



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE CEPAS DE *Escherichia*
coli Y *Salmonella* spp. EN 6 AMBIENTES
ACUÁTICOS DE LA BAHÍA DE
SECHURA, PIURA

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO
DE MAESTRO EN SANIDAD ACUÍCOLA

MVZ. INÉS GABRIELA ALEJOS TAPIA

LIMA – PERÚ

2018

Asesor de tesis

Carlos Shiva Ramayoni, MVZ, MSc, DVM

Quiero agradecer al Dr. Carlos Shiva, por su apoyo, asesoría y conocimientos brindados durante la ejecución de la tesis.

El presente estudio fue realizado gracias al financiamiento del Programa Innóvate Perú – PRODUCE N° 134-PNICP-PIAP-2015 “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”.

Agradecimiento también al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por Cienciactiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015 FONDECYT), por el apoyo financiero brindado que permitieron mis estudios de maestría.

INDICE

LISTA DE CUADROS Y TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	
a. Planteamiento del Problema	3
b. Marco Teórico	3
c. Justificación del Estudio	11
d. Objetivos	13
i. General	
ii. Específicos	
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
a. Diseño de estudio	14
b. Población	14
c. Muestra	14
d. Operacionalización de variables	15
e. Procedimientos y Técnicas	15
i. Obtención de muestras	
ii. Aislamiento de <i>E. coli</i>	
iii. Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp.	

iv.	Extracción de ADN	
v.	Caracterización molecular	
f.	Consideraciones éticas	25
g.	Plan de análisis	25
IV.	RESULTADOS	27
V.	DISCUSIÓN	35
VI.	CONCLUSIONES	45
VII.	RECOMENDACIONES	46
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
IX.	ANEXOS	54

LISTA DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro 1. Operacionalización de variables

Cuadro 2. Secuencia de primers utilizados

Tabla 1. Total de muestras de *E. coli* y *Salmonella* spp. aislados de medios de cultivo selectivos.

Tabla 2. Identificación de *E. coli* EPEC y EHEC mediante PCR multiplex, del total de muestras de *E. coli* aislados de medio de cultivo HiCrome® *E. coli*.

Tabla 3. Identificación de serogrupo O157 mediante PCR en *E. coli* aislados de medio de cultivo MacConkey Sorbitol.

Tabla 4. Identificación de *Salmonella* spp. mediante evaluación de la presencia del gen *invA* por PCR.

Tabla 5. Presencia de genes de viruencia en muestras de *E. coli*.

Tabla 6. Cantidad (n) de enteropatógenos aislados e identificados mediante PCR por meses.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Mapa de los sitios muestreados en la Bahía de Sechura (Fuente: Google Maps®)

Anexo 2. Imágenes de los sitios muestreados. (Fuente: Propia)

Anexo 3. Extracción de *Donax* spp. (Fuente: Propia)

Anexo 4. Aislamiento de *E. coli* (Fuente: Propia, Gianoli A, 2016)

Anexo 5. Aislamiento de *Salmonella* spp. (Fuente: Propia)

Anexo 6. Resultados de PCR (Fuente: Propia)

Anexo 7. Parámetros fisicoquímicos mensuales en cada uno de los puntos evaluados.

RESUMEN

La Bahía de Sechura, ubicada en Piura, Perú, alberga una gran fuente de recursos hidrobiológicos, pero se encuentra afectada por distintos factores de contaminación antropogénica. El presente estudio evaluó la presencia de *Escherichia coli* y de dos de sus patotipos más representativos, enteropatogénico (EPEC) y enterohemorrágico (EHEC), además de la presencia del serotipo O157:H7 y *Salmonella* spp. en agua de mar de dicha bahía. Se realizó un primer aislamiento mediante técnicas microbiológicas convencionales utilizando medios de cultivo específicos para cada una de las bacterias en mención. Los patotipos de *E. coli* se identificaron mediante la técnica de PCR para los genes de virulencia como el *eaeA*, para EPEC, *eaeA*, *sxt1*, *stx2* e *hlyA* para EHEC, y *rfbE* y *fliC* para los serogrupos O157 y H7 respectivamente. Asimismo para confirmar las cepas de *Salmonella* spp. aisladas, se amplificó el gen *invA*. De 102 muestras analizadas, el 86.57% de estas presentaron *E. coli* y 5.882% *Salmonella* spp. El patotipo más frecuente fue EHEC (7.96%); solo una muestra amplificó para el antígeno O157, más no se evidenció como serotipo O157:H7 (ausencia del gen *fliC*). Se concluye que la Bahía de Sechura se encuentra contaminada con *E. coli* potencialmente patógena, además de *Salmonella* spp.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Salmonella*, diarrea, contaminación, bahía.

ABSTRACT

Sechura Bay, located in Piura Peru, hosts a large source of hidrobiological resources, but is affected by different factors of anthropogenic contamination. This study assessed the presence of *Escherichia coli*, two of their more representative patotypes, enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC), besides the presence of O157:H7 serotype, and *Salmonella* spp. in marine water of this bay. A first isolation was carried out by conventional microbiological techniques using specific culture media for each of the bacteria mentioned. *E. coli* patotypes were indentified by PCR technique for virulence genes as *eaeA* for EPEC, *eaeA*, *stx1*, *stx2* and *hlyA* for EHEC, and *rfbE* and *fliC* for O157 and H7 serogroups. Likewise to confirm *Salmonella* spp. isolated strains, *invA* gene was amplified. From 102 samples analyzed, 86.57% of this were *E. coli*, and 5.88% identified as *Salmonella* spp. The most frequent patotype was EHEC (7.96%); just one sample was recognized as O157, but it wasn't evidenced as O157:H7 serotype (absences of *fliC* gene). It is concluded that Sechura Bay is contaminated with potentially pathogenic *E. coli*, in addition to *Salmonella* spp.

Keywords: *Escherichia coli*, *Salmonella*, diarrhea, contamination, bay

I. INTRODUCCIÓN

La Bahía de Sechura, ubicada en la región Piura, ubicada en Perú, es uno de los principales centros que concentra actividad pesquera y maricultura, siendo el principal productor de *Argopecten purpuratus* (concha de abanico). Sin embargo, se encuentra afectada debido a la actividad antropogénica, deficiencia en saneamiento y alcantarillado, lo cual conlleva a la contaminación con afluentes que llegan al medio marino, el cual está en estrecho contacto con los productos hidrobiológicos.

El presente estudio evaluó dos principales contaminantes bacterianos, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., enterobacterias de transmisión oro-fecal, en ambientes marinos cercanos a zonas de producción de *Argopecten purpuratus* (zonas de amortiguamiento) en la Bahía de Sechura, en Piura.

E. coli es una bacteria indicadora de contaminación fecal de alimentos, bebidas, etc, la cual es medida a través del Número Más Probable (NMP), para definir los Límites Máximos Permisibles (LMP) del agente evaluado. Sin embargo, los

LMP no consideran si se encuentran o no involucrados los patotipos de *E. coli*, los cuales tienen capacidad potencial de provocar enfermedad (dependiendo también de otros factores). Entre los patotipos más importantes, el presente estudio evaluó la presencia de *E. coli* enteropatógena (EPEC) y enterohemorrágica (EHEC), también conocida como productora de toxina Shiga (STEC), además del serotipo O157:H7, todas ellas de importancia en salud pública.

El otro agente bacteriano evaluado en el presente estudio fue *Salmonella* spp., enterobacteria patógena que no es considerada en los monitoreos de rutina de ambientes marinos, pero su hallazgo podría tener repercusiones en la clasificación de las zonas de producción y maricultura de moluscos bivalvos, por tener un efecto negativo directo en la sanidad e inocuidad.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

Planteamiento del Problema

En la Bahía de Sechura, Piura, existe la práctica de pesca y extracción de productos hidrobiológicos. Sin embargo es una zona de alta contaminación, la cual pone en riesgo a la población que consume dichos productos hidrobiológicos, así como afectaría también a la exportación de dichos productos, principalmente moluscos bivalvos. Este estudio evaluó la presencia de *E. coli* y sus patotipos EPEC y EHEC, así como *Salmonella* spp., ya que se realizan monitoreos que evalúan LMP de coliformes totales y termotolerantes, pero sin considerar específicamente a *E. coli* y sus patotipos, así como la presencia de *Salmonella* spp., la cual no es incluida dentro de los monitoreos de rutina, sin embargo es una bacteria de importancia en salud pública, debido a su patogenicidad.

Marco Teórico

En el Perú, el consumo de productos hidrobiológicos en el año 2014 fue de 15.4 kg per cápita, encontrándose en aumento respecto a años anteriores

(PRODUCE, 2016). En el año 2015, la Bahía de Sechura, incluyendo la zona de Parachique, ha desembarcado un total de 48 608 TM de productos hidrobiológicos; y la extracción de *Argopecten purpuratus* (concha de abanico) fue de 30 396 TM a nivel nacional (PRODUCE, 2016). La mayor producción de moluscos bivalvos se concentra en el norte del país, destacando la Bahía de Sechura, además de contar con bancos naturales para concha de abanico, sin embargo también existe alta actividad antropogénica, así como desechos de la producción agrícolas, de la industria pesquera y petrolera, los cuales conllevan a ser fuentes de contaminación directa de la bahía (IMARPE, 2007; ESCAES 2010). La concha de abanico y otros moluscos bivalvos, son animales que se alimentan mediante filtración, pero sin ser selectivos, por lo cual pueden albergar microorganismos resultantes de la contaminación del agua, entre ellas, la contaminación fecal (FAO, 2006; Vega, 2010).

En la actualidad, Perú cuenta con deficiencias en el sistema de saneamiento y correcta eliminación de residuos, siendo en el 2007 afectados un total de 11 978 506 habitantes, de los cuales el 47,4% pertenece a zonas urbanas, y el 52,6% a zonas rurales; esta deficiencia lleva como consecuencia que la eliminación de desechos sea directo a ríos, acequias u otros afluentes (INEI, 2007, 2010). Resultante de esta contaminación se encuentran organismos microbiológicos y compuestos orgánicos (IMARPE, 2010).

Se puede encontrar en medios acuáticos microorganismos de origen fecal provenientes en su mayoría de desechos domésticos, siendo en el grupo de las bacterias, la familia Enterobacteriaceae la más representativa (Arcos *et. al.*, 2005). Esta familia incluye a distintos géneros y especies, siendo de amplia distribución en el suelo, agua, plantas y microbiota intestinal normal de animales y el hombre; la más frecuente es *E. coli*, la cual puede comportarse como patógeno oportunista, sin embargo, otras especies son consideradas patógenos primarios y se han adaptado para colonizar al hombre, como es el caso de *Salmonella* spp. (Puerta-García y Mateos-Rodríguez, 2010; Fariñas y Martínez-Martínez, 2013)

E. coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, con mayor presencia en la microbiota intestinal, siendo en su mayoría serotipos no patógenos (Steiner *et al.*, 2006); es considerado también un microorganismo indicador de higiene en agua y alimentos (MINSA, 2008). Además, *E. coli* es utilizada para evaluar la calidad de agua en zonas de producción de moluscos bivalvos (MINAM, 2008); esto se realiza a través de la evaluación de los LMP de Coliformes Termotolerantes, con el método del NMP, estableciendo las zonas con clasificación tipo A o área aprobada a aquellas zonas de extracción que den como resultado ≤ 14 NMP/100 ml de agua, las cuales permiten el comercio directo y consumo de los moluscos bivalvos; y zonas con clasificación tipo B o áreas restringidas a aquellas que den como resultado ≤ 88 NMP/100 ml, en las

cuales los moluscos bivalvos extraídos de dichas zonas tendrán que pasar por un proceso de depuración previo al consumo o comercialización. (MINAM, 2008; SANIPES, 2016).

Sin embargo, existen distintas cepas de *E. coli* patógenas capaces de desarrollar enfermedades diarreicas (Gómez, 2014). *E. coli* enteropatógena (EPEC) causa diarreas acuosas profusas debido a lesiones a nivel de las microvelocidades intestinales, mediante el mecanismo de A/E (adherencia y borrado), en el cual se encuentra comprometida la adhesina íntima (*eae*), considerada un gen de virulencia de EPEC. Además existe adherencia local de EPEC en las microvelocidades intestinales mediadas por una fimbria BFP (bundle-forming pilus - gen *bfp*), sin embargo esta última, a diferencia de la íntima, no se encuentra en la totalidad de EPEC, clasificando a la bacteria como EPEC típica (con presencia de *bfp*) o atípica (ausencia de *bfp*), prevaleciendo las cepas atípicas sobre las típicas. Los reservorios de EPEC pueden ser animales como bovinos, porcinos y aves, e incluso niños y adultos, los cuales pueden o no presentar sintomatología (Nataro y Kaper, 1998; Vidal, 2003; Alonso *et al.* 2014; Farfán *et al.*, 2016)

El grupo etario afectado principalmente por este patotipo es el de infantes, llegando a causar entre un 25 % y 70 % de mortalidad en este grupo etario, a nivel mundial (Steiner *et al.*, 2006). En el Perú, en el año 2000, se reportó en

una población de infantes menores a 5 años que de 103 casos de diarrea persistente y 97 casos de diarrea aguda, el 6.79 % y 4.12 % respectivamente, fueron casos de EPEC, mediante el reconocimiento de los genes de virulencia *eae* y *bfp* (Arias *et al.*, 2000). En otro estudio, tanto en niños con y sin diarrea, EPEC fue uno de los serotipos más frecuente, con 8.5 % y 10.9 % respectivamente, encontrando que aumenta su frecuencia conforme aumenta la edad del infante (Ochoa *et al.*, 2011).

Mientras que *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) causa diarreas acuosas, que pueden llegar a ser sanguinolentas (colitis hemorrágica) e incluso desarrollar el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) si la infección progresa; puede afectar a diferentes estratos etarios, pero son los niños, ancianos y personas inmunodeprimidas los más afectados (The Center for Food Security & Public Health, 2009). El principal factor de virulencia está dado por las shiga toxinas (*stx*), también llamadas verotoxinas, debido a su similitud con las toxinas shiga producidas por *Shigella dysenteriae*, y son las capaces de causar diarreas sanguinolentas y colitis hemorrágica (Farfán *et al.*, 2016). Sin embargo, EHEC posee otros genes de virulencia, principalmente *eae* e *hlyA*, que codifican la adhesina intimina y enterohemolisina, respectivamente; mientras que se conoce que por la adhesina intimina, EHEC tendría el mecanismo A/E que causa daño en microvelocidades intestinales similares a EPEC. No se conoce mucho de la actividad de la enterohemolisina, pero se encuentra ampliamente distribuida

tanto en las EHEC productoras de toxina Shiga, como en el serotipo O157:H7 (Paton J y Paton A, 1998; The Center for Food Security & Public, 2009). En cuanto al Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), se ha reportado que su desarrollo se encuentra asociado a signos de diarrea sanguinolenta causadas por O157:H7, así como a la presencia de *stx2*, pudiendo ser considerada más importante para estos casos que *stx1* (Nataro y Kaper, 1998).

El serotipo más estudiado es el O157:H7, siendo el de mayor prevalencia, por lo cual es utilizado para el diagnóstico clínico de diarreas causadas por EHEC (Steiner *et al.*, 2006). Este serotipo es considerado zoonótico, debido a que animales pueden ser portadores y transmitirlo al humano, principalmente el ganado bovino, pero también ha sido aislado de otros mamíferos e incluso peces (Tuyet *et al.* 2006; Ferens y Hovde, 2011). Sin embargo, otro serotipo a considerar es O104:H4, el cual en el 2011 tuvo un brote en Europa, especialmente en Alemania, donde hubieron casos de EHEC con y sin SUH, de los cuales hubo un total de 36 fallecidos (MINSa, 2011). El primer reporte de *E. coli* EHEC O157:H7 en el Perú fue en el año 2001, a un menor de 11 meses de edad, el cual además de haber consumido leche materna, también consumió leche fresca de vaca (Huapaya *et al.*, 2001). Además, otro estudio realizado en niños con y sin diarrea demostró que hubo casos de *E. coli* productoras de Shiga toxina en individuos con diarrea (0.8%) y sin diarrea (0.5%), pero ningún caso presentó SUH (Ochoa *et al.*, 2011)

Otra bacteria de la familia Enterobacteriaceae de importancia en la salud pública es *Salmonella* spp., bacilo gram negativo, mótil que cuenta con antígenos O, H y Vi como endotoxinas, siendo los serovares más comunes *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium, serovar Enteritidis y serovar Newport (Steiner *et al.*, 2006; Cabral, 2010). La enfermedad causada por esta bacteria se denomina salmonelosis, la cual es una de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) más común y de gran distribución; su transmisión puede ser orofecal, a través de alimento o bebidas manipuladas incorrectamente, o mediante alimento o bebidas contaminados al estar expuestos ante una fuente infecciosa (OMS, 2013), además de encontrarse en el suelo y ambientes marinos (Cortés, 2003; Gorski *et al.*, 2011). En el 2016, en Perú se reportaron 56 brotes de ETAs, de los cuales *Salmonella* spp. fue identificado como agente causal en cuatro de ellos (MINSA, 2017). Un estudio etiológico de diarreas realizado en diferentes Centros de Salud del Perú evidenció que de 303 casos de diarreas causados por bacterias, el 12.9% fueron identificados por *Salmonella* spp., habiendo sido solo superado por los casos de *E. coli* enteropatogénicas y *Shigella* spp., siendo 29.4% y 37% del total de casos (N=303) respectivamente (MINSA, 2001). En vacas, se ha reportado que *Salmonella* spp. es el agente bacteriano responsable de la mayoría de casos de diarreas en animales adultos en hatos lecheros de Perú, y la segunda en cuanto a terneros, siendo *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium y

serovar Dublin las más frecuentes (Delgado *et al.*, 2017). En Estados Unidos se han reportado cuatro brotes de *Salmonella* spp, transmitidos de tortugas a humanos, quienes las tenían como mascotas, atribuyendo la fuente al contacto directo con dichos animales o el agua de su entorno (CDC, 2016).

Reportes a nivel mundial señalan que *E. coli* EPEC puede aislarse de moluscos bivalvos. (Martínez y Villalobos, 2005). Además se ha reportado que los moluscos bivalvos pueden ser parte del ciclo de contaminación de *Salmonella* spp. actuando como reservorios, lo cual ha sido demostrado a través de marcadores moleculares; incluso se ha evidenciado que después de 10 días se podía encontrar dicho agente a razón de 3.7×10^3 UFC/g de molusco bivalvo (Cabral, 2010; Morrison *et al.*, 2011). Con ello se evidencia que los moluscos bivalvos son capaces de albergar una mayor cantidad de bacterias, incluso mayor al ambiente marino que las rodea, debido a su capacidad filtradora y de concentración (Altuğ G., 2012)

Evaluaciones en la calidad de agua del Río Sechura han determinado altos niveles de *E. coli* (UFC/100ml) y coliformes fecales (NMP/100ml), con resultados máximos de 3.2×10^2 UFC/100mL y >1600 NMP/100ml, niveles que superaban los LMP, así como la presencia del virus de Hepatitis A, el cual se encuentra asociado a deficiencias sanitarias y es de transmisión fecal-oral, patógeno con riesgo potencial para la población. (Marcos *et al.*, 2014; Saire,

2014; OMS, 2017). En cuanto a monitoreos realizados a bacterias coliformes totales y termotolerantes realizados en la Bahía de Sechura en los años 2009 y 2010, estos se encontraron por encima de los niveles máximos permitidos según la normativa de Extracción de Recursos Hidrobiológicos, encontrando a través de la técnica del NMP, para coliformes totales $1.03 \times 10^2/100\text{ml}$ y $3.17 \times 10^1/100\text{ml}$, y en coliformes termotolerantes $6.11 \times 10^1/100\text{ml}$ y $3.17 \times 10^1/100\text{ml}$, para cada año, siendo mayores a los LMP para zonas de clasificación A. (IMARPE, 2010). En los años 2014 y 2015 se evidenció que la concha de abanico extraída de Chulliyachi, Puerto Rico y Parachique sobrepasaba los LMP establecidos por SANIPES (230NMP/100g), así como también la presencia de *Salmonella* spp. (ausencia en 25g.); los ambientes marinos de dichas áreas también se encontraron por encima de los LMP (<14NMP/100ml) en cuanto a coliformes fecales (Romero, 2016).

Justificación del Estudio

En Perú existe una deficiencia en la correcta eliminación de desechos, al no haber un correcto saneamiento, desencadena que muchos de estos desechos sean vertidos en fuentes de aguas, principalmente ríos. Esto trae carga orgánica como inorgánica, además de distintos microorganismos, siendo uno de ellos el grupo de bacterias potencialmente patógenas, que desembocan en el mar.

El mar peruano es fuente de una gran variedad de especies hidrobiológicas,

entre ellos los moluscos bivalvos, los cuales son filtradores; estos tendrán un contacto estrecho con los desechos que lleguen al mar, incluidas bacterias potencialmente patógenas, como *E. coli* y *Salmonella* spp., que pueden encontrarse y sobrevivir en diferentes ambientes incluido el marino, por lo cual pueden llegar a ser filtrados por los moluscos bivalvos, quedando fijadas y retenidas.

Estos moluscos bivalvos llegan a la cadena alimentaria sin cocción o una cocción muy baja, la cual no elimina la carga bacteriana que podría estar presente, considerándose un riesgo para el consumo humano.

Por este motivo es importante caracterizar molecularmente las cepas de *E. coli* de ambientes marinos cercanos a zonas de extracción de moluscos bivalvos, para conocer el status de los patotipos diarrogénicos así como otros enteropatógenos como *Salmonella* spp., que podrían estar presentes en dichos ambientes marinos, ya que como se sabe, tendrían repercusiones en la salud pública.

Objetivos

Objetivo general

- Aislar y caracterizar molecularmente cepas de *Escherichia coli* patógenas y *Salmonella* spp. presentes en seis puntos de actividad antropogénica de la bahía de Sechura, Piura.

Objetivos específicos

- Aislar cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. a partir de muestras de agua de mar recolectadas en la Bahía de Sechura.
- Determinar la presencia de *E. coli* EPEC y EHEC mediante la identificación de genes de virulencia por PCR.
- Identificar mediante PCR la presencia del serotipo O157:H7 de *E. coli*.
- Confirmar mediante PCR la presencia de *Salmonella* spp. en los aislados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El presente estudio fue observacional descriptivo de tipo longitudinal

Población

Seis puntos de la Bahía de Sechura, ubicada en el departamento de Piura, en el norte del Perú; con actividad antropogénica, los cuales se ubicaron en los siguientes puntos (Anexo 1):

- 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)

Muestra

Se tomaron muestras de agua en cada uno de los puntos señalados

anteriormente, a razón de 1 L por muestra. El total de muestras obtenidas fue durante el periodo marzo – diciembre de 2016, como parte del Proyecto N° 134-PNICP-PIAP-2015 financiado por Innóvate Perú (ex FINCyT) - PRODUCE.

Las muestras fueron tomadas cada quince días, siguiendo lo establecido por el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES) en el “Procedimiento: Control Oficial de Zonas y Áreas de Producción Clasificadas de Moluscos Bivalvos Vivos” (P06-SANIPES)

Operacionalización de variables

Las variables a evaluar son *E. coli* EPEC, *E. coli* EHEC y *Salmonella* spp., siendo estas tres variables cualitativas dependientes, ya que se evalúa la presencia o ausencia de dichos enteropatógenos en los puntos muestreados y en los meses de monitoreo, siendo estos dos últimos, las variables independientes. Sin embargo, es un estudio cuantitativo, ya que se busca conocer, del total de muestras, cuántas de estas resultan positivas a cada una de las variables (Cuadro 1).

Procedimientos y técnicas

El procesamiento de las muestras se realizó en los laboratorios de Nutrición e Inocuidad Alimentaria y Biología Molecular de la Facultad de Medicina

Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Obtención de muestras

Las muestras de agua fueron recolectadas cada quince días, siguiendo el Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales (RJ N° 010-2016-ANA) y el Instructivo: Toma, Conservación y Transporte de Muestras para Ensayos Físicoquímicos y Microbiológicos (I01-SANIPES), entre marzo y diciembre de 2016, obteniendo dos muestreos por mes; además se midieron los parámetros físicoquímicos como temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH (Anexo 7). Se recolectó 1L. de agua de cada uno de los puntos con actividad antropogénica señalados, en botellas de plástico previamente esterilizadas por autoclave a vapor (121°C por 15 minutos) y rotuladas. Se utilizó guantes, mascarilla y gorro descartables, así como también botas de jebe como medida de bioseguridad. El exterior de la botella se desinfectó con alcohol de 70°, se sumergió y se abrió dentro del ambiente acuático; una vez llenada, se cerró dentro del ambiente acuático para evitar contaminación cruzada. Las botellas se sellaron con bolsas y cintillos plásticos individuales, y se colocaron en cajas térmicas, manteniéndolas entre 4 y 10 °C, para el transporte hasta el procesamiento en el laboratorio.

Cincuenta y seis ml. de la muestra era utilizado para la prueba de NMP para determinar los Coliformes Totales y Termotolerantes (Anexo 4, fig. 1), y 500 ml. eran filtrados utilizando Filtros de Membrana para el aislamiento de *Salmonella* spp. (Anexo 5, fig. 1) siguiendo el protocolo establecido por

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de la American Public Health Association (1999).

Aislamiento de E. coli

Las muestras utilizadas para evaluar la presencia y caracterización molecular de los patotipos de *E. coli* fueron obtenidas a través del trabajo de tesis “Estudio microbiológico y físico de la calidad del agua en seis puntos de la Bahía de Sechura – Piura” realizado por Gianoli (2018) donde realizó el método de NMP para determinar coliformes totales y termotolerantes. Una vez realizado el método de NMP para coliformes termotolerantes, se seleccionaron cinco tubos positivos en caldo EC (Central Drug House (CDH) Laboratories, India) por cada muestra al azar para el aislamiento de *E. coli*; se tomó una alícuota con un asa de siembra en horquilla y sembró por agotamiento, por cada tubo positivo, en medio de cultivo selectivo HiCrome® *E. coli* Agar (HiMedia Laboratories, India), incubándose a 37°C por 24 horas (Anexo 4, fig. 2). De dos a tres colonias de placas positivas (coloración turquesa) a HiCrome® *E. coli* Agar (HiMedia Laboratories, India) fueron resembradas en dicho medio e incubadas a 37°C por 24 horas, siendo las colonias puras posteriormente conservadas a -85°C en crioviales con 800 µl de Caldo Cerebro Corazón (BHI) (Laboratorios Conda, España) y 200 µl de glicerol.

Además, las colonias positivas a *E. coli* obtenidas en medio de cultivo HiCrome® *E. coli* Agar (HiMedia Laboratories, India) fueron resembradas en medio de cultivo MacConkey Sorbitol (SMAC) (CDH Laboratories, India), el cual permite diferenciar mediante la no fermentación de sorbitol, *E. coli* serotipo O157:H7, presentando dichas colonias un crecimiento sin coloración (colonias transparentes. Anexo 4, fig. 2). Las colonias positivas en estas resiembras fueron almacenadas también a -85°C en crioviales con 800 µl de Caldo Cerebro Corazón (BHI) (Laboratorios Conda, España) y 200 µl de glicerol.

Aislamiento de Salmonella spp.

Para el aislamiento de *Salmonella* spp, se siguió el protocolo del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater de American Public Health Association (APHA, 1999).

Se utilizaron Filtros de Membrana (FM) de 0.45 µm y 47 mm de diámetro (Merck, Alemania); se filtró 500 ml de cada una de las muestras de agua a través de los FM, utilizando un sistema de bomba de vacío (Manifold BioVc 300, Rocker, Taiwan). Se recuperaron lo FM y fueron colocados en frascos con 100 ml de agua peptonada (AP) (HiMedia Laboratories, India), incubándose posteriormente a 37°C por 24 horas. Luego, se llevó una parte del AP incubada con el FM a medios de enriquecimiento selectivo, Caldo Tetrionato (10 ml +

10 ml de AP) (CDH Laboratories, India) y Caldo Selenito Cistina (10 ml + 200 µl de AP) (Laboratorios Conda, España), siendo incubados por 48 horas a 37°C (Anexo 5, fig. 2 y 3).

Posterior a esto se sembraron en dos medios de cultivo selectivo, Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) (CDH Laboratories, India) y Verde Brillante (VB) (Laboratorios Conda, España), siendo incubados a 37°C por 24 horas. De dos a tres colonias obtenidas de los medios de cultivo con morfología compatible a *Salmonella* spp. fueron resembradas en medio de cultivo XLD (CDH Laboratories, India), y confirmadas por pruebas bioquímicas utilizando el kit de galerías y software API® 20E (BioMérieux, Francia) (Anexo 5, fig. 4 y 5). Las colonias compatibles con *Salmonella* spp. se almacenaron a -85°C en crioviales con 800 µl de BHI (Laboratorios Conda, España) y 200 µl de glicerol.

Extracción de ADN

Una vez obtenidas todas las colonias aisladas de *E. coli* y *Salmonella* spp. de todas las muestras recolectadas se realizó la extracción de ADN y posterior caracterización molecular, utilizando la técnica de PCR convencional.

La extracción de ADN fue realizada mediante choque térmico, siguiendo el protocolo descrito por Santos *et al.* (2001). Previo a esto, se recuperaron las colonias de *E. coli* previamente criopreservadas a -85°C, siendo resembradas en

medio de cultivo MacConkey (Laboratoris Conda, España), incubándose a 37 °C por 24 horas, y luego resembrando en medio de cultivo Triptona Soya Agar (Oxoid, Inglaterra), incubándose también a 37 °C por 24 horas.

Una vez obtenidas colonias puras se realizó la extracción de ADN. Para ello se tomaron con asas de siembra descartables, entre 2 a 3 colonias de cada placa, para ser inoculadas en microtubos de 1.5 ml que contenían 1 ml de Tampón Fosfato Salino (PBS por sus siglas en inglés). Seguidamente se agitaron en vórtex por 10 a 20 segundos (o hasta que la colonia se disolviera) y se centrifugó a 14000 rpm por 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió dos veces más, agregando 1 ml de PBS cada vez. Una vez eliminado el sobrenadante en la última repetición, el pellet obtenido fue suspendido en 100 µl de PBS y se colocó en un agitador vórtex por 10 a 20 segundos. Las muestras fueron colocadas en baño maría a 95 °C por 10 minutos. Después, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos, rescatando el sobrenadante que contenía el ADN en un microtubo de 1.5 ml estéril. Una vez obtenido el ADN se homogenizó colocando el microtubo en agitador vórtex, y se realizó una dilución 1:10 a proporción de 5 µl de ADN con 45 µl de PBS, en un microtubo de 1.5 ml nuevo. Las muestras se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Para el caso de las colonias presuntivas de *Salmonella* spp., se realizó una resiembra de las colonias criopreservadas a -85°C en medio de cultivo XLD; de este medio se tomaron las colonias para realizar la extracción de ADN, siguiendo el mismo protocolo descrito para *E. coli*, pero sin diluirse el ADN obtenido. Una vez obtenido el ADN, este fue almacenado de igual forma en microtubos de 1.5 ml estériles a -20°C.

Cabe resaltar que se cuantificó el ADN extraído mediante Espectrofotómetro (A260/A280) Nanodrop Lite (Thermo Scientific, USA).

Caracterización molecular

Para las muestras de *E. coli*, se evaluó la presencia de los patotipos EPEC y EHEC, así como el serotipo O157:H7, siguiendo el protocolo de Paton A. y Paton J. (1998) en el cual se amplificó el gen *eae* para EPEC, *stx1*, *stx2*, *eae* e *hlyA* para EHEC, y *rfbE* para O157.

Para ello se siguieron dos protocolos, el primero consistió en un protocolo de PCR Multiplex que incluía primers específicos para los genes *eae*, *stx1*, *stx2*, e *hlyA*, y el segundo en un protocolo de PCR convencional para el gen *rfbE*. Todos los primers fueron adquiridos de Integrated DNA Technologies, Inc. (Illinois, EE.UU.) (Cuadro 1). Se utilizaron además como controles positivos cepas de la colección del laboratorio de Nutrición e Inocuidad de Alimentos de

la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

En ambos protocolos, se amplificaron 2 μ l de ADN en una reacción con un volumen final de 25 μ l, el cual contenía las concentraciones de 1X de Buffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.5 μ l) (AnalytikJena, Alemania), 2mM de MgCl_2 (2 μ l) (AnalytikJena, Alemania), 0.2 μ M de cada primer (0.1 μ l), 0.2 μ M dNTP Mix (0.5 μ l) (Qiagen, Maryland) y 1U de innuTaq ADN Polimerasa (0.2 μ l) (AnalytikJena, Alemania), completando el volumen con agua molecular (17 μ l en el caso de PCR multiplex y 17.6 μ l en el PCR del gen *rfbE*). La programación en el termociclador (PTC 100TM, Bio-Rad Laboratories Inc., California) fue con las siguientes condiciones: temperatura inicial a 95 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos que consistían en desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, anillamiento a 65°C por 2 minutos en los primeros 10 ciclos, reduciendo hacia 60°C por 2 minutos para el ciclo 15, y extensión a 72°C por 1.5 minutos, aumentando este tiempo a 2.5 minutos a partir del ciclo 25 en adelante, terminando con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Una vez obtenidos los productos post-PCR amplificados, estos fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, en un buffer TAE 1X. Seis μ l de cada producto fue mezclado con 2 μ l del buffer de carga 6X loading dye (Sigma-Aldrich, Missouri, EE.UU.) y colocado en

cada uno de los pocillos del gel. Se utilizó un marcador comercial de tamaño molecular de 100 pares de bases (Ladder 100 bp ready-to-use, Thermo Fisher Scientific, California, EE.UU.). El gel de agarosa con los productos fue sometido a 70 V, 170mA por 60 minutos (Anexo 6, fig. 1 y 2).

Se realizó un tercer protocolo de PCR convencional a aquellas muestras que resultaron positivas al gen *rfbE* específico para el antígeno O157, que permitió detectar posteriormente la presencia del gen *fliC*, que identifica al antígeno H7 (serotipo O157:H7). Para ello se utilizaron primers específicos con las secuencias de nucleótidos detalladas en el Cuadro 1 (Integrated DNA Technologies Inc., Illinois), y se utilizó un control positivo obtenido de la misma colección que para los casos anteriores.

Se siguió el protocolo de Fratamico *et al.* (2000), el cual utilizó 2.5µl de muestra de ADN en un volumen final de 25 µl que contenía una concentración de 1X de Buffer KCl (2.5 µl) (AnalytikJena, Alemania), de 3mM de MgCl₂ (3 µl) (AnalytikJena, Alemania), de 0.5 µM de cada primer (0.25 µl) (Integrated DNA Technologies Inc; Illinois), de 0.4mM de dNTP Mix (1 µl) (Qiagen; Maryland) y de 2.5U de innuTaq DNA Polimerasa (0.5 µl) (AnalytikJena, Alemania), completando el volumen con 12.5 µl de agua molecular. Las condiciones para la amplificación en el termociclador fueron de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 57°C por 1 minuto y

72°C por 1 minuto, finalizando con una extensión a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron como se describió anteriormente.

Para el caso de la confirmación de las muestras de *Salmonella* spp. se realizó la técnica de PCR, siguiendo el protocolo descrito por Sunar *et al.* (2010), en el cual se identificó el gen *invA*, mediante primers específicos, detallados en el Cuadro 1 (Invitrogen™, California). El control positivo utilizado en este caso fue *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

La reacción de PCR consistió en la ampliación de 2.5 µl de muestra en un volumen final de 50 µl, con 1X de Buffer con MgCl₂ (5 µl) (Qiagen, Maryland), 0.3 µM de cada uno de los primers (1.2 µl), 0.2 mM de dNTP Mix (1 µl) (Qiagen, Maryland) y 5U de inuTaq (1 µl) (AnalytikJena, Alemania), completando con agua molecular para llegar al volumen final. Esto fue sometido en el termociclador (PTC 100™, Bio-Rad Laboratories Inc., California) a temperatura inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, finalizando con un temperatura de extensión final de 72°C por 7 minutos.

Los productos de ADN amplificados se analizaron como se ha descrito anteriormente para los patotipos de *E. coli* (Anexo 6, fig. 3).

Para la visualización de los productos de PCR después de la electroforesis, se utilizó un transiluminador de luz UV (UVP BioDOC-It™ System, California) para la lectura de los resultados según su peso molecular.

Una muestra positiva para *E. coli* EPEC tenía presente el gen *eaeA*, para el caso de una muestra positiva de *E. coli* EHEC se debía presentar dos a más genes estando siempre el gen *eaeA* con *stx1*, *stx2* y/o *hlyA*, y para el antígeno O157, la presencia del gen *rfbE* (Paton y Paton, 1998). Para el antígeno H7 se debía identificar el gen *fliC* (Fratamico et al., 2000). En el caso de *Salmonella* spp., una muestra era confirmada con la presencia del gen *invA* (Sunar et al., 2010). Los tamaños de pares de bases (pb) se detallan en el cuadro 2.

Consideraciones éticas

El estudio fue presentado ante el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para su evaluación, el cual aprobó la investigación sin restricciones u observaciones.

Plan de análisis

El análisis de datos se realizó utilizando Tablas de frecuencias, para la presentación de cada uno de los patotipos de *E. coli* (EPEC y EHEC) y *Salmonella* spp.

Cuadro 1. Operacionalización de variables.

	Identificación de la variable	Clasificación	Escala de medición	¿Cómo se medirá?	Tipo de variable
Variable 1	Lugar de evaluación	Cualitativa	Nominal	Determinando los seis lugares de evaluación seleccionados	Independiente
Variable 2	Mes de muestreo	Cualitativa	Nominal	Con la fecha del muestreo realizado	Independiente
Variable 3	<i>E. coli</i> EPEC	Cualitativa	Nominal	Mediante la presencia o ausencia del gen que la identifica.	Dependiente
Variable 4	<i>E. coli</i> EHEC	Cualitativa	Nominal	Mediante la presencia o ausencia de los genes que la identifican.	Dependiente
Variable 5	<i>Salmonella</i> spp.	Cualitativa	Nominal	Mediante la presencia o ausencia del gen que la identifica.	Dependiente

Cuadro 2. Secuencia de primers utilizados

Enteropatógeno	Gen	Secuencia (5' – 3')	Tamaño (pb)
<i>E. coli</i> EPEC y EHEC	<i>eaeA</i>	F: GACCCGGCACAAGCATAAGC R: CCACCTGCAGCAACAAGAGG	384
<i>E. coli</i> EHEC	<i>stx1</i>	F: ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC R: AGAACGCCCACTGAGATCATC	180
	<i>stx2</i>	F: GGC ACTGTCTGAAACTGCTCC R: TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	255
	<i>hlyA</i>	F: GCATCATCAAGCGTACGTTCC R: AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	534
<i>E. coli</i> serogrupo O157	<i>rfbE</i>	F: CGGACATCCATGTGATATGG R: TTGCCTATGTACAGCTAATCC	259
<i>E. coli</i> serogrupo H7	<i>fliC</i>	F: GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC R: CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	625
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	F: TATCGCCACGTTCCGGCAA R: TCGCACCGTCAAAGGAACC	285

eaeA: gen de intimina, *stx1*, *stx2*: genes de toxina Shiga, *hlyA*: gen de enterohemolisina, *rfbE*: gen transportador de antígeno O, *fliC*: gen de flagelina, *invA*: gen de invasividad. F: forward, R: reverse.

IV. RESULTADOS

Durante los meses de marzo a diciembre del 2016 se realizaron 17 muestreos por cada una de las áreas seleccionadas (Chulliyachi, San Pedro, Las Delicias, Puerto Rico, Parachique y Dren de Sechura). Se obtuvieron un total de 102 muestras de agua donde se analizó la presencia de *E. coli* y *Salmonella* spp.

Detección de *E. coli*

Se obtuvo un total de 234 muestras positivas al medio selectivo HiCrome® *E. coli*, de los tubos con Caldo EC analizados. Las muestras que pertenecían a un mismo muestreo (mismo origen de la muestra y fecha de muestreo) fueron agrupadas en conglomerados, resultando 88 positivas (86.27%) a *E. coli* de 102 muestras de agua analizadas. De estas 88 muestras, se obtuvieron 12 de ellas de Las Delicias, 15 muestras de San Pedro, 16 de Chulliyachi, 14 de Parachique, 16 de Puerto Rico y 15 muestras de *E. coli* del Dren de Sechura (Tabla 1).

De las muestras de *E. coli* que fueron resembradas en medio de cultivo MacConkey Sorbitol, se obtuvieron un total de 282 colonias que no

fermentaron sorbitol (presuntivo serotipo O157:H7). Al realizar los conglomerados para el análisis mediante la técnica de PCR para la confirmación, se obtuvo un total de 70 muestras (68.63%) de 102 muestras de agua analizadas. Del total de estas muestras, 8 provenían de Las Delicias, 11 muestras de San Pedro, 14 de Chulliyachi, 10 de Parachique, 14 de Puerto Rico y 13 muestras del Dren de Sechura (Tabla 1). No se encontró tendencia en alguna época del año para los aislados obtenidos (Tabla 6).

Se analizaron 88 muestras de *E. coli* aisladas en el medio de cultivo HiCrome® *E. coli* para el protocolo de PCR multiplex, que evaluó los patotipos EPEC y EHEC, mediante la presencia del gen *eaeA* para el primer caso, y para los genes *eaeA*, *stx1*, *stx2* e *hlyA* para la identificación del segundo patotipo. Cuatro muestras (4.55%), provenientes de Puerto Rico, Parachique, Dren de Sechura y Chulliyachi, fueron positivas para el patotipo EPEC (positivo para el gen *eaeA*); dichas muestras fueron tomadas en los meses de abril, mayo, setiembre y noviembre, respectivamente (Tabla 2).

Siete (7.95%) de las 88 muestras analizadas en el protocolo de PCR multiplex, fueron positivas para el patotipo EHEC, provenientes tres de ellas de Chulliyachi, dos de San Pedro y dos del Dren de Sechura. Las muestras fueron obtenidas en meses variados (abril, junio, julio y diciembre). Tres de estas muestras presentaron los cuatro genes de virulencia evaluados, una de cada uno

de los tres sitios anteriormente mencionados (Tabla 2).

También se evaluaron 70 muestras aisladas de medio de cultivo MacConkey-Sorbitol para detectar la presencia del gen *rfbE* (serogrupo O157) de las cuales solo una de ellas (1.43%) resultó positiva, proveniente de Chulliyachi. Cabe resaltar que dicha muestra además fue la misma que presentó los otros cuatro genes de virulencia en el protocolo de PCR multiplex, la cual fue aislada en el mes de julio. Las otras dos muestras que presentaron los cuatro genes de virulencia no evidenciaron la presencia del gen *rfbE*. No se encontraron cepas positivas para el gen *fliC* (serogrupo H7) (Tabla 3).

Además de los patotipos EPEC y EHEC de *E. coli*, se identificaron cuatro cepas que poseían genes de virulencia (*stx1*, *stx2* e *hlyA*), pero al no poseer el gen *eaeA*, no pudieron ser identificados como ninguno de los patotipos en estudio. Tres de ellas provenían del Dren de Sechura y una de ellas aislada de Chulliyachi (Tabla 5).

Detección de *Salmonella* spp.

Se evaluaron un total de 102 muestreos, de los cuales se obtuvo seis conglomerados (5.88%) de muestras compatibles con *Salmonella* spp. en medio de cultivo XLD, compuesto cada conglomerado de tres repeticiones. No se obtuvieron colonias compatibles con *Salmonella* spp. en medio de cultivo

Verde Brillante. Se evaluaron los seis conglomerados de muestras con el kit de galerías API® 20E, donde tres de ellos fueron confirmados como *Salmonella* spp., mientras que los tres restantes como presuntivos (se encontró como diferencial a *Proteus* spp, mediante API® 20E). Las seis muestras fueron analizadas por la técnica de PCR convencional, donde los tres (2.94%) conglomerados confirmados evidenciaron la presencia del gen *invA* para *Salmonella* spp., mientras que los tres restantes resultaron negativos para dicho gen. Las tres muestras positivas a *Salmonella* spp. fueron aisladas de Chulliyachi, Puerto Rico y Parachique, en los meses de setiembre (Chulliyachi) y octubre (Puerto Rico y Parachique) (Tabla 4).

Frecuencia de *E. coli* y *Salmonella* spp. por sitio evaluado

Chulliyachi (N=16) fue el sitio que presentó mayor frecuencia de los patotipos EPEC (6.25%) y EHEC (18.8%) de *E. coli*, así como *Salmonella* spp. en una de sus muestras (5.88%, N=17). Cercana a esta zona se evidenció la extracción de *Donax* spp. (Anexo 3, figuras 1 y 2).

Ninguna muestra proveniente de Las Delicias presentó algún patotipo de *E. coli* ni la presencia de *Salmonella* spp.

El patotipo de *E. coli* que se presentó con mayor frecuencia fue el EHEC, siendo de estas las más frecuentes con cuatro (*eaeA*, *hlyA*, *stx1*, *stx2*) y tres (*eaeA*, *hlyA*, *stx1*) genes de virulencia.

No se observó alguna tendencia en la presencia de los enteropatógenos identificados por PCR según el mes evaluado, excepto para *Salmonella* spp. que fue entre los meses de setiembre y octubre. (Tabla 6).

Tabla 1. Total de muestras de *E. coli* y *Salmonella* spp. aislados de medios de cultivo selectivos.

Lugar	Muestras de agua analizadas	<i>E. coli</i>				<i>Salmonella</i> spp.	
		HiCrome® <i>E. coli</i>	SMAC	XLD			
		n	%	n*	%	n	%
Dren de Sechura	17	15	88.24	13	76.47	1	5.88
Chulliyachi	17	16	94.12	14	82.35	2	11.76
Las Delicias	17	12	70.59	8	47.06	0	0
Puerto Rico	17	16	94.12	14	82.35	1	5.88
San Pedro	17	15	88.24	11	64.71	1	5.88
Parachique	17	14	82.35	10	58.82	1	5.88
TOTAL	102	88	86.27	70	68.63	6	5.88

Por sitio evaluado y total de muestras analizadas (N=102).

SMAC: Agar MacConkey Sorbitol

n: número de muestras positivas.

*: muestras no fermentadoras en MacConkey Sorbitol, presuntivas a O157:H7

XLD: Xilosa Lisina Desoxicolato (medio de cultivo).

Tabla 2. Identificación de *E. coli* EPEC y EHEC mediante PCR multiplex, del total de muestras de *E. coli* aislados de medio de cultivo HiCrome® *E. coli*.

Lugar	Aislados en HiCrome® <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> EPEC		<i>E. coli</i> EHEC	
		n	%	n	%
Dren de Sechura	15	1	6.67	2	13.33
Chulliyachi	16	1	6.25	3	18.75
Las Delicias	12	0	0	0	0
Puerto Rico	16	1	6.25	0	0
San Pedro	15	0	0	2	13.33
Parachique	14	1	7.14	0	0
TOTAL	88	4	4.55	7	7.96

Por sitio evaluado y total de muestras analizadas (N=88).

EPEC: enteropatogénico, EHEC: enterohemorrágico.

n: número de muestras positivas.

Tabla 3. Identificación de serogrupo O157 mediante PCR en *E. coli* aislados de medio de cultivo MacConkey Sorbitol.

Lugar	Aislados en SMAC*	Serogrupo O157	
		N	%
Dren de Sechura	13	0	0
Chulliyachi	14	1	7.14
Las Delicias	8	0	0
Puerto Rico	14	0	0
San Pedro	11	0	0
Parachique	10	0	0
TOTAL	70	1	1.43

Por sitio evaluado y total de muestras analizadas (N=70).

SMAC: Agar MacConkey Sorbitol

*: muestras no fermentadoras en MacConkey Sorbitol, presuntivas a O157:H7

n: número de muestras positivas.

Tabla 4. Identificación de *Salmonella* spp. mediante evaluación de la presencia del gen *invA* por PCR.

Lugar	Muestras de agua analizadas	<i>Salmonella</i> spp.	
		N	%
Dren de Sechura	17	0	0
Chulliyachi	17	1	5.88
Las Delicias	17	0	0
Puerto Rico	17	1	5.88
San Pedro	17	0	0
Parachique	17	1	5.88
TOTAL	102	3	2.94

Del total de muestras analizadas (N=102)

n: número de muestras positivas.

Tabla 5. Presencia de genes de virulencia en muestras de *E. coli*

Nro. Muestras	Genes de virulencia				Clasificación
	<i>eaeA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>hlyA</i>	
4	+	-	-	-	EPEC
3	+	+	+	+	EHEC
1	+	-	-	+	EHEC
2	+	+	-	+	EHEC
1	-	+	-	+	NC
1	-	+	+	-	NC
2	-	-	-	+	NC

EPEC: enteropatógeno, EHEC: enterohemorrágico. NC: no clasificado.
eaeA: gen de intimina, *stx1*, *stx2*: genes de toxina Shiga, *hlyA*: gen de enterohemolisina

Tabla 6. Cantidad (n) de enteropatógenos aislados e identificados mediante PCR por meses.

Mes	<i>E. coli</i>				<i>Salmonella</i>		
	HiCrome® <i>E. coli</i> *	PCR		SMAC*	PCR O157	XLD*	PCR <i>Gen invA</i>
Marzo	1	0	0	1	0	0	0
Abril	7	1	1	7	0	0	0
Mayo	7	1	0	6	0	0	0
Junio	5	0	1	2	1	0	0
Julio	12	0	2	9	0	0	0
Agosto	12	0	0	11	0	0	0
Setiembre	12	1	0	10	0	1	1
Octubre	12	0	0	8	0	2	2
Noviembre	11	1	0	11	0	0	0
Diciembre	9	0	3	5	0	3	0
TOTAL	88	4	7	70	1	6	3

n: número de muestras positivas.

*: aislamiento en medios de cultivo selectivos.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa. EPEC: enteropatógeno. EHEC: enterohemorrágico.

SMAC: agar MacConkey Sorbitol. XLD: agar Xilosa Lisina Desoxicolato.

O157: serogrupo O157 de *E. coli*.

VI. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian la presencia de enterobacterias con potencial patógeno, lo cual podría tener repercusiones en la salud pública, tanto directamente en las personas cercanas a estas áreas, como en los productos hidrobiológicos obtenidos.

Uno de los factores evidenciados en este estudio fue que del total de muestras analizadas de los ambientes marinos, 86.27 % del total de coliformes termotolerantes fueron identificados como *E. coli*, lo cual indica una alta contaminación fecal de los ambientes evaluados. Esto coincide con los reportes de Miotto (2009) y Hamilton *et al.* (2010) los cuales al evaluar agua de mar, encontraron *E. coli* en el 61.1% (N=90) y 99.8% de las muestras (N=24 493 cepas), en Santa Catarina, Brasil y California respectivamente, además de coincidir con la teoría de que el mayor porcentaje de estos coliformes corresponden a *E. coli*.

Se estaría sospechando entonces que la contaminación hallada en las zonas

evaluadas estaría reflejando un deficiente sistema de saneamiento en las poblaciones aledañas, así como en los sitios de desembarque de los productos hidrobiológicos, los cuales estarían llegando a fuentes de agua.

En cuanto a los patotipos evaluados en el presente estudio, estos se encontraron en bajos porcentajes, siendo de 4.5% para EPEC y 7.9 % para EHEC, predominando este último, a diferencia de otros estudios similares realizados también en ambientes marinos.

Hamilton *et al.* (2010) reportaron que de 24 493 cepas de *E. coli* aisladas de ambientes marinos en Bahía de Avalon, California, solo el 3.6% de ellas fueron reconocidas como EPEC (*eaeA* positivo) y ninguna de las cepas presentaron los genes *stx1* y *stx2*, con lo cual no se evidenció la presencia de EHEC. La diferencia en la presencia de EHEC, que no demostraron Hamilton *et al.* podría deberse a que el sitio evaluado fue descrito exclusivamente como balneario de recreación, mientras que en la Bahía de Sechura, los puntos eran tantos de recreación, como actividades productivas (pesca y extracción), además de que fuentes de agua que desembocaban en los puntos podrían encontrarse cercanos a centros ganaderos, los cuales se encuentran estrechamente asociados a la presencia de dicho patotipo. Por otro lado, la presencia de *E. coli* EPEC en ambos estudios se explica debido a que el humano puede ser portador de dicho patotipo.

Harakeh, Yassine y El-Fadel (2005) encontraron genes de virulencia relacionados al patotipo EHEC, en el 20% (n=15) de las muestras de mar evaluadas. Estas muestras poseían los genes *stx1* y *stx2*, con lo cual pudieron ser identificados como STEC (*E. coli* productora de toxina Shiga); de estas tres, solo dos poseía también el gen *hlyA*. En las muestras obtenidas de la Bahía de Sechura en el presente estudio, 2.94% (N=102) de las muestras de agua también poseían ambos genes (*stx1* y *stx2*), que además presentaron el gen *hlyA*, pero este estudio también consideró el gen *eaeA*, lo cual es un aporte mayor porque su presencia confirma el patotipo EHEC (Sharma y Dean-Nystrom, 2003). Identificar el gen *eaeA* junto con las shigatoxinas pueden clasificarlo como verdadero patotipo EHEC, a diferencia de Harakeh y colaboradores, que solo llega a la identificación de STEC, que se encuentra dentro del patotipo EHEC; inclusive, al conocer la presencia de diferentes genes, habría mayor potencial de patogenicidad mediante diferentes mecanismos.

En este estudio, las cepas que carecían del gen *eaeA* pero presentaban alguno de los otros genes (*stx1*, *stx2*, *hlyA*) no se clasificaron en ningún patotipo de *E. coli*, lo cual también encontraron Paton y Paton (1998), atribuyéndose a una posible transferencia de estos genes entre las cepas (Betancor *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006).

Balière *et al.* (2015) también evaluaron muestras de agua de mar en la costa de Francia, encontrando proporciones más altas para los patotipos de *E. coli*, siendo 33.3% para EPEC, y 8.3% para EHEC, pero con muestreos menores (N=12). A pesar de que los muestreos realizados por Balière *et al.* también consideraba zonas cercanas a centros de producción de ganado bovino, ovino, suino y de pollos, que podría presumir que EHEC se encontraría con mayor frecuencia, esto no fue reflejado a diferencia del presente estudio, lo cual podría deberse a un mejor sistema de eliminación de desechos en las zonas evaluadas por ellos.

No se ha encontrado muchos estudios similares que evalúen la presencia del serotipo O157:H7 de *E. coli* en ambientes marinos. Ristori *et al.* (2007) evaluaron muestras de mar en la costa brasileña para evidenciar la presencia del serotipo O157:H7, sin detectarla en ninguna de las muestras, a diferencia del presente estudio que encontró una muestra perteneciente al serogrupo O157 (1.5%, N=70), mas no se llegó a la identificación del serotipo en estudio. Wang y Doyle (1997) han evaluado la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en ambientes marinos, llegando a la conclusión de que dicho serotipo puede permanecer viable, más no cultivable, lo cual podría explicar su baja o nula presencia al querer ser identificada en distintos estudios. Sin embargo, Willians *et al.* (2007) al evaluar *in vitro* la actividad de patogenicidad del serotipo O157:H7 en un ambiente marino simulado, encontraron que a pesar que la actividad patogénica

puede disminuir al entrar en contacto con dicho ambiente, esta bacteria puede sobrevivir, estando viable hasta 5 días, incluso aumentando la patogenicidad si encuentra nutrientes en el ambiente. Esto es importante debido a que a pesar que la recuperación de este serotipo mediante cultivo sea difícil, no quiere decir que esté ausente y que ante cualquier evento de desequilibrio ambiental podría favorecer su capacidad patogénica.

Además de evaluar la presencia de *E. coli*, se pudo identificar la presencia de *Salmonella* spp. en los ambientes acuáticos, pero siendo esta en una menor frecuencia (5.9% del total de muestras).

La presencia de *Salmonella* spp. suele ser baja en ambientes marinos. Setti *et al.* (2009), Rubini *et al.* (2017), Polo *et al.* (1998) y en el presente estudio se ha reportado su presencia en 4.1% (N=243), 2.8% (N=237), 5.9% (N=213) y 2.94% (N=102), del total de muestras evaluadas en cada una de las investigaciones, respectivamente. Estos resultados sin embargo son de considerar ya que corresponden a países como Marruecos, España e Italia, que al compararlos con el presente estudio en la Bahía de Sechura, no guardan características similares, principalmente en cuanto a temperatura del agua de mar, y actividades en zonas aledañas a las evaluadas, que podrían generar fuentes de contaminación distintas.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio en la Bahía de Sechura, con evaluaciones realizadas en países sudamericanos como Venezuela y Brasil, estos difieren debido a que en estos países las frecuencias de *Salmonella* spp. aisladas, han sido mayores. González *et al.* (2009), evaluaron muestras de mar cercanas a bancos naturales de *C. rhizophorae*, en Laguna Grande del Obispo, ubicada en la zona central de la costa sur de la Península de Araya, Sucre, Venezuela, reportando una frecuencia de 19.44% (N=36). Ristori *et al.* (2007) evaluaron muestras obtenidas en la costa sur de San Pablo, Brasil, señalando una frecuencia de 30% de *Salmonella* spp. (N=10) en las muestras analizadas. Además, otros estudios realizados en países cercanos a los que presentan mayor cercanía con España, Italia y Marruecos, también presentan diferencias en la frecuencia; Altuğ (2012) evaluó la presencia de *Salmonella* spp. en 495 muestras de agua tomada en Turquía, encontrando un 13% similar a Catalao *et al.* que evidenciaron *Salmonella* spp. en 18.28% (N=93) de las muestras de agua de mar en Portugal.

La variabilidad de la presencia de *Salmonella* spp. dependería principalmente del grado de contaminación del mar, ya que algunos estudios coinciden que su presencia se encontraría asociada a una alta concentración de coliformes, principalmente fecales (Efstratiou *et al.*, 1997; Polo *et al.*, 1998; Catalao *et al.*, 2000; Altuğ, 2012), coincidiendo con nula o baja cantidad de estos cuando *Salmonella* spp. se encontraba ausente (Catalao *et al.*, 2000). A través del

conteo de coliformes totales y fecales, se podría sugerir la presencia de *Salmonella* spp., sin embargo, no todas las muestras de *Salmonella* spp. aisladas en la Bahía de Sechura, cumplieron con esto; la muestra obtenida de Parachique fue tomada de un muestreo que evidenció muy baja contaminación, obteniendo 2 NMP/100 de coliformes totales y termotolerantes (Gianoli, 2018). Esto podría deberse a que *Salmonella* spp., puede tener además una mejor adaptación al enfrentarse a ambientes marinos, incluso mejor que *E. coli*, pudiendo quedar viable (Dupray y Derrien, 1994; González *et al.*, 2009).

Los hallazgos de *Salmonella* spp. confirmados por PCR corresponden a tres muestreos realizados entre setiembre y octubre, que a pesar de no ser un número representativo, da indicios de que puede ser aislado en ambientes que tienen una temperatura menor a la óptima, que se encuentra entre 30°C a 37°C (ELIKA, 2013), habiendo obtenido en los muestreos una temperatura del agua de 22.9°C para la muestra de setiembre, y de 16.9°C y 18.2°C para las muestras de octubre, en Puerto Rico y Parachique respectivamente.

Quispe (2017) señaló que a raíz del Fenómeno del Niño Costero, presentado en Perú entre los meses de diciembre de 2016 a mayo de 2017 (OPS, 2017), SANIPES realizó muestreos en agua de mar de la Bahía de Sechura para evaluar la presencia de *Salmonella* spp, encontrándola en Puerto Rico, lo cual conllevó al cierre de esta zona para extracción y cultivo de moluscos bivalvos,

atribuyendo estos resultados a dicho fenómeno. Sin embargo en el presente estudio también se identificó dicha bacteria en el punto mencionado, pero en un periodo anterior al fenómeno (octubre) donde la temperatura era favorable para el cultivo de moluscos bivalvos, por lo cual se podría intuir que la presencia de *Salmonella* spp. no es exclusiva a un aumento de la temperatura del agua o aumento en el caudal debido a huaicos.

La presencia de *E. coli*, dos de sus patotipos, y *Salmonella* spp. halladas en este estudio serían de importancia principalmente por repercusiones en la salud pública, al ser enterobacterias potencialmente patógenas. Al realizar los muestreos, se evidenció que entre dos puntos evaluados se realizaba la extracción de *Donax* spp., que a pesar de no ser producto de exportación, si es de consumo interno, llegando al consumidor final sin los controles respectivos que aseguren un producto inocuo. Además se observó que cercano a las zonas de desembarque, a menos de 10 metros, hay acceso y actividad recreativa en playas, las cuales pueden también resultar directamente contaminadas.

Otro factor importante a resaltar con estos resultados es que a pesar de que en la actualidad dichas bacterias no son consideradas en los monitoreos de rutina para evaluar ambientes marinos, se ha evidenciado que SANIPES ha llegado a cerrar zonas de extracción y cultivo por la presencia de *Salmonella* spp., por lo cual sí se recomendaría a futuro evaluar incluir su monitoreo, ya que este estudio también lo halló. Además, los hallazgos encontrados tanto en

Salmonella spp., *E. coli* y sus patotipos, tendría una importancia también en la salud pública e inocuidad de alimentos, pudiendo relacionar su presencia, entre otros factores, al ganado como agente portador y transmisor de estos, siendo rol del médico veterinario junto con las autoridades competentes, confirmar dicha relación, mitigar su presencia y posibles factores que lo favorecen, para evitar que estos agentes se encuentren en ambientes donde existe cultivo y extracción de productos hidrobiológicos. Además, cultivos que provienen de zonas autorizadas, sin riesgos de contaminación, también podrían resultar contaminados al momento de desembarque si es que estos son lavados con agua contaminada, como el caso de los ambientes evaluados, que se encontraban cercanos a zonas de desembarque, donde se evidenció falta de agua potable, siendo la fuente hídrica más cercana, aquella que se encontraba contaminada.

Cabe resaltar también que no existen muchos estudios de esta índole a nivel latinoamericano, que permitan una mejor comparación y evaluación de posibles factores predisponentes a la presencia de estos enteropatógenos. Además, en el país, no se ha encontrado estudios similares que evalúen estos enteropatógenos, por lo cual para llegar a evidencias concluyentes, se recomendaría realizar más estudios en el área.

A pesar de haber contado con limitaciones tales como la lejanía entre la zona del muestreo y laboratorio, que suponía en tener un mayor control y cuidado en

las condiciones de transporte (mantener cadena de frío de las muestras), y el trabajar con un agar cromogénico (HiCrome® *E. coli*) el cual fue un factor inhibitor para el PCR al inicio de la experimentación, no haber realizado el aislamiento previo de las bacterias y ejecutar la caracterización molecular directamente de las muestras de agua, igual habría evidenciado la presencia de los genes de virulencia que caracterizan a los patotipos de *E. coli* y a *Salmonella* spp. mas no se habría tenido conocimiento sobre si la bacteria como tal se encontraba viable en el ambiente, lo cual es importante para determinarla como potencialmente patógena.

V. CONCLUSIONES

- Se aisló *E. coli* en el 86.27% del total de muestras de agua evaluadas por NMP para coliformes termotolerantes en la Bahía de Sechura, Piura.
- Se identificaron cepas de *E. coli* con los patotipos EPEC y EHEC predominando EHEC (7.9%).
- Se identificó el antígeno somático O157 de *E. coli* en 1.43%, pero ninguna cepa portó el antígeno flagelar H7.
- Se aisló *Salmonella* spp. en 2.9% del total de muestras de agua analizadas.
- Las Delicias, punto de muestreo más lejano de la costa, no presentó patotipos de *E. coli*, ni presencia de *Salmonella* spp.
- Medios de cultivo y pruebas bioquímicas no siempre son confirmatorias para una especie o serotipo, como en los casos presuntivos de *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar conteos de *Salmonella* spp., para estimar la concentración en ambientes marinos de la Bahía de Sechura.
- Identificar los serovares de *Salmonella* spp. aislados en el presente estudio, o en posteriores.
- Determinar la presencia de otros patotipos de *E. coli.*, además de su diversidad genética para establecer la relación con cepas provenientes de humanos o animales.
- Determinar la presencia de los enteropatógenos en productos marinos.
- Realizar el aislamiento de la bacteria junto con la caracterización molecular para confirmar el patotipo o la bacteria, así como determinar su viabilidad en el ambiente.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso M, Sanz M, Padola N, Lucchesi P. 2014. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteropatogénico (EPEC) aisladas durante el proceso de faena de pollos. Rev. Argent. Microbiol. 46(2):122-125.

Altuğ G. 2012. The Occurrence of *Salmonella* in Various Marine Environments in Turkey. Mahmoud B, editor. *Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen*. 1st. Ed. Rijeka, Croatia: InTech. 73-90.

Arcos M, Ávila de Navia S, Estupiñán S, Gómez A. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas: 3(4):69-79.

Arias I, Cáceres O, Salazar E, Zamudio M, Rojas J. 2000. Estudio de *Escherichia coli* enteropatógena y enteroagregativa en menores de cinco años de edad con diarrea persistente. Lima: MINSA. Serie Informes Técnicos N° 34. 15 pp.

[APHA] American Public Health Association. American Water Works Association, Water Environment Federation. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th ed. 1220 pp.

[ANA] Autoridad Nacional del Agua. 2016. Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hidrobiológicos Superficiales. Resolución Jefatural N° 010-2016-ANA. 92 pp.

Balière C, Rincé A, Blanco J, Dahbi G, *et. al.* 2015. Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing and Enteropathogenic *Escherichia coli* in Shellfish-Harvesting Areas and Their Watersheds. *Frontiers in Microbiology*. 6:15pp.

Betancor L, Gadea M, Florees K. 2006. Genética Bacteriana. En: Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2da ed. Montevideo: Universidad de la República. 59-80.

Cabral J. 2010. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. Int. J. Environ. Res. Public Health. 7:3657-3703.

Catalao L, Soares M, Fidalgo M, García E, Borrego J. 2000. Occurrence of *Salmonella* spp. in estuarine and coastal waters of Portugal. Antonie van Leeuwenhoek. 78:99-106.

[CDC] Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2016. Cuatro brotes multiestatales de infecciones por *Salmonella* en seres humanos vinculadas a tortugas pequeñas. [Acceso 25 de setiembre de 2017] Disponible en: <https://www.cdc.gov/salmonella/small-turtles-10-15/index-esp.html>

Cortés-Lara M. 2003. Importancia de los coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit. Rev Biomed 14(2):121-123.

Delgado A, Sandoval R, Uribe E, Montenegro M. Salmonelosis en vacas lecheras en el Perú. Artículo. [Acceso 25 de setiembre de 2017] Disponible en: <http://www.actualidadganadera.com/articulos/salmonelosis-en-vacas-lecheras-en-el-peru.html>

Dupray E, Derrien A. 1995. Influence of the previous stay of *Escherichia coli* and *Samonella* spp. in waste waters on their survival in seawater. Wat. Res. 29(4):1005-1011.

ELIKA. 2013. *Salmonella*. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. Riesgos biológicos – Fichas de riesgos: 6pp. [Acceso el 28 de setiembre de 2017]. Disponible en: <https://riesgos.elika.eus/wp-content/uploads/2018/01/1.Salmonella.pdf>

Efstratiou M, Mavridou A, Richardson S, Papadakis J. 1998. Correlation of bacterial indicator organisms with *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in sea water. Letters in Applied Microbiology. 28:342-346.

[ESCAES] Escuela Campesina de Educación y Salud. 2010. Expediente: Sustento técnico de la actividad pesquera en la bahía de Sechura ante la posibilidad de una incursión petrolera. Documento técnico. 75 pp.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Documento Técnico de Pesca 471. 42 pp.

Farfán A, Ariza S, Vargas F, Vargas L. 2016. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. Rev. Chilena Infectol. 33(4):438-450.

Fariñas M, Martínez-Martínez L. 2013. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enferm. Infecc. Microbiol. Clín. 31(6):402-409.

Ferens W, Hovde C. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. Foodborne Pathogens and Disease. 8(4):465-487.

Fratamico P, Bagi L, Pepe T. 2000. A Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 in Foods and Bovine Feces. J. Food. Prot. 63(8):1032-1037.

Gianoli A. 2018. Estudio microbiológico y físico de la calidad del agua en seis puntos de la Bahía de Sechura – Piura. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 36 pp.

Gómez O. 2014 Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* patógenas en Colombia. Rev. Chilena Infectol. 31(5):577-586.

González M, Grati C, Villalobos L, Gil H, Vásquez A. 2009. Calidad microbiológica de la ostra *Crassostrea rhizophorae* y aguas de extracción, Estado Sucre, Venezuela. Revvista Científica, FCV-LUZ. XIX(6):659-666.

Gorski L, Parker C, Liang A, Cooley M, *et. al.* Prevalence, Distribution and Diversity of *Salmonella enterica* in a Major Produce Region of California. Appl. Environ. Microbiol. 77(8):2734-2748.

Hamilton M, Hadi A, Griffith J, Ishii S, *et. al.* 2010. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. Water Research. 44:5463-5473.

Harakeh S, Yassine H, El-Fadel M. 2006. Antimicrobial-resistant patterns of *Escherichia coli* and *Salmonella* strains in the aquatic Lebanese environments. Environmental Pollution 143:269-277

Huapaya B, Huguet J, Suárez V, Torres Y, Montoya Y, *et. al.* 2001. Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. Rev. Med. Exp. 18(1-2):38-39.

[IMARPE] Instituto del Mar del Perú. 2007. Estudio de línea base del ámbito marino de la Bahía de Sechura. Documento técnico. 116 pp.

[IMARPE] Instituto del Mar del Perú. 2010. Informe nacional sobre el estado del ambiente marino del Perú. Informe técnico. 175 pp.

[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2010. Perú: Mapa del Déficit de Agua y Saneamiento Básico a Nivel Distrital, 2007. Perú: INEI. Informe Técnico. 192 pp.

Marcos A, Gómez-Sánchez M, Hung A. 2014. Detección del virus de la Hepatitis A en dos muestras de agua del Río Sechura, usando transcriptasa-reversa PCR en tiempo real. Salud tecnol. vet.:2:1-6.

Martínez R, Villalobos L. 2005. *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. Revista Científica, FCV-LUZ: 15(2):163-167.

[MINAM] Ministerio del Ambiente. 2008. Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua. 10 pp.

[MINSAL] Ministerio de Salud. Dirección General de Salud de las Personas. 2001. Estudio de Etiología de la Diarrea en las Direcciones de Salud Cajamarca, Lambayeque, Loreto y Lima Este. Informe Técnico. 21 pp.

[MINSAL] Ministerio de Salud. 2008. Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano. NTS N° 071 – MINSAL/DIGESA-V.01. 23 pp.

[MINSAL] Ministerio de Salud. Dirección General de Epidemiología. 2011. Brote de Síndrome Hemolítico Urémico por *E. coli* enterohemorrágico O104:H4 en Alemania 2011. Bol Epidemiol. (Lima): 20(23):461-462.

[MINSAL] Ministerio de Salud. 2017. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Bol Epidemiol. del Perú. 26(7):1374-1375.

Miotto L. 2009. Coliformes Termotolerantes e *Enterococcus* sp. em Ostras e Aguas Salinas Utilizadas para Cultivo de Moluscos Bivalves da Baía Sul Da Ilha de Santa Catarina-Brasil. Tesis Maestría en Ciencia de Alimentos. Florianópolis: Universidad Federal de Santa Catarina. 104 pp.

Morrison C, Armstrong A, Evans S, Mild R, *et. al.* 2011. Survival of *Salmonella* Newport in oysters. *International Journal of Food Microbiology*. 148:93-98.

Nataro J, Kaper J. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142-201.

Ochoa T, Mercado E, Durand D, Rivera F, Mosquito S, Contreras C. 2011. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*: 28(1):13-20.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2013. *Salmonella* (no tifoidea). Ginebra: OMS. Nota descriptiva N° 139. [Acceso 1 de mayo de 2016] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2017. Hepatitis A. Ginebra: OMS. Nota descriptiva. [Acceso 26 de setiembre de 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/es/>

[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2017. Emergencia por impacto del Fenómeno “El Niño Costero” – Perú, 2017. [Acceso el 2 de julio de 2018]. Disponible en: https://www.paho.org/per/index.php?option=com_content&view=article&id=3710:emergencia-por-impacto-del-fenomeno-el-nino-costero-2017-peru&Itemid=1060

Paton A, Paton J. 1998. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA* Enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J. Clin. Microbiol.* 36(2):598-602.

Paton J, Paton A. 1998. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(3):450-479.

Pegues D, Ohl M, Miller S. 2006. Nontyphoidal Salmonellosis. Guerrant R, Walker D, Weller P, editors. *Tropical Infectious Diseases – Principles, Pathogens & Practice*. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Inc. 241-254.

Polo F, Figueras M, Inza I, Sala J, *et. al.* 1998. Relationship between presence of *Salmonella* and indicators of faecal pollution in aquatic habitats. *FEMS Microbiology Letters*. 160:253-256.

[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2016. Plan de Implementación Programa Nacional “A Comer Pescado”. RM N° 172-2016.PRODUCE. 32 pp.

[PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2016. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2015. 196 pp.

Puerta-García A, Mateos-Rodríguez F. 2010. *Enterobacterias*. *Medicine* 10(51):3426-3431.

Quispe A. 2017. Plan de control de moluscos bivalvos en la Bahía de Sechura. En II Jornada Acuícola. Charla llevada a cabo en la Universidad Nacional del Callao, Perú.

Ristori C, Iaria S, Gelli D, Rivera I. 2007. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliensis*) and estuarine water along the south coast of Brazil. *International Journal of Environmental Health Research*. 17(4):2569-269.

Romero J. 2016. Efecto de los Residuos Orgánicos Antrópicos en la Calidad del Agua y sobre la Producción de *Argopecten purpuratus* “Concha de Abanico” en la Bahía de Sechura – Piura, Perú en los años 2014 – 2015. Tesis para optar el grado académico de Maestro en Ciencias con Mención en Gestión Ambiental. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. 137 pp.

Rubini S, Galleti G, D’Incau M, Govoni G, *et. al.* 2017. Occurrence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* in bivalve molluscs and associations with *Escherichia coli* in molluscs and faecal coliforms in seawater. *Food Control*. 84:429-435.

Sánchez S, Ropmecin P, Guachalla L, Iñiguez V. 2006. Caracterización genotípica de aislados de *Escherichia coli* (AEEC) de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz: Implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. *Revista chilena de pediatría*, 77(4):412-427.

[SANIPES] Dirección General del Servicio Nacional de Sanidad Pesquera. 2010. Instructivo: Tomas, conservación y transporte de muestras para ensayos fisicoquímicos y microbiológicos. Documento técnico I01-SANIPES. 14 pp.

[SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2016. Procedimiento: Control Oficial de Zonas y Áreas de Producción Clasificada de Moluscos Bivalvos Vivos. P02-SDSA-SANIPES. 16 pp.

Saire R. 2014. Evaluación de la presencia de *E. coli* y recuento de coliformes fecales en muestras de agua del río Sechura (Piura). Tesis para optar el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Santos L, Nascimento V, Oliveira S, *et. al.* 2001. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of *Salmonella* in Artificially Inoculated Chicken Meat. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 43(5):247-250.

Setti I, Rodriguez A, Pata M, Cadaro C, *et. al.* 2009. Characteristics and Dynamics of *Salmonella* Contamination along the Coast of Agadir, Morocco. Appl. Environ. Microbiol. 75(24):7700-7709.

Sharma V, Dean-Nystrom E. 2003. Detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. Veterinary Microbiology 93:247-260.

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.

Sunar N, Stentiford E, Stewart D, Fletcher L. 2014. Molecular techniques to characterize the *invA* genes of *Salmonella* spp. for pathogen inactivation study in composting. ORBIT2010. 10 pp.

The Center for Food Security & Public Health. 2009. *E. coli* enterohemorrágica. Iowa State University. 12pp.

Tuyet D, Assibanda S, Nguyen P, Koyenede M, Gouali M, *et. al.* Etropathogenic *Escherichia coli* O157 in Bangui and N'Goila, Central African Republic: A Brief Report. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75(3):513-515.

Vega J. 2010. Incidencia de bacterias del género *Vibrio* sp. como indicadores de contaminación fecal presentes en moluscos bivalvos en La Ensenada de La Paz, B. C. S y áreas adyacentes. Tesis de Biólogo Marino. La Paz, Baja California Sur: Universidad Autónoma de Baja California Sur. 45 pp.

Vidal J. 2003. *Esherichia coli* (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. Salud en Tabasco. 9:188-193.







Wang G, Doyle M. 1998. Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Water. J. Food. Prot. 61(6):662-667.

Williams A, Avery L, Killham K, Jones D. 2007. Persistence, dissipation, and activity of *Escherichia coli* O157:H7 within sand and seawater environments. FEMS Microbiol. Ecol. 60:24-32.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Mapa de los sitios muestreados en la Bahía de Sechura (Fuente: Google Maps®)



- | | |
|---|---|
|  San Pedro |  Las Delicias |
|  Dren de Sechura |  Parachique |
|  Chulliyachi |  Puerto Rico |

Anexo 2. Imágenes de los sitios muestreados. (Fuente: Propia)



Figura 1. Chulliyachi



Figura 2. San Pedro



Figura 3. Dren de Sechura



Figura 4. Las Delicias



Figura 5. Parachique



Figura 6. Puerto Rico

Anexo 3. Extracción de *Donax* spp. (Fuente: Propia)

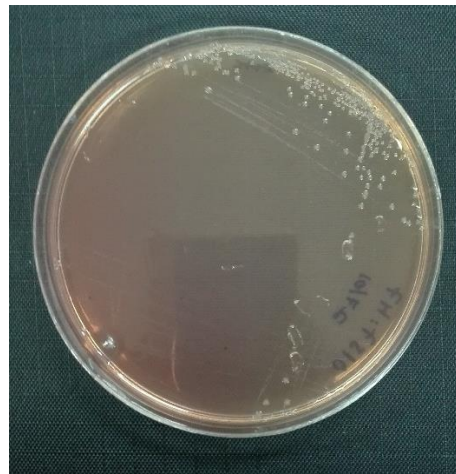
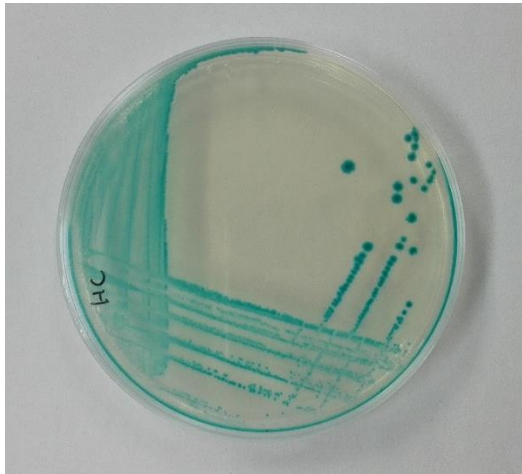


Figuras 1 y 2. Extracción de *Donax* spp. en la orilla, en zona intermedia entre Chulliyachi y San Pedro. Fuente: Propia.

Anexo 4. Aislamiento de *E. coli*

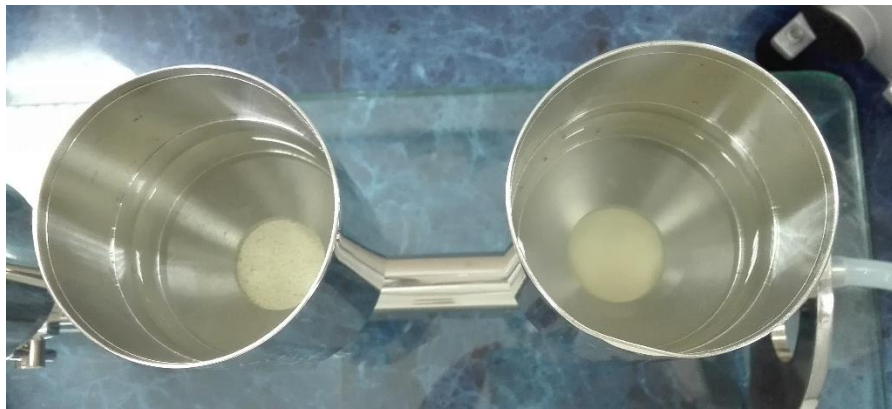


Figura 1. Caldo EC positivo para coliformes termotolerantes (turbidez y producción de gas). Fuente: Gianoli A.



Figuras 2 y 3. Cultivo de *E. coli* en agar HiCrome *E. coli*® (izquierda) y MacConkey Sorbitol (derecha). Fuente: Propia.

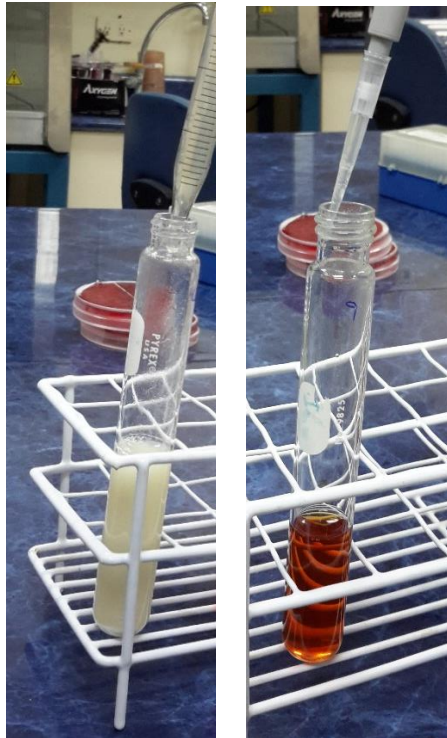
Anexo 5. Aislamiento de *Salmonella* spp.



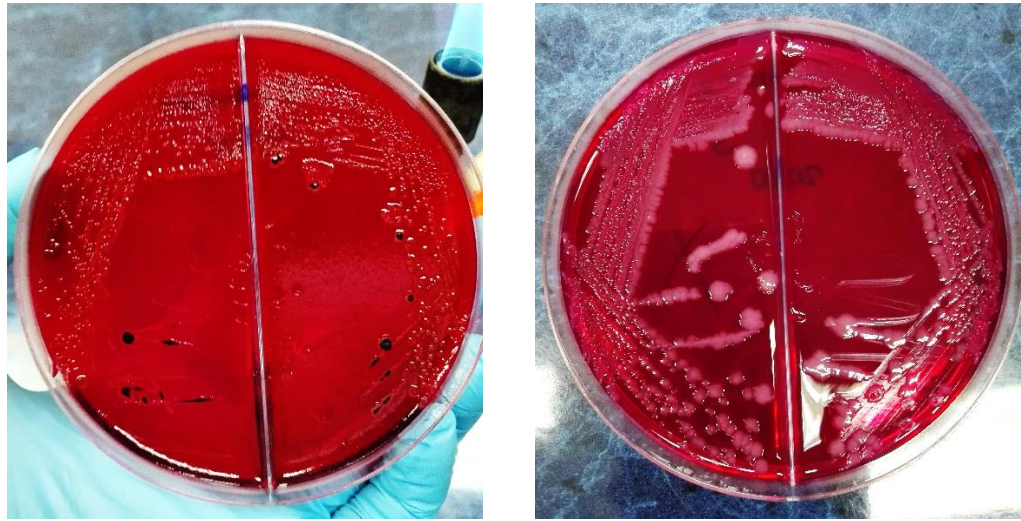
Figuras 1 y 2. Filtración de muestras de agua marina en Filtros de Membrana (de 0.45 μm y 47 mm de diámetro). Fuente: Propia



Figura 3. Pre-enriquecimiento de los FM en agua peptonada; incubación a 37°C por 24 horas. Fuente: Propia.



Figuras 4 y 5. Enriquecimiento selectivo en Tetracionato (izquierda) y Selenito Cistina (derecha); incubación a 37°C por 24 horas. Fuente: Propia.



Figuras 6 y 7. Siembra en medio de cultivo XLD (izquierda, colonias negras), y Verde Brillante (derecha, colonias rosadas). Fuente: Propia



Figura 8. Kit de galerías API® 20E para identificación de *Salmonella* spp. Fuente: Propia.

Anexo 6. Resultados de PCR

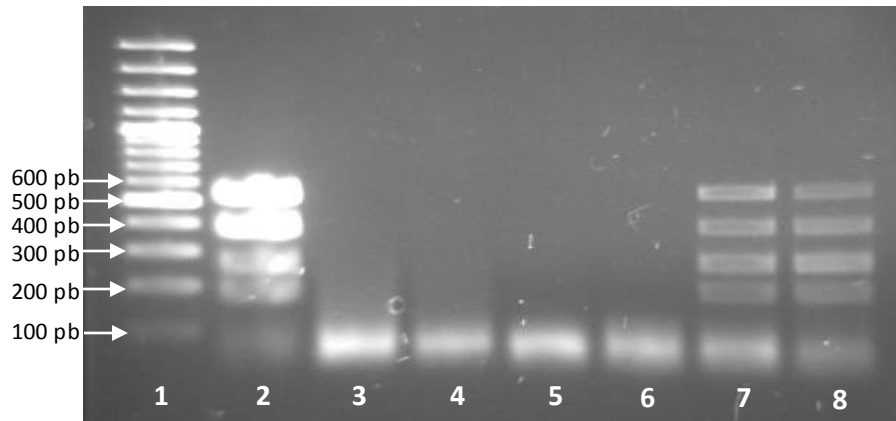


Figura 1. Electroforesis del PCR multiplex para los patotipos EPEC y EHEC. 1. Ladder 100 pb. 2. Control positivo (EHEC). 3 al 6. Muestras negativas. 7 y 8: Muestras positivas. Genes *stx1*: 180pb, *stx2*: 255pb, *eaeA*: 384pb, *hlyA*: 534pb. Fuente: Propia.

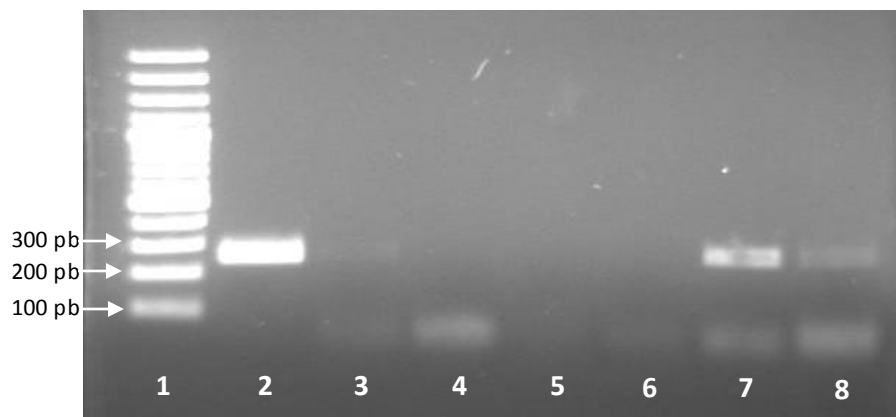


Figura 2. Electroforesis del PCR para el serogrupo O157. 1. Ladder 100 pb. 2. Control positivo (O157). 3, 7 y 8. Muestras positivas. 4 al 6. Muestras negativas. Gen *rfbE* 259pb. Fuente: Propia.

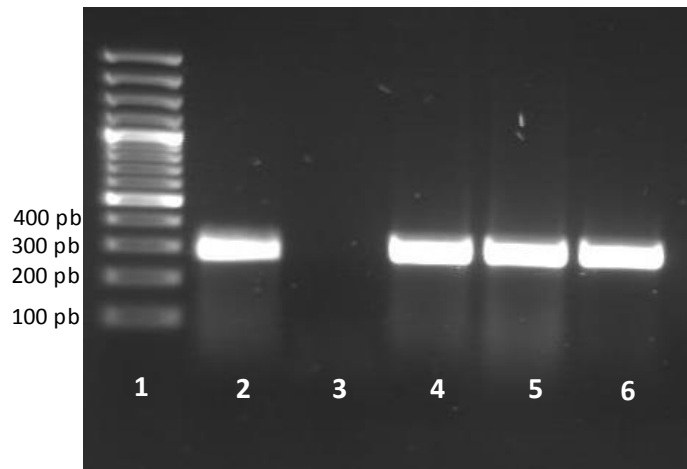


Figura 3. Electroforesis del PCR para *Salmonella* spp. 1. Ladder 100 pb. 2. Control positivo (*Salmonella enteritidis* ATCC 13076). 3. Control Negativo (agua molecular). 4 al 6. Muestras positivas. Gen *invA* 285pb. Fuente: Propia.

Anexo 7. Parámetros fisicoquímicos mensuales en cada uno de los puntos evaluados.

	Dren de Sechura				Chulliyachi			
	Oxígeno (mg/l)	Temp. (°C)	Salinidad (ppm)	pH	Oxígeno (mg/l)	Temp. (°C)	Salinidad (ppm)	pH
Marzo	DNP ¹	DNP ¹	DNP ¹	DNP ¹	5.48	31.64	10.29	8.06
Abril	4.66	27.10	2.88	8.32	6.48	24.59	16.91	8.25
Mayo	8.80	25.70	2.80	8.61	6.69	27.38	5.99	8.64
Junio	7.97	25.15	3.98	8.24	6.82	26.72	8.19	8.17
Julio	2.09	23.00	6.16	7.81	6.23	20.50	6.68	8.23
Agosto	4.73	23.12	5.44	8.04	9.10	21.91	21.70	8.19
Setiembre	4.77	23.30	4.10	8.06	6.64	22.49	14.27	8.23
Octubre	5.19	23.81	4.02	8.05	6.25	22.60	14.45	8.12
Noviembre	7.78	25.37	4.75	7.82	6.27	25.47	11.56	7.86
Diciembre	4.61	26.93	7.80	7.90	4.67	24.52	21.08	7.99

	Las Delicias				Puerto Rico			
	Oxígeno (mg/l)	Temp. (°C)	Salinidad (ppm)	pH	Oxígeno (mg/l)	Temp. (°C)	Salinidad (ppm)	pH
Marzo	3.49	25.89	34.61	7.94	1.97	23.74	34.67	7.95
Abril	3.25	20.57	34.36	7.76	2.18	21.06	34.12	7.69
Mayo	6.75	20.63	34.79	7.95	7.92	21.10	35.22	9.24
Junio	4.71	19.20	34.68	7.97	2.37	19.70	35.10	7.88
Julio	6.18	19.82	34.64	7.93	4.76	19.78	34.70	7.79
Agosto	5.50	18.72	35.14	8.52	2.03	17.25	35.02	7.72
Setiembre	5.58	18.89	35.16	8.09	1.49	16.96	34.50	7.82
Octubre	4.63	19.32	34.60	8.05	2.44	18.13	34.59	7.89
Noviembre	4.55	19.26	35.78	7.75	3.57	18.09	35.43	7.51
Diciembre	4.10	20.15	35.23	7.86	1.39	20.31	35.05	7.57

¹ DNP: Datos no proporcionados

	San Pedro				Parachique			
	Oxígeno (mg/l)	Temp. (°C)	Salinidad (ppm)	pH	Oxígeno (mg/l)	Temp. (°C)	Salinidad (ppm)	pH
Marzo	6.40	27.95	17.91	7.95	6.57	26.42	35.15	8.06
Abril	5.13	25.26	14.52	8.03	4.28	21.24	33.33	7.67
Mayo	6.75	26.02	23.28	8.40	7.90	20.38	34.68	7.84
Junio	6.28	24.15	22.10	7.78	5.30	19.25	34.60	7.98
Julio	6.14	18.85	30.50	7.86	6.78	19.85	34.02	8.03
Agosto	7.33	20.05	29.71	8.03	5.95	18.98	35.29	8.09
Setiembre	6.20	20.61	29.70	8.03	5.13	19.41	35.54	8.11
Octubre	6.10	20.36	30.25	7.93	3.93	19.42	35.50	8.25
Noviembre	6.76	22.53	31.66	7.69	5.14	19.59	35.87	7.68
Diciembre	5.02	23.39	33.28	7.98	4.08	21.63	35.74	7.87