



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**DETECCIÓN MOLECULAR DE FACTORES
DE VIRULENCIA Y DIVERSIDAD GENÉTICA
DE *Escherichia coli* AISLADA DE CONCHA DE
ABANICO (*Argopecten purpuratus*)
PROCEDENTES DEL DEPARTAMENTO DE
ANCASH- PERÚ”.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN SANIDAD ACUÍCOLA

JOYSI CLEILA CARBAJAL RÍOS

LIMA – PERÚ

2018

Asesor de tesis: Dr. Marcos Enrique Serrano Martinez

DEDICATORIA

A mi madre Angelita, siempre apoyándome en cada una de mis decisiones y alentándome en mis nuevos retos, gracias por confiar tanto en mí.

Mi papá Genaro por guiarme y a pesar de todo siempre apoyándome.

A mis hermanos Hembler y Elder, más que hermanos, amigos.

Mi hermana Mery, mi renegona, pero una gran persona, mi amiga y cómplice, gracias por ser una súper tía.

Kelvin, mi compañero de vida, gracias por el apoyo, la confianza y estar a mi lado en todo momento.

A ti mi bebé, Anghela Nihal mi mayor bendición, desde tu llegada, siempre apoyando a mamá, todo este tiempo no ha sido fácil, pero valió la pena.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, gracias a él todo es posible.

El Dr. Luis Llanco, por los conocimientos transmitidos, amistad, consejos y por su gran paciencia.

El Dr. Enrique Serrano, por sus enseñanzas y el apoyo hacia la realización de este estudio.

André y Alessandra por la amistad y apoyo en el laboratorio.

Marelsy por la amistad y la disponibilidad de siempre apoyarnos.

A mi grupo de amigos de la maestría: Claudia, Lorena, Rosa Fernández, Rosa Villegas, Adhemir, Jeansen, Inés y Martín.

A Gustavo Olivos por su gran amistad.

A la señora Charito, siempre tan amable y servicial.

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.

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES.....	2
III.	MARCO TEÓRICO	4
3.1.	<i>Escherichia coli</i>	4
3.2.	Virulencia	4
3.3.	<i>Escherichia coli</i> diarrogénicas (DEC)	5
3.4.	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	6
3.5.	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	9
3.6.	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	10
3.7.	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	11
3.8.	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	12
3.9.	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa (DAEC)	12
3.10.	<i>Escherichia coli</i> en el Perú.....	14
3.11.	<i>Escherichia coli</i> en productos acuícolas.....	14
3.12.	Concha de abanico <i>Argopecten purpuratus</i> (Lamarck 1819).....	15
3.13.	Contaminación de ambientes marinos en la región Ancash.....	18
IV.	JUSTIFICACIÓN	19
V.	OBJETIVOS	20
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
VIII.	DISCUSIÓN	42
IX.	CONCLUSIONES	47
X.	RECOMENDACIONES.....	48
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
XII.	ANEXOS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Evolución de <i>E. coli</i> comensales y patógenas. Se muestra que la bacteria <i>E. coli</i> abarca un grupo en constante evolución que incluye cepas tanto comensales como patogénicas.....	5
Figura. 2. Sitios del organismo colonizados por <i>E. coli</i> patógena.....	6
Figura. 3. Modelo de adhesión de EPEC a células hospedadoras.....	8
Figura. 4. El modelo de 3 pasos de la patogénesis de EAEC. Tres características principales de la patogénesis de EAEC: (1) adherencia abundante a la mucosa intestinal, (2) elaboración de enterotoxinas y citotoxinas, e (3) inducción de inflamación de la mucosa.....	11
Figura. 5. Organización genética general de operones <i>afa / dra / daa</i> y ensamblaje de las adhesinas <i>Dr</i> y <i>Afa-III</i>.....	13
Figura. 6. Principales bancos naturales de concha de abanico en la costa peruana.	17
Figura. 7. Área de estudio: Bahías de Samanco y Tortugas (Ancash).....	22
Figura. 8. Crecimiento de <i>E. coli</i> en cultivo. a) Cultivo bacteriano realizado en agar MacConkey, se observan las colonias color rosadas, producido por la fermentación de la lactosa. b) Muestra con colonias turquesas crecidas en agar HiCrome, color característico de <i>Escherichia coli</i> en este medio	31
Figura. 9. Electroforesis de productos PCR. Carril 1: marcador de peso molecular 100 bp DNA, carriles: 2-5 y 7: controles negativos (agua molecular). Carril: 6 <i>edl933</i> , <i>Stx1</i> y <i>Stx2</i> . Carril 8: cepa control <i>edl933 eae</i> (570bp)..	33
Figura. 10. Electroforesis de productos PCR. Carriles 2-5, 7,9 y 10: muestras negativas de la bahía de Samanco. Carriles 6 y 8: amplificación positiva para los genes <i>Stx1</i> y <i>Stx2</i> en dos muestras provenientes de la bahía de Samanco. Carril 12: amplificación positiva para el gen <i>Stx1</i> , en una muestra procedente de la bahía de Tortugas. Carriles 13-19: muestras negativas de la bahía de Tortugas, Carriles 1 y 20: marcador de 100 bp DNA Ladder.	33

Figura. 11. Amplificación mediante el PCR-Multiplex del gen *eae*. Carril 1: marcador de DNA 1 kb; Carril 2, 4 y 5: muestras negativas de la bahía de Tortugas. Carril 3: Amplificación positiva para el gen *eae* en una de las muestras proveniente de la bahía de Tortugas Amplificación mediante el PCR-Multiplex del gen *eae*.

.....34

Figura. 12. Estandarización de la técnica RAPD- PCR. Carril 2 a 6: (OPA 3, OPA 12, OPA 17 y OPA 18, a 10 pMol y con 60 ng/ μ L (DNA). Carril 7 a 9: OPA 3, OPA 12, OPA 17, a 20 pMol y con 85ng/ μ L (DNA). Carriles 1 y 10, marcadores de peso molecular 100 bp DNA Ladder y 1 kb Plus DNA Ladder, respectivamente

.....36

Figura. 13. Amplificación mediante la técnica RAPD- PCR. La figura muestra los resultados obtenidos a partir de ocho cepas de *Escherichia coli*, usando el iniciador OPA 3 en la prueba de RAPD-PCR. Carril 1: marcador molecular de 100 bp DNA. Carriles 2 - 5: *E. coli* aisladas de la bahía de Samanco. Carriles 6- 9: *E. coli* aisladas de la bahía de Tortugas). Carril 10: marcador molecular 1 kb Plus DNA

.....37

Figura.14. Relaciones genéticas de *E. coli* provenientes de la bahía de Samanco y la bahía de Tortugas. Dendograma construido con el programa NTSYS 2.0, coeficiente DICE y el método de agrupamiento UPGMA

.....41

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Primers utilizados en la detección de genes de virulencia de E. coli.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 2. Frecuencia de E. coli en las bahías de Samanco y Tortugas</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 3. Genes de virulencia de E. coli diarrogénicas encontrados en las bahías de Samanco y Tortugas</i>	<i>35</i>

GLOSARIO

bp	: Bases de pares
CDC	: Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
DEC	: <i>Escherichia coli</i> diarrogénica
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
FAO	: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	: Administración de Medicamentos y Alimentos
FONDECYT	: Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico
LST	: Lauril sulfato Triptosa
NMP	: Número más Probable
OMS	: Organización Mundial de la Salud
PCR	: Reacción en cadena de la Polimerasa
SANIPES	: Organismo Nacional de Sanidad Pesquera
RAPD-PCR	: ADN polimórfico amplificado aleatorio
RNA	: Ácido ribonucleico

RESUMEN

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa considerada como parte de la microbiota autóctona de animales y el hombre, sin embargo, existen algunos patotipos que causan serios problemas en la salud humana e inclusive la muerte. El presente estudio tuvo como objetivo detectar molecularmente los factores de virulencia y la diversidad genética de *E. coli* asociada al cultivo de *Argopecten purpuratus* “concha de abanico”, procedentes de las Bahías de Samanco y Tortugas en el departamento de Ancash-Perú. Esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la FAVEZ de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima-Perú. La identificación de los aislados se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales. La detección de los genes de virulencia se hizo por PCR convencional y la evaluación de la diversidad genética mediante la técnica de RAPD-PCR. Se analizaron 89 muestras, constituido cada “muestra” por el homogenizado de las partes blandas de 3 organismos de *A. purpuratus*, de las cuales se obtuvo un total de 68 aislados de *E. coli*, 35 pertenecientes a la Bahía de Samanco y 33 a la Bahía de Tortugas. La frecuencia estimada fue de 68.6 % en la Bahía de Samanco y 86.8 % en la Bahía de Tortugas encontrándose diferencias significativas entre estas según la prueba estadística del Chi-Cuadrado. Entre los aislados se detectó la presencia de los genes *Stx1* y *Stx2*, ambos en dos cepas de la Bahía de Samanco, y *Stx1* y *eae* en dos cepas proveniente de la Bahía de Tortugas, en muestras independientes. Se construyó un dendograma basado en el RAPD-PCR utilizando el programa NTSYS 2, el cual clasificó las cepas en diecinueve grupos, con un porcentaje de similitud de 85%, mostrando una alta diversidad genética de *E. coli* entre las muestras de las bahías, e incluso entre muestras provenientes de un mismo lugar. Los resultados de este estudio representan una base técnica y científica para la adopción de medidas de prevención ante el consumo de este molusco y con ello mitigar los problemas de infección causados por las formas patógenas de esta bacteria.

Palabras claves: *Escherichia coli* diarrogénicas, patotipos, *Stx1*, *Stx2*, *eae*.

ABSTRACT

Escherichia coli is a Gram negative bacteria considered as part of autochthonous microbiota of animals and humans; however, there are some pathotypes that cause serious problems in human health and even lead to death. The aim of this study was to detect, using molecular techniques, virulence factors and genetic diversity of *E. coli* associated with *Argopecten purpuratus* "fan shell" cultures, from bahia de Samanco and bahia de Tortugas in department of Ancash-Peru. This research was conducted at the FAVEZ laboratory in the Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima-Peru. Strain identification was performed by conventional biochemical tests. Detection of virulence genes was performed using PCR and evaluation of genetic diversity was performed using RAPD-PCR. 89 samples of *A. purpuratus* were analyzed and a total of 68 *E. coli* isolates were obtained, 35 belonging to bahia de Samanco and 33 to bahia de Tortugas. Frequency of *E. coli* was 68.6% in bahia de Samanco and 86.8% in bahia de Tortugas; this difference was statistically significant, according to Chi-Square statistical test. Among isolates, presence of *Stx1* and *Stx2* genes was detected both in two strains of bahia de Samanco, and *Stx1* and *eae* in two strains from bahia de Tortugas, in independent samples. Based on RAPD-PCR a dendrogram was constructed using NTSYS 2 program, in which strains were classified into nineteen groups with a percentage of similarity of 85%, showing a high genetic diversity of *E. coli* between samples from both bays, and even between samples from a same place. Findings of this research represent a technical and scientific basis for adoption of measures aimed at mitigating infection problems caused by pathogenic forms of this bacterium.

Key words: diarrhogenic *Escherichia coli*, pathotypes, *Stx1*, *Stx2*, *eae*.

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli, es una bacteria Gram negativa, facultativa, que es parte de la microbiota residente de humanos. Esta bacteria es utilizada como el principal indicador de contaminación fecal, cuando se evalúa la inocuidad de los alimentos y el agua (FAO, 2011). La mayoría de las especies son consideradas comensales y otras causan enfermedades, principalmente cuadros gastroentéricos (Kaper et al., 2004; CDC, 2017).

E. coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera microbiota normal, sin embargo, se han descritos seis patotipos de *E. coli* productoras de diarrea, también conocidas como *E. coli* diarreogénicas (DEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), que se clasifican según las lesiones histopatológicas características que causan en células epiteliales (Nataro y Kaper, 1998) y a la expresión de algunos factores de virulencia.

En el Perú es poco el conocimiento y la difusión de las consecuencias del consumo de los alimentos contaminados por esta bacteria, más aún sobre el consumo de moluscos bivalvos. Salvo algunos muestreos periódicos para determinar la presencia de coliformes totales en la concha de abanico realizado por la entidad sanitaria (SANIPES) en algunas provincias de Ancash, no hay datos que confirmen, a nivel molecular, la presencia de *E. coli*. Menos aún datos sobre la presencia de *E. coli* portadores de genes de virulencia.

El presente estudio tuvo como objetivo la detección de *E. coli* enteropatógenas a través de la detección de los genes de virulencia asociadas a estas cepas.

II. ANTECEDENTES

Diversas investigaciones se han realizado en la detección de patotipos patógenos de *E. coli* utilizando factores de virulencia empleando técnicas moleculares. Así Balière et al.(2015), detectaron por PCR, la existencia del gen *Stx*, que está involucrado con la producción de la toxina shiga, en el 30% de lotes de moluscos estudiados y el gen *eae* en un gran porcentaje de los mariscos. Adicionalmente, este estudio identificó dieciocho serotipos entre los aislamientos de ETEC y 57 entre los aislados de EPEC. Estos resultados permitieron determinar que STEC y EPEC están ocasionalmente presentes en el medio ambiente y pueden contaminar mariscos.

Strubbia et al.(2016) demostraron la presencia de *E. coli* y norovirus en mejillones, encontrando una correlación significativa entre *E. coli* y este virus y que ambas pueden ser usadas como indicadores de contaminación fecal.

La diversidad genética de *E. coli* presente en moluscos bivalvos como ostras y mejillones ha sido estudiada empleando técnicas como ERIC-PCR (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas) y RAPD- PCR (ADN polimórfico amplificado al azar) consiguiéndose identificar la presencia de diferentes cepas de *E. coli* en productos marinos (Salinas et al., 2010; Pizarro et al., 2013; Balière et al., 2015).

Salinas et al. (2010), detectaron la presencia de cepas de EPEC en aguas de bahías, las cuales se genotipificaron mediante ERIC-PCR (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas) revelando que existe una elevada diversidad genética de *E. coli*. En el mismo estudio también se detectó, mediante PCR, la presencia del gen *eae*, característico de *E. coli* enteropatogénica, en 18 cepas, representando un 38.3% de las muestras evaluadas.

Barbosa et al. (2016), analizaron camarones provenientes de mercados y empleando la técnica de PCR Multiplex y reportaron la presencia de dos genes de virulencia, *eae*, indicativo del patotipo enteropatógeno (EPEC) y el gen *Stx*, que está presente en el patotipo de *E. coli* productoras de las enterotoxinas (ETEC) en todas las muestras evaluadas.

En otro estudio, realizado en alimentos, se encontró que la prevalencia de las cepas de DEC fue baja (1.08%), siendo los productos lácteos los alimentos más contaminados (2.8%), seguidos por los derivados de la carne, mariscos y pescado; entre los grupos patogénicos de DEC detectados en alimentos, EPEC fue el más prevalente (78.5%), seguido de EAEC (10.7%), STEC (8.9%) y ETEC (1.7%) (Canizalez et al., 2013).

III. MARCO TEÓRICO

3.1. *Escherichia coli*

Descrita por primera vez en 1885, por el pediatra alemán Theodor Escherich, fue llamado inicialmente como *Bacterium coli commune*, posteriormente fue renombrado con el nombre actual, en honor a su descubridor (Kaper, 2005).

Dentro del género *Escherichia* existen seis especies: *Escherichia blattae*, *E. fergussonii*, *E. vulneris*, *E. albetii*, *E. hermannii* y *E. coli*, esta última es la más estudiada en humanos (Huys et al., 2003).

La mayoría de las *E. coli* son organismos comensales, inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural (OMS, 2018). Sin embargo, existen diferentes cepas de *E. coli* considerados patógenos que causan serios daños gastrointestinales en humanos y algunas también son patógenos para animales jóvenes, destinados a la producción de carne (FAO, 2011).

Actualmente, esta bacteria es utilizada como el principal indicador de contaminación fecal cuando se evalúa la inocuidad de los alimentos y el agua (OMS, 2007).

3.2. Virulencia

E. coli tiene la capacidad de intercambiar material genético por medio de elementos genéticos móviles, tales como plásmidos, como respuesta de adaptación a entornos nuevos y adversos (fig. 1), se cree que estos elementos genéticos contribuyen a la aparición de agentes patógenos con mayor virulencia, supervivencia ambiental y persistencia en los sistemas alimentarios (FAO, 2011)

3.3. *Escherichia coli* diarrogénicas (DEC)

Se han descrito seis patotipos de *E. coli* patógenas que causan diarrea y estos se dividen en grupos o variedades, según sus mecanismos comunes de patogenicidad y síndromes clínicos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998).

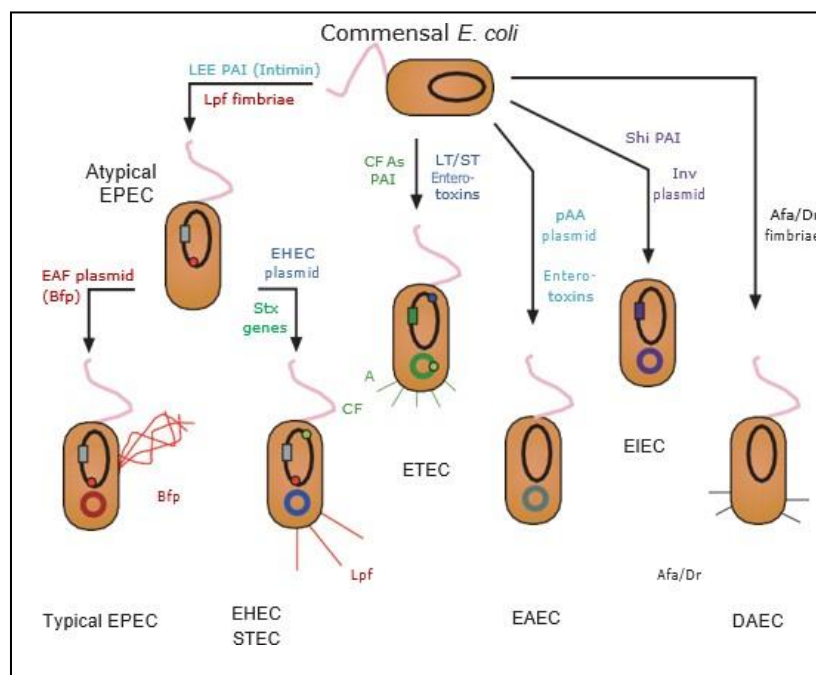


Figura. 1. Evolución de *E. coli* comensales y patogénicas

Se muestra que la bacteria *E. coli* abarca un grupo en constante evolución que incluye cepas tanto comensales como patogénicas.

Fuente: Torres, 2010.

Las *E. coli* comensales solo necesitan de elementos genéticos móviles para convertirse en un patógeno altamente adaptado y ser capaz de causar enfermedades desde gastroenteritis hasta infecciones extraintestinales del tracto urinario y afectar la circulación sanguínea y el sistema nervioso central (Croxen y Finlay, 2010) (fig. 2).

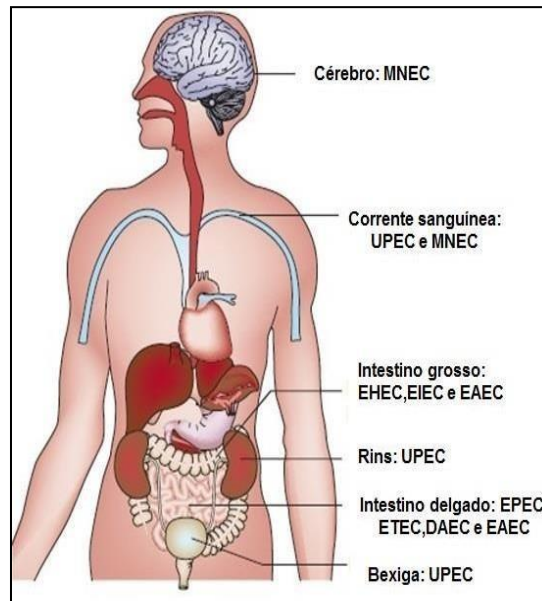


Figura. 2. Sitios del organismo colonizados por *E. coli* patógena

Fuente: Modificado por Croxen y Finlay, 2010.

3.4. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Este patotipo se caracteriza por una causar lesiones histopatológicas en la superficie apical de los enterocitos, conocida como "Adherencia y Esfascelamiento" (A/E) (Nataro y Kaper, 1998).

Las EPEC típicas de origen humano causantes de diarrea infecciosa poseen un plásmido de virulencia grande conocido como plásmido de factor de adherencia EAF (EPEC factor de adherencia), que es la encargada de la codificación del "Bundle forming pilus" tipo IV (BFP), así también contiene el locus Per (plasmid-encoded

regulator), que regula el operón *bfp* y la mayoría de genes del Locus of enterocyte effacement" (LEE) (Locus de borrado enterocítico) por el *Ler* (LEE encoded regulator), mientras que las EPEC atípicas contiene el LEE, pero no poseen este plásmido (Nataro y Kaper, 1998).

Bfp son fimbrias dinámicas que contribuyen a la patogénesis de EPEC, están codificadas por un grupo de 14 genes (Sohel et al. 1996; Stone, et al., 1996). La Intimina es una proteína de 94 kDa codificada por el gen *eae* y necesaria para la adhesión íntima de EPEC a las células huésped en los sitios de las lesiones A / E (Nataro y Kaper, 1998).

Finalmente, las bacterias se adhieren íntimamente a la célula hospedera mediante la interacción Intimin-Tir insertada en la membrana y numerosas proteínas del citoesqueleto se acumulan debajo de las bacterias unidas que dan la estructura de un pedestal (Kenny et al., 1997; Mellies et al., 2001) (fig 3).

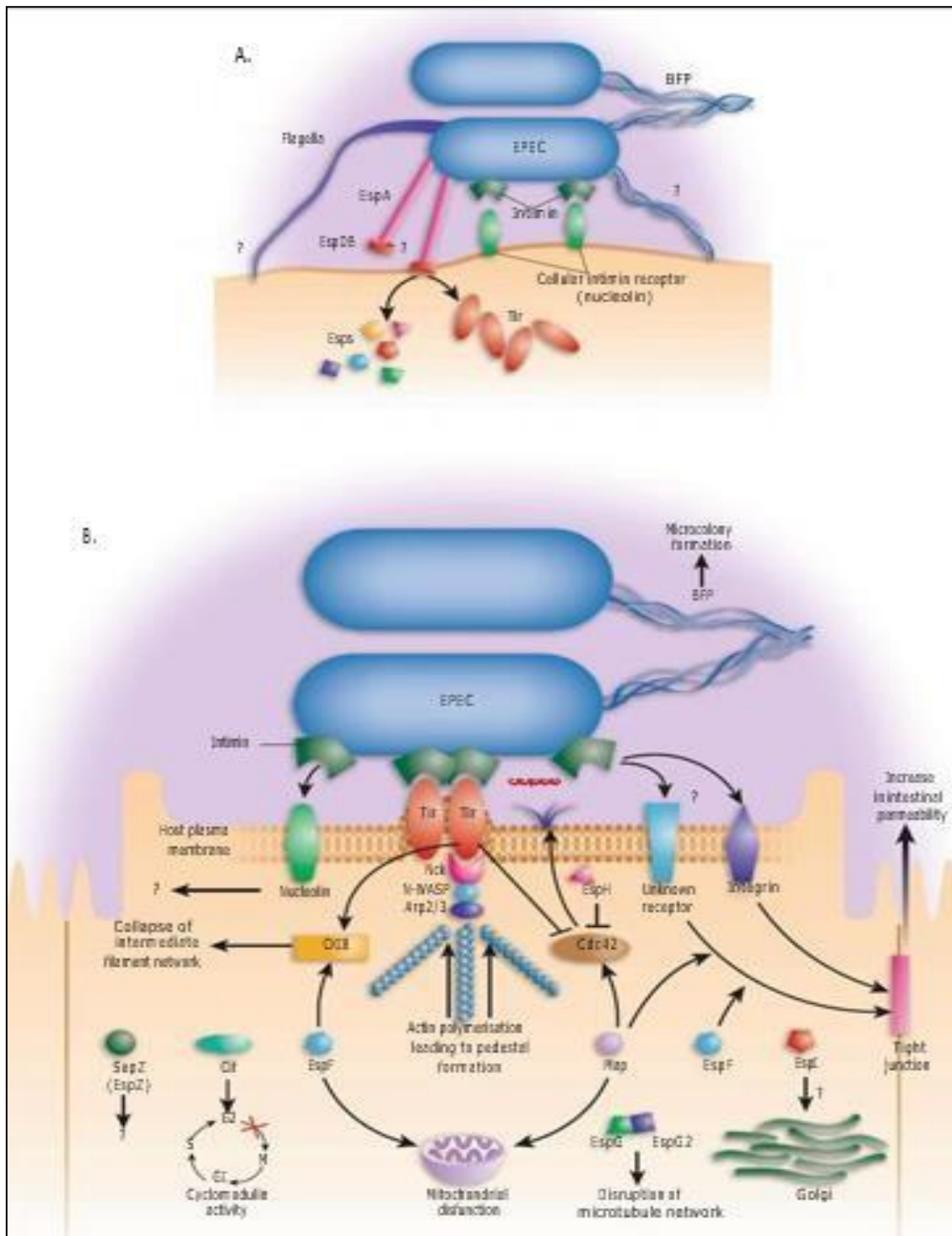


Figura. 3. Modelo de adhesión de EPEC a células hospedadoras.

Fuente: Torres, 2006.

3.5. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

El término *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) se usó originalmente para clasificar un subconjunto de cepas de STEC (*E. coli* - toxina shiga) siendo *E. coli* O157: H7 el prototipo, considerado altamente patógeno y responsable de causar enfermedades muy graves en humanos, incluyendo Colitis Hemorrágica (HC) y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Karmali et al., 1985). En este patotipo se expresa el gen *Stx* y *eae*, los cuales le confieren atributos de virulencia la adherencia íntima bacteriana, además de un plásmido de aproximadamente 60 MDa conocido como "plásmido EHEC" (Karmali et al., 1983).

Sin embargo, la ausencia de marcadores de virulencia, como *eae*, no indica necesariamente que un aislado sea menos virulento para los humanos (Paton et al. 1999), lo que conllevó al uso del término STEC, término más general para referirse a todos los tipos de *E. coli* aislados (Torres et al., 2010).

El gen *Stx* presenta dos subgrupos, *Stx1* y *Stx2*, estas comparten aproximadamente el 55% de homología de aminoácidos, es posible aislar bacterias que sintetizen una de las toxinas o ambas (Nataro y Kaper, 1998; WHO, 1998).

Las bacterias del patotipo STEC pasan a través del intestino delgado y los genes de virulencia se activan mediante señales ambientales en el colon (Spears et al., 2006).

3.6. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

El término adherencia agregada fue acuñado por Nataro y sus colegas en un estudio epidemiológico realizado en Chile (Nataro et al., 1987).

La adhesión está mediada por fimbrias formadoras de haces denominadas fimbrias de adherencia agregativa, actualmente las adhesinas conocidas son: AAF/I, AAF/II, AAF/III, AAF/IV y AAF/V, codificadas en un plásmido de 65 MDa (Castro, 2014) (fig. 4). La primera es llamada fimbria I de adherencia agregativa y está involucrada en la adherencia a células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos, que es codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa (Nataro et al., 1992).

Este patógeno se subclasifica en cepas típicas y atípicas (las cepas típicas contienen el gen *aggR*; en las atípicas está ausente), se presume que la cepa típica enteroagregativa tiene más potencial patógeno por la presencia del regulador *aggR* así como por los factores de virulencia que regula y que están presentes en el plásmido pAA (Gomes et al., 2016).

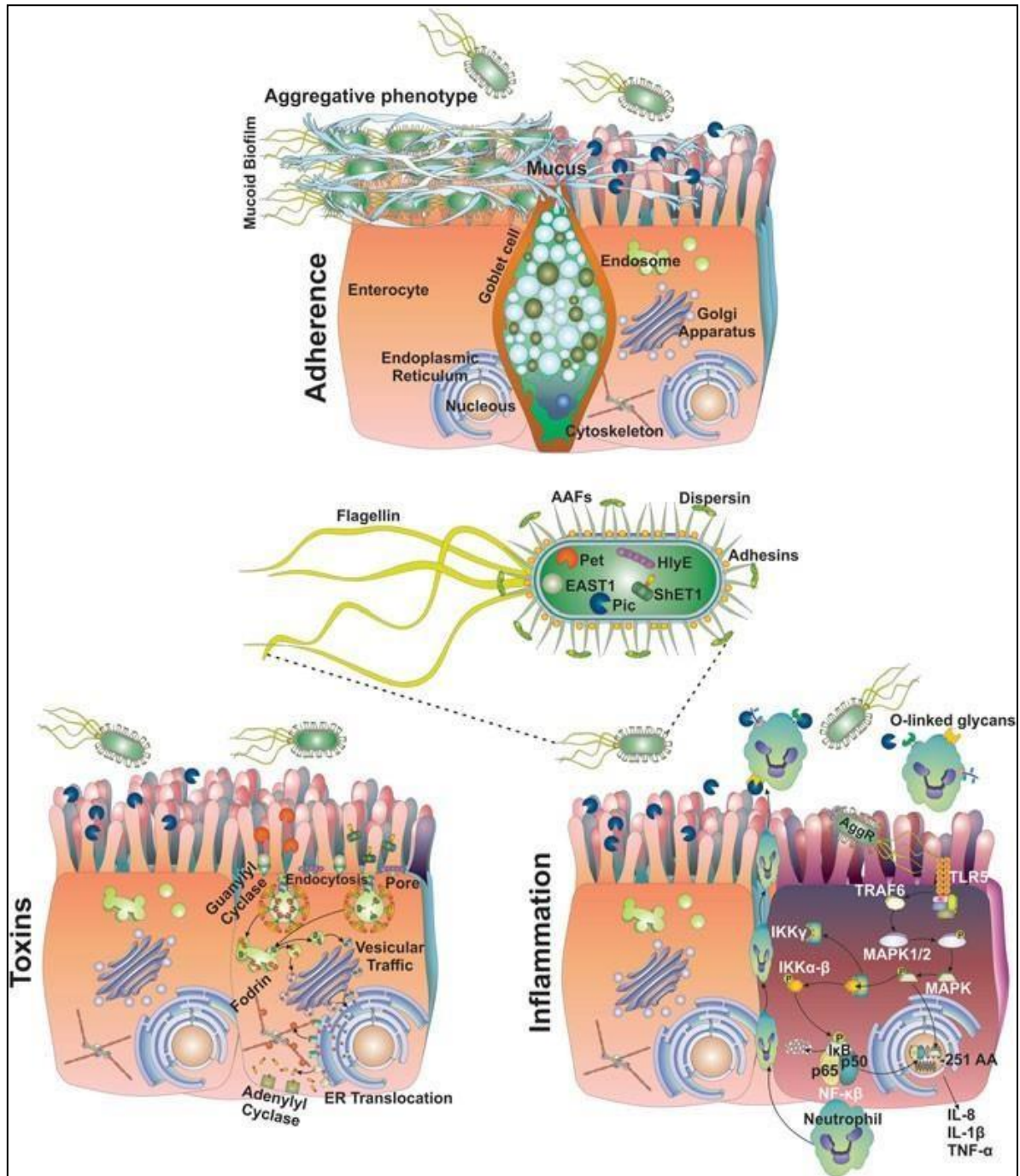


Figura. 4. El modelo de 3 pasos de la patogénesis de EAEC. Tres características principales de la patogénesis de EAEC: (1) adherencia abundante a la mucosa intestinal, (2) elaboración de enterotoxinas y citotoxinas, e (3) inducción de inflamación de la mucosa.

Fuente Torres, 2010

3.7. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Se presenta de manera endémica en países en vías de desarrollo, con una epidemiología similar a la observada con *Shigella*, causando en promedio del 1 al 5%

de episodios de diarrea entre la población (Villalobos, 2003). EIEC se distingue de *Shigella* por algunas pruebas bioquímicas de menor importancia, pero estos patotipos comparten factores de virulencia esenciales (Kaper et al., 2004).

Los genes necesarios para la invasión se encuentran codificados en un plásmido de 140 MDa llamado pInv, que codifica para proteínas como IpaC e IpaB, así también los genes *mxi* y *spa*, los cuales codifican para el sistema de secreción tipo III y otros que están involucrados en el proceso de patogénesis (Castro, 2014).

3.8. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

El mecanismo de patogenicidad de este grupo de *E.coli* es la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas termolábil (LT) y termoestable (ST). Estas enterotoxinas están reguladas a nivel transcripcional por una proteína dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), quien reprime la expresión de LT mientras activa la expresión de ST (Munson, 2013). La toxina ST es una proteína de bajo peso molecular y posee múltiples residuos de cisteína (Cabello y Benavente, 2002).

Este patotipo incluye dos clases no relacionadas, *STa* y *Stb*, que se diferencian en su estructura y mecanismos de acción; sólo la toxina *Sta* se ha asociado a enfermedades humanas (Kaper et al., 2004).

La Toxina termolábil LT de *E. coli* es una toxina oligomérica que está estrechamente relacionada en su estructura y función a la enterotoxina del cólera (CT) causada por *Vibrio cholerae* (Sixma et al., 1993).

3.9. *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC)

Este patógeno se caracteriza por la presencia de un patrón característico de adherencia difusa (DA) en las células epiteliales HEp-2 (Scaletsky et al. 1984; Nataro

et al. 1987). El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea. Sus principales síntomas son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Nataro y Kaper, 1998).

Las adhesinas Afa, Dr y F1845 están codificadas por los operones *afa* / *dra* / *daa*, respectivamente. Todos estos operones contienen al menos cinco genes diferentes con una distribución y función conservadas, A, B, C, D y E, que codifican un regulador transcripcional, una chaperona, un Usher una invasina y una subunidad estructural de adhesina, respectivamente (Servin, 2014). Los genes *afa* / *dra* / *daa* A, B, C y D son altamente conservados entre la mayoría de los miembros de esta familia, mientras que el gen E es menos conservado; a excepción de *afaE-3* y *draE*, que tienen una homología del 99% y una identidad del 98% (Labigne-Roussel y Falkow, 1988; Le Bouguenec et al., 1993; Garcia et al., 2000) (fig 5).

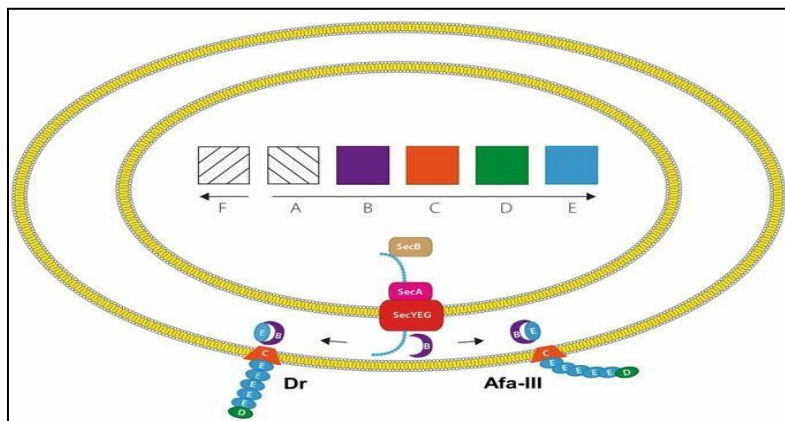


Figura. 5. Organización genética general de operones *afa* / *dra* / *daa* y ensamblaje de las adhesinas Dr y Afa-III.

Fuente: Torres, 2010

3.10. *Escherichia coli* en el Perú

En nuestro país un acontecimiento importante fue el primer aislamiento de *E. coli* enterohemorrágica serotipo O157: H7, aislado de un niño lactante de 11 meses (Huguet et al., 2002). La infección por *E. coli* es la tercera causa de muerte de niños menores de 5 años (Riveros y Ochoa, 2015). *E. coli* es uno de los patógenos más frecuentes en los hospitales peruanos, los pacientes neonatos presentan mayor caso de infecciones por esta bacteria (Ministerio de Salud, 2001).

En un estudio retrospectivo de la prevalencia de DEC en Perú empleando cepas de *E. coli* aisladas en pacientes pediátricos, la presencia de EAEC, EPEC, ETEC y DAE fue de 10, 8, 7, a 5%, respectivamente, siendo ETEC el que presentó mayor frecuencia entre niños de 13- 20 meses (Rivera et al., 2010). De igual manera, en una colección de 20 aislados STEC bien caracterizados, aislados de niños peruanos, se encontró *Stx1* en 18 cepas, *Stx2* en 2, y el gen de intimina (*eae*) en 16. El serotipo más frecuente fue O26:H11, presente en 7 cepas (35%); otros serotipos encontrados fueron el O111, O1:H7 y O6, el grupo clonal más prevalente fue EHEC2 (Riveros y Ochoa, 2015).

3.11. *Escherichia coli* en productos acuícolas

De 1973 a 2006, en Estados Unidos, se notificaron 28 brotes de *E. coli* de los patotipos *E. coli* enteroagregativa y *E. coli* enterohemorrágica como agentes etiológicos asociados al consumo de crustáceos (OMS, 2018). Jain et al. (2008), informaron de un brote de *E. coli* enterotoxigénica, asociada al consumo de camarones mariposa en restaurantes de sushi en Nevada (EE.UU.) en el año 2004. Esto sugiere que malas prácticas en la manipulación de alimentos, promueven una contaminación

mayor con estas bacterias patógenas, adicionales a las que ya se encuentran en las especies acuícolas.

Jain et al., (2008), analizaron muestras de mejillones (*Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*), ostras (*Cassostrea gigas*) y berberechos (*C. edule*) provenientes de las zonas costeras y entornos de estuarios en Francia, obtuvieron como resultado el primer aislamiento de cepas de ETEC Stx1 en estas especies.

Albuquerque (2013), manifiesta que la presencia de *E. coli* en los mariscos puede representar un riesgo para los consumidores si está relacionado con cepas patógenas, especialmente con *E. coli* diarreogénicas, es por ello que es de suma importancia el mantenimiento de la calidad microbiológica del agua, el cuidado postcosecha, las condiciones adecuadas de higiene en el proceso de manipulación y para los alimentos procesados, se deben garantizar la seguridad bacteriológica durante todo el proceso. Además de esto es extremadamente recomendable no consumir mariscos crudos o poco cocidos.

3.12. Concha de abanico *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819)

La concha de abanico se encuentra distribuida en la costa del Océano Pacífico tropical que abarca desde la costa nicaragüense hasta la región norte de Chile. En el Perú, se encuentra principalmente en la costa central y norte (Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero 2004). Tradicionalmente, la obtención de concha de abanico se restringía únicamente a la extracción a nivel artesanal, sin embargo, desde la segunda mitad del siglo pasado se empezó a delimitar áreas para su cultivo a mayor escala (Ruiz, 2012).

El cultivo se lleva a cabo principalmente en los sistemas “suspendido” o denominados “long - line” y en menor medida en sistemas de “fondo”. Las fases de cultivo incluyen: captación de semilla, cultivo intermedio (3 a 6 meses) y engorde (6 meses, hasta que alcancen 5 a 8 cm.), culminando en la cosecha (FONDEPES, 2004). Se considera que los principales factores que contribuyen al desarrollo de este cultivo en el país, son la existencia de abundante semilla de la especie en el medio natural, clima apropiado para alcanzar tallas comerciales en corto tiempo; dominio de la técnica de maduración sexual artificial, alta productividad del mar peruano que provee de alimento natural a la especie y una alta demanda con precios atractivos en el mercado internacional (Ministerio de la Producción, 2011).

El mercado local en su mayoría se abastece de los bancos naturales de conchas de abanico, siendo los más importantes los que se encuentran en la Bahía de Sechura, Isla Lobos de Tierra, Isla Blanca, Bahía de Samanco, Los Chimus, Las Salinas, Guaynuma, Tortugas, Bahía Independencia, Bahía de Paracas, Lagunillas, Isla San Lorenzo e Isla El Frontón (FAO, 2011)(FAO, 2008) (fig. 6).

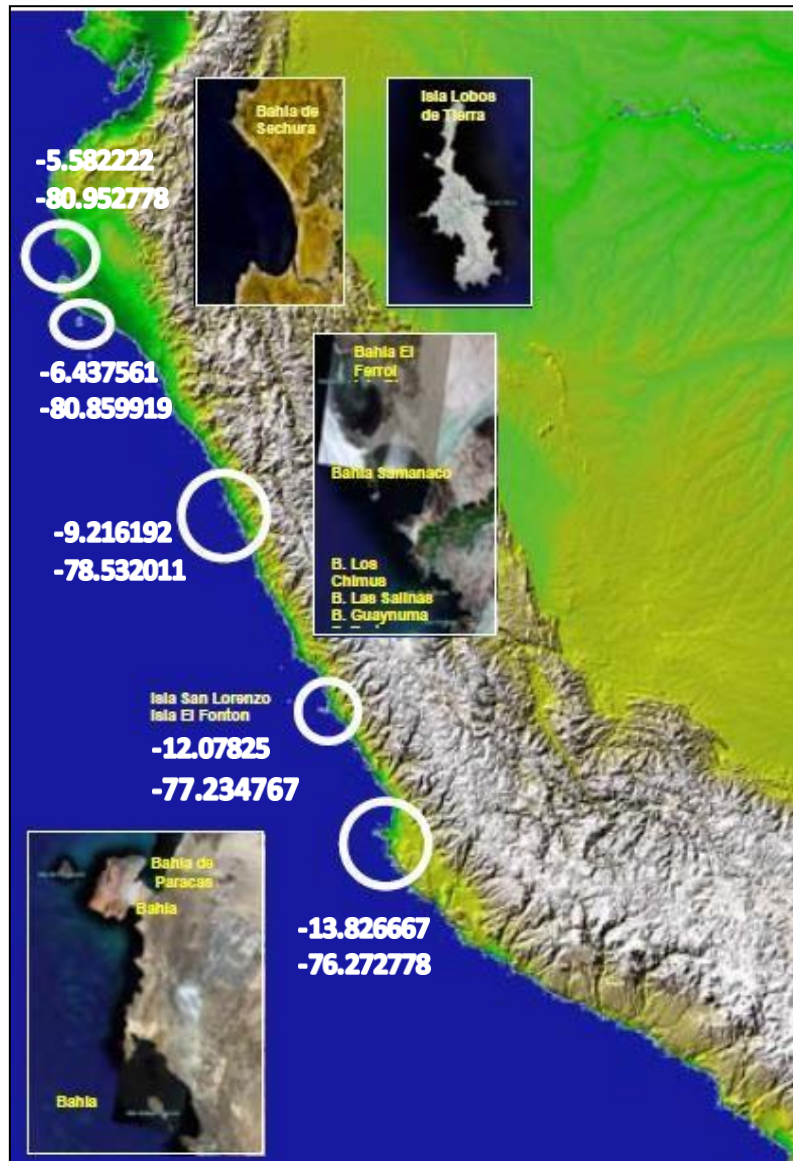


Figura. 6. Principales bancos naturales de concha de abanico en la costa peruana.

Fuente: FAO, 2008.

3.13. Contaminación de ambientes marinos en la región Ancash

En una evaluación microbiológica realizada en el ambiente marino del departamento de Ancash se halló que, en la superficie, el promedio de los coliformes totales varió de < 2 a 2400 NMP/100 mL, las concentraciones más altas se registraron en las bahías El Ferrol, Tortugas y Casma, sobrepasando lo permitido por los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para el Agua, situándola en la categoría 4 (Ministerio del Ambiente, 2017). En cuanto a coliformes termotolerantes también varió de < 2 a 2400 NMP/100 mL y la distribución presentó similar tendencia que el de los coliformes totales y en los sedimentos se registraron concentraciones que variaron de < 30 a 24000 NMP/100 ml, los valores más altos se registraron en la bahía del Ferrol (IMARPE, 2015).

IMARPE (2009), en una evaluación realizada en la bahía de Samanco, se encontró que los niveles de coliformes totales a nivel superficial fueron de < 30 a 230 NMP/100 mL, y la distribución horizontal presentó la concentración más alta en la zona central de esta bahía, mientras que la que se encontraba cerca al litoral se mostraron las concentraciones próximas a 30 NMP/100 mL. En cuanto a coliformes tolerantes, detectados a nivel superficial, los valores fluctuaron entre < 30 a 90 NMP/100mL, mientras que en la distribución horizontal presentó un comportamiento similar a los coliformes totales.

IV. JUSTIFICACIÓN

La concha de abanico es el molusco de mayor demanda en nuestro país y su principal forma de consumo bajo la forma cruda. Debido a sus hábitos filtradores y a que su ambiente está generalmente contaminado con desechos de la actividad antropogénica, esta especie acumula bacterias con potencial patogénico para la salud humana, como *E. coli*, sin mostrar lesiones aparentes.

Los monitoreos sanitarios de los centros de cultivo y extracción de la concha de abanico son poco frecuentes, emplean técnicas microbiológicas clásicas y se centran, principalmente, en cuantificar la carga de coliformes, que frecuentemente resulta elevada. Todo esto indica un riesgo de infección alimentaria para los consumidores.

Por lo tanto, es importante realizar estudios que permitan caracterizar el potencial patogénico y genotipos de las *E. coli* aisladas de la concha de abanico, con técnicas más sensibles como las basadas en PCR. Estas técnicas ya son realizadas en nuestros países vecinos, pero, lamentablemente, aún son escasas en nuestro medio.

Esperamos que este estudio permita conocer los diferentes patotipos de *E. coli* presentes en la concha de abanico y que esta información pueda ser utilizada en programas de alerta sanitaria y estudios epidemiológicos moleculares sobre la patogenicidad de esta bacteria.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

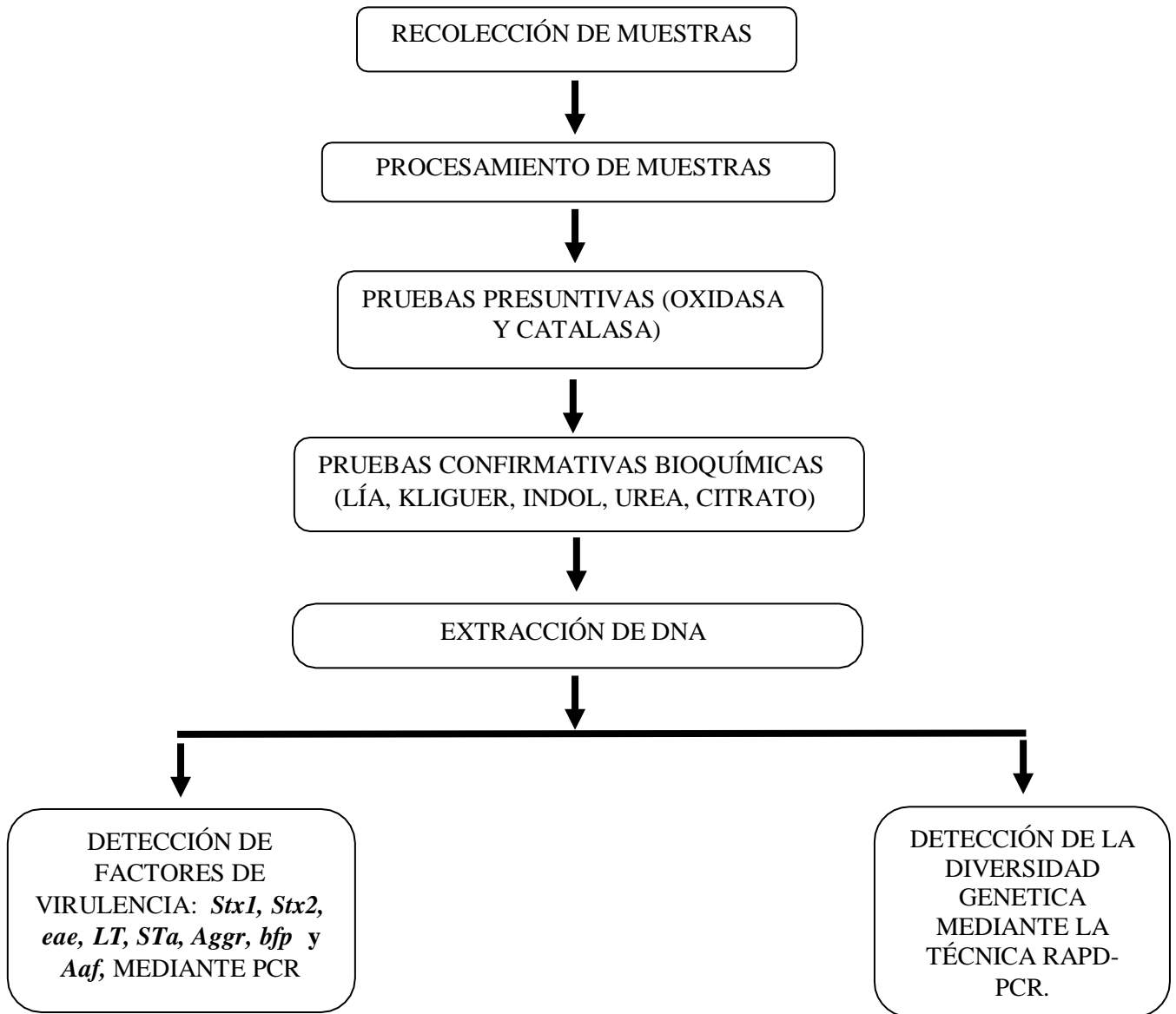
Detectar molecularmente los factores de virulencia y analizar la diversidad genética de *E. coli* aisladas de la concha de abanico (*A. purpuratus*) procedentes del departamento de Ancash- Perú”.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar bioquímicamente cepas de *E. coli* presentes en la concha de abanico (*A. purpuratus*).
- Identificar molecularmente la presencia de los genes *Stx1*, *Stx2*, *eae*, *LT*, *STa*, *Aggr*, *bfp*, y *Aaf* que codifican la producción de algunos factores de virulencia en los aislados.
- Evaluar la diversidad genética de las *E. coli* aisladas por la técnica de RAPD-PCR.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

FLUJOGRAMA DE LA INVESTIGACIÓN



Lugar de estudio

Las muestras fueron recolectadas de la bahía de Samanco y Tortugas, provincia del Santa, departamento de Ancash (fig. 7). Estas bahías presentan intensa actividad antropogénica, como la pesca artesanal y el cultivo de concha de abanico (Anexo 3 a y b). Dentro de los parámetros físicos-químicos del agua, presentan una temperatura promedio de 20 a 22 °C, pH de 7 a 7.5 y una salinidad de 36 ppm, parámetros adecuados para el cultivo de conchas abanico. Los lugares donde se realizó la extracción se encuentran en las siguientes coordenadas: Lat.: 9° 21'46.890 | Lon.: -78°24'36.91690 y 9°12'5.608 | Lon.: -78°32'21.058. Las muestras se trabajaron con la debida autorización de las concesiones de conchas de abanico, cuya identidad se mantendrá en estricta confidencialidad

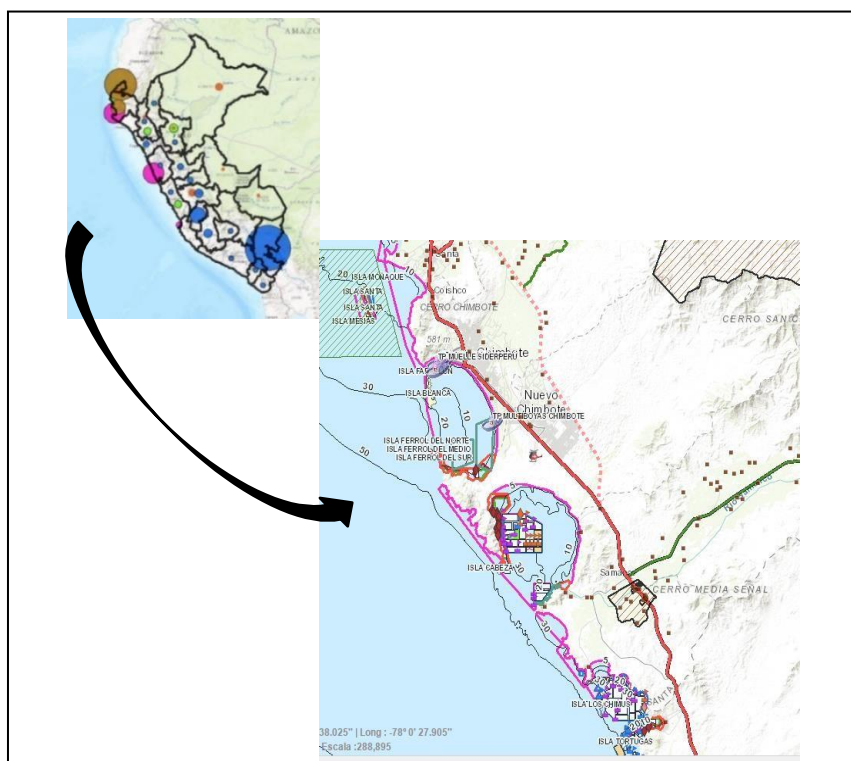


Figura 7. Área de estudio: Bahías de Samanco y Tortugas (Ancash).

Fuente: Catastro Acuícola

Tamaño de muestra

Cada muestra estuvo constituida por la homogenización de todas las partes blandas de tres conchas de abanico. Se recolectaron 89 muestras de las áreas de estudio, bahía de Samanco y Tortugas. Se tomaron muestras de bancos naturales y centros de cultivo (suspendidos y corrales). Se recolectaron 51 muestras de la bahía de Samanco, 18 procedieron de sistema de cultivo suspendido; 18 muestras fueron de sistema de cultivo de fondo, y 15 muestras de bancos naturales.

Para el caso de la bahía de Tortugas se recolectaron 38 muestras, 12 pertenecieron al sistema de cultivo suspendido, 13 del sistema de cultivo de fondo y finalmente 13 muestras fueron de bancos naturales.

Se realizaron 8 muestreos semanalmente, 4 muestreos a la bahía de Samanco y Tortugas respectivamente, donde se recolectaban un total de 30 a 40 conchas por muestreo. Las muestras fueron conservadas sobre hielo hasta su llegada al Laboratorio de Microbiología de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (FMVZ-UPCH).

Enriquecimiento de *E. coli*

El enriquecimiento de la muestra fue realizado siguiendo la metodología utilizada por el Manual Analítico Bacteriológico (BAM) de la FDA (2016), para esto se trabajó para cada muestra por independiente. Se sacrificaron las conchas de abanico abriendo las valvas, luego se homogenizaron en un mezclador (licuadora) tomando 25 g de las partes blandas de las muestras con 225 mL de caldo de peptona tamponada, durante 60 segundos (anexo 4a). Posteriormente, el homogenizado fue enriquecido en tubos de ensayo conteniendo 10 mL de caldo LST (para la evaluación de coliformes

totales) conteniendo una campana Durhan en el interior, luego se incubó a 37° por 24 horas.

Los tubos que formaron burbujas (gas), fueron sembrados nuevamente en tubos de ensayo con caldo E.C. para la evaluación de coliformes termotolerantes, también conteniendo tubos Durhan en su interior, los que se incubaron a 44° por 48 horas (anexo 1).

Aislamiento e identificación bacteriana

Después del enriquecimiento, se tomó un tubo de cada muestra positiva, estas se inocularon en agar Mac Conkey en condiciones aerobias a 37 ° C durante 24 h. Las colonias que fueron de color rosa a rojo, características de las enterobacterias, posteriormente se les realizaron la coloración Gram.

Las colonias que presentaron bacilos Gram negativos cortos en forma de bastones (anexo 2), se les presumió como positivas, posteriormente, todas estas muestras fueron sembrados en agar HiCrome *E. coli* a 44°C, por 48 horas (medio más sensible para *E. coli*) y las colonias positivas de coloración turquesa, dada por la fermentación de la β -glucoronidasa, fueron repicadas en agar TSA para los posteriores análisis. La identificación presuntiva fue realizada por un resultado positivo a pruebas de la catalasa (+) y oxidasa (-), mientras que la identificación definitiva a nivel de especie fue empleando las pruebas bioquímicas convencionales (agar LÍA, KLIGER, CITRATO, SIM y UREA).

Posteriormente una colonia representativa de cada aislado fue enriquecida en 5 mL de caldo BHI en aerobiosis a 37° por 24 horas, luego se le colocó en un tubo Eppendorf, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos con una centrifuga marca Spectrafuge, con este proceso se obtuvo el precipitado bacteriano, finalmente fueron

guardadas en una refrigeradora convencional marca COLDEX 450 lt COOLSTYLE390 a -20 °C.

Extracción de DNA

El DNA bacteriano fue extraído empleando el kit comercial “kit DNAeasy blood & Tissue (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se determinó mediante espectrofotometría empleando un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), con ello se obtuvo los datos de concentración y pureza de los ADN (anexo 4b).

Para llegar a la concentración deseada de ADN (85ng) se utilizó la fórmula $C1V1 = C2V2$, los ADNs extraídos se diluyeron con agua ultrapura y homogenizaron empleando un Vortex.

Determinación de los genes de virulencia

La determinación de los genes que codifican la producción de los factores de virulencia de las *E. coli* diarrogénicas fue realizada por PCR- Múltiplex, para los genes *Stx1*, *Stx2*, *eae*, *LT* y *STa* y los genes *Agg* y *Aaf* a, mientras que para el gen *Bfp* se le realizó un PCR convencional empleando primers y protocolos estandarizados por Barbosa et al. (2016) y Canizalez-Roman et al. (2013) (Tabla 01).

Se empleó la cepa edl933 como control positivo para los genes *Stx1*, *Stx2* y *eae* (Proporcionada por la Universidad de Sao Paulo- Brasil (fig. 9).

Todas la reacciones de amplificación se realizaton empleando el Termociclador Mastercycler Nexus (Eppendorf, EEUU).

Antes de realizar los PCR, se realizó la dilución de los primers, estos se encontraban liofilizados a una concentración de 50nmol, quedando a una concentración final de 10 pmol.

Para el PCR- Multiplex para los genes *Stx1*, *Stx2*, *eae* y *LT*, las reacciones de amplificación de DNA se llevaron a cabo en volúmenes de 25 μ L, la mezcla de PCR contenía 12.5 de 2x buffer PCR GoTaq® Green Master Mix (conteniendo 1.5mM de $MgCl_2$), dNTP (0.2 mM) y Platinum Taq polimerasa (0.5 U)); 1 μ L de cada primer (10 pmol); 1 μ L de DNA (85 ng) y 3.5 μ L de agua ultrapura.

El ciclo de amplificación consistió de un paso de desnaturalización inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos, cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 95 °c por 1 minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para el caso PCR Multiplex para los genes *Agg* y *Aaf*, las reacciones de amplificación de DNA se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L. la mezcla de PCR contenía 12.5 μ L de: 2x buffer PCR GoTaq® Green Master Mix ($MgCl_2$ (1.5 mM), dNTP (0.2 mM), Platinum Taq polimerase (0.5 U)); 1 de cada primer μ L de primers (10pmol/ μ L); 1 μ L de DNA (85 ng) y 7.5 μ L de agua ultrapura.

El ciclo de amplificación consistió de un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 30 segundos, seguido de 35 ciclos, cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 42°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos; y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Para el gen *Bfp*, se realizó un PCR convencional, donde las reacciones de amplificación de DNA se llevaron a cabo en volúmenes finales de 25 μ L, la mezcla de

PCR contenía 12.5 µL de 2x buffer PCR GoTaq® Green Master Mix (MgCl₂ (1.5 mM), dNTP (0.2 mM), Platinum Taq polimerase (0.5 U)); 1 µL de cada primer (10 pmol); 1 µL de DNA (85 ng) y 9.5 µL de agua ultrapura.

El ciclo de amplificación consistió de un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos, cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación a 42°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos; y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Cada muestra se analizó por duplicado. Todos los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al (1%), utilizando buffer TAE 1X como diluyente. Posterior a la corrida electroforética los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/mL) por 15 minutos. Los productos de amplificación fueron visualizados con transiluminador de luz UV (Bio- Imaging systems). Se utilizó como marcador de peso el 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Brasil).

Tabla 1. Primers utilizados en la detección de genes de virulencia de *E. coli*.

Primers	Secuencia de Oligonucleótidos 5' → 3'	Amplicón (bp)	Referencia
<i>Stx1</i>	AGA GCG ATG TTA CGG TTT G TTG CCC CCA GAG TGG ATG	388	Jackson et al. (1987a)
<i>Stx2</i>	TGG GTT TTT CTT CGG TAC C GAC ATT CTG CTT GAC TCT CTT	807	Jackson et al.(1987b)
<i>Eae</i>	AGG CTT CGT CAC AGT TG CCA TCG TCA CCA GAG GA	570	Yu y Kaper (1992)
<i>LT</i>	TTA CGG CGT TAC TAC CCT CTC TA GGT CTC GGT CAG ATA TGT GAT TC TCC CCT CTT TTA GTC AGT CAA	275	Furrer et al. (1990)
<i>Sta</i>	CTG GCA CAG GCA GGA TTA CAA CAA AGT	163	Ngeleka et al. (1990)
<i>Aggr</i>	GTA TAC ACA AAA GAA GGA AGC ACA GAA TCG TCA GCA TCA GC	254	Ratchtrachenchai (1997)
<i>Bfp</i>	TTT ACTA CCA GTC TGC GTC T ATG CCG CTT TATC CAA CCT G	282	Canizales et al. (2013)
<i>Aaf</i>	AITCCCATGATGTCAAGCACTTC CACAGGCAACTGAAATAAGTCTGG	378	Vidal et al. (2005)

Fuente: Barbosa et al., 2016; Canizales et al., 2013.

Determinación de la diversidad genética

La diversidad genética de los *E. coli* aislados de conchas de abanico se determinó empleando la técnica de RAPD-PCR (Williams et al. 1990), empleando cuatro iniciadores arbitrarios: OPA-03 (AGT CAG CCA C), OPA-12 (TCG GCG ATA G), OPA-17 (GAC CGC TTG T), OPA-18 (AGG TGA CCG T).

Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 25 μL , la mezcla de reacción del RAPD-PCR consistió de: 12.5 μL de 2x buffer PCR GoTaq® Green Master Mix (MgCl_2 (1.5 mM), dNTP (0.2 mM), Platinum Taq polimerase (0.5 U); 1 μL de cada iniciador (10 pmol; 1 μL de DNA (85 ng) y 10.5 μL de agua ultrapura. La amplificación se realizó con las siguientes condiciones: Un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 42°C por 2 minutos, extensión a 72°C por 2 minutos; y una extensión final a 72°C por 10 minutos. La cepa *E. coli* ATCC 35218 fue incluida en el análisis bajo las mismas condiciones.

Las reacciones de amplificación fueron realizadas por duplicado en un termociclador (Mastercycler nexus gradient (Eppendorf, EEUU). Todos los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (1%), utilizando buffer TAE 1x como diluyente, posteriormente los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/mL) por 15 minutos y visualizados con transiluminador de luz marca Bio-Imaging systems. Se utilizó como marcador de peso el 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Brasil) y 1 kb Plus DNA Ladder.

Los diferentes perfiles genéticos fueron analizados y empleados para la construcción de los dendogramas empleando el programa NTSYS (Applied

Biostatitics, Inc. versión 2.21), utilizando los coeficientes de similitud de Jaccard, Dice, Simple Matching (SM) y UN1.

Análisis de datos

Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística del Chi – Cuadrado, utilizando el programa estadístico WIN EPI. Esta prueba fue realizada para comparar la frecuencia de asilamiento *de E. coli* entre las dos bahías en estudio.

VII. RESULTADOS

De las 89 muestras analizadas, 51 muestras de la bahía de Samanco y 38 de la bahía de Tortugas, 85 muestras dieron positivas para coliformes totales en los caldos LST (formación de burbuja), de las cuales 80 fueron positivas para coliformes Termotolerantes en caldo E.C.

Las 80 colonias mostraron coloraciones rojizas en agar MacConkey (fig. 8a), de las cuales 68 fueron positivas para *E. coli* en agar HiCrome como colonias turquesa (fig. 08b). Se realizó tinción Gram a 20 colonias al azar, se observaron bacilos teñidos de color rojo (anexo 2) de estas fueron confirmadas con las pruebas bioquímicas, resultando todas positivas para *E. coli*, obteniéndose un 75.55% de positividad. De las 68 muestras positivas, 35 fueron procedentes de la bahía de Samanco y 33 de la bahía de Tortugas, obteniéndose un porcentaje de positividad del 68.63% y 86.84% respectivamente.

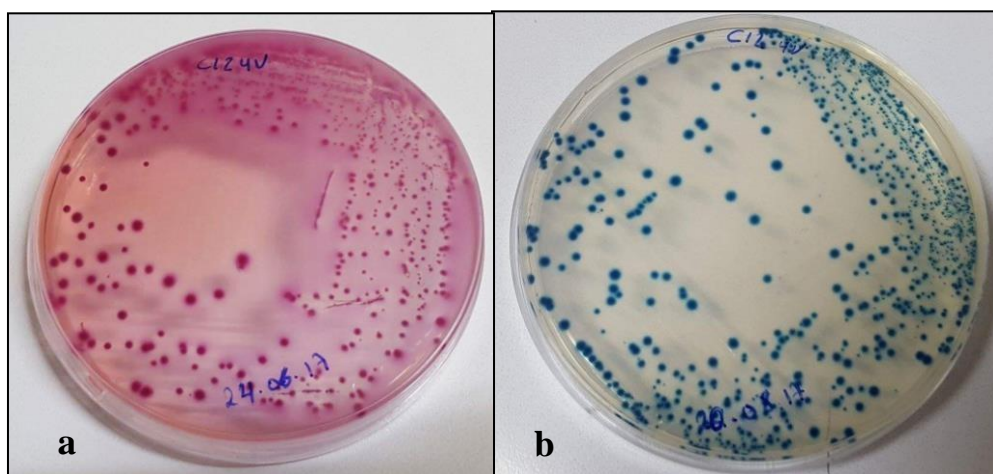


Figura. 8. Crecimiento de *E. coli* en cultivo

a) Cultivo bacteriano realizado en agar MacConkey, se observan las colonias color *rosa*, producido por la fermentación de la lactosa. b) Muestra con colonias turquesas crecidas en agar HiCrome, color característico de *Escherichia coli* en este medio

Se encontró una mayor frecuencia de *E. coli* en las muestras provenientes de la bahía de Tortugas que de la bahía de Samanco ($p=0.0453$, tabla 2).

Tabla 2. Frecuencia de *E. coli* en las bahías de Samanco y Tortugas.

Procedencia	Total	Positivas	Porcentaje (%)
Bahía de Samanco	51	35	68.6
Bahía de Tortugas	38	33	86.8

La tabla 2, muestra que existe diferencia estadística significativa entre las áreas de estudio a un nivel de 0.05, según prueba de Chi-Cuadrado.

Dos de los 35 aislados de *E. coli* procedentes de la bahía de Samanco albergaron los genes *Stx1* y *Stx2*, estos aislados pertenecen a los primeros muestreos realizados en esta zona. Para el caso de la bahía de Tortugas sólo en un aislado de *E. coli*, de los 33 en total, se encontró que el gen *Stx1*. Ambos genes pertenecen al patotipo STEC. La figura 10 muestra el resultado de la amplificación de estos genes produciendo amplicones de 388 bp para *Stx1* y 807 bp para el gen *Stx2*

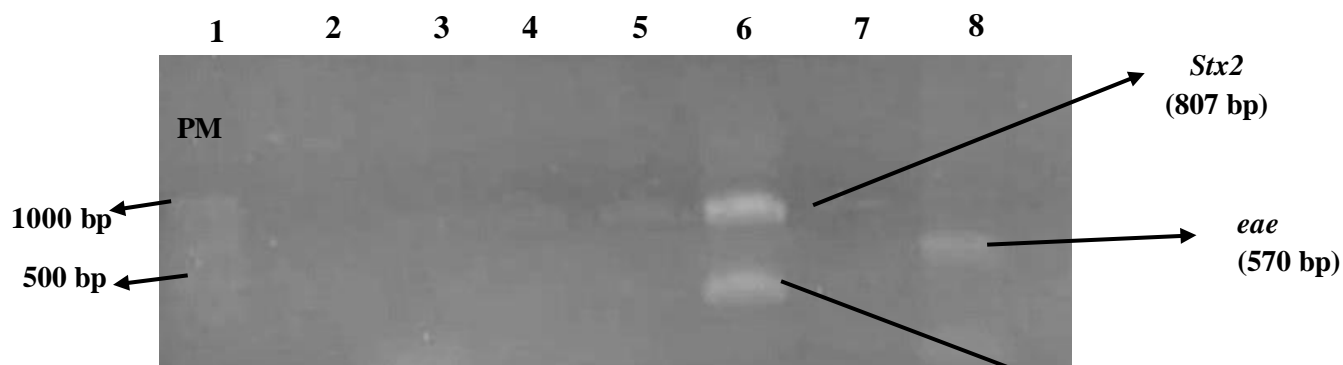


Figura 9. Electroforesis de productos PCR.

Carril 1: marcador de peso molecular 100 bp DNA, carriles: 2-5 y 7: controles negativos (agua molecular). Carril: 6 *edl933*, *Stx1* y *Stx2*. Carril 8: cepa control *edl933 eae* (570bp).

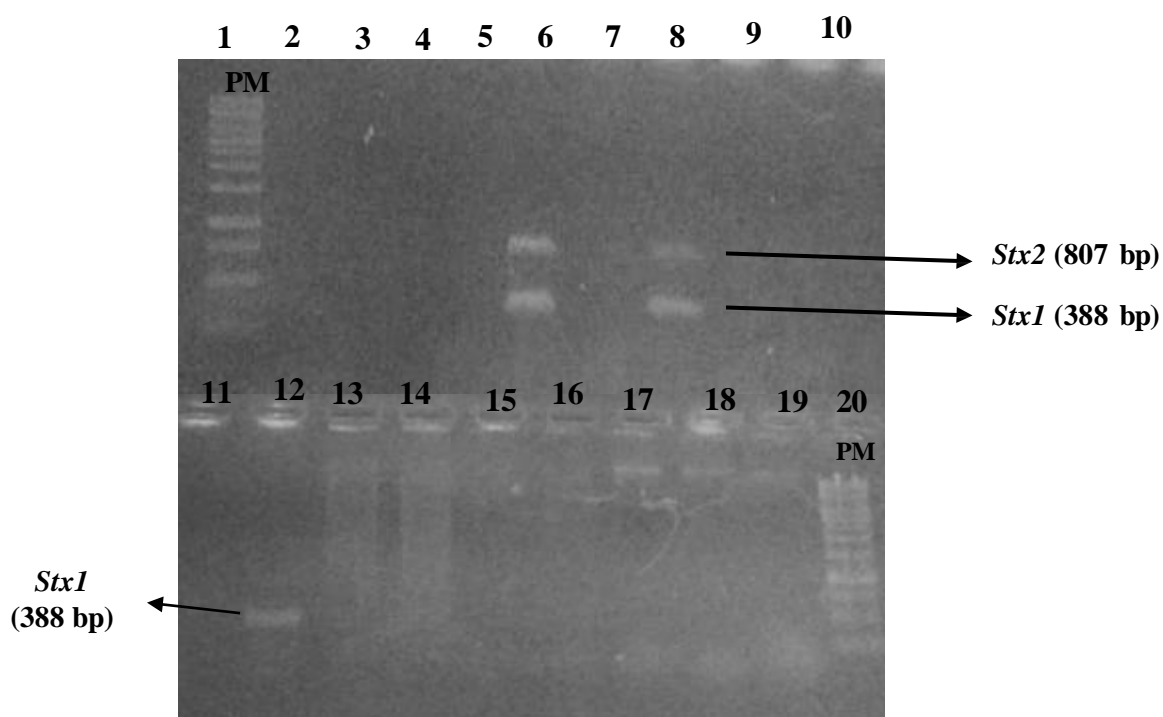


Figura.10. Electroforesis de productos PCR.

Carriles 2-5, 7,9 y 10: muestras negativas de la bahía de Samanco. Carriles 6 y 8: amplificación positiva para los genes *Stx1* y *Stx2* en dos muestras provenientes de la bahía de Samanco. Carril 12: amplificación positiva para el gen *Stx1*, en una muestra procedente de la bahía de Tortugas. Carriles 13-19: muestras negativas de la bahía de Tortugas, Carriles 1 y 20: marcador de 100 bp DNA Ladder .

Sólo uno de los 33 aislados de *E. coli* de la bahía de Tortugas presentó el amplicón correspondiente al gen *eae*, gen característico de STEC, que tiene un tamaño de 570 bp (Fig 11).

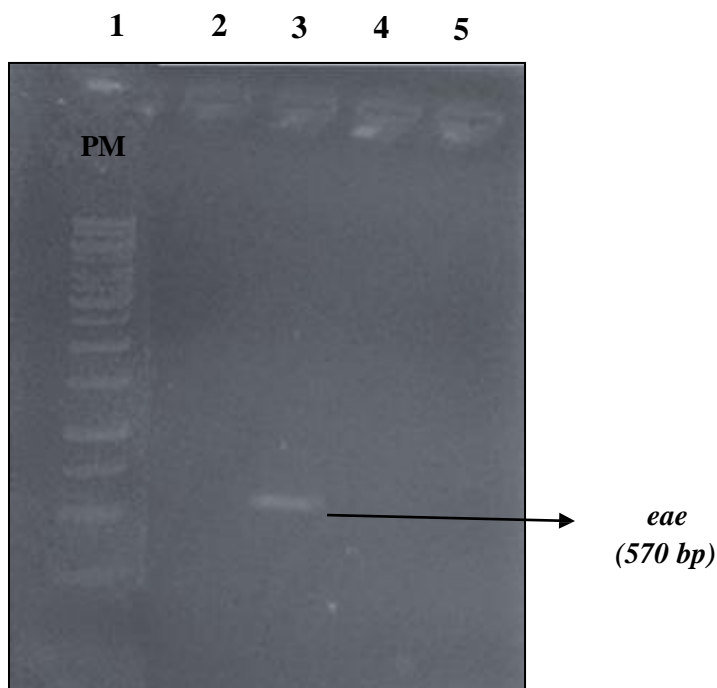


Figura. 11. Amplificación mediante el PCR-Multiplex del gen *eae*.

Carril 1: marcador de DNA 1 kb; Carril 2, 4 y 5: muestras negativas de la bahía de Tortugas. Carril 3: Amplificación positiva para el gen *eae* en una de las muestras proveniente de la bahía de Tortugas.

De las 51, muestras de la bahía de Samanco 18 procedieron de sistema de cultivo suspendido, de las cuales 10 fueron positivas para *E.coli*; 18 muestras fueron de sistema de cultivo de fondo, todas positivas para *E. coli* de las 15 muestras de bancos naturales, 7 muestras positivas para *E. coli*. Dos muestras presentaron amplificación para los genes *Stx1* y *Stx2*, ambas procedentes del sistema de cultivo de fondo (fig.10 y tabla 3). De las 38 muestras de la bahía de Tortugas, 12 pertenecieron al sistema de cultivo suspendido, resultando todas positivas para la bacteria en estudio, 13 del sistema de cultivo de fondo, también todas positivas para *E. coli* y finalmente

13 muestras fueron de bancos naturales, siendo 8 de estas positivas para *E. coli*. Al igual que el caso anterior, las dos muestras independientes que contenían los genes *Stx1* y *eae* (fig. 10, 11 y tabla 3) fueron del sistema de cultivo de fondo.

Tabla 3. Genes de virulencia de *E. coli* diarrogénicas encontrados en las bahías de Samanco y Tortugas.

Procedencia	Total muestras positivas a <i>E. coli</i>	Patotipos								Total (%)
		EHEC		ETEC		EAEC		EPEC		
		<i>Stx1</i>	<i>Stx2</i>	<i>Lt</i>	<i>Sta</i>	<i>AggR</i>	<i>Aaf</i>	<i>eae</i>	<i>Bfp</i>	
B. Samanco	35	2 (5.71)	2(5.71)	0	0	0	0	0	0	5.71 (2)
B. Tortugas	33	1(3.03)	0	0	0	0	0	1(3.03)	0	6.06(2)

Cuatro iniciadores arbitrarios fueron empleados en este estudio (OPA-3, OPA-9, OPA-12 y OPA-18) pero solamente el iniciador OPA-3 fue utilizado para la evaluación final de las muestras, debido al mayor número de bandas amplificadas, repetibilidad y la nitidez de estas por la técnica molecular de RAPD-PCR (fig. 12).

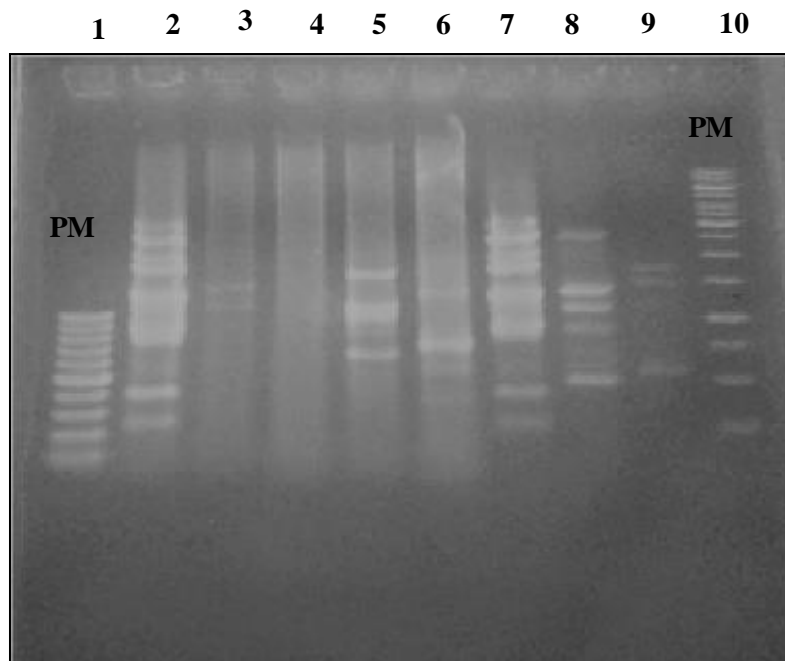


Figura. 12. Estandarización de la técnica RAPD- PCR.

Carril 2 a 6: (OPA 3, OPA 12, OPA 17 y OPA 18, a 10 pmol y con 60 ng/ μ L (DNA). Carril 7 a 9: OPA 3, OPA 12, OPA 17, a 20 pmol y con 85ng/ μ L (DNA). Carriles 1 y 10, marcadores de peso molecular 100 bp DNA Ladder y 1 kb Plus DNA Ladder, respectivamente.

Se evaluaron los 68 aislados de *E. coli* de las dos bahías de estudio, mediante RAPD-PCR. En la figura 13, se observa las bandas amplificadas para ocho muestras, cuatro provenientes de la bahía de Samanco y cuatro de la bahía de Tortugas, empleando el iniciador OPA-03.

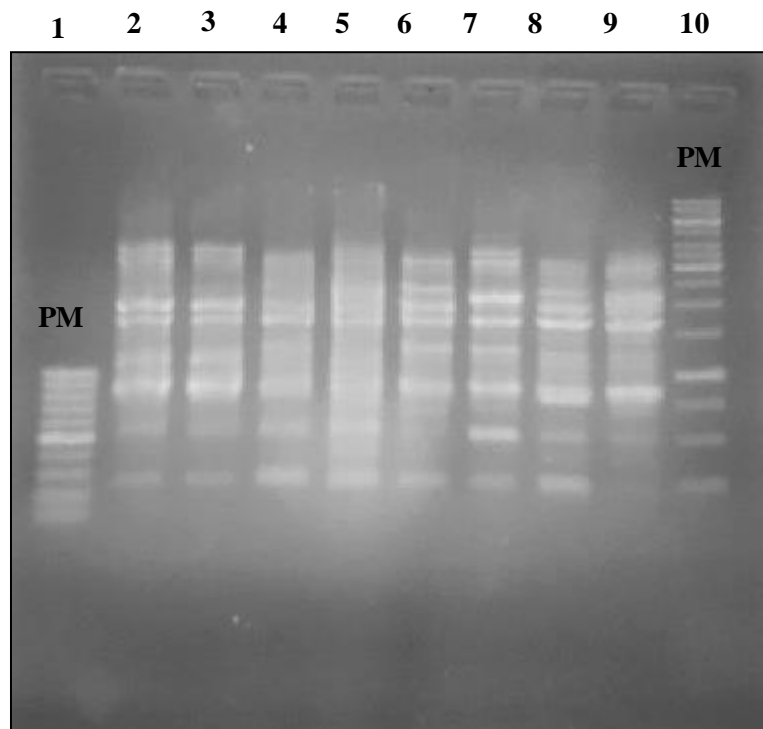


Figura. 13. Amplificación mediante la técnica RAPD- PCR.

La figura muestra los resultados obtenidos a partir de ocho cepas de *Escherichia coli*, usando el iniciador OPA 3 en la prueba de RAPD-PCR. Carril 1: marcador molecular de 100 bp DNA. Carriles 2 - 5: *E. coli* aisladas de la bahía de Samanco. Carriles 6- 9: *E. coli* aisladas de la bahía de Tortugas). Carril 10: marcador molecular 1 kb Plus DNA.

Para el análisis de la diversidad genética, se construyó el dendograma empleando el programa NTSYS 2.0, con el coeficiente UPGMA DICE.

Todos los aislados de *E. coli* analizados fueron agrupados en 19 clúster (I – XIX), con una similitud de 85%. El clúster I alberga 8 colonias en dos subgrupos (A y B). La primera se subdivide en dos subgrupos más (1 y 2). El clúster IA1 contiene 3 aislados homólogos, el clúster IA2 posee dos aislados homólogos. Mientras que el clúster IB, presenta 3 colonias similares (figura 14).

El clúster II posee 4 colonias, contiene 2 subgrupos (A y B), el subgrupo A presenta dos divisiones (1 y 2). Todos los aislados pertenecientes a este clúster no

presentaron homología. El clúster III, solo contiene a la colonia C123MTB, procedente de la bahía de Tortugas y que tiene un 83% de similitud con el clúster II. El clúster IV alberga dos subgrupos (A y B) y presentó el mayor número de subdivisiones en el subgrupo A, este a la vez muestra 12 colonias con patrones similares, 7 son de la subdivisión 1.1.1, 2 de 1.1.2 y 3 colonias similares en la subdivisión 1.2. Lo característico de estas colonias homólogas es que la primera y tercera subdivisión de estas colonias procede de las dos bahías de estudio. Así mismo, la subdivisión también del subgrupo A (2.1 y 2.2) presentan dos aislados que albergan genes de virulencia de *E. coli* diarrogénicas y ambas proceden de la bahía de Tortugas (C33MTA Y C73MTB), el primero contiene el gen *Stx1* del patotipo EHEC y el segundo aislado el gen *eae*, también del patotipo EHEC. Por otro lado, el subgrupo B posee una sola colonia C63MTA, con características distintas a las colonias anteriormente mencionadas, pero tiene el mismo origen.

El V clúster también contiene dos subgrupos (A y B), el primero tiene una subdivisión (A1 y A2), la segunda posee la colonia C31MSB procede de la bahía de Samanco y contiene a los genes *Stx1* y *Stx2*, del patotipo EHEC. Mientras que el subgrupo B, con un aislado, C23MTB de la Bahía de Tortugas. El clúster VI posee una colonia (C24MSB), es la colonia que tiene mayor diferencias y características con las otras estudios y procede de la bahía de Samanco. El clúster VII, también posee una sola colonia (C123MTA), pero posee una similitud del 85% con el clúster VIII. El clúster VIII presenta dos subgrupos (A y B). A contiene subdivisiones (1 y 2), A1 se subdivide aún en dos subdivisiones más (1.1 y 1.2), estas últimas subdivisiones poseen cinco colonias con patrones de amplificación similar, dos en 1.1 procedentes de la bahía de Tortugas y tres colonias homólogas en la segunda subdivisión que

proviene de la bahía de Samanco. El subgrupo B formado por la colonia C22MSB, que alberga los genes *Stx1* y *Stx2*, característicos del patotipo EHEC y procede de la bahía de Samanco. El clúster IX muestra dos subgrupos (A y B), ambos aislados provienen de la bahía de Tortugas.

Por otro lado, el clúster X limitadamente con una sola colonia. El clúster XI, con dos subgrupos (A y B), A2 presenta tres colonias con patrones de amplificación similares, las cuales provienen de la bahía de Tortugas; el sub grupo B, posee un solo aislado C31MSB. Del mismo modo, el clúster XII muestra una sola colonia, C113MTB de la bahía de Samanco.

El clúster XIII, presenta dos subgrupos (A y B). A alberga 3 colonias homólogas que proceden de la bahía de Tortugas. El clúster XIV, con dos colonias de las dos bahías de estudios, con un 86% de similitud. El clúster XV alberga dos subgrupos (A y B), sólo AI posee dos colonias con patrones de amplificación disitntos C74MSA y C184MSA, ambas colonias provienen de la bahía de Samanco. En el clúster XVI y XVIII, se muestra sólo un aislado C114MSB y C74MSB respectivamente, ambas proceden de la bahía de Samanco. El clúster XVII, con dos subgrupos (A y B), ambos subgrupos poseen dos colonias con patrones de amplificación similares A:(C34MSB, C84MSB) y B:(C24MSB, C134MSB). Finalmente, el clúster XIX alberga dos subgrupos (A y B), el subgrupo contiene colonias patrones de amplificación similares C13MTA y C124MSB, de las bahías de Tortugas y Samanco, respectivamente.

Las colonias positivas a los genes *Stx1* y *Stx2* provenientes de la bahía de Samanco, no muestran perfiles genéticos similares, ubicándose en los clústers V y IX, mientras que los genes *Stx1* y *eae*, provenientes de la bahía de Tortugas pertenecen al

mismo cluster (IV), presentando estas colonias un 93% de patrones de amplificación similares (fig. 14).

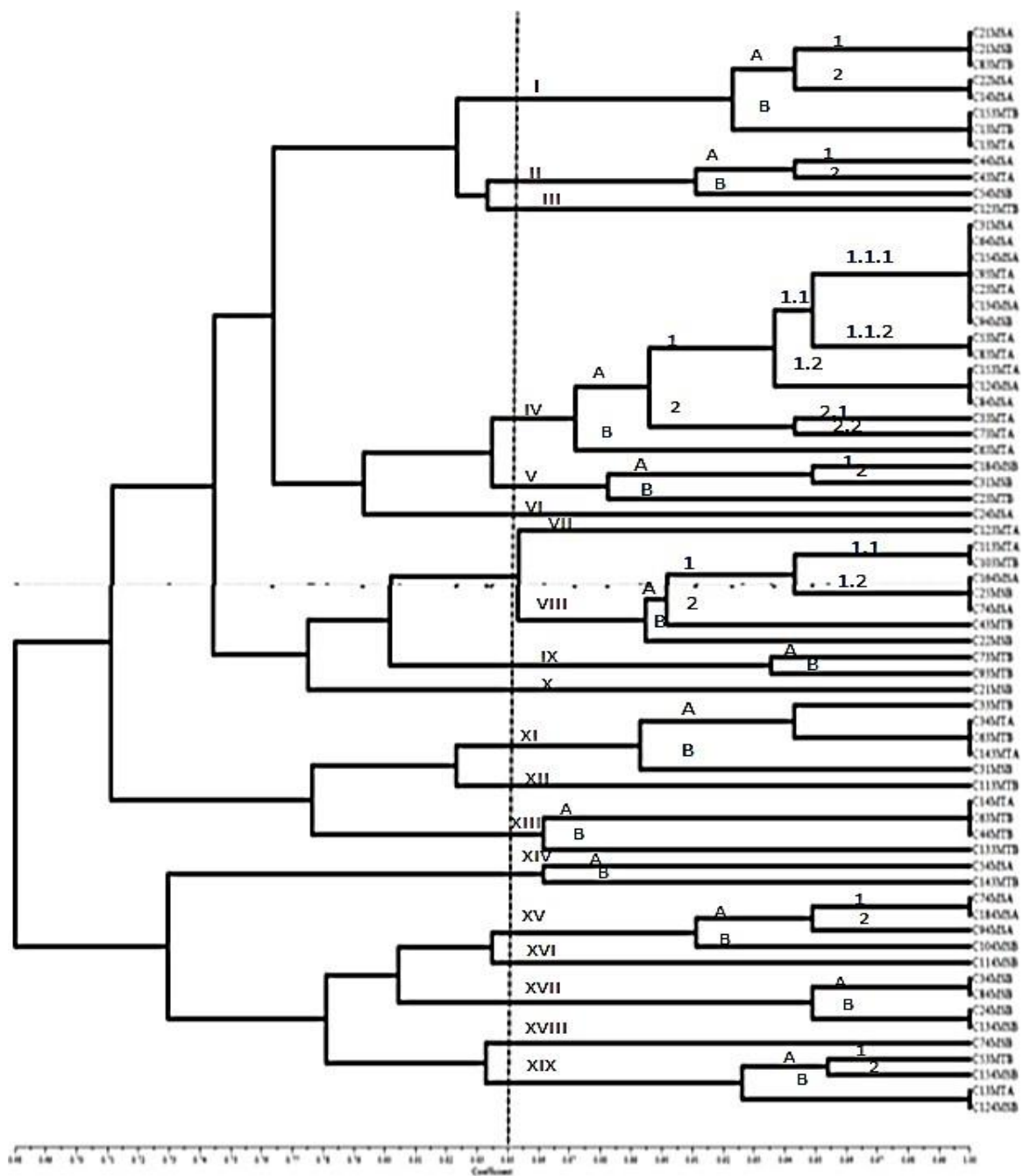


Figura.14. Relaciones genéticas de *E. coli* provenientes de la bahía de Samanco y la bahía de Tortugas.

Dendograma construido con el programa NTSYS 2.0, coeficiente DICE y el método de agrupamiento UPGMA.

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados encontrados en este estudio ponen en evidencia la presencia de genes que codifican la producción de toxinas presentes en conchas de abanico, situación que podría preentar serios riesgos a la salud pública.

Las cepas de *E. coli* patógenas son detectables empleando técnicas de biología molecular mediante la amplificación de genes que codifican factores de virulencia específicos (Torres et al., 2010). En este estudio se evaluó la presencia de *E. coli* en las muestras de conchas de abanico provenientes de dos bahías de suma importancia para el cultivo de esta especie en la región Ancash (bahía de Tortugas y Samanco), ambas bahías mostraron elevadas frecuencias de aislamiento de *E. coli*, 68.6% en la bahía de Samanco y 86.8% en la bahía de Tortugas, existiendo diferencia significativa entre ambas ($p= 0.0453$), según la prueba estadística de Chi- Cuadrado.

Los datos obtenidos en nuestro estudio coinciden con otro realizado por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE, 2015), en las principales bahías de Ancash, donde se indicó que la Bahía de Tortugas posee elevado número de coliformes totales, que sobrepasan los límites de calidad para aguas.

La pesca y la maricultura (cultivo de conchas de abanico) son las actividades principales en las bahías de donde proceden las muestras estudiadas (IMARPE, 2009). El cultivo de la concha de abanico es una actividad económica importante en las bahías de donde proceden las muestras estudiadas (IMARPE, 2009). Lamentablemente, debido a que los desperdicios generados por esta industria son eliminados directamente al mar ya que los pescadores no cuentan con servicios sanitarios, se contamina el mar donde

crece esta especie acuícola, con heces que contienen bacterias intestinales, principalmente *E. coli*.

La presencia de *E. coli* en ambientes marinos no es un acontecimiento extraño (CDC, 2017), si bien es cierto este microorganismo está adaptado para vivir en las entrañas de los animales calientes, también se ha encontrado en el suelo, agua, estiércol y en todo el entorno natural. Esta bacteria es considerada un riesgo de contaminación no solo en el agua, sino también en los productos alimenticios, y en los últimos años se han reportado un aumento en el número de alimentos rechazados debido a la contaminación por este patógeno (Kaper et al., 2004).

En Ecuador, Larreátegui (2003) hicieron estudios microbiológicos en el Estero Puerto Hondo, encontrando Coliformes totales con un rango de 115 - 256 ufc/mL en muestras de agua y 35 - 45 ufc/g en moluscos (*Ostrea*), indicando que esta área no tiene un alto grado de contaminación microbiológica. Estos resultados concuerdan con lo que hallamos durante el muestreo ya que los valores de *E. coli* que detectamos también fueron bajos. Aún así, estas bajas concentraciones no aseguran que los productos acuícolas sean completamente seguros para su consumo.

Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos previamente con otros moluscos. Quiñones et al. (2000), en un estudio realizado con almejas, encontraron la presencia de coliformes fecales en el 100% de las muestras evaluadas. Sigüencia (2010), demostró que todas las muestras analizadas de *Mytella guyanensis* y *Ostrea columbiensis*, colectadas en Estero Puerto Hondo, presentaron acumulación de coliformes totales y *E. coli* con un rango de 25 -815 UFC/g. y de 20 - 350 UFC/g. respectivamente.

En otro estudio realizado en el Mercado Mayorista Pesquero de Ventanilla-Callao, a partir de productos marinos como *A. purpuratus*, aunque procedentes de otra zona, también se identificaron altos niveles de coliformes fecales e incluso la presencia de *Salmonella* sp. (Carbajal et al., 2003), resaltando, nuevamente, el potencial que tiene esta especie acuícola como vehículo de patógenos intestinales.

Por todo esto, es importante considerar análisis moleculares de la bacteria, además del monitoreo de los niveles de contaminación porque las diferencias entre las cepas de *E. coli* patógenas a menudo son detectables solo a este nivel y muchas de estas diferencias causan cambios en la fisiología o estado de salud del hospedero cuando son consumidas (Nataro y Kaper, 1998).

Kaper et al. (2004) afirman que existe una gran diversidad de cepas de *E. coli* que causan diversas enfermedades intestinales y extraintestinales por medio de factores de virulencia que afectan a una amplia gama de procesos celulares.

En nuestro estudio se han encontrado los genes *stx1*, *stx2* y *eae* en bajo porcentaje de las muestras estudiadas; dos colonias de la bahía de Samanco albergaban los genes *Stx1* y *Stx2* (5.71%), mientras que, en la bahía de Tortugas, se obtuvieron dos aislados que contenían los genes *Stx1* y *eae* en muestras independientes (fig.12) con un porcentaje del 3.03% de todas las muestras evaluadas de esta bahía. Estos genes de virulencia están involucrados en la patogénesis de ciertas *E. coli* diarrogénicas, como es el caso del *Stx* con sus dos variantes *Stx1* y *Stx2*, son los principales mecanismos de patogenicidad de la EHEC (Jackson et al., 1987) y se pueden aislar bacterias que sintetizan una de las toxinas o ambas (Nataro y Kaper, 1998), por otro lado, el gen *eae* también participa en la adherencia de EPEC a las células huésped en los sitios de las lesiones A/E (Nataro y Kaper, 1998).

Es importante mencionar que los tres genes de virulencia encontrados en nuestro estudio, fueron procedentes de los sistemas de cultivo de fondo, que, está más próximo al litoral, zona donde ocurre mayor contaminación. Asimismo, las especies de este cultivo están en contacto con el fango siendo importante que se tome mayor énfasis a los monitoreos y estudios a este tipo de cultivo.

Los genes encontrados en este estudio, también se han reportado en otros estudios, donde han evaluado productos pesqueros, como el caso de Barbosa et al. (2016), quienes reportaron la presencia de dos genes de virulencia, *eae*, indicativo del patotipo enteropatógeno (EPEC) y el gen *Stx*, que está presente en el patotipo de *E. coli* productora de enterotoxinas (ETEC). Además, Balière et al. (2015), detectaron la presencia del gen *stx*, involucrado en la producción de la toxina shiga, en el 30% de lotes de moluscos estudiados y el gen *eae*, en un gran porcentaje de los mariscos evaluados.

Sanath et al. (2001), empleando también la técnica de RAPD-PCR, encontraron elevada diversidad genética de aislados de *E. coli* en muestras de peces y moluscos.

Los perfiles genéticos obtenidos empleando la técnica de RAPD-PCR demostraron la gran diversidad genética de los aislados de ambas bahías, permitiéndonos identificar 19 grupos (clusters) con 85 % de similitud, en el dendograma construido (Fig. 14). Asimismo, hemos detectado la presencia de diferentes subpoblaciones entre los lugares de muestreo, como también colonias similares al 100%. Fue interesante encontrar tres cepas similares al 100%, donde dos de estos procedían de la bahía de Samanco y una colonia provenía de la bahía de Tortugas, esto podría estar asociado con la presencia de abundantes poblaciones de lobos marinos y aves marinas que habitan en estas zonas (IMARPE, 2009).

Otras técnicas moleculares de tipaje también se han utilizado para el estudio de diversidad genética. Salinas et al. (2010), detectaron la presencia de cepas EPEC en aguas de bahías del norte de Chile, las cuales genotipificaron con la técnica de ERIC-PCR (amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas de enterobacterias) revelando que existe una elevada diversidad genética de *E. coli* en la costa norte de Chile. Similares resultados obtuvieron Leung et al. (2004), mediante la técnica de BOX-PCR, afirmando que las cepas de *E. coli* de humanos y animales se relacionan genéticamente según su procedencia, esto realizado en un estudio en Canadá.

Si bien es cierto que se han encontrados bajos porcentajes de genes de virulencia de las *E. coli* patogénicas, la sola presencia de estos es un indicativo del riesgo que corre la población al consumir estos moluscos, y debe servir para que las autoridades exijan una correcta depuración de estos moluscos, buscando disminuir la viabilidad de esta bacteria.

IX. CONCLUSIONES

- Se aislaron e identificaron bioquímicamente 35 cepas de *E. coli* de la bahía de Samanco y 33 cepas de *E. coli* de la bahía de Tortugas.
- La frecuencia de *E. coli* fue mayor (86.8%) en la bahía de tortugas que en la bahía de samanco (68.6%).
- Se detectó la presencia de los genes *Stx1* y *Stx2* (n=2) en muestras de la bahía de Samanco y *Stx1* (n=1) y el gen *eae* (n=1) en las muestras evaluadas de la bahía de Tortugas.
- Los aislados de *E. coli* son diferenciables genéticamente según los patrones de diferenciación de la técnica RAPD- PCR empleando el iniciador OPA3, sin embargo, se detectó la presencia de bacterias con perfiles idénticos.

X. RECOMENDACIONES

- Se sugiere realizar estudios microbiológicos en lugares de mayor extracción de la concha de abanico, durante diferentes estaciones, con el fin de conocer la situación sanitaria de estos productos durante todo el año.
-
- Asimismo, se recomienda estudios adicionales, empleando técnicas moleculares, para detectar factores de virulencia adicionales o genes que confieren resistencia a antimicrobianos, con el fin de reforzar programas de vigilancia epidemiológica y medir sus efectos sobre la salud pública.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, R. 2013. *Escherichia coli* in seafood: A brief overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4: 450-454.

Anantha, R.P., Stone, K.D., Donnenberg, M.S. 2000. Effects of bfp Mutations on Biogenesis of Functional Enteropathogenic *Escherichia coli* Type IV Pili. *Journal of bacteriology* 182(9): 2498-2506.

Balière, C., Rincé, A., Thevenot, D., Gourmelon, M. 2015. Successful detection of pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish, environmental waters and sediment using the ISO/TS-13136 method. *Letters in Applied Microbiology* 60(4): 315-320.

Barbosa, L.J., Ribeiro, L.F., Lavezzo, L.F., Barbosa, M.M.C., Rossi, G.A.M., do Amaral, L.A. 2016. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and microbiological quality of chilled shrimp sold in street markets. *Letters in Applied Microbiology* 62(5): 372-378.

Bilge, S.S., Clausen, C.R., Lau, W., Moseley, S.L. 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Journal of Bacteriology* 171(8): 4281-4289.

Cabello R., R., Benavente I.F.H. 2002. Síndrome diarreico infeccioso, Ed. Médica Panamericana. México, D.F. 653.

Canizalez-Roman, A., Gonzalez-Nuñez, E., Vidal, J.E., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N. 2013. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology* 164(1): 36-45. Carbajal M., Rabelo P., Gonzales C., Ayala M. 2003. Evaluación microbiológica de productos adquiridos en el mercado mayorista pesquero de Ventanilla – Perú. *Rev. Cubana Salud Pública. Instituto Tecnológico Pesquero de Perú*: 29(2):122- 123

Castro A. M. 2014. Bacteriología médica basada en problemas. 2ª Edición.

Editorial El Manual Moderno. México, D.F. 344.

CDC. 2017. *E. coli* y la seguridad de los alimentos - Especiales CDC - CDC en Español. 1-5.

Costa-Carvalho, B., Bertipaglia, A., Solé, D., Naspitz, C., Scaletsky, IC. 1994. Detection of immunoglobulin (IgG and IgA) anti-outer-membrane proteins of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in saliva, colostrum, breast milk, seum, cord blood and amniotic fluid. Study of inhibition of localized adherence of EPEC to HeLa Cells. *Acta Paediatr* 83(8): 870-873.

Croxen, M.A., Finlay, B.B. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8(1): 26-38.

[FAO] Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y la Agricultura. 2011. Erradicación mundial de la peste bovina. *Empres*.

[FDA] Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y la Agricultura. 2016. Bacteriological Analytical Manual. *FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition* 1-8.

[FDA] Organización de las Naciones Unidas para La Alimentación y la Agricultura. 2013. Las enfermedades transmitidas por alimentos son especialmente peligrosas para las personas vulnerables. 1-5.

[FONDEPES] Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. 2004. Manual de Cultivo Suspendido de Concha de Abanico. 1-4.

García, M.I., Jouve, M., Nataro, J.P., Gounon, P., Le Bouguéneq, C. 2000. Characterization of the AfaD-like family of invasins encoded by pathogenic *Escherichia coli* associated with intestinal and extra-intestinal infections. *FEBS Letters* 479(3): 111-117.

Gómez-Duarte, O.G., Arzuza, O., Urbina, D., Bai, J., Guerra, J., Montes, O.,

Huguet, J., Huapaya, B., Salazar, E. 2001. *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. 19: 63-67.

Huys, G., Cnockaert, M., Janda, J.M., Swings, J. 2003. *Escherichia albertii* sp.

nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(Pt3): 807-810.

[IMARPE] Instituto del Mar del Perú. 2015. Calidad del ambiente marino y costero en la región Áncash, 2012. *Inf Inst Mar Perú* 42: .

[IMARPE] Instituto del Mar del Perú. 2009. Estudio de Linea base en el ámbito marino del área sur de bahía El Ferrol. *Informe Interno IMARPE* 1-78.

Jackson, M.P., Neil , R.J., O'Brien, A.D., Holmes, R.K., Newland, J.W. 1987. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters* 44(1): 109-114.

Jain, S., Chen, L., Dechet, A., Hertz, A.T., Brus, D.L., Hanley, K., Wilson, B. *et al.* 2008. An Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Associated with Sushi Restaurants in Nevada, 2004. *Clinical Infectious Diseases* 47(1): 1-7.

Kaper, J.B. 2005. Pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295(6-7): 355-356.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2(2): 123-140.

Karmali, M., Petric, M., Lim, C., Fleming, P., Arbus, G., Lior, H. 1985. Association Between Idiopathic Hemolytic Uremic Syndrome (Hus) and Infection By Verotoxin Producing *Escherichia-Coli* (Vtec). *The Journal of Infectious Diseases* 151(5): 775-782.

Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M., Lim, C. 1983. Sporadic Cases of Haemolytic-Uraemic Syndrome Associated With Faecal Cytotoxin and Cytotoxin- Producing *Escherichia coli* In Stools. *Lancet* 1(8325): 619-620.

Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., Finlay, B.B. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91(4): 511-520.

Labigne-Roussel, A., Falkow, S. 1988. Distribution and degree of heterogeneity of the afimbrial- adhesin-encoding operon (afa) among uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Infect Immun* 56(3): 640-648.

Larreátegui M. 2003. Análisis bacteriológico y de metales pesados en ostiones capturados en Puerto Hondo. Trabajo de la Cátedra de Metodología de Investigación. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Guayaquil. N° 833. 35.

Le Bouguenec, C., Garcia, M.I., Ouin, V., Desperrier, J.-M., Gounon, P., Labigne, A. 1993. Characterisation of plasmid-borne afa-3 gene cluster encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. *Infect. Immun.* 61(12): 5106-5114.

Leung, K.T., Mackereth, R., Tien, Y.C., Topp, E. 2004. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *FEMS Microbiology Ecology* 47(1): 111-119.

Madhavan, T.P., Sakellaris, H. 2015. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol* 90:155-97.

Mellies, J.L., Navarro-Garcia, F., Okeke, I., Frederickson, J., Nataro, J.P., Kaper, J.B. 2001. espC Pathogenicity Island of Enteropathogenic *Escherichia coli* Encodes an Enterotoxin. 69(1): 315-324.

Ministerio del Ambiente. 2017. Aprueban Estandares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen disposiciones complementarias. *El Peruano* 6-9.

Ministerio de la Producción. 2011. Anuario Estadístico Pesquero y Acuícola 2016. 199.

Ministerio de Salud del Perú. 2001. Estudio de etiología de la diarrea en las Direcciones de Salud Cajamarca, Lambayeque, Loreto y Lima este: Informe Técnico. 21.

Mitsuda, T., Muto, T., Yamada, M., Kobayashi, N., Toba, M., Aihara, Y., Ito, A., Yokota, S. 1998. Epidemiological study of a food-borne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by pulsed-field gel electrophoresis and

randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 36(3): 652-656.

Munson, G.P. 2013. Virulence regulons of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Immunologic Research* 57(1-3): 229-236.

Nataro, J.P., Deng, Y., Maneval, D.R., German, A.L., Martin, W.C., Levine, M.M. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of Human erythrocytes. *Infection and immunity* 60(6): 2297-2304.

Nataro, J.P., Kaper, J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11(1): 142-201.

Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., Levine, M.M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatric Infectious Disease Journal* 6(9): 829-831.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2007. Brote de *Escherichia coli* O157:H7 en espinacas. 5.

[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2018. *E. coli*. Datos y cifras. 1-6.

Paton, A.W., Woodrow, M.C., Doyle, R.M., Lanser, J.A., Paton, J.C. 1999. Molecular characterization of a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *Journal of clinical microbiology* 37(10): 3357-61.

Pizarro, M.A., Orozco, J.H., Degarbo, S.M., Calderón, A.E., Nardello, A.L., Laciari, A., Rüttler, M.E. 2013. Virulence profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* of bovine origin, in Mendoza, Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(4): 1173-1180.

Quiñones, E.I., Vasquez C., Pedroche F., Moreno L., Rodas O.R. 2000. Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella*, y detección de coliformes fecales en almejas del Golfo de México. *Hidrobiología*: 10(2): 131- 138.

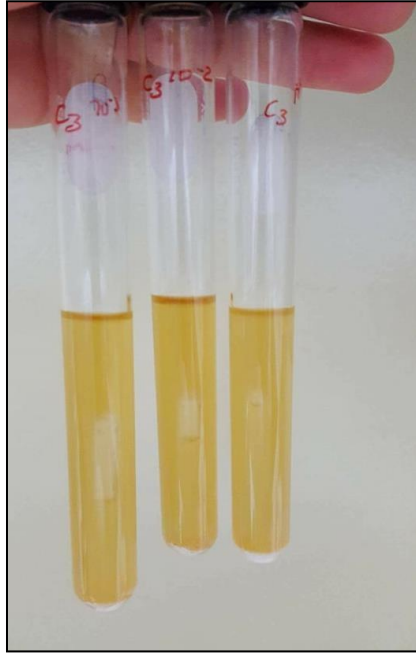
Rivera, F.P., Ochoa, T.J., Maves, R.C., Bernal, M., Medina, A.M., Meza, R.,

- Ruiz, L. 2012. Estado de la acuicultura en el Perú. *Revista AquaTIC* 37: 99-106.
- Sanath Kumar H., Otta S., Karunasagar I., Karunasagar I. 2001. Detection of Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Letters in Applied Microbiology* 33(5):334-338.
- Salinas, P., Moraga, R., Santander, E., Sielfeld, W. 2010. Presence of diarrheagenic strains of *Escherichia coli* and virulence genes study in isolates from feces of two populations of South American sea lion, *Otaria flavescens* in Northern Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 45(1): 153-158.
- [SANIPES] Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. 2016. Control Oficial de Zonas y Areas de Producción Clasificadas de Moluscos Bivalvos. 16.
- Scaletsky, I.C., Fabriccotti, S.H., Carvalho, R.L., Nunes, C.R., Maranhão, H.S., Morais, M.B., Fagundes-Neto, U. 2002. Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study. *Journal of Clinical Microbiology* 40(2): 645-648.
- Scaletsky, I.C., Silva, M.L., Trabulsi, L.R. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and Immunity* 45(2): 534-536.
- Servin, A.L. 2014. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. *Clinical Microbiology Reviews* 27(4): 823-869.
- Siguencia, R. 2010. Niveles de Coliformes totales y *Escherichia coli* en Bivalvos de Interés Comercial *Ostrea columbiensis* y *Mytella guyanensis* (Molusca: Bivalvia) como bioindicador de contaminación microbológica en el estero puerto Homdo, Provincia del Guayas-Ecuador. 16.
- Sixma, T.K., Kalk, K.H., Van Zanten, B.A.M., Dauter, Z., Kingma, J., Witholt, B., Hol, W.G.J. 1993. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a

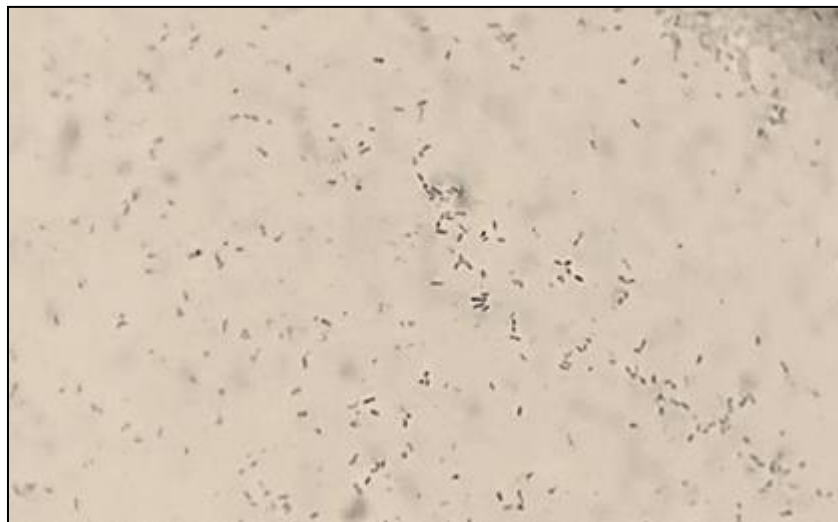
- close relative of cholera toxin. *Journal of molecular biology* 230(3): 890–918.
- Sohel, I., Puente, J.L., Ramer, S.W., Bieber, D., Wu, C.Y., Schoolnik, G.K. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol* 178(9): 2613-2618.
- Spears, K.J., Roe, A.J., Gally, D.L. 2006. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 255(2): 187-202.
- Stone, K.D., Zhang, H.Z., Carlson, L.K., Sonnenberg, M.S. 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Molecular Microbiology* 20(2): 325-337.
- Strubbia, S., Lyons, B.P., Lee, R.J. 2016. Geographical and temporal variation of *E. coli* and norovirus in mussels. *Marine Pollution Bulletin* 107(1): 66-70.
- Torres A. G. 2016. *Escherichia coli* in the Americas in Latin America. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. I. Texas, USA
- Torres, A.G., Arenas-Hernandez, M.M., Martinez-Laguna, Y. 2010. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. I. Texas, USA.
- Torres A. G. 2006. Adhesins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *AScience/EcoSaIPLUS*. 1-9.
- Vittecoq, M., Laurens, C., Brazier, L., Durand, P., Elguero, E., Arnal, A., Thomas, F. et al. 2017. VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* in gulls from southern France. *Ecology and Evolution* 7(4): 1224-1232.
- [WHO] World Health Organization. 1998. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Report of a WHO scientific working group meeting* 1-35.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Siembra realizada en caldo E.C.



Anexo 2. Coloración Gram, realizado a las colonias de *Escherichia coli*



Anexo.3. Zonas de Estudio

a) Bahía de Tortugas



b) Bahía de Samanco



Anexo. 4. Procesamiento de muestras

a. Homogenizado de las muestras



b. Cuantificación del DNA

