



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**DETECCIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE
RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli*
AISLADA DE AGUA DE MAR UTILIZADA EN EL
EXPENDIO DE PRODUCTOS HIDROBIOLÓGICOS EN
LOS TERMINALES PESQUEROS DE ANCÓN Y
CHORRILLOS.**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN
SANIDAD ACUÍCOLA**

CRISTIAN ZOILO SÁNCHEZ PARIONA

LIMA – PERU

2018

ASESOR DE TESIS

PHD. MARCOS ENRIQUE SERRANO MARTÍNEZ

DEDICATORIA

A papá y mamá.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT-CIENCIA ACTIVA) al Programa de SANIDAD ACUÍCOLA (contrato 230-2015 FONDECYT. Concurso PROGRAMAS DE MAESTRÍA EN UNIVERSIDADES PERUANAS”) de la UPCH.

ÍNDICE

Contenido

AGRADECIMIENTO	iix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Productos Hidrobiológicos.....	3
2.2 El problema de la resistencia antimicrobiana.....	4
2.3 Mecanismo de acción y resistencia a los antimicrobianos en <i>E. coli</i>	4
2.3.1 Tetraciclinas	5
2.3.2 Betalactámicos.....	5
2.3.3 Cloranfenicol.....	6
2.3.4 Trimetoprim - Sulfametaxol.....	7
2.3.5 Quinolonas	7
2.3.6 <i>Escherichia coli</i>	8
III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	10
IV. OBJETIVOS	11
V. MATERIALES Y MÉTODOS	12
5.1. Toma de muestra	12

5.2.	Número más probable y aislamiento de <i>E. coli</i>	12
5.3.	Determinación de la resistencia antimicrobiana.....	13
5.4.	Extracción del ADN.....	13
5.5.	Detección de genes de resistencia antimicrobiana.....	14
VI.	RESULTADOS.....	16
6.1	Cuantificación de coliformes.....	16
6.2	Sensibilidad antimicrobiana.....	17
6.2.1	Sensibilidad antimicrobiana a ampicilina.....	18
6.2.2	Sensibilidad antimicrobiana al ácido nalidíxico.....	18
6.2.3	Sensibilidad antimicrobiana al cloranfenicol.....	19
6.2.4	Sensibilidad antimicrobiana al Trimetoprim-sulfametoxazol.....	20
6.2.5	Sensibilidad antimicrobiana a tetraciclina.....	20
6.2.6	Diversidad fenotípica de resistencia.....	21
6.2.7	Patrones de resistencia antimicrobiana.....	23
VII.	DISCUSIÓN.....	25
VIII.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	30
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
X.	ANÉXOS.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Iniciadores utilizados en la detección de genes de resistencia de <i>E. coli</i> aislada de productos hidrobiológicos.....	15
Tabla 2 NMP de coliformes totales y termotolerantes en agua utilizadas en el expendio de PH en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.....	16
Tabla 3 Sensibilidad a ampicilina en aislados de <i>E. coli</i> proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.....	18
Tabla 4 Sensibilidad a ácido nalidíxico en aislados de <i>E. coli</i> proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.....	19
Tabla 5 Sensibilidad a cloranfenicol en aislados de <i>E. coli</i> proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.....	19
Tabla 6 Sensibilidad a Trimetoprim-sulfametoxazol en aislados de <i>E. coli</i> proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.....	20
Tabla 7 Sensibilidad a tetraciclina en aislados de <i>E. coli</i> proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.....	21
Tabla 8 Diversidad de fenotipos de resistencia entre los aislados de <i>E. coli</i> resistentes a antimicrobianos procedentes del terminal pesquero de Ancón.....	22
Tabla 9 Diversidad de fenotipos de resistencia entre los aislados de <i>E. coli</i> resistentes a antimicrobianos procedentes del terminal pesquero de Chorrillos.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Prevalencia de resistencia antimicrobiana en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos	17
Figura 2 Patrones de resistencia a múltiples antimicrobianos de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos	24

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico ocasionado por la aparición de mutaciones espontáneas y por la aptitud de las bacterias para transferir material genético de forma horizontal, este fenómeno se ha convertido en un problema emergente y motivo de gran preocupación ya que dificulta el enfoque terapéutico de los pacientes infectados. La presente investigación tuvo como objetivo determinar molecular y fenotípicamente la resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislada de agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos. Se realizaron muestreos semanales entre los meses de junio y julio de 2017 en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos, utilizando la técnica del número más probable (NMP) para cuantificar coliformes totales y coliformes termotolerantes, posteriormente se identificaron aislados de *E. coli* mediante pruebas bioquímicas convencionales, a los cuales se les determinó el perfil fenotípico de resistencia a cinco antimicrobianos (ampicilina, tetraciclina, sulfatrimetropim, ácido nalidíxico y cloranfenicol) empleando la técnica de difusión en agar, finalmente se determinó por PCR la presencia de genes de resistencia (*blaTEM*, *Sul2*, *catA1*, *tet (A)* *dfrA1* y *qnrA*). Se obtuvieron 32 aislados de *E. coli* en cada uno de los lugares de estudio. Del terminal pesquero de Ancón el 40.6 % de estos aislados mostró resistencia a ampicilina, 31.3% a tetraciclina y ácido nalidíxico, 15.6% a sulfatrimetropim y solo 3.1% a cloranfenicol; mientras que de los aislados del terminal pesquero de Chorrillos el 46.9% fue resistente a ampicilina y tetraciclina, 40.6 % a ácido nalidíxico y oxitetraciclina, mientras que todos los aislados fueron sensibles al cloranfenicol. Por otra parte, el 15.6% y 9.4 % de los aislados provenientes de Chorrillos y el 9.4% y el 15.6% de Ancón fueron resistentes a dos y tres antimicrobianos respectivamente. La resistencia simultánea a cuatro antimicrobianos fue de 9.4% en ambos terminales pesqueros, mientras que ninguna cepa fue resistente a todas las drogas evaluadas.

Palabras clave: *Escherichia coli*, resistencia antimicrobiana, *Tet(A)*, *blaTEM*

ABSTRACT

Resistance to antimicrobials is a biological phenomenon caused by the appearance of spontaneous mutations and by the ability of bacteria to transfer genetic material horizontally, this phenomenon has become an emerging problem and a cause of great concern since it hinders the approach Therapeutic treatment of infected patients. The objective of the present investigation was to determine molecularly and phenotypically the antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from seawater used in the sale of hydrobiological products. Weekly samplings were carried out between June and July 2017 in the fishing terminals of Ancón and Chorrillos, the most probable number technique (NMP) was used to quantify total coliforms and thermotolerant coliforms, later isolates of *E. coli* were identified through conventional biochemical tests, which were determined the phenotypic profile of resistance to five antimicrobials (ampicillin, tetracycline, sulfa.trimetropim, nalidixic acid and chloramphenicol) using the technique of agar diffusion, finally determined by PCR the presence of genes of resistance (*blaTEM*, *Sul2*, *catA1*, *tet (A)* *dfrA1* y *qnrA*). 32 isolates of *E. coli* were obtained in each of the study sites. From the fishing terminal of Ancón, 40.6% of these isolates showed resistance to ampicillin, 31.3% to tetracycline and nalidixic acid, 15.6% to sulfa.trimetropim and only 3.1% to chloramphenicol; while of the isolates from the fishing terminal of Chorrillos, 46.9% were resistant to ampicillin and tetracycline, 40.6% to nalidixic acid and oxytetracycline, while all the isolates were sensitive to chloramphenicol. On the other hand, 15.6% and 9.4% of the isolates from Chorrillos and 9.4% and 15.6% of Ancón were resistant to two and three antimicrobials respectively. The simultaneous resistance to four antimicrobials was 9.4% in both fishing terminals, while no strain was resistant to all the evaluated drugs.

Key words: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, resistance gene, *Tet(A)*, *blaTEM*

I. INTRODUCCIÓN

El consumo per cápita de Productos Hidrobiológicos (PH) en el Perú crece considerablemente (PRODUCE, 2014) siendo Lima metropolitana la región con mayor demanda (INEI, 2009). Chorrillos y Ancón son importantes puntos de desembarque y venta de recursos hidrobiológicos marítimos en la capital, siendo el destino total de esta comercialización el consumo humano directo (PRODUCE, 2015).

La contaminación de los PH en la etapa de post captura con bacterias patógenas está relacionada a la mala calidad del agua, hielo y prácticas de manejo antihigiénico (Saritha *et al.*, 2014), siendo estos, puntos críticos en la calidad del producto final (Balasubramaniam *et al.*, 2009). El agua utilizada en los procesos de comercialización debe ser potable y protegida de toda contaminación, el agua no potable puede utilizarse siempre y cuando no esté en contacto con los productos hidrobiológicos además de ser independiente y no compartir líneas de suministro con el agua potable (FAO, 2010). Para garantizar la calidad del agua, el recuento de coliformes fecales no debe exceder las 0 UFC/100ml a 44.5° C (SANIPES, 2017).

Escherichia coli es un indicador sanitario de contaminación fecal (Jeyasanta *et al.*, 2009), estando su proliferación en PH relacionada a una inadecuada manipulación y a la mala calidad de la fuente de agua (Iwamoto *et al.*, 2010).

El tracto intestinal de animales de sangre caliente, incluyendo a los humanos, es el hábitat de *E. coli*, donde usualmente se comporta como comensal (Nataro y Kaper, 1998). Algunas de estas especies presentan la capacidad de producir toxinas, entre otros factores de virulencia, que causan enfermedades entéricas (Kaper *et al.*, 2004).

Desde antes del descubrimiento, producción y utilización de los antimicrobianos, las bacterias desarrollaron varios mecanismos de resistencia (Guardabassi, y Courvalin 2006). Esta capacidad es

un fenómeno biológico natural (FAO, 2010) que se ha convertido en un problema emergente debido principalmente al uso inadecuado e irresponsable de estas drogas, lo que ha favorecido la selección de cepas que expresan genes de resistencia, así como aparición de mutaciones que confieren resistencia y sobreexpresión de bombas de flujo, además de promover la transferencia horizontal de elementos genéticos intra e inter especies (Rodríguez, 2015). Todo esto es motivo de gran preocupación porque dificulta el enfoque terapéutico de los pacientes infectados (OMS, 2001), prolonga la recuperación e incrementa los costos de tratamiento, lo que conlleva al aumento de mortalidad y morbilidad, además de incrementar la aparición de los indeseados efectos secundarios tóxicos que producen algunos antibióticos (Gómez *et al.*, 2007).

En nuestro estudio, aislamos *E. coli* de muestras de agua de mar utilizada en los procesos de comercialización de PH de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos con la finalidad de caracterizar la resistencia antimicrobiana, así como de identificar molecularmente los genes responsables de conferir dicha resistencia.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Productos Hidrobiológicos

En el Perú el consumo per cápita de los PH se ha incrementado durante los últimos años (PRODUCE, 2014) alcanzando 22 kg, uno de los más altos en Latinoamérica (FAO, 2010), siendo el consumo en Lima el más alto en comparación con el resto del país (INEI, 2009). Chorrillos y Ancón son importantes puntos de desembarque y venta de recursos hidrobiológicos marítimos, reportando 13 302 y 1 926 TM anuales respectivamente, destinados en su totalidad para el consumo humano directo (PRODUCE, 2015).

Los PH representan una importante fuente de alimento para una gran parte de la población mundial (Bakr *et al.*, 2011) y, aunque son parte de una dieta saludable, su consumo no está exento de riesgos, por lo que es necesario la prevención de los principales mecanismos de contaminación que son susceptibles de control (Sanjee y Karim 2016). Los PH pueden contaminarse en el transporte, manejo y procesamiento, contaminación relacionada con la materia prima, personal o de herramientas (Svanevik, 2015). La calidad microbiológica del agua o hielo utilizados para el procesamiento es importante porque al estar en contacto directamente con los PH suponen un riesgo alto de contaminación (Andrews y Hammack, 2001).

Teniendo en cuenta que el indicador más preciso de contaminación fecal son los coliformes fecales (Suvanich *et al.*, 2000; Noble *et al.*, 2004), un bajo recuento de estos puede representar la efectividad de los procedimientos de bioseguridad durante el procesamiento o y manejo (Elhadi *et al.*, 2004). La contaminación por coliformes puede ocurrir en cualquier paso de procesamiento, transporte y manipulación; también puede ser causada por el agua utilizada para lavar o para hacer hielo (Boyd, 1990) siendo indispensable el control en el transcurso o de toda la cadena productiva (Smith *et al.*, 2015). Para garantizar que la calidad del agua a utilizar en los

procesos de comercialización de PH sea limpia el recuento de *E. coli* en esta no debe exceder las 0 UFC/100ml a 44.5° C o lo que es equivalente a < 1.8/100 ml por el método de Número Más Probable (NMP) por tubos múltiples (SANIPES, 2017).

2.2 El problema de la resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico ocasionado por la aparición de mutaciones espontáneas y por la aptitud de las bacterias para transferir material genético de forma horizontal, este fenómeno se ha convertido en un problema emergente y motivo de gran preocupación ya que dificulta el enfoque terapéutico de los pacientes infectados (OMS, 2001). Las bacterias pueden clasificarse según el perfil de resistencia que presentan en: multidrogo resistente (MDR), definido como la no sensibilidad adquirida a por lo menos un antibiótico en más de tres categorías; extremadamente resistente (XDR), definida como la no sensibilidad a por lo menos un antibiótico en casi todas las categorías (exceptuando dos) y pan resistente (RDP), que es definida como la no sensibilidad a todos los antibióticos en todas las categorías antimicrobianas (Magiorakos *et al.*, 2012).

2.3 Mecanismo de acción y resistencia a los antimicrobianos en *E. coli*

En las enteropatías producidas por *Escherichia coli* es frecuente observar elevados niveles de resistencia a tetraciclina, ampicilina, Trimetoprim-sulfametoxazol, cloranfenicol y ácido nalidíxico, ocasionando dificultades en la antibioticoterapia (Mosquito *et al.*, 2010).

Los genes de resistencia brindan esta característica frente una clase de antibiótico, pero, puede conferir resistencia a otros antibióticos con los que comparten el mismo mecanismo de acción pudiendo ser estos inclusive de familias diferentes (OMS, 2001). Cabe señalar que la resistencia

antimicrobiana en cepas de *E. coli* comensales es preocupante ya que podrían estar ejerciendo como depósito de genes de resistencia facilitando así su distribución (Bartoloni *et al.*, 2008).

2.3.1 Tetraciclinas

Las tetraciclinas por su bajo costo, amplio espectro y escasos efectos secundarios son de los antibióticos más utilizados tanto en medicina humana como en medicina veterinaria (Chopra y Roberts, 2001) donde son empleados como promotores del crecimiento (Roberts, 2005). La generalización e indiscriminado uso de las tetraciclinas ocasionó el incremento de la prevalencia de resistencia antimicrobiana limitando su eficacia (Chopra y Roberts, 2001).

La resistencia a tetraciclinas es originada principalmente por la adquisición de genes *tet*, a menudo asociado con elementos móviles (plásmidos y transposones) (Chopra y Roberts, 2001) que codifican bombas de eflujo o expulsión, inactivación enzimática y protección ribosómica (Koo y Woo, 2011). En bacterias Gram negativas el mecanismo de resistencia más común es el sistema de bomba de eflujo (Chopra y Roberts, 2001).

La resistencia de *E. coli* a las tetraciclinas se puede utilizar como un indicador general de resistencia a los antimicrobianos debido a su alta frecuencia de ocurrencia, que se relaciona a la alta capacidad de transferencia horizontal de los genes *tet* (Koo y Woo 2011).

2.3.2 Betalactámicos

Los betalactámicos son de los antibióticos más conocidos y ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria, químicamente se caracterizan por presentar un anillo betalactámico (García *et al.*, 1999). Actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana e induciendo su destrucción, esto se logra mediante la unión irreversible a las enzimas encargadas del último paso en la síntesis del peptidoglucano (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Bush y Jacoby, 2009).

La resistencia a los betalactámicos se confiere por disminución de la permeabilidad a estos, modificación de las dianas, inactivación del antimicrobiano mediante la producción de betalactamasas y por expulsión activa (Marín y Gudiol, 2003). En bacterias Gram negativas, como *E. coli*, el mecanismo de resistencia más frecuente es la producción de betalactamasas, las cuales pueden estar codificadas en plásmidos o en el ADN cromosómico (McDermott *et al.*, 2003). Las betalactamasas de codificación plasmídica tienen una elevada capacidad de diseminación entre cepas de la misma especie y entre distintas especies bacterianas lo que representa un problema epidemiológico mayor (Canton *et al.*, 2002). Los genes que codifican las beta-lactamasas más frecuentes son *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA-1 y *bla*CARB (Bush y Jacoby, 2009), y de importancia creciente *CTX-M*, betalactamasa de espectro extendido (Pallecchi *et al.*, 2007). Las betalactamasas encontradas con mayor frecuencia en aislados de *E. coli*, procedentes tanto de animales como de personas, son las de tipo TEM (Briñas *et al.*, 2002). En el Perú se reportó la presencia de *bla*TEM (30,5 %), *bla*SHV (4,5 %), *bla*CARB (1,9 %) y *bla*OXA (5,8 %) en un estudio realizado en niños menores de dos años (Mosquito *et al.*, 2010).

2.3.3 Cloranfenicol

El cloranfenicol es un antibiótico que debido a su toxicidad y a la disponibilidad de antimicrobianos con similar espectro de actividad su uso actualmente es bastante limitado (Schwarz *et al.*, 2004), es un potente inhibidor de la biosíntesis proteica uniéndose reversiblemente al centro de peptidiltransferasa del ribosoma 70S previniendo la elongación de la cadena peptídica (Schlüunzen, 2001). Tiene espectro de acción frente a Gram positivos, Gram negativos, micoplasmas y rickettsias (Shaw, 1983; Yao y Moellering, 1999), puede atravesar membranas biológicas para llegar a bacterias intracelulares y es capaz de traspasar la barrera hematoencefálica (Yao y Moellering, 1999).

El principal mecanismo de resistencia al cloranfenicol es por inactivación enzimática y está mediada por diferentes tipos de cloranfenicol acetil transferasas (CAT), que son codificadas por el gen *cat*, menos frecuentes son las resistencias mediadas por bombas de eflujo, mutación del objetivo y barrera de permeabilidad (Schwarz *et al.*, 2004).

El gen *catA1*, que codifica para CAT, se encuentra en el transposón Tn9 que es muy común entre las bacterias Gram negativas (Frech *et al.*, 2003), este gen es transferible mediante conjugación lo que puede favorecer a la diseminación de la resistencia (Kikvi *et al.*, 2007).

2.3.4 Trimetoprim - Sulfametaxol

Las sulfonamidas son drogas ampliamente utilizadas en medicina humana y veterinaria, generando una rápida y elevada resistencia antibiótica, es por ello que se le asoció con diaminopirimidinas (trimetoprim) para potencializar su efecto. Mientras las sulfonamidas inhiben la síntesis de la enzima dihidropteroato sintasa, el trimetoprim inhibe a la dihidrofolato reductasa; afectando así de manera complementaria la síntesis del ácido fólico (Ho *et al.*, 2009). Los mecanismos de resistencia para sulfonamidas y trimetoprim están relacionados con la presencia de *sul1*, *sul2* y *sul3*, genes que codifican mutantes de la enzima dihidropteroato sintasa, las cuales no son inhibidas por el antimicrobiano. Mientras que el gen *dfr* confiere resistencia a trimetoprim (Dahmen *et al.*, 2010).

2.3.5 Quinolonas

Las quinolonas ingresan en las bacterias Gram negativas a través de las proteínas porinas, o también directamente a través de la bicapa lipídica (Hooper, 1998), afectan la síntesis de proteínas inhibiendo a la topoisomerasa que es la enzima encargada del desdoblamiento de ADN para su posterior replicación (Tafur *et al.*, 2008).

Los mecanismos de resistencia a quinolonas están relacionados con mutaciones en genes que reducen la unión del fármaco al complejo enzima –ADN, que esta mediado por los genes *gyrA* o *parC* y en la sobreexpresión de bombas de eflujo (Hooper y Jacoby, 2015).

En las enterobacterias, la resistencia a las fluoro quinolonas también está determinada por un mecanismo de resistencia que ha aumentado en los últimos años (Strahilevitz *et al.*, 2009) y que esta codificado por genes *qnr* entre los que se encuentran *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS* (Schink *et al.*, 2012). Estos genes codifican proteínas que bloquean la acción sobre la ADN girasa y topoisomerasa IV del ADN pudiendo conferir resistencia de bajo nivel que promueve la resistencia mutacional de alto nivel (Hooper y Jacoby, 2015) y se localizan en plásmidos, por lo que su diseminación es de gran preocupación en la salud global (Tafur *et al.*, 2008).

Además, los integrones, segmentos de DNA extracromosomal adicionales, comúnmente forman parte de plásmidos, se encuentran hasta en 40 % de bacterias Gram negativas, los aislados que contienen estos elementos son más resistentes a quinolonas, aminoglucósidos y betalactámicos (Martínez, 1998). La frecuencia de *qnr* se ve aumentada si son preseleccionados de muestras positivas para betalactamasas de espectro extendido y otros fenotipos de resistencia (Robicsek *et al.*, 2005), por otra parte, el gen *qnr* también se puede encontrar en el cromosoma de bacterias Gram negativas y Gram positivas, de fuentes clínicas y ambientales (Jacoby y Hooper 2013).

2.3.6 *Escherichia coli*

El género *Escherichia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, que se caracteriza por ser bacilos Gram negativos que no forman esporas (Kaper *et al.*, 2004), oxidasa negativos, pudiendo o no contar con flagelos (Weintraub, 2007). Es un grupo genéticamente heterogéneo, generalmente no patógeno, que hace parte de la microbiota intestinal autóctona de seres humanos y animales. Sin embargo, algunos miembros de este grupo adquirieron genes que les permiten causar

enfermedades entéricas, urinarias y meningitis (Rüttler *et al.*, 2006) mediante la producción de toxinas y adhesinas, invadiendo células, interfiriendo con el metabolismo celular o destruyendo tejidos (FAO, 2015).

Las cepas que causan infecciones entéricas son llamadas de *E. coli* diarreogénicas y se clasifican en seis principales patotipos según su virulencia y efectos patogénicos en cultivos celulares epiteliales: *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Productora de Toxina Shiga (STEC), *E. coli* Enteroagregativa (CEEA) y *E. coli* de Adherencia difusa (DAEC) (Rüttler *et al.*, 2006).

E. coli ha sido aislada en muestras de agua utilizada en los procesos de comercialización de productos hidrobiológicos (Smith *et al.*, 2015), además en el Perú ha sido reportada en altas frecuencias en choro (*Aulacomya ater*) destinados al consumo humano (Taboada *et al.*, 1974)

III. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El irracional y excesivo uso de los antibióticos en situaciones donde no es necesaria su utilización favorece el surgimiento de bacterias resistentes y acelera su propagación (Gómez *et al.*, 2007), ocasionando el incremento continuo de fracasos terapéuticos (Livermore, 2003). *E. coli* es un enteropatógeno importante en la difusión de genes resistencia antimicrobiana (Zhao *et al.*, 2012) incluyendo antibióticos de última línea como las fluoro quinolonas (Alouache *et al.*, 2012). Su presencia en aguas costeras refleja contaminación fecal por lo que es un adecuado indicador sanitario de la calidad de cuerpos de agua (Jeyasanta *et al.*, 2009).

El uso de aguas costeras sin tratamiento destinada a los procesos de comercialización de productos hidrobiológicos y el hábito de consumirlos crudos son factores que predisponen el contagio con *E. coli* resistente a antimicrobianos poniendo en riesgo la salud pública.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar molecular y fenotípicamente la resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislada de agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.

4.2 Objetivo específico

- Cuantificar coliformes termo tolerantes provenientes de agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos utilizando el método del número más probable.
- Aislar cepas de *E. coli* de agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológico.
- Determinar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* aislados de agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos.
- Identificar molecularmente por PCR los genes de resistencia a los distintos antimicrobianos evaluados.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Toma de muestra

Las muestras fueron tomadas por ocho semanas consecutivas entre los meses de junio y julio de 2017 en dos puntos de muestreo de cada lugar de estudio, siguiendo las recomendaciones descritas por SANIPES, (2017). El agua de mar, transportado por tuberías hasta el terminal pesquero, se ubicaron y desinfectaron con fuego directo los puntos de toma de muestra, seguidamente se dejó correr el agua por dos minutos, a continuación, se abrió la tapa del frasco de vidrio previamente autoclavado, hasta obtener un volumen de un litro. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Microbiología de FMVZ en un *cooler* que permitió la conservación de la cadena de frío.

5.2. Número más probable y aislamiento de *E. coli*

El cálculo del número más probable (NMP) de coliformes totales y coliformes termo tolerantes se realizó utilizando el método de tubos múltiples siguiendo las recomendaciones de la American Public Health Association (APHA, 2012). Se utilizó Caldo Lauril Triptosa en volúmenes de 10 mL de concentración simple, para inóculos de 1 y 0.1 mL y de doble concentración para inóculos de 10 mL, por triplicado en tubos provisto con campana Durham. Posteriormente, se incubó a 35°C por 24-48 horas, al cabo de este periodo se evaluó los tubos, considerándose como positivos aquellos con presencia de gas y turbidez. De los tubos positivos, se transfirió una asada a tubos con Caldo EC y se incubó a 44.5 °C por 24-48 horas. La formación de gas se consideró positiva a Coliformes Fecales (Termo tolerantes). Seguidamente, se estimó el Número más probable en las tablas correspondientes de coliformes Totales por 100 mL y NMP de coliformes Fecales por 100 mL. Una asada proveniente de los tubos positivos para Coliformes fecales fue sembrada en agar HiCrome e incubada a 44.5°C por 24 horas, de donde se identificaron dos colonias características de *E. coli*, luego se resembraron en agar soya tripticasa e incubaron por 24 horas a

37°C, finalmente se realizaron pruebas bioquímicas (LIA, SIM, Citrato, Urea, Kliger, e Indol) para su confirmación.

5.3. Determinación de la resistencia antimicrobiana

La resistencia a antimicrobianos se evaluó empleando la técnica de difusión en agar Kirby-Bauer descrita por Woods y Washington (1995) frente a los siguientes antibióticos: ampicilina (10 µg) (betalactámico), ácido nalidíxico (30 µg) (quinolona), tetraciclina (30 µg), cloranfenicol (30 µg) y Trimetoprim-Sulfametoxazol (25 µg). Brevemente, un inóculo bacteriano equivalente a la escala 0,5 de McFarland se esparció, con la ayuda de un asa de digralsky, sobre la superficie de una placa de Petri con agar Müeller-Hinton de modo tal que se logró un crecimiento confluyente. Posteriormente, en un tiempo no mayor a 15 minutos se colocó equidistantes los discos con los antibióticos. Seguidamente la placa se incubó a 35 °C por un periodo de 18 horas. Finalmente, cada placa fue observada en luz indirecta reconociendo los halos de inhibición que fueron medidos utilizando un caliper. Se tomó como referencia lo indicado por el CLSI (2016) para determinar la resistencia o susceptibilidad a las drogas evaluadas.

5.4. Extracción del ADN

El DNA bacteriano fue extraído por el método fenol-cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). Una colonia representativa de cada aislado fue sembrada en 5 mL de BHI e incubada por 48 h. Se centrifugo a 13.000 g x 10 min, posteriormente el sedimento bacteriano fue lavado dos veces en PBS (pH 7,2), fue incubado con 70 µL de lisozima (10 mg/mL) a 37 °C por 3 h. En seguida, fueron adicionados 35 µL de sodio duodecil sulfato (SDS 20%) y 35 µL de proteinasa K (20 mg/mL), e incubados a 55 °C por 2 h, siendo posteriormente, adicionados volúmenes iguales de fenol cloroformo (1:1) y centrifugados (14.000 g x 6 min). El sobrenadante (DNA) fue precipitado con

volúmenes iguales de acetato de sodio (20%) e isopropanol absoluto. En seguida, el DNA fue lavado con etanol helado (70%) y centrifugado (14.000 g x 10 min), y el mismo, diluido en 100 µL de TE, siendo guardado a - 20 °C, hasta su uso.

5.5. Detección de genes de resistencia antimicrobiana

La determinación de los diferentes de genes de resistencia antimicrobiana de *E. coli* aislados fue realizada por PCR, según especificado en la Tabla 1. Las reacciones de amplificación de DNA fueron llevadas a cabo en volúmenes finales de 25 µL conteniendo 2,5 µL de 10 x buffer PCR, 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µL de dNTP (0,2 mM), 1 µL de cada iniciador (0,4 mM), 0,25 µL de Platinum Taq polimerase (0,5 U) (Invitrogen), y 1 µL de DNA (10 ng). Las reacciones de amplificación se realizaron en el termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) programado para: 1 ciclo de 95 °C (3 min); seguido de 35 ciclos de 95 °C (1 min), 56 °C (1 min), y 72 °C (2 min); y 1 ciclo final de 72 °C (5 min). (Mabilat y Goussard 1993; Enne *et al.*, 2004; Alton y Vapnek, 1979; Allmeir *et al.*, 1992; Navia *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007).

Todos los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%), teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/mL) y fotografiados con transiluminador de luz UV con el sistema Kodak (EDAS, DC-120). Fue utilizado como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. DNA de cepas de *E. coli* positivas a los genes estudiados fueron concedidos por el Dr. Jesús Tamariz, investigador del Laboratorio de Mecanismo de Resistencia Antimicrobiana de la Universidad Peruana Cayetano Heredia fueron utilizados como controles positivos. Agua libre de DNAsas fue utilizada como controles negativos.

Tabla 1 *Iniciadores utilizados en la detección de genes de resistencia de E. coli aislada de productos hidrobiológicos.*

Iniciador	Antibiótico	Secuencia de Oligonucleótidos		Amplicón (pb)	Referencia
		5'	→ 3'		
<i>Bla TEM</i>	Ampicilina	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	1058	Mabilat y Goussard . 1993
<i>Sul2</i>	Sulfametoxazol	ACAGTTTCTCCGATGGAGGCCG	CTCGTGTGTGCGGATGAAGTCA	704	Enne <i>et al.</i> , 2004
<i>catA1</i>	Cloranfenicol	GGCATTTCAGTCAGTTG	CATTAAGCATTCTGCCG	551	Alton y Vapnek, 1979
<i>tet (A)</i>	Tetraciclina	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	210	Allmeir <i>et al.</i> , 1992.
<i>dfrA1</i>	Trimetoprim	GTG AAA CTA TCA CTA ATG G	TTA ACC CTT TTG CCA GAT TT	474	Navia <i>et al.</i> , 2003
<i>qnrA</i>	Ácido Nalidíxico	TTCAGCAAGAGGATTTCTCA	GGCAGCACTATTACTCCCAA	608	Wu <i>et al.</i> , 2007

VI. RESULTADOS

6.1 Cuantificación de coliformes.

En la tabla 2 se representa el NMP /100ml de coliformes totales y termotolerantes en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos en cada uno de los muestreos realizados, además se muestra el promedio obtenido a lo largo del estudio, donde se aprecia que el NMP de Coliformes totales es ligeramente superior en Chorrillos, con respecto a Ancón, mientras que en el caso del NMP de Coliformes termotolerantes, es evidente la superioridad en el terminal pesquero de Ancón. Tanto el NMP de coliformes totales como de termotolerantes varían a lo largo de la duración de la investigación en ambos lugares de estudio.

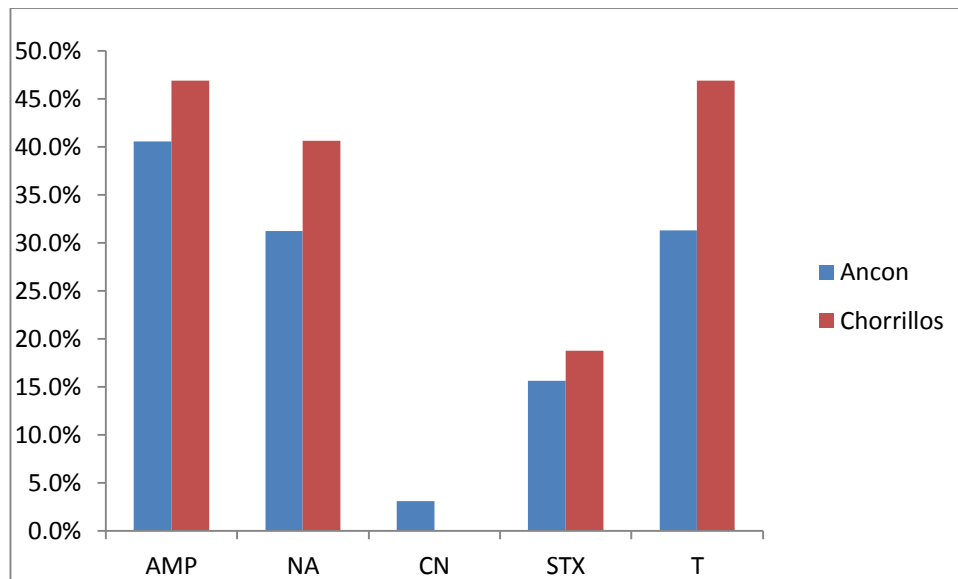
Tabla 2 NMP de coliformes totales y termotolerantes en agua utilizadas en el expendio de PH en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.

N° Muestreo	Coliformes Totales NMP/100mL		Coliformes Termotolerantes NMP/100mL	
	Ancón	Chorrillos	Ancón	Chorrillos
1	560.5	1100	57	57
2	240.5	655	233.65	48
3	587.5	165	20	17.5
4	142.5	1100	78.65	15
5	564	655	115	85.5
6	225	150	780	21.5
7	1100	276.5	780	29
8	780	625	93	58
Promedio	525	590.8125	269.6625	41.4375

6.2 Sensibilidad antimicrobiana

De los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos se obtuvieron un total de 64 aislados de *E. coli*, 32 aislados de cada lugar de estudio, los cuales fueron examinados para determinar sus perfiles de resistencia antimicrobiana. Las prevalencias de resistencia a los antimicrobianos evaluados entre los lugares de estudio están representadas en la figura 1. Las cepas resistentes a ampicilina y tetraciclina son las más prevalentes en ambo lugares de estudio. Los aislados de Chorrillos, en comparación con los Ancón, mostraron mayor prevalencia de resistencia a ampicilina (46.9 %), ácido nalidíxico (40.6%) Trimetoprim-sulfametoxazol (18.8%) y tetraciclina (46.9%), mientras que la resistencia al cloranfenicol, fue de apenas 3.1% en Ancón; en Chorrillos todas las cepas se mostraron sensibles a este último fármaco.

Figura 1 Prevalencia de resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.



AMP: ampicilina, AN: ácido nalidíxico, STX: Trimetoprim-sulfametoxazol, T: tetraciclina, CN: cloranfenicol

6.2.1 Sensibilidad antimicrobiana a ampicilina.

La tabla 3 muestra los resultados de la prueba de sensibilidad a ampicilina en los dos lugares de estudio, donde observamos que los niveles de resistencia a este fármaco son mayores en Chorrillos (46.9%) con respecto a Ancón (40.6%), mientras que la mayor cantidad de cepas sensibles se reportan en el terminal pesquero de Ancón (56.3%). Por otro parte las cepas con perfil de resistencia intermedio presentan valores bajos tanto en Ancón como en Chorrillos, 3.1 y 6.3% respectivamente.

En general, del total de cepas evaluadas se reportó que existen una mayor prevalencia de cepas sensibles (51.6%) que de resistentes a este antibiótico (43.8%).

Tabla 3 Sensibilidad a ampicilina en aislados de E. coli proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.

Sensibilidad antimicrobiana A ampicilina	Ancón		Chorrillos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Resistente	13	40.6	15	46.9	28	43.8
Intermedio	1	3.1	2	6.3	3	4.7
Sensible	18	56.3	15	46.9	33	51.6
TOTAL	32	100	32	100	64	100

6.2.2 Sensibilidad antimicrobiana al ácido nalidíxico

En la tabla 4, se detallan los resultados de la prueba de sensibilidad al ácido nalidíxico, 10 cepas fueron resistentes a este fármaco en Ancón, frente a 13 en Chorrillos (31.3 y 40.6% respectivamente), mientras que las cepas sensibles a este antibiótico representan el 53 % en Ancón y 46.9% en Chorrillos. Las cepas con perfil de resistencia intermedio reportan prevalencias de 15.6% y 12.5 % respectivamente. Del total de cepas evaluadas en el estudio el 35.9% fueron resistentes a este antibiótico.

Tabla 4 Sensibilidad a ácido nalidíxico en aislados de *E. coli* proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.

Sensibilidad antimicrobiana a ácido nalidíxico	Ancón		Chorrillos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Resistente	10	31.3	13	40.6	23	35.9
Intermedio	5	15.6	4	12.5	9	14.1
Sensible	17	53.1	15	46.9	32	50
TOTAL	32	100	32	100	64	100

6.2.3 Sensibilidad antimicrobiana al cloranfenicol

La tabla 5 representa los resultados de perfiles de resistencia reportados para el cloranfenicol, donde del total de cepas evaluadas solo se reporta una cepa resistente a este fármaco, cepa proveniente del terminal pesquero de Ancón, Los valores de prevalencia de cepas sensibles al cloranfenicol representa el 90.6 y 93.8 % en Ancón y Chorrillos respectivamente. Mientras que el 6.3% de cepas de cada lugar de estudio fueron reportadas con perfil de resistencia intermedio

Tabla 5 Sensibilidad a cloranfenicol en aislados de *E. coli* proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.

Sensibilidad antimicrobiana a cloranfenicol	Ancón		Chorrillos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Resistente	1	3.1	0	0	1	1.6
Intermedio	2	6.3	2	6.3	4	6.3
Sensible	29	90.6	30	93.8	59	92.2
TOTAL	32	100	32	100	64	100

6.2.4 Sensibilidad antimicrobiana al Trimetoprim-sulfametoxazol.

La prevalencia de resistencia al Trimetoprim-sulfametoxazol y cada perfil de sensibilidad están representadas en la tabla 6, donde se observa que los niveles más altos se reportan en Chorrillos (18.8%) en comparación con las cepas aisladas de Ancón (15.6%), mientras que las cepas sensibles a este fármaco representan el 68,8% en los dos lugares de estudio. Por otro lado, el 15.6% y 12.5% muestran un perfil de sensibilidad intermedio para Ancón y Chorrillos respectivamente. Del total de cepas evaluadas el 68.8% reportó sensibilidad a este antibiótico, mientras que el 17.2% reportó resistencia.

Tabla 6 Sensibilidad a Trimetoprim-sulfametoxazol en aislados de E. coli proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.

Sensibilidad antimicrobiana a Trimetoprim-sulfametoxazol	Ancón		Chorrillos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Resistente	5	15.6	6	18.8	11	17.2
Intermedio	5	15.6	4	12.5	9	14.1
Sensible	22	68.8	22	68.8	44	68.8
TOTAL	32	100	32	100	64	100

6.2.5 Sensibilidad antimicrobiana a tetraciclina

Los perfiles de sensibilidad a tetraciclina se muestran en la tabla 7, las cepas provenientes del terminal pesquero de Chorrillos reportan la prevalencia más alta de cepas resistentes, 46.9%, frente al 31.3% de cepas resistentes provenientes de Ancón, terminal pesquero donde también se reporta la mayor prevalencia de cepas sensibles a este fármaco, 68.8%, frente al 50% en Chorrillos. Por último, del total de cepas estudiadas el 59.4% fue sensible y el 39.1% fue resistente a este antibiótico.

Tabla 7 Sensibilidad a tetraciclina en aislados de *E. coli* proveniente de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.

Sensibilidad antimicrobiana a tetraciclina	Ancón		Chorrillos		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Resistente	10	31.3	15	46.9	25	39.1
Intermedio	0	0.0	1	3.1	1	1.6
Sensible	22	68.8	16	50.0	38	59.4
TOTAL	32	100	32	100	64	100

6.2.6 Diversidad fenotípica de resistencia

Los fenotipos de resistencia mostrados por los 32 aislados de *E. coli* aislados del terminal pesquero de Ancón se muestran en la tabla 8, estos se distribuyeron en diez diferentes fenotipos de resistencia, desde resistencia a un antimicrobiano hasta resistencia simultánea a cuatro antimicrobianos, el fenotipo mayormente detectado fue el perfil ampicilina -ácido nalidíxico -tetraciclina (23.5%), el segundo perfil de resistente más frecuente fue el de ampicilina (17.6%). El 64.7 % de aislados mostraron resistencia a dos o más de los antimicrobianos evaluados, mientras que el 35.2% fueron mono resistentes.

Tabla 8 *Diversidad de fenotipos de resistencia entre los aislados de E. coli resistentes a antimicrobianos procedentes del terminal pesquero de Ancón.*

Fenotipos de Resistencia Antimicrobiana	Numero de aislados	Frecuencia (%)
NA	2	11.8
T	1	5.9
AMP	3	17.6
AMP-NA	1	5.9
AMP-OT	1	5.9
STX-NA	1	5.9
AMP-STX-T	1	5.9
AMP-NA-T	4	23.5
AMP-STX-CN-T	1	5.9
AMP-STX-NA-T	2	11.8

AMP: ampicilina, AN: ácido nalidíxico, STX: Trimetoprim-sulfametoxazol, T: tetraciclina, CN: cloranfenicol.

En la tabla 9 se observan los fenotipos de resistencia mostrados por los aislados de *E. coli* provenientes del terminal pesquero de Chorrillos. Se reportan nueve fenotipos de resistencias diferentes, siendo los fenotipos tetraciclina y ampicilina-ácido nalidíxico-oxitetraciclina los encontrados con mayor frecuencia (19%). Los fenotipos mono resistentes mostraron una prevalencia de 33.4%, mientras que los fenotipos resistentes a dos o más antimicrobianos representan el 66.7% .

Tabla 9 *Diversidad de fenotipos de resistencia entre los aislados de E. coli resistentes a antimicrobianos procedentes del terminal pesquero de Chorrillos.*

Fenotipos de Resistencia Antimicrobiana	Numero de aislados	Frecuencia %
AMP	3	14.3
T	4	19
AMP-STX	1	4.8
NA-T	2	9.5
AMP-NA	2	9.5
AMP-STX-T	1	4.8
AMP-NA-T	4	19
AMP-STX-NA	1	4.8
AMP-STX-NA-T	3	14.3

AMP: ampicilina, AN: ácido nalidíxico, STX: Trimetoprim-sulfametoxazol, T: tetraciclina.

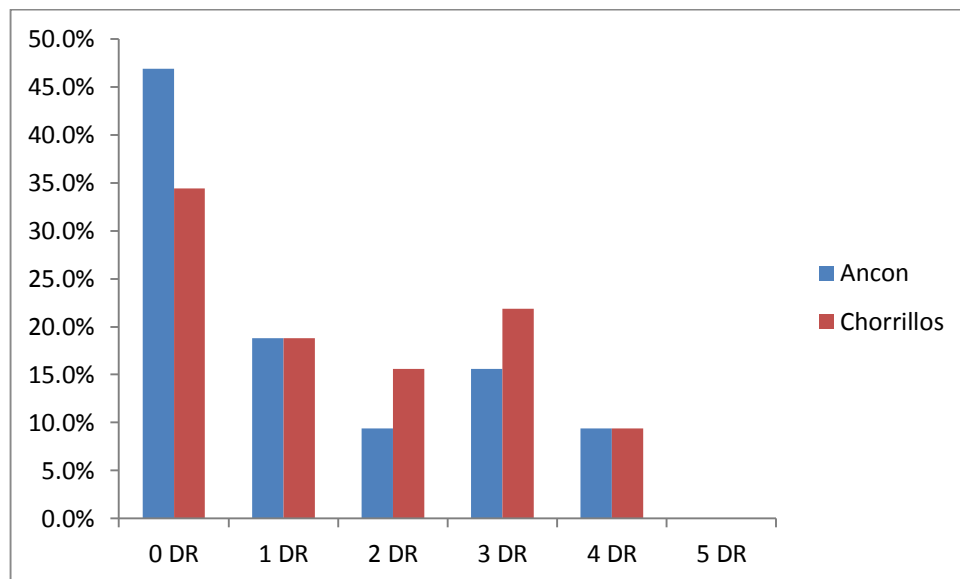
En general, 38 aislados fueron resistentes a por lo menos uno de los antimicrobianos evaluados, siendo Chorrillos el lugar con mayor cantidad de cepas resistentes en comparación con Ancón, con 21 y 17 cepas resistentes, respectivamente.

6.2.7 Patrones de resistencia antimicrobiana

Como se muestra en la Figura 2 el 46.9% de los aislados provenientes de Ancón y el 34.4 % de los provenientes de Chorrillos mostraron ser sensibles a todos los antimicrobianos evaluados, el 18.8%

de los aislados de ambos lugares de estudio fueron resistentes a una droga. De los aislados resistentes a dos antimicrobianos se reportó una mayor prevalencia en Chorrillos (15.6%) que en Ancón (9.4%), mientras que la prevalencia fue mayor en Chorrillos (21.9%) en comparación con Ancón (15.6%), para los aislados resistentes a tres antimicrobianos. Por otra parte, la resistencia a cuatro antimicrobianos fue igual en ambos lugares de estudio. Finalmente, no se reportó ningún aislado resistente a todas las drogas evaluadas.

Figura 2 Patrones de resistencia a múltiples antimicrobianos de cepas de *E. coli* aisladas de los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos.



DR: Drogo resistente

6.3 Detección de genes de resistencia

Se detectó el gen *bla*TEM en tres aislados (21.4%) resistentes a ampicilina de *E. coli* provenientes del terminal pesquero de Ancón, mientras que del terminal pesquero de Chorrillos se detectó en dos aislados (11.8%), a su vez el gen *tetA* se detectó en dos aislados de *E. coli* resistentes a tetraciclina

de Ancón (20%) y solo en uno de los aislados de Chorrillos (6.3%). Los genes de resistencia *Sul2*, *catA1* y *dftA1* y *qnrA* no fueron detectados en ninguno de los aislados de ambos lugares en estudio.

VII. DISCUSIÓN

La calidad del agua utilizada en los procesos de comercialización debe ser adecuada porque esta influirá directamente en la calidad sanitario/microbiológica de los PH, teniendo en cuenta además de que esta es una categoría alimento de vida útil muy corta, siendo su calidad fácilmente alterada por factores externos (Stratev *et al.*, 2015). El recuento de Enterobacterias se considera como indicador del índice de calidad del pescado, contaminación relacionada con el almacenamiento, lavado y evisceración (Zambuchini *et al.*, 2008).

Los resultados de este estudio constituyen un indicador de la calidad del agua utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos, reportándose en todas las muestras niveles de coliformes totales y termotolerantes que superan ampliamente los máximos permisibles (< 1.8/100 mL) dispuestos por SANIPES, (2017) incluyendo muestras con NMP tan altos como 780/100 mL. Este elevado recuento se podría explicar debido a que el agua es obtenida muy próxima de la costa, donde la acumulación de este tipo de contaminantes es mayor (Svanevik *et al.*, 2015), tal como también lo reportan Whitman y Nevers, (2003) quienes demostraron que las concentraciones de *E. coli* son más altas en aguas poco profundas, disminuyendo los recuentos en aguas más alejadas de la costa, pudiendo este factor estar influenciado por la arena, que actúa un reservorio de esta bacteria.

La presencia de coliformes fecales en el agua se considera como indicador de contaminación fecal ya que está presente en las heces de humanos y animales de sangre caliente (Noble *et al.*, 2004), por

este motivo, el control de coliformes es indispensable en el transcurso de la cadena productiva de productos hidrobiológicos, ya que estos se pueden contaminar en cualquiera de sus etapas, afectando la calidad del producto final (Svanevik *et al.*, 2015).

La fuente de contaminación del agua con coliformes termotolerantes no fue determinada por este estudio, pero podría atribuirse al vertimiento de aguas servidas sin tratamiento a las costas cercanas a ambos terminales pesqueros. También pueden contribuir a dicha contaminación la presencia de aves marinas que aprovechan los desechos producidos (Levesque *et al.*, 2009; Whitman y Nevers, 2003), y otros animales silvestres (Desmarais *et al.*, 2002).

El total de las muestras provenientes de ambos terminales pesqueros fueron positivas para *E. coli*, teniendo en cuenta que en el ambiente acuático este tipo de bacterias se inactivan, nuestros resultados indican contaminación fecal persistente y abundante (Noble *et al.*, 2004). Ha sido reportada la presencia de coliformes totales en el 50 % de muestras de aguas potable utilizadas en los procesos de comercialización de pescado, con una frecuencia de 28% para *E. coli* (Svanevik *et al.*, 2015); es probable que esta menor frecuencia se deba al origen del agua utilizada, señalando que en nuestro estudio el agua utilizada proviene directamente del mar sin recibir ningún tratamiento, lo que favorece el recuento de coliformes.

Por otra parte, respecto a la emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos en el agua, esta se debe en parte al uso indebido de estos (Kumar y Schweizer, 2005), que son usados ampliamente en salud pública, así como en la prevención y tratamiento de animales y plantas. Estas drogas pueden ser excretadas en la orina como sustancia activa, entre 30 y 90 % de la dosis administrada, las cuales se liberan, dispersan y concentran constantemente en el medio ambiente, siendo motivo de gran preocupación (Kumarasamy *et al.*, 2010). Se ha reportado presencia de grandes concentraciones de antibióticos en cuerpos de agua contaminadas con otras residuales (Azanu *et al.*, 2018; Baquero *et al.*, 2008), convirtiendo a estas fuentes en vehículos de diseminación de organismos resistentes a

antibióticos (Baquero *et al.*, 2008) porque pueden acelerar la propagación de resistencia antimicrobiana. Constanzo *et al.* (2005) y Kemper (2008) han reportado la presencia de más de treinta antibióticos en este tipo de aguas, lo que resulta en una fuente potencial de diseminación de bacterias resistentes a los antimicrobianos.

En nuestro estudio, los aislados de *E. coli* mostraron resistencia bacteriana considerable a amoxicilina y tetraciclina. La alta prevalencia de resistencia a estas drogas en *E. coli* aislada de agua de mar también ha sido reportada por Da Costa *et al* (2015) pero contrasta con los hallados por Kumar y Schweizer, (2005), que en un estudio donde aislaron *E. coli* a partir de agua, hielo y pescado, reportaron ocurrencia de resistencia a ampicilina (4.3%), ácido nalidíxico (0.86%) y tetraciclina (0.86%), resultados más bajos a los encontrados en nuestro estudio; es probable que esta diferencia se deba a que el agua utilizada en los terminales pesqueros de Ancón y Chorrillos proviene directamente del mar, sin previo tratamiento, contaminadas con aguas residuales, siendo estas fuente potencial de diseminación de bacterias resistentes a los antimicrobianos debido a que la gran concurrencia de bacterias en estas aguas hace posible que interactúen y a través de la conjugación con bacterias de la misma o diferente especies pueden intercambiar genes de resistencia que son codificados en plásmidos (Huycke *et al.*, 1998; Kühn *et al.*, 2000). Según da Costa *et al* (2015), esta transferencia es facilitada debido a que la mayoría de patógeno entéricos comparten genes de resistencia a antimicrobianos (Kariuki *et al.*, 2011), a que los genes de resistencia se transfieren fácilmente a partir de cepas comensales (Blake *et al.*, 2003) y a que la arena juega un papel importante en la diseminación de bacterias resistentes al agua (Da Costa *et al.*, 2015). Además, *E. coli* sobrevive a procesos de tratamiento de aguas residuales (Galvin *et al.*, 2010) y debido a la naturaleza hidrosoluble de los antibióticos, estos pueden dispersarse a gran distancia en fuentes de agua, facilitando su diseminación (Daughton y Ternes 1999).

Por otra parte, Onyucka *et al.* (2011) reportaron frecuencias de resistencia más altas, 64 % a ampicilina, 76% a tetraciclina y 28% a cloranfenicol, en muestras de agua y peces lacustres. Esta diferencia puede ser explicada por que, según Anderson *et al.* (2005), *E. coli* es más persistente en agua dulce que en agua de mar, donde, debido a su escasa capacidad de adaptación a condiciones marinas, estas sufren lesiones subletales manteniendo cierta capacidad metabólica (Barcina *et al.*, 1990) lo cual favorecería el intercambio de genes de resistencia. A su vez, Boss *et al* (2012), reportaron resistencia a ácido nalidíxico, tetraciclina y ampicilina, en *E. coli* aisladas de productos hidrobiológicos, en una frecuencia menor a la reportada en nuestro estudio, sin embargo, la resistencia al cloranfenicol fue ligeramente mayor (5%).

Nuestro estudio reporta una considerable frecuencia de cepas resistentes a múltiples fármacos, este patrón de resistencia ha sido también detectado en otros ambientes acuáticos (Nontongana *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2013). Probablemente, la diseminación de estos pueda estar más relacionada con la diseminación de elementos genéticos extra cromosómicos móviles, ampliamente distribuidos en bacterias entéricas, que a mutaciones cromosómicas (Berglund, 2015; Alekshun y Levy, 2007). Además, Boss *et al* (2012) encontraron cepas de *E. coli* resistentes a más de tres antibióticos en el 45 % de aislados de camarón, de los cuales dos fueron resistentes a siete diferentes drogas, que incluyen a ampicilina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, tetraciclina y trimetoprim, fármacos que también fueron usados en nuestro estudio. Los patrones de resistencia hallados están relacionados también con el uso de antibióticos en medicina veterinaria, lo que conduce a la resistencia en humanos (Laxminarayan, 2011).

En nuestro estudio no se diferenció entre *E. coli* patógenas y *E. coli* comensales, pero cabe señalar que la resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli* comensales es preocupante ya que podrían estar ejerciendo como depósito de genes de resistencia facilitando así su distribución (Bartoloni *et al.*, 2008), pudiendo realizar transferencia genética entre microorganismos del mismo género e incluso

entre microorganismo evolutivamente distantes como bacterias Gram positivas y otras Gram negativas (Courvalin, 1994).

El gen *bla*TEM se difunde por elementos móviles (plásmidos) y codifica una enzima que hidroliza las B-lactamasas (Berglund, 2015), de igual manera, el gen *tet* A también es mediado por plásmidos, y codifica una bomba de eflujo activa que funciona contra todas las drogas tetraciclinas (Lyimo *et al.*, 2016).

En nuestra investigación sólo se reportó la presencia de los genes *bla*TEM y *tet*A, ambos genes son muy prevalentes en aislados de *E. coli*. Así, en un estudio detectaron una alta prevalencia (69%) del gen *bla*TEM y *tet*A en agua de mar mientras que en el mismo estudio la presencia de ambos genes en aguas residuales fue de 38 y 31% respectivamente, a la vez que no se detectó el gen *qnr*A (Alves *et al.*, 2014). Similares resultados fueron obtenidos por Lyimo *et al.* (2016) quienes reportaron altas prevalencias de *bla*TEM y *tet*A en aislados de *E. coli* provenientes de agua dulce; es probable que la mayor prevalencia a estas drogas se deba a la amplia utilización de estos antibióticos en medicina humana y veterinaria (Christopher *et al.*, 2013).

En Suecia se reportó 84% de prevalencia del gen *bla*TEM en *E. coli* comensales aislados de niños menores de un año, siendo este gen mucho más prevalente que *bla*SHV y *bla*OXA, genes que también confieren resistencia a betalactámicos (Karami *et al.*, 2008). También en una investigación realizada en Perú en niños menores de dos años se reportó la predominancia de el gen *bla*TEM (30.5%) respecto a *bla*SHV, *bla*CARB y *bla*OXA (Mosquito *et al.*, 2010).

Por otro lado, *tet*A fue reportado en una alta prevalencia (49%) en cepas de *E. coli* resistentes a tetraciclina aisladas de infantes en Suecia (Karami *et al.*, 2006), mientras que en un estudio realizado en Perú se halló una prevalencia mayor de *tet*A con respecto a *tet*B (Mosquito *et al.*, 2010).

VIII. CONCLUSIONES

- El número de coliformes termotolerantes detectados en el agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos sobrepasa los límites establecidos por el SANIPES (< 1.8/100 ml por NMP)
- Existe elevada resistencia antimicrobiana entre las cepas de *E. coli* aislados de agua de mar utilizada en el expendio de productos hidrobiológicos, 43.8% para ampicilina, 35.9% para cloranfenicol, 39.1 % de sulfatrimetropin y 39.1% a tetraciclina.
- Se detectó molecularmente la presencia de genes de resistencia para antibióticos Ampicilina *bla*TEM y Tetraciclina (*tetA*).

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alekshun MN, Levy SB. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128:1037–1050
2. Alouache S, Kada M, Messai Y, Estepa V, Torres C, Bakour R. 2012. Antibiotic resistance and extended-spectrum beta-lactamases in isolated bacteria from seawater of Algiers beaches (Algeria). *Microb. Environ.* 27:80–86.
3. Alton NK, Vapnek D. 1979. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature*. 282:864–869.
4. Allmeier H, Cresnar B, Greck M, Schmitt R. 1992. Complete nucleotide sequence of Tn1721: gene organization and a novel gene product with features of a chemotaxis protein. *Gene* 111: 11–20
5. Alves MS, Pereira A, Araújo SM, Castro BB, Correia ACM, Henriques I. 2014. Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. *Frontiers in Microbiology*. 5: 426.
6. Anderson KL, Whitlock JE, Harwood VJ. 2005. Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6):3041-3048.
7. Andrews WH, Hammack TS. 2001. Food sampling and preparation of sample homogenate, in United States Food and Drug Administration (US FDA) Bacteriological Analytical Manual, chapter 1, United States Food and Drug Administration, Silver Spring, Md, USA, 2001.
8. APHA. 2012. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
9. Azanu D, Styryshave B, Darko G, Weisser JJ, Abaidoo RC. 2018. Occurrence and risk assessment of antibiotics in water and lettuce in Ghana. *622(623)*: 293–305

10. Bakr WMK, Hazzah WA, Abaza AF. 2011. Detection of Salmonella and Vibrio species in some seafood in Alexandria, Journal of American Science, vol. 7 no. 9, pp. 663–668.
11. Balasubramaniam S, Charles J, Krishna S. 2009. Adoption of hygienic practices at Fish Landing Centres and Markets. Fish Technology. 46:177-184.
12. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr. Opin. Biotechnol. 19 (3): 260–265.
13. Barcina I, González JM, Iriberry J, Egea L.1990. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. Journal of Applied Bacteriology. 68:189 –198.
14. Bartoloni A, Pallecchi L, Fiorelli C, Di Maggio T, Fernández C, Villagrán A, Mantella A, Bartalesi F, Strohmeyer M, Bechini A, Gamboa H, Rodríguez H, Kristiansson C, Kronvall G, Gotuzzo E, Paradisi F, Rossolini GM. 2008. Increasing resistance in commensal *Escherichia coli*, Bolivia and Peru. Emerg Infect Dis. 14:338-40.
15. Berglund B.2015. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. Infect Ecol Epidemiol. 5:28564
16. Blake DP, Hillman K, Fenlon DR, Low J.2003. Transfer of antibiotic resistance between commensal and pathogens members of the *Enterobacteriaceae* under ileal conditions. Journal of Applied Microbiology. (95) 428–436 p.
17. Boyd CE.1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, Ala- USA.
18. Briñas L, Zarazaga M, Sáenz Y, Ruiz-Larrea F, Torres C. 2002. Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. Antimicrob Agents Chemother 46: 3156-3163.

19. Bryan FL.1980. Epidemiology of foodborne diseases transmitted by fish, shellfish and marine crustaceans in the United States, 1970–1978,” *Journal of Food Protection* (43) 859–876 p.
20. Bush K, Jacoby GA. 2009. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3):969-76.
21. Calvo J, Martinez-Martinez L., 2009. Antimicrobial mechanisms of action. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 27: 44-52.
22. Canton R, Oliver A, Coque TM, Varela MC, Perez-Diaz JC, Baquero F. 2002. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *J Clin Microbiol* 40: 1237-1243.
23. Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232-260.
24. (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute.2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-sixth informational supplement. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
25. Constanzo SD, Murby J, Bates J. 2005. Ecosystem response to antibiotics entering in the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin.* 51: 218–223.
26. Cormican M. 2010. Enumeration and characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* bacteria in effluent from municipal, hospital, and secondary treatment facility sources. *Applied and Environmental Microbiology.* 76: 4772–4779.
27. Courvalin P.1994. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*38(7):1447-1451.
28. Christopher A, Mshana SE, Kidenya BR, Hokororo A, Morona D. 2013. Bacteremia and resistant Gram-negative pathogens among under-fives in Tanzania. *Ital J Pediatr.*39:27.

29. Dahmen S, Mansour W, Boujaafar N, Arlet G, Bouallegue O. 2010. Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of Enterobacteriaceae in a university hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist.* 16:43-7.
30. Da Costa Andrade V, del Busso Zampieri B, Ballesteros ER, Pinto AB, Fernandes Cardoso de Oliveira AJ. 2015. Densities and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from marine waters and beach sands. *Environmental Monitoring and Assessment.* 187(6):342.
31. Desmarais TR, Solo-Gabriele HM, Palmer CJ. 2002. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1165-1172.
32. Daughton CG, Ternes TA. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change *Environmental Health Perspectives.* 107: 907–938.
33. Elhadi S, Radu C, Chen H, Nishibuchi M. 2004. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia, *Journal of Food Protection.* 67(7):1469– 1475 p.
34. Enne V, Bennett PM, Livermore DM, Hall L. 2004. Enhancement of host fitness by the sul2-coding plasmid p9123 in the absence of selective pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 53: 958–963
35. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y la Agricultura. 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura. Roma, 242p.
36. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y la Agricultura. 2015. Prevención de *E. coli* en alimentos. 16p
37. Frech G, Kehrenberg C, Schwarz S. 2003. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var Copenhagen isolates from animal sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 51:180–182.
38. Galvin S, Boyle F, Hickey P, Vellinga A, Morris D, Cormican M. 2010. Enumeration and Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Bacteria in Effluent from Municipal, Hospital, and Secondary Treatment Facility Sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4772–4779.

39. García JE, Fresnadillo MJ, Arce JJ, García E. 1999. Antibióticos betalactámicos, En: Antimicrobianos en medicina. J. E. García, R. Lopezy J. Prieto (Eds.) Sociedad Española de Quimioterapia Prouss Science, Barcelona. 213-226 p
40. Gómez M, Araujo M, Díaz M, Garrido J, Sueiro R, Suárez S. 2007. El tratamiento secundario de aguas residuales como mecanismo redistribuidor de genes de resistencia en bacterias: análisis y evaluación de riesgo. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 7:238-250.
41. Guardabassi L, Courvalin P. 2006. Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. In Aarestrup F (ed), *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. ASM Press, Washington, DC. 326-333 p.
42. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL. 2009. Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Lett Appl Microbiol* 49:627-34.
43. Hooper DC.1998. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis*.27: 4-S63
44. Hooper DC, Jacoby GA.2015. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1354(1):12-31.
45. Huycke MM, Sahn DF, Gilmore MS. 1998. Multiple drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases*, 4(2): 239–249
46. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática 2009. Consumo de alimentos y bebidas 32p.
47. Iwamoto M, Ayers T, Mahon BE, Swerdlow DL. 2010 Epidemiology of seafood-associated infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*. 23: 399-411
48. Jacoby GA, Hooper DC.2013. Phylogenetic analysis of chromosomally determined Qnr and related proteins. *Antimicrob Agents Chemother*. 57:1930–1934.

49. Jeyasanta KI, Aiyamperumal V, Patterson J. 2009. Prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in sea foods of Tuticorin coast, Southeastern India. *Advances in Biological Research*. 6:70-77.
 50. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol* 2(2): 123-140.
 51. Karami N, Hannoun C, Adlerberth I, Wold AE.2008. Colonization dynamics of ampicillin-resistant *Escherichia coli* in the infantile colonic microbiota. *J Antimicrob Chemother*.62:703-8
 52. Karami N, Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE.2006. Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota. *Antimicrob Agents Chemother*.50:156-61.
 53. Kariuki M, Gichia R, Kakai D, Kusenererwa W. Macharia T. Menge S, Morpeth G, Mwabu L, Ndegwa B, OlackB J, Orwa J, Pandit G, Revathi C, Winters H, Gelband, Laxminarayan R. 2011. Situation analysis: Antibiotic Use and Resistance in Kenya. Global Antibiotic Resistance Partnership – Kenya country report.
 54. Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic.* 8, 1–13.
 55. Kikui GM, Schwarz S, Ombui JN, Mitema ES, Kehrenberg C. 2007. Streptomycin and chloramphenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from cattle, pigs, and chicken in Kenya. *Microb Drug Resist*.13:62–8.
 56. Koo HJ, Woo GJ. 2011. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *Int J Food Microbiol* 145:407-413.
 57. Kühn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljenquist B, Franklin A, Finn M, *et al.* 2000. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. Example of and ongoing project within the European research program. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(4): 337–342.
- Kumar, Schweizer HP. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57:1486-1513.

58. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, *et al.* 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan. And the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infection Diseases*.10: 597–602.
59. Laxminarayan.2011. Situation analysis: Antibiotic Use and Resistance in Kenya. Global Antibiotic Resistance Partnership – Kenya country report.
60. Levesque B, Brousseau P, Bernier F, Dewailly E, Joly J. 2000. Study of the bacterial content of ring-billed gull droppings in relation to recreational water quality. *Water Res.* 34:1089-1096.
61. Livermore DM. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis* 36: 11–23.
62. Lyimo B, Buza J, Subbiah M, Smith W, Call DR. 2016. Comparison of antibiotic resistant *Escherichia coli* obtained from drinking water sources in northern Tanzania: a cross-sectional study. *BMC Microbiology*.16:254.
63. Mabilat C, Goussard S. 1993. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum lactamases, 553–559 p.
64. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pan drug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268- 81.
65. Marin M, Gudiol F. 2003. beta-Lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21: 42-55.
66. Martínez-Freijó P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VS, Verhoef J, Jones ME.1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother.* 42:689-96.
67. McDermott PF, Walker RD, White DG. 2003. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol* 22: 135-143.

68. Mosquito SG, Pons MJ, Maves R, Sáenz Y, Mercado E, Vargas M, *et al.* 2010. Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from Peruvian infants. En 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Vienna, Austria. April, 10-13.
69. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev.11(1): 142-201.
70. Noble RT, Lee IM, Schiff KC. 2004. Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. J. Appl. Microbiol. 96 (3): 464-472
71. Navia, MM, Ruiz J, Sanchez-Céspedes J, Vila J. 2003. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. Diagn Microbiol Infect Dis. 46:295–298.
72. Nontongana N, Sibanda T, Ngwenya E, Okoh AI. 2014. Prevalence and antibiogram profiling of *Escherichia coli* pathotypes isolated from the Kat river and the fort Beaufort abstraction water. Int J Environ Res Public Health. 11:8213–8227.
73. [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2001. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra. 99 p.
74. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, Gotuzzo E, Kronvall G, Paradisi F, Rossolini GM. 2007. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. Antimicrob Agents Chemother 51:2720-5
75. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2015. Anuario estadístico pesquero y Acuícola.196 p
76. [PRODUCE] Ministerio de la Producción. 2014. Anuario estadístico pesquero y Acuícola.196 p.
77. Roberts MC. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Lett 245:195-203
78. Robicsek A, Sahm DF, Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC.2005. Broader distribution of plasmid-mediated quinolone resistance in the United States. Antimicrob Agents Chemother. 49:3001–3003.

79. Ruttler ME, Yanzon CS, Cuitino MJ, Renna NF, Pizarro MA, Ortiz AM. 2006. Evaluation of a multiplex PCR method to detect enteroaggregative *Escherichia coli*. *Biocell*. 30:301-8.
80. Sambrook J, Fritsch EF Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
81. [SANIPES]. Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2017. Ejecución del programa control de agua y hielo. 19p.
82. Sanjee SA, Karim ME. 2016. Microbiological Quality Assessment of Frozen Fish and Fish Processing Materials from Bangladesh. *International Journal of Food Science*. 2016:1-6.
83. Saritha K, Immaculate J, Jamila P. 2014. Quality of tomato hind fish (*Cephalopholis sonnerati*) at different stages of post-harvest processing. *International Journal of Research in Medical and Health Sciences*. 4(4): 30-42.
84. Schink AK, Kadlec K, Schwarz S. 2012. Detection of qnr genes among *Escherichia coli* isolates of animal origin and complete sequence of the conjugative qnrB19-carrying plasmid pQNR2078. *J Antimicrob Chemother* 67:1099–1102.
85. Schliünzen F, Zarivach R, Harms J, Bashan A, Tocilj A, Albrecht R, Yonath A, Franceschi F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413:814–821.
86. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckaert A. 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev*. 28:519-42.
87. Shaw WV.1983. Chloramphenicol acetyltransferase, enzymology and molecular biology. *Crit. Rev. Biochem*. 14:1–46.
88. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC et al. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*. 22: 664–89.

89. Stratev D, Vashin I, Daskalov H, 2015. Microbiological status of fish products on retail markets in the republic of Bulgaria. *Int Food Res J*. 22:64-9.
90. Suvanich V, Marshall DL, Jahncke ML.2000. Microbiological and color quality changes of channel catfish frame mince during chilled and frozen storage, *Journal of Food Science*, 65 (1): 151–154 p.
91. Svanevik CS, Roiha IS, Levsen A, Lunestad BT. 2015. Microbiological assessment along the fish production chain of the Norwegian pelagic fisheries sector – results from a spot sampling programme. *Food Microbiol*. 51:144–153.
92. Taboada P, Russac H, Ramos de Ormachea C.1974. Aislamiento de enterobacterias en algunos moluscos del mar peruano. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1-2.
93. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infectio*, 12(3): 227-232.
94. Wang C, Gu X, Zhang S, Wang P, Guo C, Gu J, Hou J. 2013. Characterization of antibiotic-resistance genes in antibiotic resistance *Escherichia coli* isolates from a lake. *Arch Environ Contam Toxicol*. 65:635–41.
95. Weintraub A. 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J. Med. Microbiol*. 56(1): 4-8
96. Whitman RL, Nevers MB.2003. Foreshore Sand as a Source of *Escherichia coli* in Nearshore Water of a Lake Michigan Beach. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9):5555-5562
97. Woods GL, Washington JA. 1995. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, 1327-1341 p.
98. Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ. 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51:1223–1227

ANEXOS

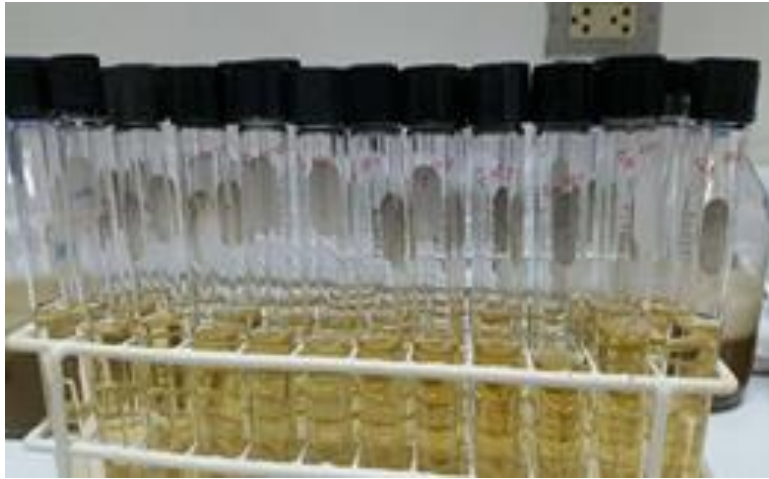


Figura 1: Técnica de Numero más Probable de coliformes termotolerantes.



Figura 2: Determinación del Número más Probable de coliformes termotolerantes.



Figura 3: Aislamiento de bacterias Gram negativas en agar MacConkey.



Figura 4: Aislamiento de *E. coli* en agar Hicrome.

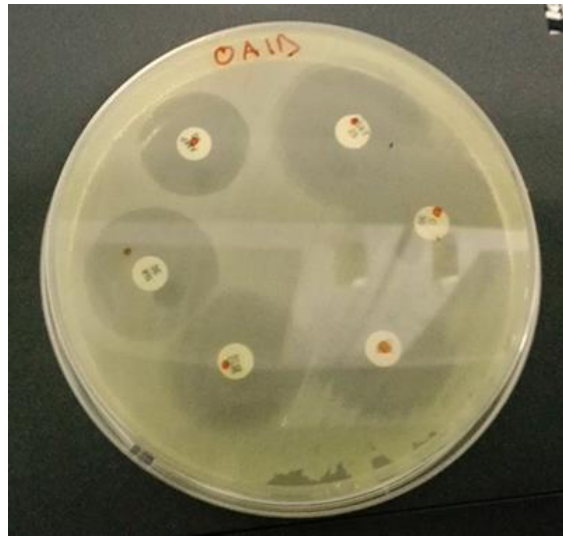


Figura 5: Determinación de resistencia antimicrobiana por el método de Kirby-Bauer.

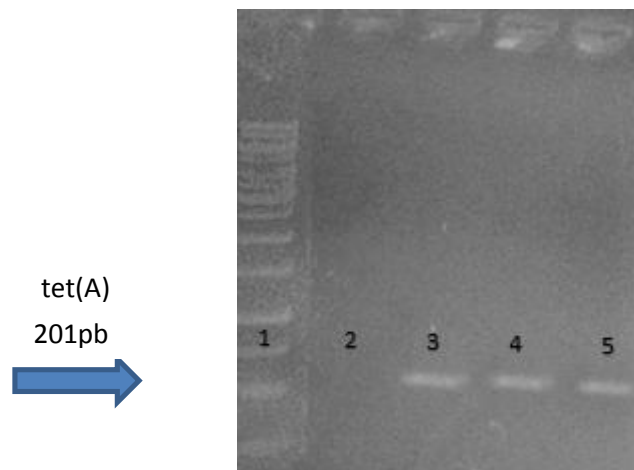


Figura 6: Electroforesis de productos PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Control positivo. Carriles 4 y 5: Amplificación positiva para el gen tet(A).

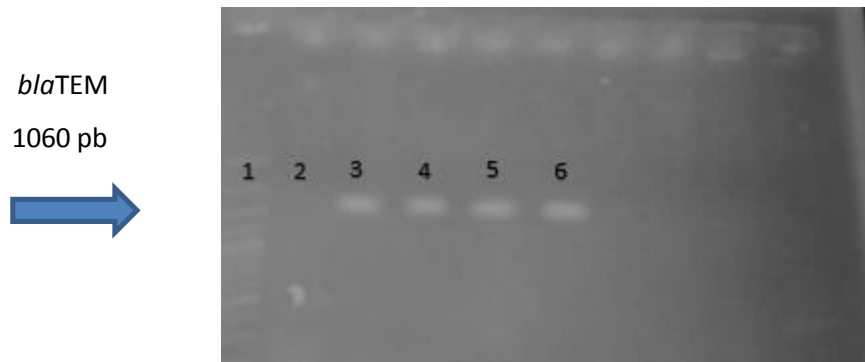


Figura 7. Electroforesis de productos PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder. Carril 2: Control negativo. Carril 3: Control positivo. Carril 4-6: Amplificación positiva para el gen *bla*TEM.