



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA
DE *VIBRIO* SPP. AISLADO DE
LANGOSTINOS BLANCOS
(*LITOPENAEUS VANNAMEI*)
CULTIVADOS EN TUMBES”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN SANIDAD ACUICOLA

FRANCISCO JOSE GRANDE AVALOS

LIMA - PERÚ

2020

ASESOR

Carlos Martín Shiva Ramayoni, MVZ, MSc, DVM
Jefe de la Unidad de Posgrado y Especialización de la Facultad de Veterinaria y
Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

JURADO DE TESIS

DR. PABLO TSUKAYAMA CISNEROS

PRESIDENTE

DRA. GALY JUANA MENDOZA TORRES

VOCAL

MG. LUIS MIGUEL JARA SALAZAR

SECRETARIO

Dedicatoria

A mis padres, como muestra de amor y reflejo de que sus esfuerzos están comenzando a dar fruto.

Agradecimientos

Al Dr. Shiva por la confianza, tiempo y esfuerzo depositado en la construcción y finalización de este trabajo.

A Krizia Pretell, Yuliana Saavedra y a todo el personal de la oficina descentralizada de SANIPES en Tumbes, por acogerme en su equipo y ayudarme en todo y cuanto necesité.

A Muriel Gomez-Sanchez y Betsi Boada por su paciencia y asistencia además de otorgarme las facilidades para ejecutar el proyecto.

A todos en el laboratorio de bacteriología del CIBUS, especialmente a Ana, Sabella, Jesús y Javi; sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible.

A mis compañeros de maestría Fariva, Renato y Milagros, por sus sugerencias durante la redacción del manuscrito.

A Katryn, por el apoyo incondicional e inmenso cariño que me dio las fuerzas para seguir adelante.

Fuentes de financiamiento

Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por
Cienciaactiva del CONCYTEC (Convenio de Gestión N° 230-2015 FONDECYT)

Programa INNÓVATE PERÚ mediante el proyecto “Reforzamiento sanitario del
sector langostinero, mediante la aplicación de programas sanitarios para el control
de residuos de sustancias de acción farmacológicas y contaminantes del medio
natural en el desarrollo de la acuicultura.”

Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela.

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	2	marzo	2020
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	GRANDE AVALOS FRANCISCO JOSE		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN SANIDAD ACUÍCOLA		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2017		
TITULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE <i>VIBRIO</i> SPP. AISLADO DE LANGOSTINOS BLANCOS (<i>LITOPENAEUS VANNAMEI</i>) CULTIVADOS EN TUMBES.”		
MODALIDAD (marcar)	Tesis	X	Sustentación temática
Declaración del Autor			
<p>La presente Tesis es un Trabajo de Investigación de Grado original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.</p>			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	989172666		
E-mail	Francisco.grande@upch.pe		



Firma del Egresado

DNI 7292082

Índice

Lista de tablas	
Lista de figuras	
Resumen / Abstract	
I. Introducción	1
II. Planteamiento de la investigación	3
II.1. Planteamiento del problema	3
II.2. Justificación del estudio	4
III. Marco teórico	5
IV. Objetivos	12
IV.1 Objetivo generales	12
IV.2 Objetivos específicos	12
V. Hipótesis	13
VI. Materiales y métodos	14
VI.1 Diseño del estudio	14
VI.2 Lugar de estudio	14
VI.3 Recolección de muestras	14
VI.4 Técnicas y procedimientos	14
VI.4.1. Reactivación y verificación de pureza	14
VI.4.2. Determinación fenotípica de la resistencia antimicrobiana	15
VI.4.3. Preservación y movilización de muestras	16
VI.4.4. Extracción y cuantificación de ADN	16
VI.4.5. Amplificación del gen 16S rNA	16

VI.4.6. Amplificación del gen <i>ftsZ</i>	17
VI.4.7. Detección de los genes de resistencia.....	17
VI.4.8. Lectura de la amplificación del PCR.....	18
VI.4.9. Secuenciación de genes.....	19
VI.5. Análisis de datos.....	18
VI.5.1 Aplicación del método de interpretación de resistencia normalizada (NRI).....	19
VI.5.2. Afiliación filogenética de los aislados de <i>Vibrio</i> spp. NWT _{OTC}	20
VI.5.3. Confirmación de los genes de resistencia y diversidad genética.....	20
VI.5.4. Diferencias geográficas en la frecuencia de cepas NWT y genes de resistencia.....	20
VI.5.5. Almacenamiento y presentación de datos.....	21
VII. RESULTADOS.....	22
VII.1. Recolección, reactivación y verificación de la pureza de las muestras.....	22
VII.2. Distribución de los halos de inhibición y análisis NRI.....	22
VII.2.1. Punto de corte epidemiológico para la ampicilina.....	23
VII.2.2. Punto de corte epidemiológico para la tetraciclina.....	24
VII.2.3. Punto de corte epidemiológico para la oxitetraciclina.....	24
VII.2.4. Punto de corte epidemiológico para el trimetopin/ sulfametoxazol.....	25
VII.2.5. Punto de corte epidemiológico para el cloranfenicol.....	26
VII.2.6. Punto de corte epidemiológico para la enrofloxacin.....	27
VII.3. Resistencia antimicrobiana in vitro.....	28
VII.4. Identificación molecular de las cepas NWT _{OTC}	29

VII.5. Detección y confirmación de los genes de resistencia.....	31
IV.5.1. Análisis de las secuencias parciales del gen tet(A).....	31
IV.5.2. Análisis de las secuencias parciales del gen tet(B).....	32
VII.6. Diferencias geográficas en la frecuencia de resistencia antimicrobiana y genes de resistencia	34
VIII. Discusión.....	35
IX. Conclusiones.....	40
X. Recomendaciones.....	42
XI. Bibliografía.....	43
XII. Anexos	

Lista de tablas

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la detección de genes de resistencia

Tabla 2. Resumen del análisis NRI para la ampicilina

Tabla 3. Resumen del análisis NRI para la tetraciclina

Tabla 4. Resumen del análisis NRI para la ampicilina

Tabla 5. Resumen del análisis NRI para el trimetopin/sulfametoxazol

Tabla 6. Resumen del análisis NRI para el cloranfenicol

Tabla 7. Resumen del análisis NRI para la enrofloxacin

Tabla 8. Perfiles de resistencia identificados en las cepas estudiadas

Tabla 9. Interpretación del diámetro de los halos de inhibición obtenidos mediante la prueba de difusión en agar a 28°C

Tabla 10. Resumen de la identificación molecular basada en la secuenciación del gen 16S rRNA y el *ftsZ*.

Tabla 11. Frecuencia de genes de resistencia en Tumbes

Tabla 12. Distribución geográfica de las cepas en función de su fenotipo contra oxitetraciclina

Tabla 13. Distribución geográfica de las cepas en función de su genotipo contra oxitetraciclina

Lista de figuras

Figura 1. División de la región Tumbes en unidades epidemiológicas según SANIPES (Fuente: Informe Técnico n° 010 – 2018 – SANIPES/DSNPA).

Figura 2. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a ampicilina.

Figura 3. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a tetraciclina.

Figura 4. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a ampicilina.

Figura 5. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a trimetopin/sulfametoxazol.

Figura 6. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a cloranfenicol.

Figura 7. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a enrofloxacina.

Figura 8: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas resistentes a tetraciclinas, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

Figura 9: Árbol filogenético basado en las secuencias del gen tet(A) de las cepas resistentes a tetraciclinas, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

Figura 10: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen tet(B) de las cepas resistentes a tetraciclinas, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

Resumen

El uso excesivo e inadecuado de antibióticos en la acuicultura ha favorecido la aparición y diseminación de la resistencia antimicrobiana en el ambiente acuático. En el Perú la industria langostinera no cuenta con estudios de línea base ni un plan de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en las bacterias del género *Vibrio*, microorganismos asociados a una serie de enfermedades y que son una de las principales causas por las que se medica el alimento en la crianza de langostinos. Este estudio estuvo dirigido a determinar los determinantes genéticos que confieren resistencia a los principales antibióticos utilizados para combatir bacterias del género *Vibrio* y crear puntos de corte epidemiológicos para facilitar la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos. Para esto se utilizaron cepas de *Vibrio* spp. aisladas por el laboratorio de la oficina desconcentrada de SANIPES en Tumbes entre los meses de octubre (2017) y julio (2018) y fueron sometidas a pruebas de difusión en agar y PCR. El 76.46% (91/119) de las cepas estudiadas mostraron resistencia a ampicilina, 35.29% (42/119) a tetraciclina y oxitetraciclina, 0.84% (1/119) a trimetropin/sulfametoxazol, 0.84% (1/119) a enrofloxacin; ninguna de las muestras estudiadas mostró resistencia a cloranfenicol. Se lograron detectar los genes tet(A) en el 26.19% (11/42) de las cepas resistentes a tetraciclina y tet(B) en el 69.04% (29/42) de las mismas. El análisis NRI permitió establecer puntos de corte epidemiológicos que identificaron cepas portadoras de genes de resistencia contra tetraciclinas.

Palabras clave: Langostino blanco, *Vibrio* spp., punto de corte epidemiológico, genes de resistencia.

Abstract

The excessive and inadequate use of antibiotics in aquaculture has favored the appearance and spread of antimicrobial resistance in the aquatic environment. In Peru, the shrimp industry does not have baseline studies or a surveillance plan for antimicrobial resistance in bacteria of the genus *Vibrio*, microorganisms associated with a series of diseases and which are one of the main causes for which the drug is medicated in prawn's food. This study aimed to determine the genetic determinants that confer resistance to the main antibiotics used to fight bacteria of the genus *Vibrio* and create epidemiological cut-off points for the correct interpretation of the results of antibiograms. For this, strains of *Vibrio* spp. isolated by the laboratory of the deconcentrated office of SANIPES in Tumbes between the months of October (2017) and July (2018) and they were subjected to diffusion tests in agar and PCR. 76.46% (91/119) of the strains studied showed resistance to ampicillin, 35.29% (42/119) to tetracycline and oxytetracycline, 0.84% (1/119) to trimethoprim / sulfamethoxazole, 0.84% (1/119) to enrofloxacin; none of the samples studied showed resistance to chloramphenicol. The tet (A) genes were detected in 26.19% (11/42) of the strains resistant to tetracycline and tet (B) in 69.04% (29/42) of them. The NRI analysis allowed the establishment of epidemiological cut-off points that identified strains carrying resistance genes against tetracyclines.

Key words: White shrimp, *Vibrio* spp., Epidemiological cut-off point, resistance genes.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de alimentos para el consumo humano por parte de la acuicultura ha ido creciendo vertiginosamente durante las últimas décadas y ha generado más de 23,4 millones puestos de trabajos alrededor del mundo (Valderrama et al., 2010). En la actualidad la acuicultura contribuye con el 45.2% de la oferta mundial de pescado, es el único rubro de la producción animal que crece más rápido que la población humana y se estima que el valor en granja de sus productos alcanzara los 202 billones de dólares para el año 2020 (Grand View Research Inc., 2014; FAO, 2016).

Dentro de las actividades más importantes de la acuicultura se encuentra la crianza de langostinos. Esta representa alrededor del 28% del comercio internacional de alimentos marinos y está representada en un 75% por la crianza del langostino blanco *litopenaeus vannamei* (FAO, 2016). La crianza del *litopenaeus vannamei* se encuentra ampliamente distribuida en las regiones subtropicales y tropicales y ha ido incrementado su producción casi exponencialmente desde mediados de los años 70 con variaciones mejor representadas en países asiáticos y latinoamericanos como China, Tailandia, Ecuador y México donde han predominado por su alto valor económico, su capacidad para tolerar amplios rangos de salinidad y temperatura, poseer ciclos de producción cortos y contar con requerimientos tecnológicos relativamente accesibles para iniciar su producción (Bostock *et al.*, 2010; Bondad-Reantaso *et al.*, 2012).

En el Perú la crianza del *litopenaeus vannamei* se encuentra en aumento y es la principal actividad acuícola en el departamento de Tumbes, lugar donde se concentra la mayor parte de langostineras del país y de donde se exporta la mayor

parte de su producción (PRODUCE, 2017; Martínez y Céspedes, 2017). En esta región, la mayoría de los centros de crianza mantienen una estrecha relación con el sistema acuático de los esteros por lo que su exposición a microorganismos en los estanques de crianza es inevitable y puede desencadenar problemas sanitarios graves (Noriega-Orozco *et al.*, 2007; Alfaro, 2010; Oliver *et al.*, 2013).

Entre las principales amenazas para la crianza de langostinos se encuentran las enfermedades bacterianas vinculadas al género *Vibrio*. Estas infecciones son generalmente controladas con antibióticos, sin embargo, el uso inadecuado de estos favorece la aparición y diseminación de la resistencia antimicrobiana al poder persistir en el ambiente acuático y alterar el desarrollo de las comunidades bacterianas hasta por varios meses después de su aplicación (Hektoen *et al.*, 1995; Roque *et al.*, 2001; Le *et al.*, 2005).

La resistencia antimicrobiana es un fenómeno que ha tomado importancia a nivel mundial ya que disminuye la efectividad de los tratamientos y restringe las opciones terapéuticas (OMS, 2014). A pesar de esto, la industria langostinera peruana aún no cuenta con estudios de línea base ni un plan de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en las bacterias del género *Vibrio*; por lo que este trabajo es uno de los primeros esfuerzos para establecer la situación genotípica actual de la resistencia a antibióticos cepas potencialmente patógenas de *Vibrios* en el departamento de Tumbes.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

II.1. Planteamiento del problema

La persistencia de antibióticos en el ambiente acuático afecta el desarrollo de las comunidades bacterianas aún después de varios meses de haber sido administrados (Hektoen *et al.*, 1995; Le *et al.*, 2005). Esta selección involuntaria en el medio facilita la aparición de cepas de patógenos oportunistas resistentes a antibióticos que podrían aprovechar la presión selectiva durante el tratamiento dirigido a otras bacterias para replicarse y producir brotes secundarios en los estanques de producción de langostinos (Tendencia y De la Pena, 2002; Miranda y Zemelman, 2002; Le *et al.*, 2005).

Entre las bacterias más importantes que pueden causar enfermedades en la crianza de langostinos blancos (*Litopenaeus vannamei*) se encuentran los *Vibrio* spp., estos; a pesar de ser parte de la microbiota normal, son responsables de pérdidas millonarias alrededor del mundo (Lightner, 1996; Tuyub *et al.*, 2014). En la actualidad se conoce poco acerca del impacto de la antibioterapia sobre las comunidades de *Vibrio* spp. en las langostineras, su capacidad de actuar como reservorios de genes de resistencia en los canales de marea de Tumbes y su efecto sobre la sostenibilidad de los sistemas productivos.

Además, en los últimos años los casos reportados de vibriosis humana a nivel mundial han estado en aumento y se proyecta que se mantendrá esta tendencia debido en parte al cambio climático; por lo que la transferencia de genes de resistencia en *Vibrio* spp. hacia vibrios patógenos para los humanos es un riesgo que amerita ser considerado (Baker-Austin *et al.*, 2017).

II.2. Justificación del estudio

La industria langostinera contribuye con el 97.8% de la canasta exportadora del departamento de Tumbes; esto representa el 77.8% del valor FOB de todas las exportaciones de esta región y genera valor por más de 215.5 millones de dólares (Martínez y Céspedes, 2017; MINCETUR, 2018). Lamentablemente el uso constante y a veces indiscriminado de antibióticos por parte de los productores ha favorecido la aparición y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos. (Lightner, 1996; Roque *et al.*, 2001).

Entre los patógenos bacterianos más importantes para la crianza de langostinos se encuentran los del género *Vibrio*; sin embargo, al no existir puntos de corte clínicos para clasificar la resistencia en animales acuáticos es necesario establecer puntos de corte epidemiológicos e identificar los mecanismos implicados en esta para mejorar los sistemas de vigilancia de la resistencia antimicrobiana de bacterias que afectan la crianza de langostinos en el Perú, especialmente en la región Tumbes.

III. MARCO TEÓRICO

Las bacterias del género *Vibrio* son bacilos curvos, gram-negativos, mesófilos, quimiorganotrofos, generalmente motiles, catalasa y oxidasa positivos que crecen fácilmente en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) y agar marino (Farmer, 1992; Thompson. *et al.*, 2005). Actualmente se les reconocen 14 clados en donde las especies son definidas como clústeres de cepas con una alta similitud fenotípica y genotípica. Son comunes en el ambiente acuático y a pesar de formar parte de la microbiota normal de los langostinos, son responsables de altas mortalidades y pérdidas millonarias en varios países (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005; Tuyub *et al.*, 2014; You *et al.*, 2016). Esto se debe a que algunos vibrios tienen la capacidad de volverse patógenos al sobrepasar un umbral de densidad celular; evento que generalmente sucede cuando su ambiente se ve sometido a condiciones que perturban el equilibrio de las interacciones entre los microorganismos y favorecen la supervivencia de clones con características funcionales más específicas (Atlas *et al.*, 1991; Sung *et al.*, 2001; Lucas *et al.*, 2010).

Existe una gran variedad de *Vibrio* spp. capaces de infectar al *Litopenaeus vannamei* y causar vibriosis (ejm. *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. penaeicida*, etc) (Brock y Lightner, 1990). En los langostinos, la vibriosis puede manifestarse a través de varios síndromes durante cualquier etapa de la producción, aunque las mortalidades más altas suelen suceder en las fases de post larvas y juveniles (Lightner, 1996; Robertson *et al.*, 1998). Entre los síndromes más comunes se encuentra la vibriosis entérica, la vibriosis cuticular y de apéndices, la vibriosis sistémica y la hepatopancreatitis séptica; los signos clínicos que suelen incluir son: palidez del hepatopáncreas, debilitamiento del telson, enrojecimiento

de los urópodos y apéndices, anorexia, nado errático o hacia las orillas, pérdida del reflejo de huida y melanización de la cutícula (Lightner 1996). Los vibrios comensales de los langostinos también pueden causar enfermedad en humanos, (ejm. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, etc) y las infecciones suelen dividirse en vibriosis-colera y vibriosis-no cólera; la vibriosis cólera se caracteriza por una diarrea acuosa severa, la vibriosis no cólera puede tener diferentes manifestaciones clínicas dependiendo de la especie, ruta de infección y susceptibilidad del paciente (ejm. gastroenteritis, otitis, infección de heridas, sepsis) (Baker-Austin *et al.*, 2018).

Actualmente el tratamiento contra la vibriosis en langostinos consiste en la aplicación directa de antibióticos en el agua de las hatcheries o su inclusión en el alimento peletizado (Roque *et al.*, 2001). Este enfoque si bien ha logrado mitigar las pérdidas económicas causadas por *Vibrio* spp., también ha acelerado la aparición y diseminación de la resistencia antimicrobiana al ejercer una presión selectiva sobre las comunidades bacterianas de manera constante al dejar residuos que pueden persistir en el ambiente acuático hasta varios meses después de haber sido administrados (Hektoen *et al.*, 1995; Le *et al.*, 2005).

La aparición de resistencia antimicrobiana es un problema a nivel mundial que afecta tanto a los animales como al ser humano al restringir las opciones terapéuticas (OMS, 2017). Según la encuesta internacional sobre resistencia antimicrobiana aplicada por Tuševljak *et al.*, en el 2013 a profesionales involucrados en la acuicultura, el 20% de los encuestados refiere como “común” la presencia de resistencia a al menos 3 antimicrobianos en *Vibrio* spp. y solo el 35% reporta nunca haber observado resistencia a quinolonas en este género, además, el

29%, 21%, 13% y 12% de los encuestados cataloga como frecuente el uso de tetraciclina, quinolonas, fenicoles y sulfas en la crianza de langostinos.

En el Perú, el expendio de antibióticos para el uso en acuicultura se encuentra regulado por el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES); este también establece los límites máximos residuales de antibióticos en el musculo de los productos provenientes de la acuicultura para el consumo humano, así como asegura que se cumplan los diferentes requisitos para la exportación de los productos acuícolas (SANIPES, 2016). Según la norma vigente los únicos residuos de antibióticos permitidos en el musculo de productos acuícolas es la amoxicilina (50 ug/kg), clortetraciclina (100 ug/kg), enrofloxacin (100 ug/kg), florfenicol (1000 ug/kg), flumequina, (600 ug/kg) eritromicina (200 ug/kg), oxitetraciclina (100 ug/kg), ácido oxolínico (100 ug/kg) y sulfonamidas (100 ug/kg). Estos valores sin embargo solo aplican al mercado nacional, ya que los requisitos para la exportación pueden variar de acuerdo al destino; como en el caso de EE.UU, en donde los límites máximos residuales de florfenicol son los mismos y los de oxitetraciclina son mayores, pero no se permiten residuos del uso de otros antibióticos (FDA 2011).

El mecanismo de acción de los antibióticos difiere bastante entre cada grupo. Por ejemplo: los b-lactámicos como la ampicilina mantienen una afinidad a las proteínas de anclaje a penicilinas (PBP); estas proteínas en condiciones normales se unen a los terminales D-alanil-D-alanina de las subunidades precursoras de la barrera de peptidoglicano pero en presencia de b-lactámicos forman uniones irreversibles que interrumpen la formación de péptidoglicano (referencia). Las tetraciclinas en cambio se unen al helix 34 (h34) de la subunidad 30S del 16S e

inhiben la formación del anticodon de la aminoacil-tRNA (Donhofer et al., 2012). Los fenicoles se unen a los residuos A2451 y A2452 en el 23S rRNA de la subunidad 50S, esto interfiere la unión del substrato con el ribosoma y previene la formación uniones entre peptidos. (Jardetzky, 1963). Las sulfas funcionan como inhibidores competitivos del ácido paraaminobenzoico (PABA) evitando la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico (Randa Hilal-Dandan, Laurence Brunton. 2014). Por otro lado, las quinolonas inhiben la acción de la girasa y topoisomerasa tipo IV al unirse a estas enzimas. El rol de la girasa y topoisomerasa tipo IV en la célula consiste en ayudan a controlar los niveles de ADN y remover nudos en el cromosoma bacteriano al modular el estado topológico del ADN pasando dobles hélices intactas a través de una ruptura transitoria que generan en un segmento separado del ADN. Cuando las topoisomerasas tipo IV o las girasas se encuentran estabilizadas por moléculas de quinolonas, estas mantienen la ruptura transitoria y esta se convierte en permanente, lo que activa mecanismos alternativos de reparación en la célula y si estos son saturados conllevan a la muerte de la célula (Aldred et al., 2014).

La resistencia antimicrobiana, así como los mecanismos de acción de cada antibiótico están mediados por diferentes mecanismos (mutación de los objetivos, inhibición enzimática del antibiótico, sistemas de flujo de salida, alteración de la permeabilidad, etc.) y se cree que es la consecuencia de la evolución de genes que pudieron tener un propósito inicial distinto. En muchos casos, estos genes tienen la capacidad de transferirse horizontalmente en forma de “unidades operacionales” compuestas por integrones, transposones y/o secuencias de inserción a otras bacterias mediante procesos de transformación, conjugación o transducción

facilitados por plásmidos o fagos. (Baquero y Canton, 2017).

El proceso de transformación consiste en la adquisición de material genético provenientes de células lisadas por parte de bacterias en crecimiento en un estado metabólico de competencia, estas incorporan el material a su genoma mediante recombinación y retienen cualquier rasgo genético que les sea ventajoso mediante selección natural. En la conjugación la transferencia se da por el contacto físico entre el donante y el receptor mediante un tubo llamado pilus F o pilus sexual. La translocación se da cuando, durante la replicación de un bacteriófago en el estado lítico, el ADN viral es empacado con una pieza de ADN bacteriano en el genoma del fago; si este se incorpora en el genoma de un nuevo huésped y la porción copiada contenía un gen de resistencia, la bacteria receptora obtendrá resistencia al antibiótico para el que codifica resistencia el recientemente incorporado gen. (Manavathu y Vazquez, 2017)

Diversos reportes en otros países han detectado el incremento de genes de resistencia antibiótica en *Vibrios* y han demostrado la presencia de los genes *penA* y *blaTEM-1* contra los b-lactámicos (Srinivasan et al., 2005; Zhang et al., 2009), *catI*, *catII*, *catIII*, *catIV*, *fexA*, *fexB* y *floR*, contra el cloranfenicol (Dang et al., 2007; Dang et al., 2008), *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(J)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(34)* y *tet(35)* contra tetraciclina (Macauley et al., 2007; Zhang et al., 2009; Kim et al., 2013), mutaciones de las regiones determinantes de resistencia (QRDRs) de los genes *gyrA* y *parC* para quinolonas y la presencia de varios elementos móviles que permiten su transmisión horizontal (Jiang, et al., 2014; Letchumanan et al., 2016).

En los genes de resistencia antimicrobiana que confieren resistencia a las

tetraciclinas se pueden distinguir hasta 4 mecanismos distintos, sin embargo, solo han sido reportados 3 en *Vibrio* spp. los genes que codifican para bombas de flujo de salida (tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(35)), los genes de protección ribosomal (tet(M), tet(S)) y los de protección enzimática tet(34). Con respecto a la resistencia a los genes CAT, estos se encargan de producir cloranfenicol-acetiltransferasa, enzima que transfiere un grupo acetil del acetil-CoA al cloranfenicol (Roberts y Schwarz, 2017).

En la actualidad los estudios sobre la resistencia antimicrobiana de vibrios aislados en Perú se han enfocado en Vibrios ambientales y de aislados clínicos de la región Lima (Ibarra y Alvarado, 2007; Sulca, *et al.*, 2018). A la fecha solo existe un estudio sobre la resistencia antimicrobiana en bacterias del género *Vibrio* aisladas de langostinos en Tumbes, en este se afirma que de 57 cepas el 47.4% fue resistente a ampicilina, 15.8% a tetraciclina y 19.3% a cloranfenicol (Rosado 2018). El segundo estudio más cercano corresponde al de Sperling *et al.*, 2015 en donde se reporta que de 154 *V. parahaemolyticus* aislados de langostinos de granjas de cultivo de Ecuador el 92.2% fueron resistentes a ampicilina, 51.3% a tetraciclina y 1.3% a cloranfenicol. Ambos estudios utilizan los lineamientos del documento M-45 del CLSI y utilizan puntos de corte clínicos no traspolables a la práctica veterinaria.

Como alternativa para presentar datos de resistencia antimicrobiana Kronvall *et al.*, 2003 desarrollaron el método de interpretación normalizada de la resistencia (NRI) que permite la comparación de resultados inter-laboratorios a través de la clasificación de las cepas en silvestres (toda cepa que no posea mecanismos de resistencia adquiridos o mutacionales detectables fenotípicamente) y no silvestres (toda cepa que posea mecanismos de resistencia adquiridos o mutaciones

detectables fenotípicamente, independientemente de su significancia clínica) (Brown, 2011).

En breve el método de la NRI asume que en un histograma de los halos de inhibición de una muestra, las cepas tipo silvestre (WT) seguirán la distribución normal y podrán ser diferenciadas de las tipo no silvestre (NWT) al restarle entre 2 y 3 desviaciones standard al valor pico de la porción derecha de la gráfica (Kronvall y Smith, 2016).

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Caracterizar genotípicamente la resistencia antimicrobiana de las especies de *Vibrio* spp. prevalentes en camarones blancos (*Litopenaeus vannamei*) de cultivo en el departamento de Tumbes.

IV.2. Objetivo específico

- Establecer puntos de corte epidemiológicos para la prueba de difusión en agar a 28°C contra *Vibrio* spp. Enfrentados a ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina, enrofloxacin, cloranfenicol y trimetropin/sulfametoxazol.
- Identificar a nivel de clado los aislados resistentes del genero *Vibrio* mediante la secuenciación y comparación del gen16S con la base de datos de EZBioCloud.
- Determinar el perfil de resistencia fenotípica a ampicilina, tetraciclina, oxitetraciclina, enrofloxacin, cloranfenicol y trimetropin/sulfametoxazol de los vibrios aislados mediante la de prueba de difusión en agar.
- Identificar los principales genes de resistencia antimicrobiana contra tetraciclinas y cloranfenicol presentes en las cepas de *Vibrio* spp. estudiadas mediante la técnica de PCR de punto final.

V. HIPÓTESIS

Al menos el 30% de cepas de *Vibrio* spp. estudiadas podrá ser clasificada como tipo no silvestre contra oxitetraciclina (NWT_{OTC}) o cloranfenicol (NWT_C); además la resistencia a oxitetraciclina será mediada por genes tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(S) o tet(M) y la resistencia a cloranfenicol por los genes catI catII, catIII y catIV; los cuales han sido previamente reportados en el género *Vibrio* y son abundantes en los ambientes asociados a la acuicultura.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Diseño del estudio

Estudio de naturaleza observacional de tipo transversal.

VI. 2 Lugar de estudio

Las técnicas microbiológicas fenotípicas del estudio se realizaron en los laboratorios de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y el laboratorio de la oficina desconcentrada del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES); las técnicas moleculares y el análisis de datos se realizaron en el laboratorio de microbiología del Instituto de Acuicultura del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela (Galicia, España).

VI.3. Recolección de muestras

Se recolectó el total de cepas de *Vibrio* spp. provenientes de la región tumbes en el cepario del laboratorio de la oficina desconcentrada de SANIPES en Tumbes, estas fueron aisladas entre los meses de octubre (2017) y julio (2018) como parte del plan de monitoreo sanitario para la detección de enfermedades de notificación obligatoria ante la OIE en pozas con eventos de mortalidad o enfermedad reciente.

VI.4 Técnicas y procedimientos

VI.4.1. Reactivación y verificación de pureza

Se reactivaron las cepas en agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) al 2.5% de NaCl a 28°C por 18 horas y se verificó la congruencia de la fermentación de sacarosa con los registros del cepario. Los aislados recuperados fueron sembrados en agar tripticasa de soya (TSA) al 2.5% de NaCl y sometidos a las pruebas de catalasa y oxidasa; adicionalmente se verificó su motilidad y se les realizó una

tinción Gram.

VI.4.2. Determinación fenotípica de la resistencia antimicrobiana

Se empleó la prueba de difusión en agar siguiendo las recomendaciones del documento VET03-A del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2006), específico para bacterias aisladas de animales acuáticos. Se utilizaron discos comerciales (Oxoid, UK) de ampicilina (AMP, 10µg), tetraciclina (TET, 30µg), oxitetraciclina (OTC, 30µg), enrofloxacino (ENR, 5µg), cloranfenicol (C, 30µg) y trimetoprim/sulfametoxazol (SXT, 1.25/23.75 µg) y se midieron los halos de inhibición después de 24 horas de incubación a 28°C en agar Muller Hinton con una regla transparente de 20cm. Todas las pruebas se realizaron en paralelo con las cepas control *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *Aeromona salmonicida subsp. salmonicida* ATCC® 33658.

A falta de un criterio interpretativo para el punto de quiebre clínico en el género *Vibrio* aprobado por el CLSI en el documento VET03/VET04-S2 las cepas fueron clasificadas como tipo silvestre (WT) y tipo no silvestre (NWT) en función del diámetro de los halos de inhibición y los puntos de corte epidemiológicos (CO_{WT}) generados mediante la aplicación del método de interpretación de resistencia normalizada (NRI), en donde las cepas WT se encuentran distribuidas a no más de -2.5 desviaciones estándar del pico derecho de la gráfica y las NWT se encontraran en la porción izquierda de esta (Kronvall *et al.*, 2003.).

En las pruebas en las que no se pudo obtener un CO_{WT} se propuso uno, de manera tentativa, modificando la precisión proyectada de la prueba en el programa “Automatic NRI calculations for disc zone histograms” (Kronvall y Smith, 2016).

VI.4.3. Preservación y movilización de muestras

Las cepas clasificadas como tipo no silvestre frente a oxitetraciclina (NWT_{OTC}) y cloranfenicol (NWT_C) fueron inoculadas y transportadas en viales de tapa rosca con caldo marino suplementado con 8g/l de agar microbiológico a temperatura ambiente y protegido de la luz hasta el laboratorio de microbiología del Instituto de Acuicultura del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela (Galicia, España).

VI.4.4. Extracción y cuantificación de ADN

Las cepas transportadas fueron sembradas en agar marino y cultivadas a 25°C por 24 horas. Las colonias obtenidas fueron suspendidas en viales con 1 ml de agua destilada estéril y centrifugadas a 12'000 rpm por un minuto, luego se les extrajo el sobrenadante y se les añadió 200 µl de matriz InstageneTM (Bio-Rad, USA) para incubarlas a 56°C por 30 minutos. Después de la incubación, los viales fueron agitados en un vortex a alta velocidad por 10 segundos y calentados por 8 minutos en agua hirviendo, luego se volvieron a agitar en un vortex a alta velocidad por 10 segundos y finalmente se centrifugaron a 12'000 rpm por 2 minutos. (Inserto del Instagene matrix, LIT544 Rev G)

El ADN obtenido fue cuantificado con un fluorómetro Qubit, utilizando el kit comercial QubitTM dsDNA BR; y almacenado en alícuotas de 30ng/ul de ADN a -20°C hasta el momento de su utilización.

VI.4.5. Amplificación del gen 16S rRNA

Se realizó mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) de punto final utilizando los pares de primers 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGTCTCAG -3') – 1510R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT -3') y pA (5'- AGAGTTTGATCC

TGGTCTCAG -3') – pH (AAGGAGGTGATCCAGCCGCA), los cuales producen amplicones de aproximadamente 1500 bp. Para la reacción se utilizaron 12.5ul de Thermo Scientific PCR Master Mix (2X) (0.625 U Taq polimerasa, 4 mM MgCl₂ y 0.4mM de cada dNTP), 1 ul (30ng) de ADN y 20pmol de cada primer. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos, (Lane *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1997). Se utilizó como control positivo la cepa Vs-58, del cepario del laboratorio de bacteriología del CIBUS.

VI.4.6. Amplificación del gen *ftsZ*

Como medida alternativa para la identificación molecular de las cepas presuntivas de *Vibrio* spp. en las que no se logró amplificar el gen 16S con los primers universales previamente descritos; se amplificó el gen *ftsZ* con el fin de secuenciarlo; para esto se utilizaron los primers *ftsZ*75F (5'-GCTGTGAACACATGGTACG -3') y *ftsZ*800 (5'-GCACCAGCAAGATCG ATATC -3') los cuales producen amplicones de 697 pb. La reacción utilizó 12.5ul de Thermo Scientific PCR Master Mix (2X) (0.625 U Taq polimerasa, 4 mM MgCl₂ y 0.4mM de cada dNTP), 1ul (30ng) de ADN y 20pmol de cada primer. Las condiciones del PCR consistieron en una fase de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50.5°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos (Sawabe *et al.*, 2007).

VI.4.7. Detección de los genes de resistencia

Se utilizaron cuatro protocolos para la amplificación de los genes de resistencia a cloranfenicol y tetraciclinas, un PCR múltiple para la amplificación de los genes

cat I, cat II, cat III y cat IV, otro para los genes tet (A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G) y dos PCR simples para los genes tet (M) y tet(S). Cada reacción utilizó 12.5ul de Thermo Scientific PCR Master Mix (2X) (0.625 U Taq polimerasa, 4 mM MgCl₂ y 0.4mM de cada dNTP), 1ul (30ng) de ADN y 20pmol de cada primer, salvo en los primers reversos de las PCR múltiples. Las condiciones para la reacción fueron las mismas que en los trabajos de los autores referenciados (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de primers utilizados para la detección de genes de resistencia

<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>	<i>Gen</i>	<i>Amplificación (pb)</i>	<i>Ref.</i>
<i>C-R</i>	CCATCACATACTGCATGATG			
<i>C-1</i>	GGTGATATGGGATAGTGTT	cat I	349	Yoo et al. 2003
<i>C-2</i>	GATTGACCTGAATACCTGGAA	cat II	567	
<i>C-3</i>	CCATACTCATCCGATATTGA	cat III	275	
<i>C-4</i>	CCGGTAAAGCGAAATTGTAT	cat IV	451	
<i>TETF</i>	GCGCTNTATGCGTTGATGCA			
<i>TAR</i>	ACAGCCCGTCAGGAAATT	tet (A)	387	
<i>TBR</i>	TGAAAGCAAACGGCCTAA	tet(B)	171	Jun et al. 2004
<i>TCR</i>	CGTGCAAGATTCCGAATA	tet(C)	631	
<i>TDR</i>	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	tet(D)	484	
<i>TER</i>	ATGTGTCCTGGATTCCT	tet(E)	246	
<i>TGR</i>	ATGCCAACACCCCGGCG	tet(G)	803	
<i>tet(M)-FW</i>	GTAAATAGTGTTCTTGGAG	tet(M)	656	Kim et al. 2013
<i>tet(M)-RV</i>	CTAAGATATGGCTCTAACAA			
<i>tet(S)-FW</i>	CATAGACAAGCCGTTGACC	tet(S)	667	2013
<i>tet(S)-RV</i>	ATGTTTTTGGACGACAGAG			

VI.4.8. Lectura de la amplificación del PCR

Los productos del PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 5ul de solución de tinción de ácido nucleico RedSafe™. La migración del ADN en el gel se dio a 110V durante 20 minutos utilizando como

marcador el FAST Ruler de rango intermedio de Thermo Scientific™ y TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acetate, 2 mM EDTA) como buffer de electroforesis. La visualización de los amplicones se hizo en un transluminador de luz ultravioleta a través del sistema de foto documentación Gel Doc XR+ (Biorad, USA).

VI.4.9. Secuenciación de genes

Los amplicones que mostraron bandas del tamaño esperado fueron enviados a secuenciar al servicio de secuenciación Sanger de STAB VIDA (Vairão, Portugal) en placas de micropocillos con 20ul del producto del PCR sin purificar junto con viales de 1ml con los primers utilizados en la reacción. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y corregidas de manera manual utilizando el software SeqMan Pro (Versión 7.1.0 (44.1) – DNASTAR, Lasergene y guardadas en formato FASTA.

VI.5. Análisis de datos

VI.5.1 Aplicación del método de interpretación de resistencia normalizada (NRI)

Con el fin de establecer puntos de corte epidemiológicos para la interpretación de las cepas en tipo silvestre y tipo no-silvestre se llevó a cabo un análisis NRI mediante el programa “Automatic NRI calculations for disc zone histograms” disponible online en <http://www.bioscand.se/nri/> por cortesía de P. Smith, W. Finnegan y G. Kronvall con el permiso del titular de la patente, Bioscand AB, TÄBY, Suecia (Patente europea No 1383913, Patente Estadounidense No. 7,465,559). En él se colocaron las frecuencias del diámetro de inhibición para cada antibiótico y se generaron histogramas con un criterio interpretativo específico para la muestra.

VI.5.2. Afiliación filogenética de los aislados de *Vibrio* spp. NWTorc

Las secuencias del gen 16S rRNA corregidas fueron alineadas con las secuencias de especies de *Vibrio* depositadas en el servidor de EzBioCloud con las que guardaban mayor nivel de coincidencia y se construyó un árbol filogenético utilizando la inferencia de Neighbor Joining y el método evolutivo de Kimura-2-parametros en el programa MEGA X versión 10.0.5. Las secuencias del gen *ftsZ* corregidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en el NCBI utilizando el Basic Local Alignment Search Tool y se identificó la cepa con mayor identidad para determinar de manera preliminar la especie.

VI.5.3. Confirmación de los genes de resistencia y diversidad genética

Las secuencias obtenidas de la amplificación de los genes de resistencia fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI utilizando el BLAST® para confirmar su identidad. Adicionalmente se construyó un árbol filogenético utilizando la inferencia de Neighbor Joining y el método evolutivo de Kimura-2-parametros en el programa MEGA X versión 10.0.5 para evaluar la diversidad genética de las secuencias en las muestras del estudio.

VI.5.4. Diferencias geográficas en la frecuencia de cepas NWT y genes de resistencia

Con el fin de determinar si existe relación entre las frecuencias de cepas NWT y origen geográfico los aislados fueron clasificados en tres divisiones epidemiológicas (Norte, Centro, Sur) según el organigrama de SANIPES. Luego se aplicó la prueba de chi-cuadrado de Pearson y se le realizó un análisis post hoc bajo el enfoque de regresión múltiple (Beasley y Randall, 1995). Todos los cálculos fueron realizados en hojas de cálculo en Microsoft Excel y se determinó

significancia con valores $p < 0.01$.

VI.5.5. Almacenamiento y presentación de datos

Toda la data analizada, salvo las secuencias corregidas en formato FASTA fue almacenada en tablas dentro de libros de Microsoft Excel, guardados en ficheros en formato .XLSM. Para la presentación de datos se utilizaron histogramas y tablas de frecuencia de acuerdo a la necesidad del análisis.

VII. RESULTADOS

VII.1. Recolección, reactivación y verificación de la pureza de las muestras

Se lograron reactivar 119 cepas con las características fenotípicas principales del género *Vibrio* (bacilo curvo Gram negativo con crecimiento en agar TCBS, motil, oxidasa positivo y catalasa positivo). En total 76 cepas pertenecieron a la división Norte, 20 a la división centro y 23 a la división Sur (Divisiones representadas en la figura 1). Los detalles pueden observarse en el anexo 1. Esta data fue recodificada para su publicación a pedido del Organismo Nacional de Sanidad Pesquera – SANIPES y la información sobre la salinidad, temperatura, etapa productiva de la crianza, fecha de aislamiento y coordenadas de los estanques de los que se aislaron las bacterias se encuentra en las actas de inspección sanitaria en manos de la OD-Tumbes.

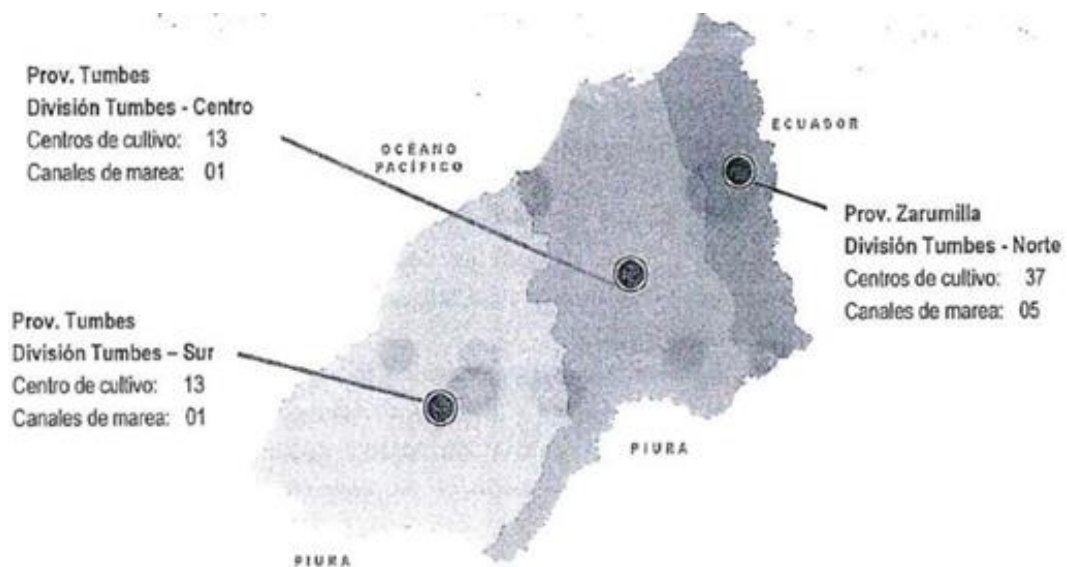


Figura 1. División de la región Tumbes en unidades epidemiológicas según SANIPES (Fuente: Informe Técnico n° 010 – 2018 – SANIPES/DSNPA).

VII.2. Distribución de los halos de inhibición y análisis NRI

La frecuencia en el diámetro de los halos de inhibición de las muestras estudiadas

siguió la distribución normal al ser enfrentados a discos de tetraciclina, oxitetraciclina, trimetropin/sulfametoxazol, cloranfenicol y enrofloxacin. Los puntos de corte epidemiológicos basados en el análisis NRI para los antibióticos analizados se describen a continuación.

VII.2.1. Punto de corte epidemiológico para la ampicilina

No fue posible proponer un CO_{wt} para vibrios enfrentados a ampicilina mediante la prueba de difusión en agar a 28°C ya que la frecuencia del diámetro de los halos de inhibición en el pico derecho del histograma no siguió la distribución normal y el número de cepas silvestres fue muy bajo (Figura 2, tabla 2).

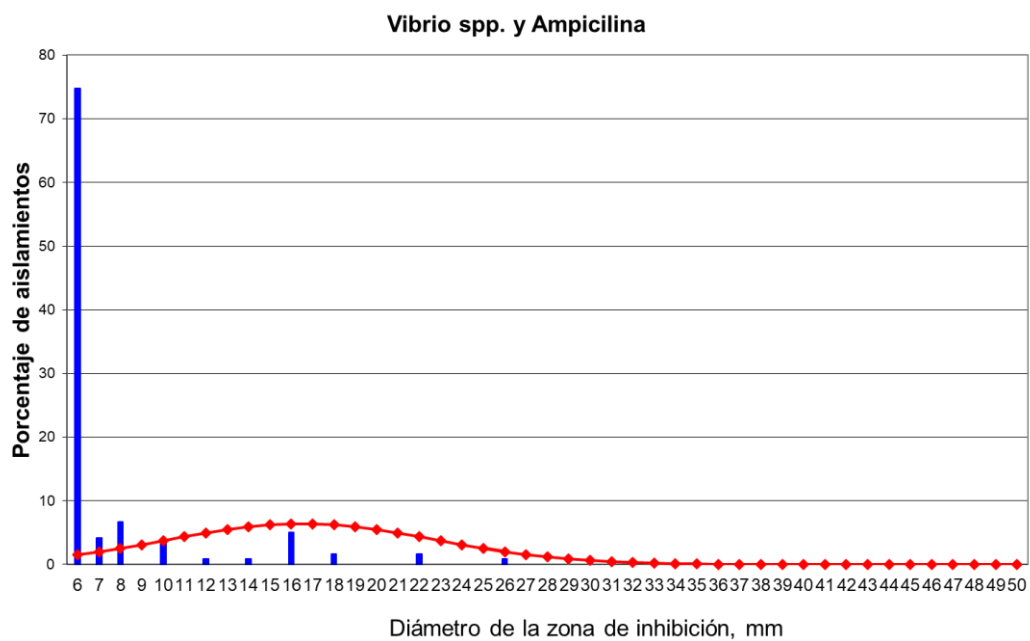


Figura 2. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a ampicilina.

Tabla 2. Resumen del análisis NRI para la ampicilina.

<i>Halo de inhibición (mm)</i>	
$WT \geq mm$	1
<i>Media</i> =	17.0193234
<i>DS</i> -2.5	1.5060073
<i>DS</i>	6.2053264

Se propuso disminuir la precisión de la prueba hasta ser equivalente a la aplicada a

22°C, bajo estas condiciones el COwt provisional se estableció en $WT \geq 7$.

VII.2.2 Punto de corte epidemiológico para la tetraciclina

Se estableció como punto de corte epidemiológico el diámetro de 18mm. Bajo esta interpretación el número de cepas NWT_{TET} es de 42.

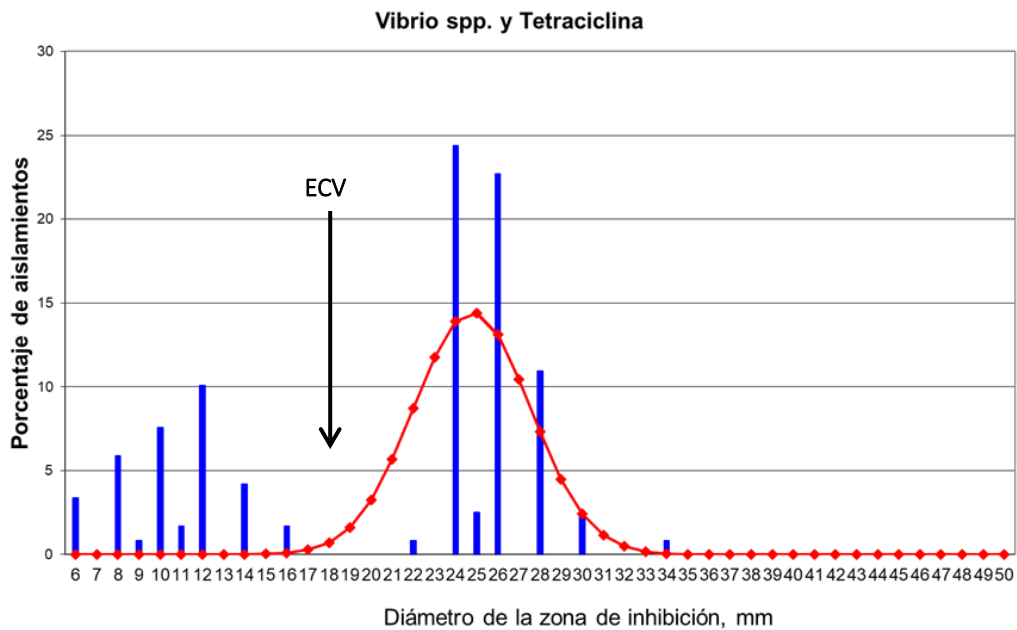


Figura 3. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a tetraciclina.

Tabla 3. Resumen del análisis NRI para la tetraciclina.

<i>Halo de inhibición (mm)</i>	
$WT \geq mm$	18
<i>Media</i> =	25.2783744
<i>DS</i> -2.5	18.4130042
<i>DS</i>	2.7461480

VII.2.3. Punto de corte epidemiológico para la oxitetraciclina

Se estableció como punto de corte epidemiológico el diámetro de 19mm. Bajo esta interpretación el número de cepas NWT_{OTC} fue de 42, estas fueron las mismas que fueron clasificadas como tipo no silvestre contra la tetraciclina en este trabajo.

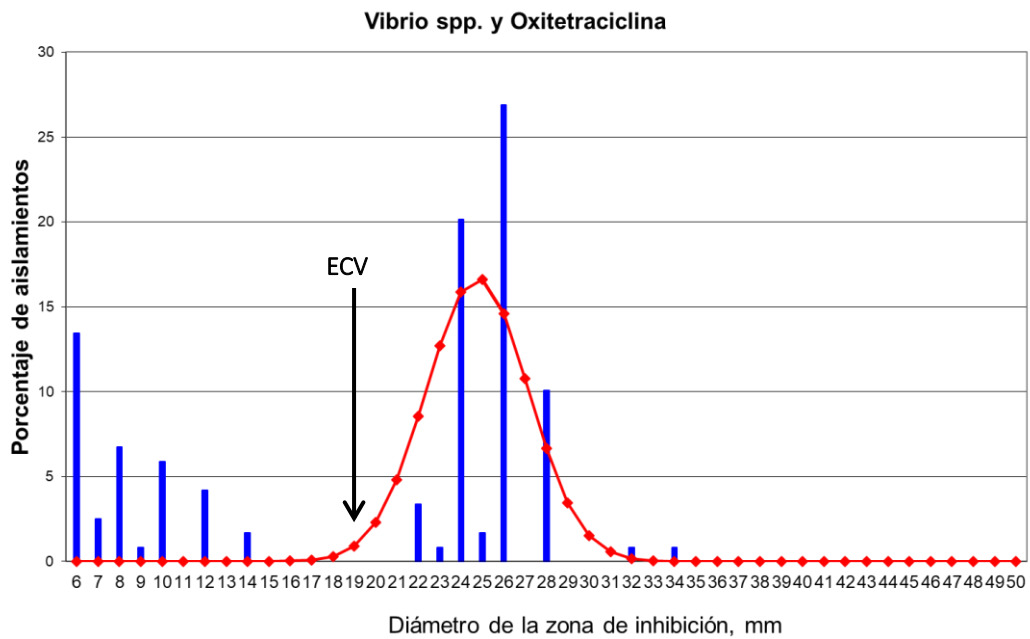


Figura 4. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a oxitetraciclina.

Tabla 4. Resumen del análisis NRI para la oxitetraciclina.

<i>Halo de inhibición (mm)</i>	
<i>WT</i> \geq mm	19
<i>Media</i> =	25.26580928
<i>DS</i> -2.5	19.33793934
<i>DS</i>	2.37114797

VII.2.4. Punto de corte epidemiológico para el trimetopin/sulfametoxazol

Se estableció como punto de corte epidemiológico el diámetro de 15mm (figura 2 y tabla). Bajo esta interpretación un aislado con zona de inhibición de diámetro 14mm fue clasificado como NWT; sin embargo, si se decide cambiar el límite de DS -2.5 que asegura la inclusión del 99.4% de las cepas WT a un DS -3 que asegura la inclusión del 99.9% de cepas WT esta dejaría de ser clasificada como NWT.

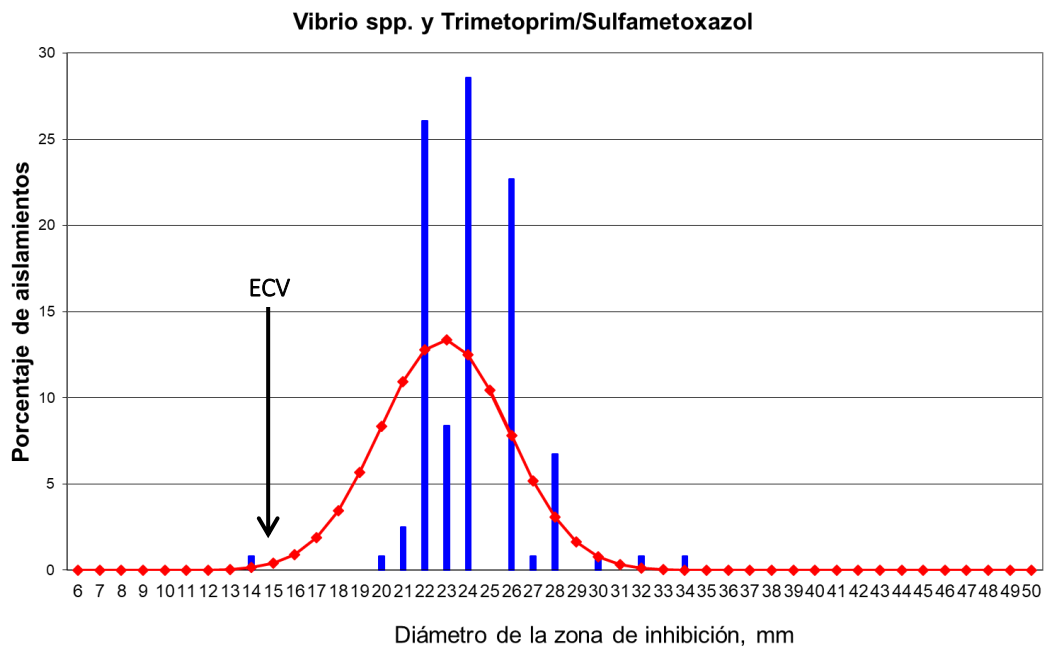


Figura 5. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a trimetoprim/sulfametoxazol.

Tabla 5. Resumen del análisis NRI para el trimetoprim/sulfametoxazol.

<i>Halo de inhibición (mm)</i>	
<i>WT</i> \geq mm	15
<i>Media</i> =	23.40029672
<i>DS</i> -2.5	15.98441211
<i>DS</i>	2.96635384

VII.2.5. Punto de corte epidemiológico para el cloranfenicol

Se estableció como punto de corte epidemiológico el diámetro de 17 mm. Bajo esta interpretación todas las cepas fueron clasificadas WT.

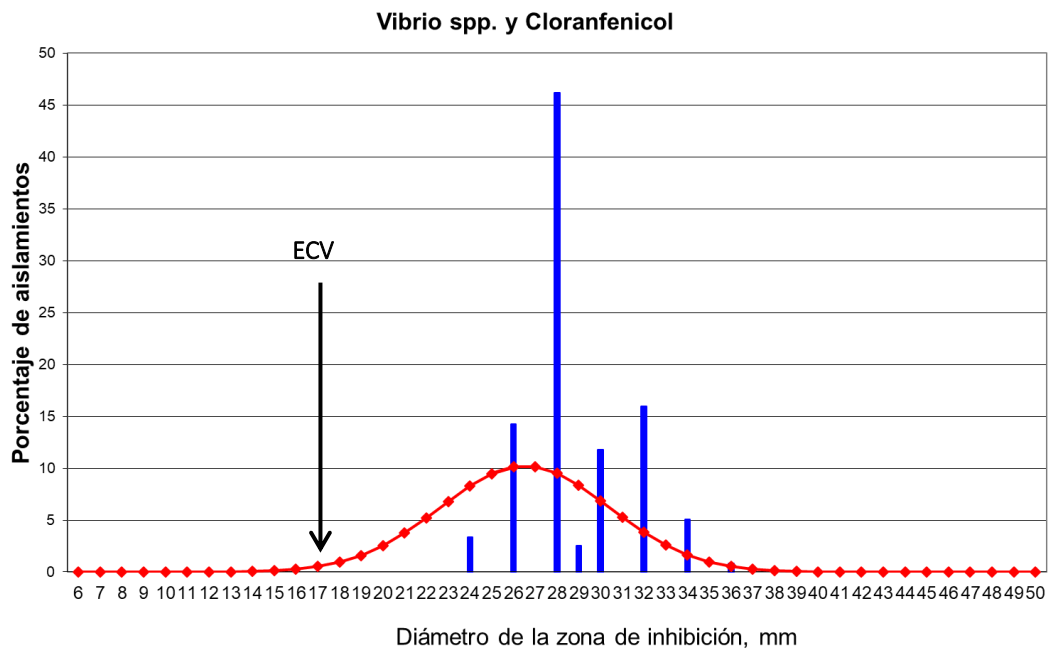


Figura 6. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a cloranfenicol.

Tabla 6. Resumen del análisis NRI para el cloranfenicol

<i>Halo de inhibición (mm)</i>	
<i>WT</i> ≥ mm	17
<i>Media</i> =	27.017180827
<i>DS</i> -2.5	17.280268448
<i>DS</i>	3.894764951

VII.2.6. Punto de corte epidemiológico para la enrofloxacin

Se estableció como punto de corte epidemiológico el diámetro de 15mm. Bajo esta interpretación solo 1 cepa es considerada NWT.

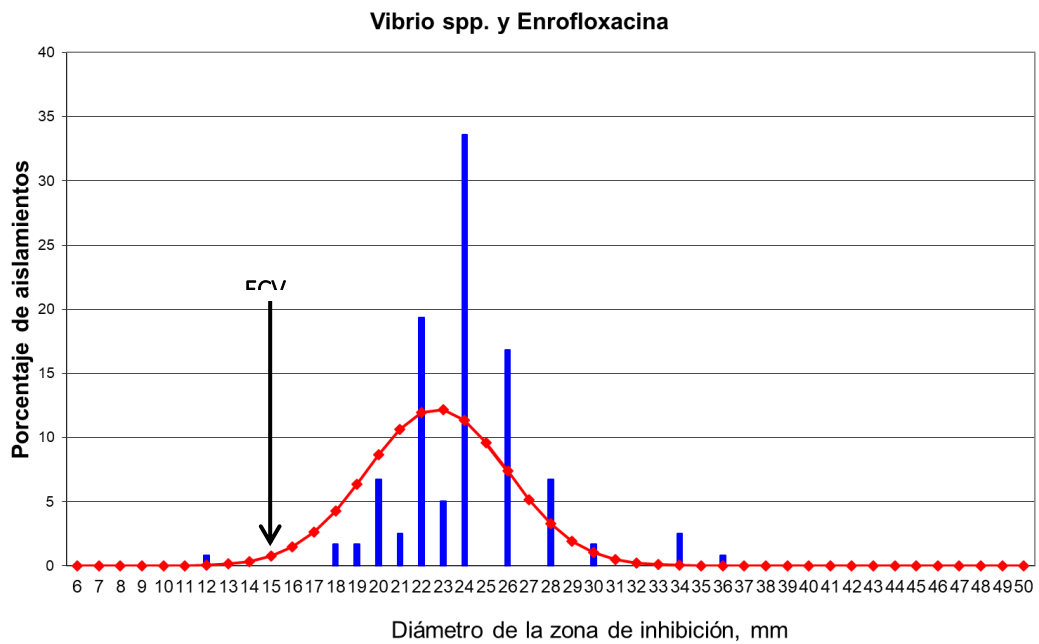


Figura 7. Histograma del diámetro de los halos de inhibición frente a enrofloxacin.

Tabla 7. Resumen del análisis NRI para la enrofloxacin.

<i>Halo de inhibición (mm)</i>	
<i>WT</i> \geq mm	15
<i>Media</i> =	23.221955119
<i>DS</i> -2.5	15.104410531
<i>DS</i>	3.247017835

VII.3. Resistencia antimicrobiana in vitro

Los antibiogramas permitieron identificar 5 perfiles de bacterias NWT en las cepas estudiadas: AMP-TE-OT-ENR (1/119); AMP-TE-OT (31/119), AMP-SXT (1/119), TE-OT (11/119) y AMP (62/119); solo 13 cepas fueron clasificadas como WT frente a todos los antibióticos probados (tabla 8). La interpretación de los resultados de la prueba de difusión en agar se muestran en la tabla 9.

Tabla 8. Perfiles de resistencia identificados en las cepas estudiadas.

<i>Perfil de resistencia</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
AMP-TE-OT-ENR	1	0.84 (0.15 – 4.61)
AMP-TE-OT	31	26.050 (19 – 34)
AMP-SXT	1	0.840 (0.15 – 4.61)
TE-OT	11	9.244 (5.24 – 15.80)
AMP	62	52.101 (43.20 – 60.87)
WT_(AMP-TE-OT-ENR-SXT-C)	13	10.924 (6.50 – 17.80)
Total	119	100.000

(CI = 0.95)

Tabla 9. Interpretación del diámetro de los halos de inhibición obtenidos mediante la prueba de difusión en agar a 28°C.

<i>Antibiótico</i>	<i>WT</i>		<i>NWT</i>	
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>
<i>AMP</i>	28	23.53 (16.81 – 31.90)	91	76.47 (68.10 – 83.19)
<i>TE</i>	77	64.71 (55.78 – 72.71)	42	35.29 (27.29 – 44.22)
<i>OT</i>	77	64.71 (55.78 – 72.71)	42	35.29 (27.29 – 44.22)
<i>SXT</i>	118	99.16 (95.39 – 99.85)	1	0.84 (0.15 – 4.61)
<i>C</i>	119	100	0	0 (0 -2.5)
<i>ENR</i>	118	99.16 (95.39 – 99.85)	1	0.84 (0.15 – 4.61)

(CI = 0.95)

VII.4. Identificación molecular de las cepas NWT_{OTC}

La amplificación y secuenciación del gen 16S permitió confirmar 28 cepas como *Vibrio spp.* cercanas al clado Harveyi (Figura 8). Los taxones con mayor grado de similitud con las cepas fueron *Vibrio owensii* (N=13), *Vibrio alginolyticus* (N=11), *Vibrio hyugaensis* (N=2), *Vibrio campbellii* (N=1) y *Vibrio harveyi* (N=1). No se logró amplificar con éxito el gen 16S en el resto de cepas estudiadas por lo que se optó por amplificar y secuenciar el gen *ftsZ* para identificarlas molecularmente. Las secuencias del gen *ftsZ* guardaron más de un 99.5% de identidad y 99.9% de cobertura con las cepas de *Vibrio Parahaemoliticus* de las que se dispone el cromosoma 1 completamente secuenciado.

Tabla 10. Resumen de la identificación molecular basada en la secuenciación del gen 16S rRNA y el ftsZ.

<i>Especie</i>	<i>Numero de aislados (n)</i>	<i>Porcentaje (%)</i>
<i>V. Owensii</i>	13	33.952 (19.07 – 46.03)
<i>V. Alginolyticus</i>	11	26.190 (15.30 – 41.07)
<i>V. Parahaemoliticus</i>	14	33.333 (21.01 – 48.45)
<i>V. Hyugaensis</i>	2	4.762 (1.32 – 15.79)
<i>V. Campbellii</i>	1	2.381 (0.42 – 12.32)
<i>V. Harveyi</i>	1	2.381 (0.42 – 12.32)
Total	42	100.00

(CI = 0.95)

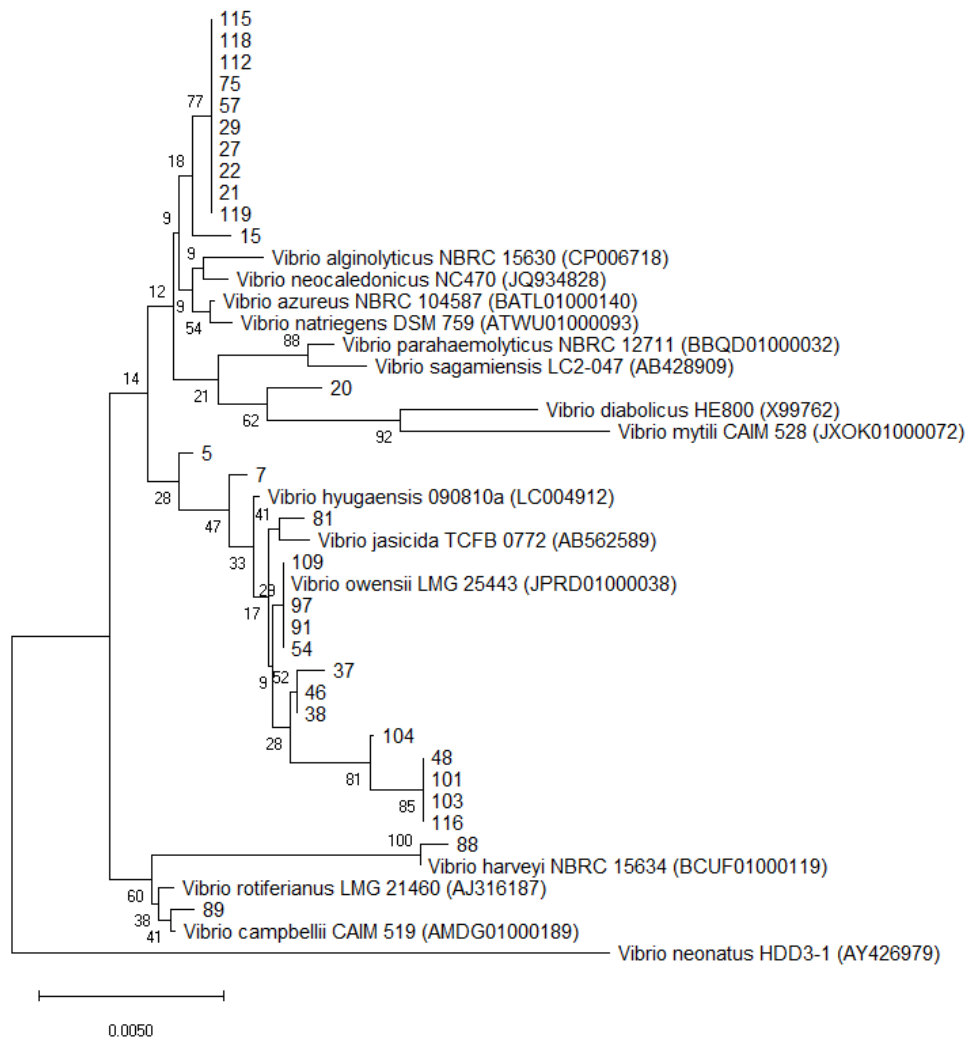


Figura 8: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16S rRNA de las cepas resistentes a

tetraciclinas, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

VII.5. Detección y confirmación de los genes de resistencia

Se logró caracterizar molecularmente la resistencia a tetraciclina de 39 cepas de vibrios de las cuales 28 contuvieron el gen tet(B) y 11 el gen tet(A). Las regiones secuenciadas de cada gen mostraron estar altamente conservadas (100% y 99.8% de identidad) al ser comparadas con las secuencias de referencia depositadas en el GenBank del NCBI.

Tabla 11. Frecuencias de genes de resistencia en Tumbes

<i>Gen</i>	<i>Frecuencias (%)</i>
<i>Tet(A)</i>	68.29% (54.05 - 82.54%)
<i>Tet(B)</i>	26.83% (13.27%, 40.39%)
<i>NC</i>	4.88% (0.00%, 11.47%)
<i>Total</i>	41

CI = 0.95

IV.5. 1 Análisis de las secuencias parciales del gen tet(A)

No se detectaron mutaciones en las porciones secuenciadas del gen tet(A) de nuestras muestras; se tomó como referencia la secuencia del tet(A) del plásmido pSS4 de la *Shigella sonnei* (código de acceso: AF534183). El árbol filogenético muestra que todas las secuencias obtenidas se encuentran relacionadas a porciones del gen tet(A) de diferentes orígenes (figura 9).

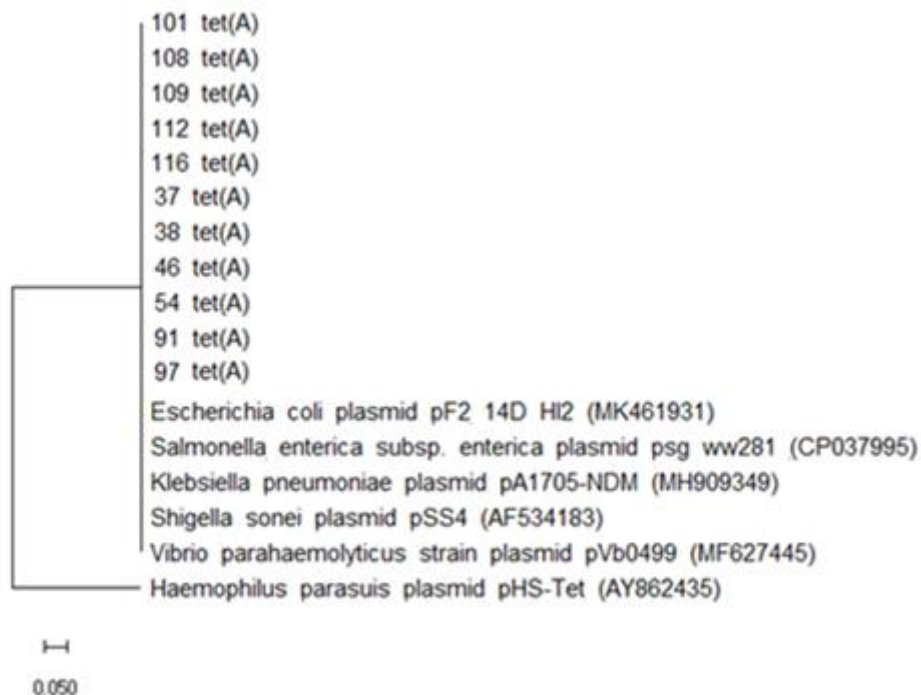


Figura 9: Árbol filogenético basado en las secuencias del gen tet(A) de las cepas resistentes a tetraciclinas, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

VII.5. 2 Análisis de las secuencias parciales del gen tet(B)

Se identificó 1 mutación puntal común a todas las cepas de nuestro estudio, esta consistió en una sustitución de T→G en el sitio 216 correspondiente al codón 72 del tet(B). Esta mutación es de tipo silenciosa ya que no afecta la síntesis de aminoácidos en la proteína que codifica. Se tomó como referencia la secuencia del tet (B) del plásmido pHS-Tet del *Haemophilus parasuis* (código de acceso: AY862435). El árbol filogenético muestra que todas las secuencias obtenidas se encuentran relacionadas a porciones del gen tet(B) de diferentes orígenes (figura 10).

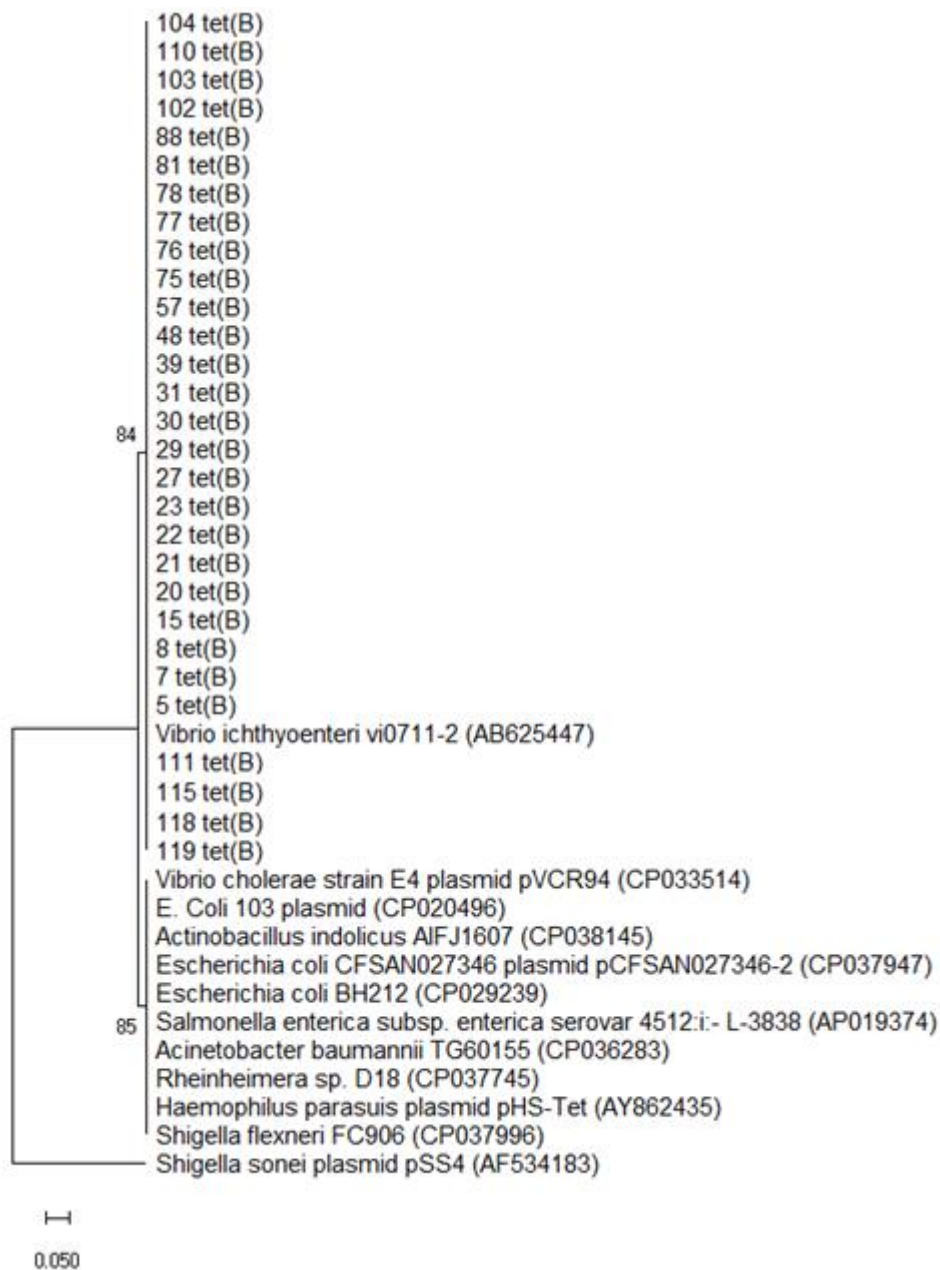


Figura 10: Árbol filogenético basado en la secuencia del gen tet(B) de las cepas resistentes a tetraciclinas, obtenido mediante el método Neighbour Joining. La barra indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de bootstrap iguales o mayores al 50% como porcentaje de 1000 pseudorélicas.

No se detectaron los genes tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(M) ni tet(S) en ninguna de las muestras estudiadas. Dos cepas NWT_(OT-OTC) resultaron negativas a todos los genes de resistencia evaluados por este estudio, por lo que no se pudieron identificar los determinantes genéticos que confieren resistencia en estas cepas.

VII.6. Diferencias geográficas en la frecuencia de resistencia antimicrobiana y genes de resistencia

La frecuencia de cepas NW_{TOTC} en las regiones epidemiológicas centro y norte fueron significativamente mayores a las de la región sur ($p < 0.01$).

Tabla 12. Distribución geográfica de las cepas en función de su fenotipo contra oxitetraciclina.

<i>Origen</i>	<i>W_{totc}</i> <i>N = 77</i> %	<i>NW_{totc}</i> <i>N = 42</i> %
<i>Norte</i>	58.44 (47.29 – 68.79) ^a	73.81 (58.93 – 84.70) ^a
<i>Centro</i>	12.99 (7.21 – 22.28) ^b	23.81 (16.81 – 31.90) ^b
<i>Sur</i>	28.57 (19.69 – 39.49) ^c	2.38 (0.42 – 12.32) ^c

$p = 0.0019$
CI = 0.95

El genotipo tet(B) fue el más común en las regiones norte y centro. Aunque se detectó un aumento de la frecuencia de tet(A) en función del acercamiento del origen de la cepa hacia el norte, este no es estadísticamente significativo; donde sí existió una diferencia en la frecuencia fue en el gen tet(B) al comparar su frecuencia entre regiones (Tabla 13). No se logró caracterizar el determinante genético responsable del fenotipo WT_{TOTC} en 2 de las cepas del norte.

Tabla 13. Distribución geográfica de las cepas en función de su genotipo contra oxitetraciclina.

<i>Origen</i>	<i>tet(A)</i> <i>N = 11</i> %	<i>tet(B)</i> <i>N = 29</i> %	<i>Sin caracterizar</i> <i>N = 2</i> %
<i>Norte</i>	63.63 (35.38 – 84.83) ^a	75.86 (57.89 – 87.78) ^a	100 ^a
<i>Centro</i>	27.27 (9.75 – 56.56) ^a	24.13 (12.22 – 42.11) ^b	0 (0 – 76.6) ^b
<i>Sur</i>	9.09 (1.62 – 37.73) ^a	0 (0 – 9.8) ^c	0 (0 – 76.6) ^b

$p = 0.646$
CI = 0.95

VIII. DISCUSIÓN

Los métodos de aislamiento utilizados por el laboratorio de la oficina desconcentrada de SANIPES en Tumbes permitieron que el total de cepas recuperadas para este estudio pertenecieran al género *Vibrio* (119 confirmadas por características fenotípicas y de estas 42 por secuenciamiento); lamentablemente no todas las muestras recolectadas fueron cultivables (90 viales no mostraron crecimiento en TCBS), por lo que las observaciones en las regiones centro y sur se vieron comprometidas. A pesar de esta situación el análisis estadístico fue capaz de identificar diferencias significativas entre la frecuencia de cepas tipo no silvestres frente tetraciclina en la región norte y centro con la región sur.

El análisis NRI aplicado al conjunto de datos obtenidos en los antibiogramas permitió establecer puntos de corte epidemiológicos en la mayoría de antibióticos probados para la clasificación de las cepas en tipo silvestre y no silvestre; esta propuesta guarda coherencia con la detección molecular de genes de resistencia de la muestra y permite ajustar los límites a una realidad local y utilizar los datos en estudios de vigilancia comparativa (Kronvall et al., 2003, Kronvall y Smith, 2014). Un error común al interpretar los resultados de los antibiogramas obtenidos de aislados acuáticos es aplicar la clasificación “resistente, intermedio, sensible” ya que esta se refiere a un punto de quiebre clínico validado en los animales (Miller, 2010). En la actualidad no existen puntos de quiebre clínicos para patógenos de animales acuáticos aprobados por el CLSI salvo los de oxitetraciclina y ácido oxolinico al ser enfrentados contra una *Aeromonas salmonicida* (CLSI 2016).

La frecuencia de cepas NWT_{OTC} en el norte y centro de Tumbes guarda relación con los hallazgos de Sperling et al., 2015 y Mendoza et al., 2016. Es posible que

esto se deba a la importación de post-larvas o al arrastre de corrientes marinas desde Ecuador, país donde se reporta que más del 50% de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de langostinos son resistentes a estos antibióticos (Evans y Tveteras, 2011; Sperling *et al.*, 2015).

Otro factor que podría estar influenciando estos resultados sería la contaminación del Río Tumbes por metales pesados como el Cr, Cu, Hg y Zn (Marshall *et al.*, 2018). En la actualidad se sabe que las bacterias incrementan su tasa de mutación en presencia de concentraciones sub-inhedoras de Zn y Cu y por consiguiente la de clones mutantes *de novo* resistentes a antibióticos; además el Cu, Cr, y el Zn facilitan la transferencia horizontal de plásmidos de resistencia a antibióticos en el agua (Gullberg *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Asimismo, existe una asociación entre los genes tet(A) y tet(B) con los del operón *mer* que confiere resistencia a Hg, coincidentemente, los de mayor frecuencia en las muestras estudiadas (Roberts, 2012).

Tampoco se puede descartar la posibilidad de que las malas prácticas en el uso de sustancias veterinarias sean más habituales en las regiones centro y sur ya que actualmente el único requerimiento para la compra de alimentos medicados para langostinos es una prueba de PCR positiva a la bacteria tipo rickettsia *Candidatus Hepatobacter penaei*, responsable de la hepatopancreatitis necrotizante (NHP); aunque solo está permitida la venta de piensos medicados con oxitetraciclina o florfenicol, razón por la que se intentó caracterizar molecularmente en este estudio los mecanismos moleculares de resistencia a estos antibióticos.

Según el portal de transparencia del PRODUCE, las regiones centro y norte son las que más antibióticos adquieren y en las que los proveedores reportan más ventas,

desafortunadamente esta información contiene incongruencias por lo que se podría esperar que el consumo real de estas sustancias sea mayor en la región sur (PRODUCE, 2019).

En cualquier caso, los estudios geomorfológicos en el delta del río Tumbes indican que la corriente costera arrastra el agua de la unidad epidemiológica Centro hacia el norte; por lo que la región sur no estaría siendo influenciada por la contaminación de metales pesados del agua del Río Tumbes y tendría un factor de riesgo menos para el desarrollo de resistencia antimicrobiana en sus granjas (Mamani, 2016).

La baja frecuencia de resistencia en la región sur puede deberse al grado de tecnificación y las medidas de control que se han implementado en los últimos años: muchos productores locales reportan haber abandonado el uso de antibióticos a favor de la aplicación de cepas pro-bióticas como medida profiláctica para evitar las mortalidades (Carrillo, comunicación personal, 2018). A la fecha estas técnicas aún no han sido validadas por alguna autoridad sanitaria sin embargo existe evidencia de que la competencia de cepas sin predisposición a adquirir RAM puede reducir las copias de genes de resistencia en un ambiente contaminado (Caselli *et al.*, 2016).

La ausencia de cepas NWT_C en este estudio permite estimar una frecuencia máxima de 5.59% con un 99.9% de confianza, cifra superior a la prevalencia mínima estimada desde el trabajo de Rosado, 2018; en la que se aislaron 57 cepas de *Vibrio* spp. de langostinos de Tumbes y de las cuales 11 fueron clasificadas como resistentes a cloranfenicol por lo que no habría incongruencias entre nuestros hallazgos (de Blas, 2006).

La baja frecuencia de cepas NWT_{SXT} y NWT_{ENR} guardan relación con los hallazgos

de Sperling *et al.*, 2015 y Rosado, 2018, desafortunadamente los diámetros de los halos de inhibición de estos estudios no se encuentran disponibles y fueron obtenidos bajo las recomendaciones del documento M45-A del CLSI específico para bacterias poco frecuentes o fastidiosas e interpretados bajo el transcrito del M100S específico para enterobacterias, por lo que las comparaciones deben tomarse con cautela.

Al tener acceso a 5 cepas resistentes a cloranfenicol del trabajo de Rosado, 2018, no se pudieron detectar los genes *catI*, *catII*, *catIII*, *catIV* pero sí el gen *tet(D)*; lamentablemente al amplificar y secuenciar el gen 16S rRNA de la cepa portadora esta resulto tener un 99.65% de similitud con el *Acinetobacter pittii* ATCC® 19004 (código de acceso: APQP01000001) por lo que no podemos afirmar la presencia del *tet(D)* en vibrios de Tumbes, pero sí en otros géneros de gamaproteobacterias.

Adicionalmente, Tarazona y colaboradores en el año 2018 identificaron una cepa de *Vibrio diabolicus* resistente a florfenicol aislada de una muestra combinada del hepatopáncreas de langostinos juveniles moribundos provenientes de una empresa langostinera de Tumbes, esto evidencia la presencia de genes distintos a los *CAT* y *cmlA* involucrados en la resistencia a fenicoles en la región (White *et al.*, 2000).

Otro hallazgo interesante fue la incapacidad de los pares de primers universales 27F-1510R y pA-pH para amplificar el gen 16S rRNA en 11 de nuestras cepas a pesar de que ningún otro estudio haya reportado antes dificultades en el uso de estos primers en el género *Vibrio*. Esto pudo deberse a sustituciones, inserciones o deleciones de bases en el inicio o final de las regiones conservadas a las que apuntaban estos primers.

Para confirmar la identidad de estas cepas se optó por amplificar y secuenciar una

porción el gen *ftsZ* que generalmente es utilizada para estudios taxonómicos en el análisis de secuencias multilocus (MLSA) de vibrios. Se escogió este gen ya que guarda una marcada diferencia filogenética con otros patógenos intestinales y además contiene variaciones que permiten la identificación de una serie de vibrios. El análisis filogenético de las secuencias de las porciones de los genes de resistencia identificados en este estudio reveló que estas regiones comparten una alta similitud con secuencias descritas en plásmidos de otras bacterias patógenas por lo que es probable que se encuentren dentro de elementos móviles y tengan capacidad conjugativa.

No se puede descartar la posibilidad de que existan más mutaciones en otras porciones de los genes *tet(A)* y *tet(B)* de las muestras estudiadas, sin embargo, a la fecha se desconocen las implicancias clínicas que podrían tener estos hallazgos.

IX. CONCLUSIONES

- El análisis NRI permitió establecer puntos de corte epidemiológicos para la clasificación de cepas de *Vibrio spp.* del clado harveyi en WT y NWT en donde la frecuencia de los diámetros de los halos de inhibición en el pico derecho de sus histogramas haya seguido la distribución normal.
- Los pares de primers universales para la amplificación del gen 16S rRNA: pA-pH, 27F-1510R y por ende el 27F-1492R no son fiables para la identificación de vibrios del departamento de Tumbes.
- Todos los *vibrios spp.* de los que se extrajo ADN en este estudio pertenecieron al *Vibrio core group*, también conocido como clado *Harveyi*.
- De acuerdo con el secuenciamiento del gen 16S se identificaron 5 especies de *Vibrio* (*V. owensii*, *V. alginolyticus*, *V. hyugaensis*, *V. campbellii* y *V. harveyi*); mientras que por el gen *ftsZ* se identificó 1 especie (*V. parahaemolyticus*).
- Existen diferencias significativas entre la frecuencia de cepas WT_{OTC} en las bacterias del género *Vibrio* de la región centro y norte con las de la región sur del departamento de Tumbes.
- La frecuencia de cepas NWT_{AMP} fue de 76.47% (91/119), 35.29% (42/119) en las cepas NWT_{TE-OT}, 0.84% (1/119) en las cepas NWT_{SXT} y 0.84% (1/119) en las cepas NWT_{ENR}.
- La frecuencia máxima de cepas NWT_c en vibrios del departamento de Tumbes no supera el 5%.
- La resistencia antimicrobiana a tetraciclinas en el género *Vibrio* del departamento de Tumbes es principalmente mediada por los genes *tet(A)* y

tet(B).

- La mutación puntual detectada en la porción secuenciada del gen tet(B) de las cepas estudiadas es de tipo silenciosa y constituye una variante de nucleótido único.

X. RECOMENDACIONES

- Continuar el monitoreo de la resistencia antimicrobiana en el género *Vibrio* junto con una política que impulse el control y disminución de los factores de riesgo para la aparición y diseminación de resistencia antimicrobiana en Tumbes.
- Adjuntar el diámetro de los halos de inhibición obtenidos en todos los estudios que utilicen la prueba de difusión en disco para determinar la sensibilidad a antibióticos.
- Debido a baja resolución del gen 16S rRNA para la identificación de vibrios a nivel de especie las técnicas de identificación molecular dependientes de secuenciamiento deberán preferir la amplificación de los genes *ftsZ*, *rpoB* u otros para analizarlos de manera individual o concatenada en caso de querer realizar un análisis multilocus de secuencias (MLSA).
- Incluir dentro de los futuros estudios de caracterización molecular las cepas fenotípicamente sensibles ya que es posible encontrar discrepancias entre la expresión fenotípica y la presencia de genes de resistencia.
- Incluir los genes *fexA*, *fexB* y *floR* en los siguientes estudios de caracterización molecular de la resistencia a fenicoles de vibrios aislados en Tumbes ya que estos son los genes más comunes que codifican resistencia a florfenicol.
- Probar más primers para la detección de genes de resistencia o mandar a secuenciar el genoma completo de las cepas en las que no se lograron identificar los determinantes genéticos involucrados en su resistencia a antimicrobianos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alfaro R, Guevara M, Gonzales I. 2010. Prevalencia y distribución de los principales agentes etiológicos que afectan los langostinos silvestres en Tumbes, Perú. *Rev. peru. biol.* 17(3): 359 – 364. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v17n3/pdf/a11v17n3.pdf>
- Atlas R, Horowitz A, Krichevsky M, Bej A, 1991. Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microb. Ecol.* 22, 249–256. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02540227>
- Baker-Austin C, Oliver J, Alam M, Ali A, Waldor M, Qadri F y Martinez-Urtaza J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1). doi: <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Baquero F, Cantón, R. 2017. Evolutionary Biology of Drug Resistance. En Mayers D, Sobel J, Ouellette M, Kaye K, Marchaim D. (eds) *Antimicrobial Drug Resistance*. Springer, Cham. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4>
- Beasley M, Schumacker E. 1995. Multiple regression approach to analyzing contingency tables: Post hoc and planned comparison procedures. *The Journal of Experimental Education*, 64(1), 79-93. doi: <https://doi.org/10.1080/00220973.1995.9943797>
- Bondad-Reantaso M, Subasinghe R, Josupeit H, Cai J, Zhou X, 2012. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: Past, present and future. *J. Invert. Pathol.* 110, 158–165. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012>.
- Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, et al. 2010. *Aquaculture:*

global status and trends. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2010) 365, 2897. doi:
<https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0170>

- Brock J, Lightner D. 1990. Diseases of crustacea - Diseases caused by microorganism. Brock Diseases of Marine Animals, Vol. III. Introduction Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata. Biologische Anstalt Helgoland Hamburg, Germany. ISBN 3-9800818-1-8.
- Brown D. 2011. EUCAST definitions (and breakpoint table, MIC and zone distribution website conventions). The EUCAST Workshop: Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST in Milano. Disponible en: http://www.eucast.org/presentations_and_statistics/eucast_at_eccmid/eucast_at_eccmid_2011/
- Caselli E, D'Accolti M, Vandini A, Lanzoni L, Camerada MT, Coccagna M, Branchini A, Antonioli P, Balboni PG, Di Luca D, Mazzacane S. (2016). Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation. *PloS one*, 11(2), e0148857. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148857>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Document VET03-A. Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals; Approved Guideline. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA. ISBN 1-56238-611-5
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2010. Document M45-

A2. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria. ISBN 1-56238- 732-4

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2014. Document VET03/VET04-2S. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria Isolated From Aquatic Animals; Second Informational Supplement. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA. ISBN 1-56238-976-9
- Dang H, Ren J, Song L, Sun S, An L. 2008. Dominant chloramphenicol-resistant bacteria and resistance genes in coastal marine waters of Jiaozhou Bay, China. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 209–217. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9458-8>
- Dang H, Zhang X, Song L, Chang Y, Yang G. 2007. Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2580–2592. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03494.x>
- de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Vallejo A. (2006) WinEpi : Working in epidemiology.
- Donhofer A, Franckenberg S, Wickles S, Berninghausen O, Beckmann R, Wilson DN.. 2012. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012Oct 16;109(42):16900-5. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>.
- Evans Y, Tveteras S. 2011. Status of Fisheries and Aquaculture Development in Peru: Case Studies of Peruvian Anchovy Fishery, Shrimp

Aquaculture, Trout Aquaculture and Scallop Aquaculture». En: Report Part of Norad/FAO project. Roma: FAO. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/fisheries/docs/Peru_-_28_April.doc

- Farmer, J. J., III. 1992. The family Vibrionaceae, p. 2938–2951. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, and applications, 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2191-1>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. pp. 200. ISSN: 1020-5489
- Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Food Safety. Fish and Fishery Products Hazards and Control Guidance, 4th ed. 2011. Disponible en: <http://www.fda.gov/FoodGuidances>
- Grand View Research, Inc., 2014. Aquaculture market analysis by culture environment (fresh water, marine water, brackish water), by product (carps, crustaceans, mackerel, milkfish, mollusks, salmon, sea bass, sea bream, trout) and segment forecasts to 2020. Disponible en: <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/aquaculture-market>
- Gullberg E, Albrecht L, Karlsson C, Sandegren L, Andersson D. Selection of a Multidrug Resistance Plasmid by Sublethal Levels of Antibiotics and Heavy Metals Bio Oct 2014, 5 (5) e01918-14 doi:

<http://doi.org/10.1128/mBio>

- Hektoen H, Berge JA, Harmazabal V, Yndeslad M. 1995. Persistence of antibacterial agents in marine sediments. *Aquaculture*. 133:175 -84. doi: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00310-K](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00310-K)
- Hilal-Dandan R, Brunton L. 2014. Goodman and Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics. McGrawHill,2007. SBN: 0071443436,9780071443432,9780071593236. Jardetzky O. 1963. Studies on the Mechanism of Action of Chloramphenicol – The Conformation of Chloramphenicol in Solution. *The Journal of Biological Chemistry*. **238** (7): 2498–2508. PMID: 13957484
- Ibarra J, Alvarado D. 20Antimicrobial resistance of clinical and environmental strains of *Vibrio cholerae* isolated in Lima-Peru during epidemics of 1991 and 1998. *Braz J Infect Dis* vol.11 no.1 Salvador. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702007000100022>.
- Jiang Y, Yao L, Li F, Tan Z, Zhai Y, Wang L. 2014. Characterization of antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from cultured sea cucumbers (*Apostichopus japonicas*). *Lett Appl Microbiol*, 59: 147–154. doi: <https://doi.org/10.1111/lam.12258>
- Jun L, Jeong J, Huh M, Chung J, Cho D, Lee C, Jeong H. 2004. Detection of tetracycline–resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea. *Aquaculture* 240:89–100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.07.025>
- Kim M, Kwon T, Jung S, Cho S, Jin S, Park N, et al. 2013. Antibiotic

- resistance of bacteria isolated from the internal organs of edible snow crabs. *PLoS ONE* 8:70887. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070887>
- Kim S, Nonaka L, Suzuki S. 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiol Lett* 237:147–156. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.026>
 - Kronvall G, Kahlmeter G, Myhre E, Galas M. 2003. A new method for normalized interpretation of antimicrobial resistance from disk test results for comparative purposes. *Clin Microbiol Infect.* Feb;9(2):120-32. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00546.x>
 - Kronvall G, Smith P. 2016. Normalized resistance interpretation, the NRI method. *APMIS* 2016; 124: 1023– 1030 doi: 10.1111/apm.12624
 - Le T, Munekage Y, Kato S. 2005. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Science of the Total Environment.* Vol 349. 95-105. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.006>
 - Letchumanan, V, Chan K, Lee L. 2014. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front Microbiol* 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705>
 - Li X, Gu Z, Ye Z, Xie B, Li D, Chen J. .2019. Sub-lethal concentrations of heavy metals induce antibiotic resistance via mutagenesis. *Journal of Hazardous Materials* (369) pp. 9–16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.006>

- Lighter D. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, ISBN : 09-624-52998
- Lucas R, Courties C, Herbland A, Gouilletquer P, Marteau A, Lemonnier H. 2010. Eutrophication in a tropical pond: understanding the bacterioplankton and phytoplankton dynamics during a vibriosis outbreak using flow cytometric analyses. *Aquaculture* 310:112–121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.022>
- Macauley J, Adams C, Mormile M. 2007. Diversity of tet resistance genes in tetracycline resistant bacteria isolated from a swine lagoon with low antibiotic impact. *Can. J. Microbiol.* 53, 1307–1315. doi: 10.1139/W07-104
- Mamani Y. 2016. Geomorfología y evolución del delta del río Tumbes. XVIII Congreso Peruano de Geología. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/313302766>
- Manavathu E, Vazquez J. 2017. The Functional Resistance of Biofilms. En: Mayers D, Sobel J, Ouellette M, Kaye K, Marchaim D. (eds) *Antimicrobial Drug Resistance*. Springer, Cham. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4_11
- Martínez A. Céspedes L. 2017. Estudio de la vulnerabilidad presente y futura ante el cambio climático en la región Tumbes Informe Técnico Especial. Repositorio Digital del IGP. Disponible en: <http://repositorio.igp.gob.pe/handle/IGP/1277>
- Mendoza S, Tinoco O, Nieto K. 2016. Evaluación de la carga bacteriana y

resistencia a antibióticos de bacterias aisladas en zonas marinas de alta influencia de producción larvaria en Ecuador. Rev del Inst de Invest FIGMMG-UNMSM 19 (38): 137-146. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/13580/11991>

- Miller R. 2010. Resistant or Susceptible May Not Always be Your Answer. Sixth International Symposium on Aquatic Animal Health. Global Strategies for a Changing Environment. Tampa, Florida USA.
- Ministerio de producción (PRODUCE). 2019. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2017. Disponible en: http://ogeiee.produce.gob.pe/images/Anuario/Pesca_2017.pdf
- Miranda C, Zemelman R. 2002. Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. Aquaculture. 212 (1-4):31-47. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00124-2)
- Noriega-Orozco L., Acedo E., Higuera I, Jiménez-Flores R, Cano R. 2007. Pathogenic and non-pathogenic *Vibrio* species in aquaculture shrimp ponds. Rev. Latinoam. Microbiol. 49:60–67
- Oliver J, Pruzzo C, Vezzulli L, Kaper J. 2013. *Vibrio* Species. p 401-439. In Doyle M, Buchanan R (ed), Food Microbiology. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555818463.ch16
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2014. Antimicrobial resistance: global 304 report on surveillance. 305 http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf

- Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES). 2016. Indicadores Sanitarios y de Inocuidad para los Productos Pesqueros y Acuícolas para Mercado Nacional y de Exportación. Resolución de Dirección Ejecutiva No 057-2016- SANIPES-DE .
- Roberts M. 2011. Mechanisms of bacterial antibiotic resistance and lessons learned from environmental tetracycline-resistant bacteria. In Antimicrobial resistance in the environment. pp 93–121. doi: <https://doi.org/10.1002/9781118156247.ch7>
- Roberts M. y Schwarz S. (2017). Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. En Antimicrobial Drug Resistance Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1 (Second Edition) Mayers D, Sobel J, Ouellette M, Kaye K, Marchaim D. (eds). Quebec, Canada, Springer
- Robertson, P. A. W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J. R., Zherdmant, M., and Austin, B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. Dis. Aquat. Org. 32, 151–155. <https://doi.org/10.3354/dao032151>
- Roque A, Molina A, Bolán M, Gómez G. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. International Journal of Antimicrobial Agents 17: 383-387. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00308-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00308-9)
- Rosado A. 2018. Rresistencia antimicrobiana de bacterias del género *Vibrio* en langostino blanco (*litopenaeus vannamei*) en centros de cultivo de la región tumbes. universidad ricardo palma - facultad de ciencias biológicas escuela profesional de ciencias veterinarias. Lima, Perú. Disponible en:

<http://repositorio.urp.edu.pe/handle/URP/1686>

- Sperling L, Alvert T, Huehn S. 2015. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Vibrio* spp. in Retail and Farm Shrimps in Ecuador. *Journal of Food Protection*, Vol. 78, No. 11, 2015, Pages 2089–2092 doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-160>
- Srinivasan V, Nam H, Nguyen L, Tamilselvam B, Murinda S, y Oliver S. 2005. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog. Dis.* 2, 201–211. doi: 10.1089/fpd.2005.2.201
- Sulca, M., Orozco, R., Alvarado, D. (2018). Antimicrobial resistance not related to 1,2,3 integrons and Superintegron in *Vibrio* spp. isolated from seawater sample of Lima (Peru). *Marine Pollution Bulletin*, 131, 370–377. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.050>
- Sung H, Li H, Tsai F, Ting Y, Chao W. 1999. Changes in the composition of *Vibrio* communities in pond water during tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultivation and in the hepatopancreas of healthy and diseased shrimp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol 236. 261-271. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00206-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00206-8)
- Takemura A, Chien D, Polz M. 2014. Associations and dynamics of vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. *Frontiers in Microbiology, Aquatic Microbiology*. Vol 5 art 33. doi: <https://10.3389/fmicb.2014.00038>
- Tendencia E, De la Pena L. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture*. 195:193 – 204. <https://doi.org/10.1016/S0044->

8486(00)00570-6

- Thompson F, Gevers D, Thompson C, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn C y Swings J. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5107–5115. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5107-5115.2005>
- Tuševljak, N, Dutil A, Rajić F, Uhland C, McClure S, St-Hilaire R, Reid-Smith, McEwen S. 2013. Antimicrobial Use and Resistance in Aquaculture: Findings of a Globally Administered Survey of Aquaculture-Allied Professionals. *Zoonoses and public health*, 60(6), 426-436. doi: <https://doi.org/10.1111/zph.12017>
- Tuyub J, Rendíz D, Rojas R, Gaxiola G, Arena M,. 2014. Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus*, 3:280. doi: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-280>
- White D, Hudson C, Maurer J, *et al.* Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli*. associated with bovine diarrhea J. *Clin. Microbiol.* 2000; 38 (12): 4593-4598. Disponible en: <https://jcm.asm.org/content/jcm/38/12/4593.full.pdf>
- Yoo M, Huh M, Kim E, Lee H, Jeong H. 2003. Characterization of chloramphenicol acetyltransferase gene by multiplex polymerase chain reaction in multidrug-resistant strains isolated from aquatic environments. *Aquaculture* 217:11–21. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00169-2)

- You K, Bong C, Lee C. 2016. Antibiotic resistance and plasmid profiling of *Vibrio* spp. in tropical waters of Peninsular Malaysia. *Environ Monit Assess.* 188:171. doi: <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5163-0>
- Zhang X, Zhang T, Fang H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotech.* 82, 397–414. doi: 10.1007/s00253-008-1829-z

Zhang Y, Gu A, Cen T , Li X, He M, Li D, Chen J. 2018. Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment *Environmental Pollution* (237) pp 74-82. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.032>

XII. ANEXOS

Anexo 1. Origen de cada cepa junto con los genes secuenciados y los resultados de la prueba de difusión en agar MH expresado como el diámetro del halo de inhibición contra cada antibiótico en cm.

<i>Cepa</i>	<i>Origen</i>	<i>Antibiótico</i>						<i>Gen</i>	
		<i>TE</i>	<i>OT</i>	<i>AMP</i>	<i>SXT</i>	<i>C</i>	<i>ENR</i>	<i>tet</i>	<i>Ident</i>
1	Norte	24	23	6	23	26	22	-	-
2	Norte	24	24	8	23	28	21	-	-
3	Norte	28	26	6	24	32	24	-	-
4	Norte	30	28	6	28	32	23	-	-
5	Norte	12	8	10	26	32	26	B	16S
6	Norte	26	26	6	26	28	24	-	-
7	Norte	10	10	6	24	30	24	B	16S
8	Norte	12	10	6	26	32	24	B	ftsZ
9	Norte	26	26	10	24	28	22	-	-
10	Norte	24	24	6	22	28	22	-	-
11	Sur	24	24	6	22	24	24	-	-
12	Sur	24	24	6	24	26	22	-	-
13	Sur	24	22	7	22	26	20	-	-
14	Sur	24	24	6	14	26	22	-	-
15	Norte	10	6	8	22	28	22	B	16S
16	Norte	26	24	6	22	28	18	-	-
17	Norte	24	24	6	23	28	19	-	-
18	Norte	28	26	6	22	28	22	-	-
19	Norte	26	26	6	22	32	19	-	-
20	Norte	6	6	6	22	32	24	B	16S
21	Norte	6	6	6	26	32	26	B	16S
22	Norte	10	6	8	28	32	28	B	16S
23	Norte	12	6	8	28	32	24	B	ftsZ
24	Norte	26	24	6	26	28	18	-	-
25	Norte	24	24	6	22	24	23	-	-
26	Norte	28	24	6	28	32	20	-	-
27	Norte	6	6	6	24	28	24	B	16S
28	Norte	24	24	6	22	28	20	-	-
29	Norte	8	6	6	22	29	22	B	16S
30	Norte	8	6	6	22	29	22	B	ftsZ
31	Norte	12	10	12	28	34	30	B	ftsZ
32	Norte	24	22	6	22	28	26	-	-
33	Norte	24	22	8	24	28	22	-	-
34	Norte	26	26	8	26	28	24	-	-

35	Norte	24	22	6	22	30	24	-	-
36	Norte	26	24	6	22	28	20	-	-
37	Norte	12	10	8	23	32	26	A	16S
38	Norte	12	10	6	24	30	24	A	16S
39	Norte	8	6	6	22	26	24	B	ftsZ
40	Norte	26	28	7	26	28	26	-	-
41	Norte	24	26	6	24	30	26	-	-
42	Norte	22	24	6	24	28	22	-	-
43	Norte	28	26	6	26	28	24	-	-
44	Norte	26	26	22	28	28	36	-	-
45	Norte	26	26	6	24	28	24	-	-
46	Norte	8	6	6	22	28	24	A	16S
47	Norte	24	24	6	22	26	24	-	-
48	Norte	14	12	6	22	26	12	B	16S
49	Norte	25	26	6	26	30	24	-	-
50	Norte	24	26	6	22	28	28	-	-
51	Norte	26	26	6	22	28	24	-	-
52	Centro	24	24	6	22	28	24	-	-
53	Centro	26	26	6	24	28	24	-	-
54	Centro	14	12	6	26	30	28	A	16S
55	Centro	26	26	6	24	28	24	-	-
56	Centro	28	28	18	26	28	26	-	-
57	Centro	12	10	6	26	30	28	B	16S
58	Centro	26	26	6	26	28	26	-	-
59	Centro	24	24	6	23	26	22	-	-
60	Sur	24	26	6	23	28	24	-	-
61	Sur	26	28	10	26	32	24	-	-
62	Sur	24	26	6	23	26	20	-	-
63	Sur	24	24	6	24	28	28	-	-
64	Sur	26	26	6	24	28	22	-	-
65	Sur	26	26	6	22	28	23	-	-
66	Sur	28	28	6	26	34	24	-	-
67	Sur	30	32	18	32	36	34	-	-
68	Sur	26	26	7	24	26	22	-	-
69	Sur	28	28	6	26	30	30	-	-
70	Sur	26	24	6	24	28	24	-	-
71	Norte	28	28	14	28	34	34	-	-
72	Norte	26	25	6	21	26	20	-	-
73	Norte	24	24	6	24	32	24	-	-
74	Norte	26	28	6	24	26	21	-	-
75	Norte	10	7	6	24	28	24	B	16S
76	Norte	12	8	7	24	32	22	B	ftsZ

77	Centro	12	8	7	23	24	28	B	ftsZ
78	Centro	12	9	6	22	28	22	B	ftsZ
79	Centro	24	24	6	20	26	20	-	-
80	Norte	28	24	6	26	28	24	-	-
81	Norte	11	8	6	23	26	24	B	16S
82	Norte	26	28	10	26	30	24	-	-
83	Norte	24	26	6	24	28	21	-	-
84	Norte	26	25	8	26	28	23	-	-
85	Norte	34	26	6	34	34	26	-	-
86	Norte	26	28	22	26	32	26	-	-
87	Norte	25	24	6	22	28	22	-	-
88	Norte	8	7	6	21	26	22	B	16S
89	Norte	10	6	6	22	28	20	SIN CAR	16S
90	Norte	24	26	6	22	28	34	-	-
91	Norte	12	14	6	24	29	26	A	16S
92	Sur	28	26	6	26	30	26	-	-
93	Sur	30	34	26	30	34	28	-	-
94	Sur	24	24	6	23	24	22	-	-
95	Sur	26	26	6	26	28	22	-	-
96	Sur	24	24	6	21	26	22	-	-
97	Sur	14	10	6	24	28	24	A	16S
98	Sur	26	26	16	24	28	24	-	-
99	Centro	24	26	6	24	30	24	-	-
100	Centro	28	28	6	26	32	26	-	-
101	Centro	12	8	6	24	30	23	A	16S
102	Centro	10	8	6	22	30	24	B	ftsZ
103	Norte	10	8	16	24	28	24	B	16S
104	Norte	9	7	6	24	32	24	B	16S
105	Norte	28	28	6	26	28	26	-	-
106	Norte	26	26	6	24	28	22	-	-
107	Norte	16	12	6	26	28	28	SIN CAR	ftsZ
108	Norte	14	12	6	24	28	24	A	ftsZ
109	Norte	14	12	6	27	32	26	A	16S
110	Norte	8	6	16	22	28	24	B	ftsZ
111	Norte	11	6	16	24	32	26	B	ftsZ
112	Norte	8	6	16	24	30	24	A	16S
113	Norte	24	26	6	24	28	26	-	-
114	Centro	28	26	6	26	26	22	-	-
115	Centro	10	6	6	22	28	23	B	16S
116	Centro	16	14	6	28	34	26	A	16S
117	Sur	25	26	6	26	28	26	-	-
118	Centro	10	8	16	24	28	6	B	16S

Anexo 2. Frecuencia de los diámetros del halo de inhibición.

<i>Diámetro</i>	<i>AMP</i>		<i>TE</i>		<i>OT</i>		<i>SXT</i>		<i>C</i>		<i>ENR</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
6	89	74.79	4	3.36	16	13.45	0	0	0	0	0	0
7	5	4.2	0	0	3	2.52	0	0	0	0	0	0
8	8	6.72	7	5.88	8	6.72	0	0	0	0	0	0
9	0	0	1	0.84	1	0.84	0	0	0	0	0	0
10	4	3.36	9	7.56	7	5.88	0	0	0	0	0	0
11	0	0	2	1.68	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0.84	12	10.08	5	4.2	0	0	0	0	1	0.84
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	1	0.84	5	4.2	2	1.68	1	0.84	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	6	5.04	2	1.68	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	2	1.68	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1.68
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1.68
20	0	0	0	0	0	0	1	0.84	0	0	8	6.72
21	0	0	0	0	0	0	3	2.52	0	0	3	2.52
22	2	1.68	1	0.84	4	3.36	31	26.05	0	0	23	19.33
23	0	0	0	0	1	0.84	10	8.4	0	0	6	5.04
24	0	0	29	24.37	24	20.17	34	28.57	4	3.36	40	33.61
25	0	0	3	2.52	2	1.68	0	0	0	0	0	0
26	1	0.84	27	22.69	32	26.89	27	22.69	17	14.29	20	16.81
27	0	0	0	0	0	0	1	0.84	0	0	0	0
28	0	0	13	10.92	12	10.08	8	6.72	55	46.22	8	6.72
29	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2.52	0	0
30	0	0	3	2.52	0	0	1	0.84	14	11.76	2	1.68
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	1	0.84	1	0.84	19	15.97	0	0
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	1	0.84	1	0.84	1	0.84	6	5.04	3	2.52
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.84	1	0.84