

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“Determinación de *Escherichia coli* enteropatógena  
(ECEP) en agua de mar del Circuito de Playas de la  
Costa Verde”**

Tesis para optar el Título Profesional de

Licenciada en Biología

Verónica Patricia Benvenuto Vargas

**Lima, Perú**

**2017**

## *DEDICATORIA*

*A mi madre, por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años. Gracias a ella he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por iluminar mi camino.*

*A mis queridos padres, Joel y Violeta; a mis hermanas Karla, Hillary y Camila quienes siempre me brindan su apoyo en todo momento.*

*A mi Director de tesis, quien con su experiencia me orientó en el desarrollo de esta tesis.*

*A quien ha sabido ganar mi corazón y llenar de sonrisas mis días, Víctor Caynero R.*

# ÍNDICE

ÍNDICE	4
INDICE TABLAS	6
INDICE DE FIGURAS	7
I. INTRODUCCIÓN	11
II. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo general:	13
2.2 Objetivos Específicos:	13
III. MARCO TEÓRICO	14
3.1 Características de <i>Escherichia coli</i>	14
3.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (ECEP)	16
3.2.1 Epidemiología	16
3.2.2 Mecanismo de acción	19
3.3 Identificación de <i>Escherichia coli</i>	19
3.3.1 Biotipado bioquímico	20
3.3.2 Sistemas miniaturizados API®	21
3.3.3 API 20E	21
3.3.4 Interpretación de los resultados	21
3.4 Identificación de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	22
3.5 Resistencia de <i>Escherichia coli</i> a los antibióticos	22
IV. ANTECEDENTES	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 Área de muestreo	34
5.2 Recolección de las muestras	36
5.3 Lugar de la experimentación	37
5.4 Procesamiento de la muestra	37
VI. RESULTADOS	44

6.1	Condiciones físicas de las muestras de agua de mar de las playas del circuito de la Costa Verde	44
6.2	Pre-enriquecimiento de la muestra y aislamiento de enterobacterias	47
6.3	Resiembra en agar EMB (Eosin Methylene Blue Agar)	48
6.4	Aislamiento de enterobacterias por cada playa muestreada	50
6.5	Prueba de confirmación bioquímica con Citrato de Simmons	53
6.6	Identificación Bioquímica de <i>Escherichia coli</i> mediante API 20E	54
6.7	Identificación Serológica de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena ECEP	56
6.8	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar	59
VII.	DISCUSIÓN	63
VIII.	CONCLUSIONES	65

# INDICE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Playas de la Costa Verde consideradas en el muestreo y número de muestras obtenidas por longitud de playa _____	35
<b>Tabla 2.</b> Número de muestras recolectadas por playas del Circuito de la Costa Verde. ____	45
<b>Tabla 3.</b> Estadísticos descriptivos asociados a las mediciones de temperatura y pH en las muestras de agua de mar de 15 playas del Circuito de Playas de la Costa Verde _____	46
<b>Tabla 4:</b> Resumen de resultados de aislamiento de enterobacterias en 15 playas del Circuito de Playas de la Costa Verde. _____	51
<b>Tabla 5:</b> Porcentajes de resultados positivos y negativos de las pruebas de Mc Conkey, EMB y TBX en las muestras de agua de mar de 15 playas del circuito de playa de la Costa Verde _____	52
<b>Tabla 6:</b> Número y porcentajes de cepas de <i>Escherichia coli</i> identificadas mediante la prueba API en las muestras del circuito de playa de la Costa Verde _____	56
<b>Tabla 7.</b> Cepas de <i>Escherichia coli</i> enteropatógenas identificadas por cada suero polivalente A y B _____	57
<b>Tabla 8.</b> Estadísticos descriptivos asociados a los diámetros de halo de inhibición de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> efectuados por su susceptibilidad a 8 antibióticos _____	59
<b>Tabla 9.</b> Estadísticos descriptivos asociados a los diámetros de halo de inhibición de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 _____	61

# INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Recolección de las muestras.....	36
<b>Figura 2.</b> Enriquecimiento e incubación de las muestras de agua de mar de las Playas del Circuito de Playas de la Costa Verde.....	37
<b>Figura 3.</b> Kit API 20E BioMérieux.....	40
<b>Figura 4.</b> Aplicación de la Prueba Api 20E BioMérieux.....	40
<b>Figura 5.</b> Antibióticos utilizados en la Prueba de Susceptibilidad Microbiana.....	42
<b>Figura 6.</b> Cepa ATCC 25922 de <i>Escherichia coli</i> .....	43
<b>Figura 7.</b> Rangos de temperatura en °C y pH en las muestras de agua del Circuito de Playas de la Costa Verde.....	47
<b>Figura 8.</b> Colonias lactosa positiva y negativas en agar Mc Conkey.....	48
<b>Figura 9.</b> Crecimiento de bacterias fermentadoras de lactosa (colonias rojo grosella).....	48
<b>Figura 10.</b> Crecimiento de colonias verde metálico en diferentes muestras de agua del Circuito de Playas de la Costa Verde.....	49
<b>Figura 11:</b> Colonias celestes por la actividad de B-D-Glucoronidasa específica de <i>Escherichia coli</i> .....	50
<b>Figura 12:</b> Porcentajes de resultados positivos y negativos de las pruebas de Mc Conkey, EMB y TBX en las muestras de agua de mar de 15 playas del circuito de playa de la Costa Verde.....	53
<b>Figura 13.</b> Resultado de la prueba Bioquímica Citrato de Simmons, confirmación de resultados de <i>Escherichia coli</i> .....	54
<b>Figura 14.</b> Comparación de porcentajes de presencia de <i>Escherichia coli</i> que se detectaron (al menos una cepa) en las muestras de agua de mar de 12 playas del circuito de playas de la Costa Verde, ordenadas en orden creciente.....	55
<b>Figura 15.</b> Resultados positivos para los Antisueros Polivalentes A y B.....	58
<b>Figura 16.</b> Identificación Serológica de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena con Antisueros Polivalentes A y B.....	58
<b>Figura 17(a).</b> Comparación de las medias de los halos de inhibición detectadas para la evaluación de la resistencia a antibióticos de <i>Escherichia coli</i> en orden creciente.....	60
<b>Figura 17(b).</b> Comparación de las medianas de los halos de inhibición detectadas para la evaluación de la resistencia a antibióticos de <i>Escherichia coli</i> .....	60

**Figura 18.** Comparación de las medidas de los diámetros de los halos de inhibición  
obtenidos con la prueba de susceptibilidad microbiana *Escherichia coli* ATCC 25922 ..... 62

**Figura 19.** Pruebas de antibiograma a las cepas aisladas del agua de mar del Circuito de  
Playas de la Costa Verde..... 62



## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en el Circuito de Playas de la Costa Verde de Lima Metropolitana. Para ello, se realizó el análisis de 71 muestras obtenidas de 15 playas del Circuito de Playas de Costa Verde, los análisis fueron: aislamiento en medios de cultivo selectivos de Agar Mac Conkey, EMB y TBX, identificación bioquímica utilizando pruebas miniaturizadas API 20E, y determinación serológica de las cepas virulentas *Escherichia coli* enteropatógena con sueros anti-*E. coli* enteropatógena clásica del Laboratorio Probac de Brasil. Se analizaron los datos obtenidos utilizando programa SPSS versión 19 y Excel 2013 para resumir los datos en información estadística sintetizada. Se determinó que del total de 100 cepas de *Escherichia coli* identificadas, 33 dieron positivo para la prueba con sueros anti-*E. coli* enteropatógena. Del total de cepas positivas para *Escherichia coli* enteropatógena 7 cepas fueron positivas para el serogrupo A y 26 fueron positivas para el serogrupo B.

Palabras clave: *Escherichia coli*, *Escherichia coli* enteropatógena, ECEP, API 20E, Serogrupos.

## ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the presence of enteropathogenic *Escherichia coli* (ECEP) in the Beach Circuit of the Green Coast of Metropolitan Lima. For this purpose, the analysis of 71 samples obtained from 15 beaches of Costa Verde Beach Circuits was carried out. The analyzes were: isolation in selective culture media of Mac Conkey Agar, EMB and TBX, biochemical identification using miniaturized API 20E tests, and determination Serology of virulent *Escherichia coli* enteropathogenic strains with anti-*E.coli* enteropathogenic sera from the Brazilian Probac Laboratory. Data were analyzed using SPSS software version 19 and Excel 2013 to summarize the data in statistical information synthesized. It was determined that out of 100 identified *Escherichia coli* strains, 33 were positive for the test with enteropathogenic *Escherichia coli* sera. Of the total strains positive for *Escherichia coli* enteropathogenic 7 strains were positive for serogroup A and 26 were positive for serogroup B.

Key words: *Escherichia coli*, Enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC, Serogroups.

# I. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los cuerpos naturales de agua es una problemática, principalmente en los países de América Latina y el Caribe, relacionada con la descarga incontrolada de aguas residuales domésticas sin tratamiento, las cuales contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras, generando un deterioro de los ecosistemas y causando numerosas enfermedades, tales como el cólera, la amebiasis, la hepatitis, la fiebre tifoidea, enterocolitis, entre otras.

Uno de los principales patógenos microbianos que se encuentran en cuerpos de agua contaminados y que sirve como indicador de contaminación fecal es *Escherichia coli*. *Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, anaerobia facultativa que forma parte del ecosistema normal del intestino del ser humano y los animales homeotermos. *Escherichia coli* no vive fuera de organismos hospedantes y su presencia en tales sitios resulta de la excreción de desechos de los animales, por ello que *Escherichia coli* es considerada como un microorganismo indicador de la contaminación fecal en el ambiente. Las cepas patógenas de esta especie poseen factores de virulencia específicos que les permite causar un amplio espectro de enfermedades intestinales, como es el caso de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP).

*Escherichia coli* enteropatógena es una bacteria que induce el daño histológico en la mucosa del intestino delgado. El mecanismo lesivo de ECEP es un proceso sumamente complejo. Una vez que alcanzan el intestino delgado, las bacterias se reproducen y comienzan a adherirse entre ellas hasta formar una microcolonia, la cual entra en contacto con la célula huésped mediante el flagelo e inyecta a la célula proteínas que alteran sus

funciones normales. ECEP se adhiere con firmeza, remodela la superficie apical del enterocito y compromete la fisiología normal del intestino, con diarrea resultante.

Esta investigación destaca la importancia sanitaria de la prevención sobre la distribución de *Escherichia coli* enteropatógena, ya que es considerada por la Organización Mundial de la Salud de alta prioridad para el desarrollo de vacunas por sus altas tasas de mortalidad y morbilidad. Debido a la importancia de obtener datos locales de la distribución de este patógeno es importante determinar si hay presencia de *Escherichia coli* enteropatógena en el Circuito de Playas de la Costa Verde, las cuales pertenecen al Proyecto Costa Verde de la Municipalidad de Lima Metropolitana, ya que estas playas brindan beneficios importantes para la recreación, salud y bienestar de las personas; sin embargo, el baño de agua de mar puede presentar riesgos para la salud de los bañistas, ya que las aguas pueden estar contaminadas con excretas humanas, las cuales pueden contener agentes patógenos, tales como *Escherichia coli* enteropatógena.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general:

Determinar la presencia de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en agua de mar de 15 playas del circuito de playas de la Costa Verde.

### 2.2 Objetivos Específicos:

Aislar en medio de cultivo selectivo y diferencial las enterobacterias presentes en las muestras de agua procedentes del circuito de playas.

Identificar mediante pruebas bioquímicas rápidas API 20E BioMérieux a *Escherichia coli* aisladas en los medios de cultivo selectivos.

Confirmar mediante prueba serológica a *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP).

Evaluar la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) mediante prueba de susceptibilidad a Amicacina (MK), Ampicilina (AM), Ceftazidina (CAZ), Norfloxacino (NX), Amoxicilina-Ac. Clavulánico (AMC), Cefuroxima (CXM) y Cotrimoxazol (SXT) y Ciprofloxacino (CIP).

### III. MARCO TEÓRICO

Se sabe que la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* son organismos comensales inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural; sin embargo, diferentes estudios han demostrado que existen diferentes cepas de *Escherichia coli* que son patógenos gastrointestinales graves para los seres humanos. Estas *Escherichia coli* patógena se distingue por su capacidad de provocar enfermedades mediante la producción de toxinas, adhesión e invasión de células huéspedes, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción de tejidos (FAO, s/f).

#### 3.1 Características de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano, no utiliza citrato como fuente de carbono y no produce acetoina. Asimismo, esta bacteria fermenta la glucosa y la lactosa produciendo gas.

*Escherichia coli* es una bacteria mesófila, debido a que su óptimo desarrollo se encuentra entre los 35 – 43 °C, temperatura corporal de los animales de sangre caliente, y su temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C.

Por otro lado, el pH y la actividad de agua pueden influir en la proliferación de *Escherichia coli*. Las condiciones óptimas de desarrollo para estos parámetros son de 7,2 y 0,99 respectivamente. El desarrollo de *Escherichia coli* se detiene a pH inferior a 3,8 y superiores a 9,5; y a valores de actividad de agua inferiores a 0,94. (Rodríguez, 2002).

De acuerdo con Scheutz, 2005, desde el punto de vista taxonómico la clasificación de *Escherichia coli* es la siguiente:

**Phylum:** Proteobacteria

**Clase:** Gammaproteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Escherichia*

**Especie:** *Escherichia coli*

Esta bacteria puede llegar a medir entre 1 hasta 3 micras y posee capacidad de movimiento a través de flagelos (antígeno H), los flagelos son estructuras filiformes que pueden medir varias micras. También posee fimbrias (antígeno F) que son estructuras más pequeñas, que a diferencia de los flagelos no tienen movilidad, pero por ser de naturaleza proteica, posee propiedades antigénicas y hemo aglutinantes. Asimismo, posee una pared celular (antígeno O) que está compuesta por lipopolisacáridos, esta pared es altamente antigénica y con capacidad de excretar endotoxinas. Finalmente, *Escherichia coli* posee una capsula (antígeno K) que le otorga protección contra la fagocitosis y la acción inmunitaria primaria (Rodríguez, 2002).

En la actualidad se identificaron por lo menos seis categorías de *Escherichia coli* que provocan diarreas en el humano *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherentedifusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC). Cada una de ellas tiene codificado a nivel cromosomal y plasmídico diferentes grupos de genes que participan directamente en la virulencia. (Vidal, 2003).

## **3.2 *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP)**

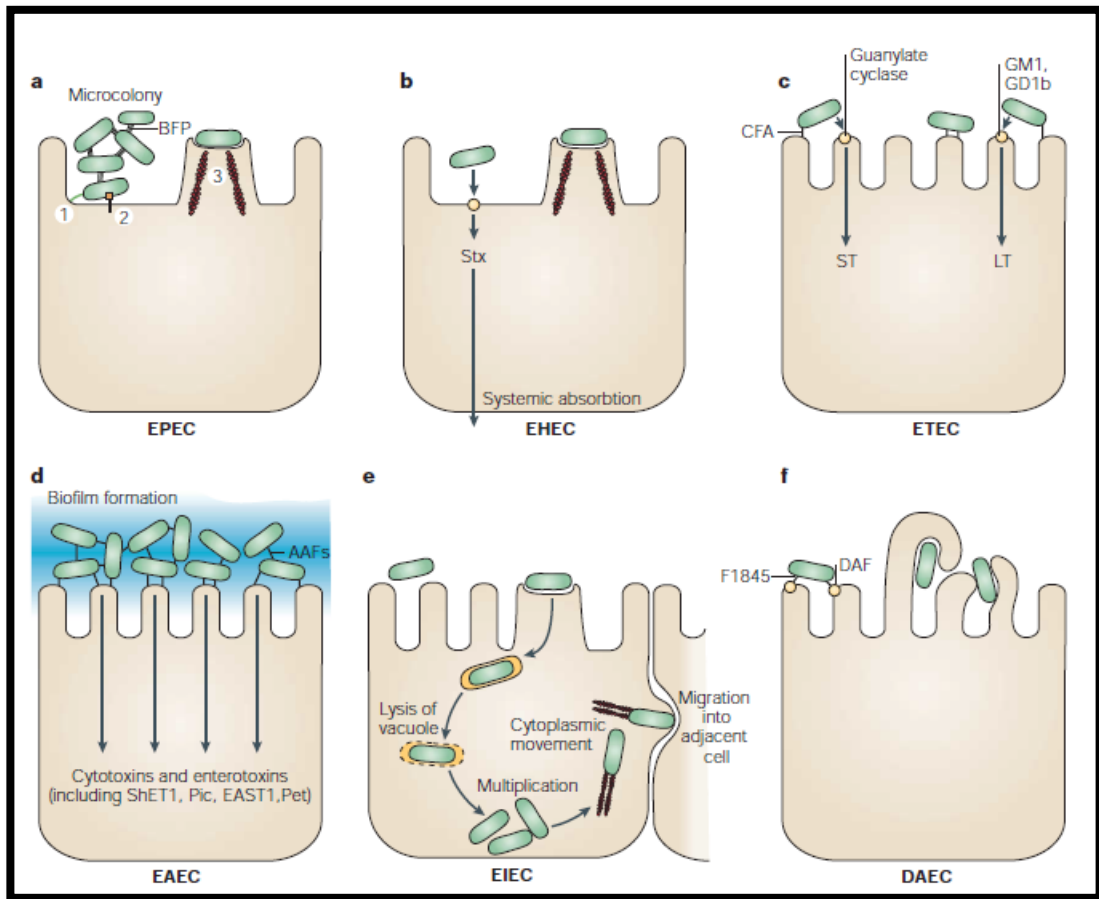
*Escherichia coli* enteropatógena fue la primera variedad de *Escherichia coli* enterovirulenta que se identificó serológicamente, esta bacteria no produce ninguna toxina, su principal factor de patogenicidad es la adherencia. Esta variedad provoca una diarrea acuosa, con vómito y fiebre (Rodríguez, 2002).

Este grupo afecta principalmente a niños entre los seis meses y dos años de edad. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal – oral, y los reservorios de ECEP pueden ser niños y adultos con o sin síntomas (Rodríguez, 2002)

### **3.2.1 Epidemiología**

La distribución de ECEP es mundial y es de particular importancia en los países con climas tropicales y en países subdesarrollados, en lugares de hacinamiento y con malas condiciones de higiene. En países en vías de desarrollo es el principal patógeno productor de diarrea en el verano entre población pediátrica, en donde se ha estimado que causa entre el 30 y 40% de los casos de diarrea infantil. (Cabello y Benavente, 2002).





Fuente: Nataro y Kaper, 2004.

### Esquema patogénico de *Escherichia coli* enterovirulentas

En el Perú, se han reportado informes (sin identificación mediante métodos moleculares) de la prevalencia de EPEC en niños y se indica que ésta varía de 1 a 28%. (Ochoa, et al. 2010)

## Prevalencia de EPEC en niños peruanos con diarrea basada en métodos de diagnóstico no moleculares

Referencia	Población/Descripción del estudio	Prevalencia de EPEC (%)
Salazar – Lindo, 2004	179 niños hospitalizados con diarrea aguda (3 a 36 meses de edad). Ensayo clínico de <i>Lactobacillus</i> .	15.4
Salazar – Lindo, 2000	135 niños hospitalizados con diarrea aguda (3 a 35 meses de edad). Ensayo clínico Racecadotril.	19.3
Salazar – Lindo, 1998	36 niños hospitalizados con diarrea persistente (18 meses de edad en promedio)	8.3
	64 niños hospitalizados con diarrea aguda (14 meses de edad promedio)	1.5
Castro – Rodríguez, 1997	80 niños hospitalizados con diarrea acuosa (3 a 24 meses de edad)	27.8
Lopez, 1996	107 pacientes hospitalizados con diarrea persistente (< 1 año de edad)	10.5
Figueroa – Quintanilla, 1993	107 pacientes hospitalizados con diarrea persistente (< 1 año de edad)	26.9
Lanata, 1992	327 muestras de niños con diarrea aguda	3.4
	304 muestras de niños con diarrea persistente Estudio longitudinal de diarrea aguda y persistente en niños con diarrea < 3 años de edad en área peri-urbana de Lima	4.9
Salazar – Lindo, 1993	72 niños con diarrea (10 meses de edad en promedio). Estudio clínico de Retinol y diarrea.	4.2
Greenberg, 1991	77 niños con diarrea aguda (< 5 años de edad). Estudio de diarrea asociada a sarampión.	22.1
Pazzaglia, 1991	391 niños hospitalizados con diarrea aguda (< 18 meses de edad). Estudio clínico de <i>Aeromonas</i> (datos de referencia)	11.0

Fuente: Ochoa *et al.* 2010

### **3.2.2 Mecanismo de acción**

La interacción entre ECEP y las células del huésped se ha dividido por los investigadores en tres principales estadios: a) adherencia inicial, b) transducción de señales y c) anclaje íntimo. (Zambrano, 2012)

La ECEP se adhiere íntimamente a la membrana de las células epiteliales, lo que se conoce como “adherencia y esfacelamiento” (A/E). La adherencia está mediada por pilis y fimbrias llamadas BfP (en inglés bundle-forming pilus), codificados por un plásmido EAF (factor de adherencia ECEP) (Rodríguez, 2002).

Una vez que la bacteria está adherida al enterocito induce una serie de señales intracelulares que son originadas por un grupo de proteínas secretadas mediante el aparato de secreción tipo III y son translocadas hacia el enterocito, estas señales juegan un papel importante en la patogenicidad de ECEP. (Zambrano, 2012)

Los efectos inmediatos que se inducen durante la transducción de señales durante la patogénesis de ECEP incluyen cambios a nivel intracelular que repercuten con la actividad fisiológica normal de la célula intestinal, tal es el caso del aumento en la secreción de electrolitos al espacio extracelular, permeabilidad de las uniones estrechas intracelulares y remodelación de la región apical del enterocito, se creen que estos cambios son los responsables de la diarrea acuosa. (Zambrano, 2012)

### **3.3 Identificación de *Escherichia coli***

Con la finalidad de identificar las cepas patógenas de *Escherichia coli* del resto de cepas no patógenas, y encontrar diferencias entre los diferentes grupos patógenos de esta especie existen sistemas de clasificación intra

específicos. Sin embargo, no existe un método ideal y usualmente se disponen de los recursos necesarios para aplicar varios métodos y ubicar una cepa en el enterogrupo que le corresponda (Romeu, 2012), existen métodos tales como:

- *Métodos fenotípicos*: biotipado, serotipado, antibiograma y ensayos de adherencia en cultivos celulares, los cuales detectan características expresadas por los microorganismos.
- *Métodos genotípicos*: reacción de la cadena polimerasa (PCR), electroforesis en campo pulsado (ECP), análisis plasmídicos, análisis de enzimas de restricción (REA), entre otros.

### **3.3.1 Biotipado bioquímico**

Este método se basa en diferenciar las cepas por su capacidad de fermentar determinado número de carbohidratos (como el manitol, la trealosa, la lactosa, la ramnosa o el sorbitol) o de degradar determinados aminoácidos como la lisina, la ornitina o la arginina u otros compuestos que ponen de manifiesto la presencia de determinadas enzimas como la beta-D-glucoronidasa.

Relacionado con este tipo de clasificación en biotipos se han descrito numerosos sistemas automatizados rápidos y sencillos de realizar. Una variante de este sistema lo constituyen las técnicas de fenotipado bioquímico conocida como PhenePlate® System, API y VITEK que se basan en la clasificación de los diferentes aislamientos en función de la capacidad y cinética de degradación de los diferentes sustratos analizados (*Chen et al., 2008*).

### **3.3.2 Sistemas miniaturizados API®**

Los sistemas miniaturizados son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar.

### **3.3.3 API 20E**

Permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos gram negativos. Es una galería conformada por 20 microtubos.

### **3.3.4 Interpretación de los resultados**

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reacciona con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado.

La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. De acuerdo a esa interpretación se puede establecer un resultado positivo o negativo.

Después del periodo de incubación y comparar, con la carta de colores, los resultados en cada microtubo se colocan en la hoja de resultados que suministra el fabricante.

Los datos así obtenidos pueden transformarse en un código de 7 dígitos denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla. (Apiweb ® BioMérieux, 2010).

### **3.4 Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena**

La identificación se hace mediante pruebas bioquímicas en tubo como TSI, LIA, MIO, citrato, sorbitol, mucato, urea, rojo de metilo, malonato y caldo manitol-rojo de fenol. En los laboratorios y hospitales que cuentan con antisuero polivalente A, B o C de EPEC se realiza la prueba de aglutinación en niños con diarrea, especialmente de un año. (Rodríguez, 2002).

Del mismo modo, la identificación de ECEP en los laboratorios clínicos se basa en la determinación de los serotipos por aglutinación con antisueros O y H. También se han desarrollado una metodología utilizando PCR múltiple en tiempo real (RT-PCR) para la detección los seis grupos de *Escherichia coli* virulentos. (Ochoa, 2010).

### **3.5 Resistencia de *Escherichia coli* a los antibióticos**

La especie *Escherichia coli* presenta resistencia a los antibióticos betalactámicos. Con el tiempo, la utilización masiva de antibióticos ha provocado un aumento en su resistencia a nivel mundial (Ajiboye *et al.*, 2009). En los últimos años, se ha observado un aumento de la resistencia de

esta especie a los principales antibióticos de uso clínico para el tratamiento de infecciones causadas por las cepas patógenas de *Escherichia coli* como la ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, tetraciclina y estreptomina, tanto en cepas de origen humano y animal como aisladas del ambiente (agua y suelo) (Alzahrani *et al.*, 2011).

El uso indiscriminado de los antibióticos tanto en el tratamiento de enfermedades humanas como en veterinaria, ha provocado un aumento del número de bacterias resistentes a los antibióticos en el medio ambiente. La mayoría de las aguas residuales que contienen antibióticos se vierten en los desagües y van a parar a ambientes acuáticos, lo cual contribuye a la selección de organismos con patrones de multiresistencia a antibióticos. Las bacterias presentes en estos ecosistemas se ven expuestas a diferentes presiones selectivas, lo que favorece el intercambio de genes de resistencia a antibióticos a través de los diferentes vectores de transmisión (Von Baum y Marre, 2005).

## IV. ANTECEDENTES

Byrd, *et al.* 1993. Examinaron el patrón de supervivencia y mantenimiento del plásmido de *Escherichia coli* en agua de mar artificial. Encontraron que las tres cepas de *Escherichia coli* (EK3C, H10407 y 34309) mantienen una porción de las células en la fase cultivable durante al menos 3 años en agua de mar artificial. Además, la parte de la población de células también mantuvo sus plásmidos nativos durante el período de 3 años. Concluyeron que las células de *Escherichia coli* mantenidas en agua de mar están adaptadas selectivamente a la salinidad del agua de mar, permaneciendo en un estado cultivable. Los resultados del estudio son significativos porque muchas autoridades de salud pública han asumido porque *Escherichia coli* no puede sobrevivir, sin adición de nutrientes, en agua de mar durante largos períodos de tiempo.

Romero, *et al.* 1994. Evaluaron las condiciones de calidad e inocuidad de los pescados y mariscos recolectados en la costa de Santa Catarina y comercializados en Florianópolis. Se obtuvieron 175 muestras de pescado y filetes (*Cynoscion leiarchus*), colas de camarón (*Peneaus paulensis*), mariscos (*Brasiliensis anomalocardia* y *Mytilus edulis*) y pulpa de cangrejo (*Callinectes sapidus*) de los mercados y fueron examinados dentro de las 4 horas de la compra. De 317 cepas de *Escherichia coli* probadas para STG y toxinas LT II, sólo una (aislada de mariscos) produce ST y ninguna para toxina LT II. *S. aureus* fue aislada en 20% de 175 muestras examinadas, incluyendo 60% de las muestras de los mariscos de carne. Sólo 9 de 109 cepas de *S. aureus* producen enterotoxinas, incluyendo la enterotoxina A (4), D (1) y AB (4). Concluyeron que debe de existir un mayor cuidado para reducir la contaminación de peces y mariscos durante el manejo de cosecha y post-cosecha.



Martin, *et al.* 1998. Desarrollaron un modelo matemático para sintetizar la información conceptual y experimental sobre el comportamiento de las bacterias entéricas en agua de mar. Este modelo se basa en cambios en los componentes intracelulares metabolizables en función de las respuestas fisiológicas de la célula cuando se somete a inanición, salinidad y radiación solar. Siguiendo una estrategia que tiene en los procesos de adaptación y de reversión fisiológicas a corto y medio plazo, las células se pueden desarrollar en diferentes estados: cultivables (B1), viable y definitivamente no cultivable (B2), y reversible latentes (B3). La validación del modelo se realizó a través de datos específicos sobre los patrones de cambio en la abundancia de células cultivables al someter poblaciones de *Escherichia coli* a tensiones experimentales simultáneas. Los resultados de simulación mostraron la eficacia de la respuesta antiestrés y la importancia de la latencia que confiere propiedades de resistencia superiores.

Quintana, 1998. Realiza una compilación de la información sobre los conceptos microbiológicos básicos para el uso correcto de los antimicrobianos, incluyendo los principales grupos de antimicrobianos y su espectro de acción, los mecanismos de acción y resistencia, los métodos de laboratorio para su estudio y su relación con su acción *in vivo*. Asimismo, describe que el espectro de acción de los antimicrobianos puede clasificarse en dos: antibióticos de amplio espectro o de espectro reducido; sin embargo, estos pueden presentar acción inhibiendo la síntesis de la pared actuando sobre las proteínas de la membrana celular, inhibiendo la síntesis proteica actuando sobre el ribosoma bacteriano o actúan inhibiendo la duplicación del ADN.

Webster, *et al.* 2004. En este estudio se tomaron muestras de aguas superficiales de dos cuencas costeras diferentes, con desarrollo y sin desarrollo urbano en Carolina del Sur. También se tomaron muestras de afluentes y efluentes de diferentes plantas de tratamiento en la misma área

donde se colectaron las muestras de agua. Se determinó el Número Más Probable de coliformes fecales (NMP) para todas las muestras. Se aislaron colonias de *Escherichia coli* para evaluar su resistencia antibiótica. Los resultados indican que el NMP de las plantas de tratamiento fueron significativamente más altas que las muestras que fueron tomadas en la cuenca con desarrollo urbano, y las muestras de la cuenca sin desarrollo urbano fue significativamente menor a las anteriores. Asimismo, la prueba de resistencia a antibióticos sugirió una tendencia al incremento de la resistencia en las muestras de la cuenca con desarrollo urbano.

Byamukama, et al. 2005. En su investigación desarrollaron técnicas rápidas que pudieran identificar coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli*, y esporas de *Clostridium perfringens* en diferentes gradientes de contaminación en hábitats acuáticos en ciudades tropicales. Los lugares de muestreo se seleccionaron basados en criterios de alta y baja influencia antropogénica. Concluyeron que, con la metodología aplicada para el reconocimiento de los parámetros de contaminación bacteriológica, la determinación de *Escherichia coli* y esporas de *Clostridium* puede ser confiable para el monitoreo de contaminación fecal en países tropicales con gran altitud.

Haraket, et al. 2006. Realizaron el aislamiento, caracterización molecular y el perfil de resistencia antimicrobiana de cepas bacterianas patógenas ambientales. Para ello, recogieron 57 muestras de agua de mar, sedimentos y agua dulce durante las estaciones de primavera y verano de 2003. En su metodología utilizaron medios selectivos apropiados para el aislamiento de *Escherichia coli* y *Salmonella* indicando que 94,7% de las muestras analizadas estaban contaminadas con una o ambas bacterias. Asimismo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) identificaron las especies de bacterias. Muchas cepas de *Escherichia coli* patógenas aisladas fueron detectadas por PCR de los cuales dos fueron identificados como

*Escherichia coli* O157:H7. Los aislamientos confirmados de *Salmonella* y *Escherichia coli* fueron analizados utilizando el método de difusión en disco para su susceptibilidad a antibióticos revelando altas tasas de resistencia a los antimicrobianos.

Guzzi, *et al.* 2006. Realizaron una revisión sobre la situación sanitaria de la zona balnearia de la ciudad de Mar de Plata, Argentina. Detallando en su trabajo que existe un incremento progresivo de la contaminación fecal que no se relaciona significativamente con los parámetros físico-químicos, si no se encuentra asociado a la presencia de descargas pluviales y/o cloacales en la zona de influencia. Asimismo, concluyen que la abundancia de *Escherichia coli* en el medio acuático está controlada por factores físicos, químicos y hasta de competencia con otros géneros de la misma Familia.

Sardinas, *et al.* 2006. Evaluaron las características físico-químicas y microbiológicas del agua de presa El Cacao en la ciudad de La Habana, Cuba. Encontraron concentraciones elevadas de DBO y bajas concentraciones de oxígeno, con lo cual sugirieron que el agua de la presa estaba contaminada posiblemente debido a los vertimientos de desagües que recibe de las áreas aledañas a la presa. Las concentraciones de coliformes totales y coliformes termotolerantes encontrados en el agua de presa son semejantes a las de agua dulce con similares ecosistemas acuáticos con vertimientos residuales.

Vergaray, *et al.* 2007. Realizaron el estudio microbiológico del agua de 8 playas de recreación de la costa de Lima con el objetivo de evaluar la utilidad de *Escherichia coli* y *Enterococcus* como indicadores de contaminación fecal. Los resultados del periodo de muestreo enero 2006 mostraron que el agua de 3 playas era inaceptable para el baño, según lo comparado con la Norma Peruana, pero si se utiliza como indicadores a *Escherichia coli* 100 NMP/100 mL y *Enterococcus* 35 NMP/100 mL, las 8 playas fueron consideradas como

inaceptables. Concluyendo que la contaminación fecal se elevó en forma significativa en verano.

Gonzales, *et al.* 2009. Describieron la sensibilidad a antibióticos de las bacterias causantes de infecciones del tracto urinario en el Hospital Cayetano Heredia. Se evaluaron 1249 urocultivos positivos realizados en los meses de enero a junio del año 2008. De las bacterias aisladas de estos urocultivos 76% fueron *Escherichia coli*, y en las pruebas de sensibilidad realizadas a estas cepas se encontró que fueron sensibles a amicacina, nitrofurantoína, ceftriaxona y ciprofloxacino en 88.89%, 75.26%, 43.88%, y 26.04%, respectivamente.

Salinas, *et al.* 2010. Realizaron una investigación para analizar el efecto de la contaminación fecal causada por el vertimiento de aguas residuales, y su relación con la presencia de cepas enteropatógenas de *Escherichia coli* en las heces de león marino (*Otaria flavescens*) de la bahía de Iquique. El análisis mediante la amplificación de los genes de virulencia asociadas a las categorías diarreogénicas de *Escherichia coli*, reveló la presencia de ECEP en 38,3% del total de las muestras analizadas. Por otro lado, no se detectó la presencia del gen de ECEP en las cepas que provenían de las heces de *O. flavescens*.

Abhirosh, *et al.* 2011. Determinaron la variación de la densidad de bacterias coliformes fecales. El valor medio vario de MPN 2900 a 7100/100mL. Además, sus resultados mostraron el patrón de resistencia a múltiples fármacos entre los aislamientos bacterianos. Las cepas de *Escherichia coli* mostraron resistencia a más de 50% de los antibióticos (amicacina, oxitetraciclina, estreptomycin, tetraciclina y kanamicina), mientras *Salmonella* mostró una alta resistencia a la oxitetraciclina, estreptomycin, tetraciclina y ampicilina. La alta densidad de bacterias coliformes fecales y la prevalencia de múltiples drogas resistente a *Escherichia coli* y serotipos de

Salmonella en el lago pueden suponer riesgo para la salud pública a través de los brotes graves transmitidos por el agua y alimentos contaminados.

Ministerio de Salud, 2013. Realizaron el monitoreo de la calidad de las playas de la Costa Verde, según la concentración de coliformes termotolerantes de enero a octubre y diciembre en el año 2013. Identificando calidad microbiológica regular en las playas Barranco y las Sombrillas el mes de enero con una concentración de coliformes termotolerantes entre 220 – 920 NMP/100 mL. Asimismo, identificaron calidad microbiológica en la playa Redondo en febrero y diciembre con una concentración de 1100 NMP/100 mL.

Liberatore, *et al.* 2015. Examinaron el perfil de las aguas en la franja costera de la provincia de Pescara (Italia, central Mar Adriático) con referencia a los parámetros microbiológicos de *Escherichia coli* y *Enterococos* intestinales requeridos por la Directiva 2006/07 de la Comisión Europea. La calidad del agua de 15 playas costeras fue examinada. Se utilizó el análisis estadístico para confirmar los aspectos deducidos de los valores medios de los datos de vigilancia y control para cada tramo. Los datos resaltan situaciones críticas en varias partes de la costa; estos problemas pueden atribuirse a la contaminación de los ríos, principalmente debido al mal funcionamiento de las plantas de tratamiento para aguas residuales urbanas.

Vergine, *et al.* 2015. Indican que la reutilización de aguas residuales tratadas es cada vez mayor en las regiones semiáridas, como respuesta a los efectos del cambio climático y el aumento de la competencia por los recursos hídricos naturales. La investigación de los indicadores bacterianos es relevante para evaluar su persistencia en el ambiente y la posible transferencia a las aguas subterráneas o de la cadena alimentaria. Para evaluar el indicador de contaminación fecal *Escherichia coli* se llevaron a cabo experimentos en un suelo cultivado utilizando los recursos de agua

contaminada para el riego. Para los experimentos de campo la contaminación fecal se simuló dosificando el indicador al efluente de un biorreactor de membrana. Para evaluar el destino del indicador en el subsuelo, se instaló un conjunto de columnas en el suelo al lado del campo, operado y monitoreado por la concentración de *Escherichia coli* con el tiempo y largo de la profundidad. Se utilizó las aguas municipales residuales en este caso como fuente de contaminación fecal. Los resultados mostraron que a corto y mediano plazo efectos en la capa superior del suelo dependían en gran medida de la concentración de *Escherichia coli* en el agua de riego. Observaron una permanencia limitada y acumulación relevante del indicador en la hierba y en el suelo superficial. La tendencia de las concentraciones de *Escherichia coli* en la lixiviación de las columnas de suelo siguieron un modelo logaritmo lineal.

Perini, L. *et al.* 2015. Realizaron estudios sobre la dinámica temporal de *Escherichia coli* por la ciudad, describiendo la estructura de la población (mediante la asignación de los aislamientos a su grupo filogenético) y su diversidad genotípica, y establecieron el papel de los factores ambientales en la determinación de su variabilidad. La abundancia de *Escherichia coli* en agua fue muy variable hasta 104UFC/100mL. La abundancia no demostró relaciones significativas con las variables fisicoquímicas del agua. El análisis de la estructura de la población mostró la presencia de todos los grupos filogenéticos conocidos, incluyendo los extra-intestinales y potencialmente patógenos. La diversidad genotípica fue muy alta, como consecuencia probable de la entrada heterogénea de bacterias fecales de la ciudad. Asimismo, concluyen que, a pesar de su importancia a nivel mundial como indicador fecal en los sistemas acuáticos, se sabe poco acerca de la diversidad de *Escherichia coli* en el medio ambiente y los factores que impulsan su distribución espacial.

Bonamano, *et al.* 2015. Investigaron la dispersión de *Escherichia coli* en la zona de baño artificial semicerrado de Santa Marinella (Lazio, Italia) a través de muestreos in situ llevados a cabo en el verano de 2012 y la aplicación de un modelo dinámico. Las muestras recogidas se analizaron mediante la técnica basada en cultivo y el método de anticuerpos fluorescentes para estimar tanto las células viables cultivables y el total de la población de *Escherichia coli*, respectivamente. El conjunto de datos in situ se utilizaron para probar el enfoque de modelado propuesto y simular el comportamiento de las bacterias. A continuación, el tiempo de lavado y el cálculo del Área de Riesgos Microbiológicos Potencial permitieron la evaluación de la contribución de los procesos físicos y biológicos a la dispersión de coliformes y el riesgo potencial relacionado para los bañistas.

Titilawo, *et al.* 2015. Exponen que el desarrollo de la resistencia bacteriana ha disminuido debido al éxito obtenido con el descubrimiento de los agentes antimicrobianos, y como las enfermedades y agentes patógenos que una vez se pensó estaban controlados por los antimicrobianos ahora están resurgiendo con nueva resistencia ligadas a la terapia. De un total de 300 cepas de *Escherichia coli* confirmadas por técnica de PCR, de diferentes fuentes de los ríos en el estado de Osun, Nigeria, se evaluaron por el método de difusión en disco. Los resultados demostraron un alto incremento en la prevalencia de la multirresistencia de *Escherichia coli* y sus determinantes de resistencia indica el aumento de los riesgos de salud pública asociados con la ingestión de aguas procedentes de fuentes no tratadas.

Maravic, *et al.* 2015. Recolectaron un total de 1,351 enterobacterias aisladas de 144 muestras de agua de mar en un período de cuatro años a partir de tres playas públicas en el mar Adriático en Croacia. Aproximadamente el 35% de las cepas fueron resistentes a múltiples fármacos. Bla BLEE se detectaron genes en el 4,2% de los aislados de Enterobacteriaceae, las

principales especies de las cuales fueron *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*. Bla TEM-1 + SHV-12 fue el genotipo más dominante, seguido por bla CTX-M-15. Estos resultados indican que las aguas de la playa son reservorios de productores de BLEE enterobacterias y por lo tanto constituyen un problema de salud pública con mayor potencial para actuar como mediadores en el flujo de genes entre las zonas costeras marinas y entornos clínicos.

Ministerio del Ambiente, 2015. Estableció en el Decreto Supremo N° 015-2015-MINAM los Estándares de Calidad Ambiental para Agua. En el cual se establece que las Aguas Superficiales destinadas para Recreación (B1 y B2) deben cumplir ciertos parámetros para contacto directo: Coliformes Totales (35-37°C) 1000 NMP/100 mL, Coliformes Termotolerantes 200 NMP/100 mL y *Escherichia coli* ausente; por otro lado, para contacto indirecto debe cumplir hasta Coliformes Totales 4000 NMP/100 mL, Coliformes Termotolerantes 1000 NMP/100 mL y ausencia de *Escherichia coli*.

Martínez, *et al.* 2015. Analizaron muestras de agua de cinco playas de interés turístico en el estado de Sucre, Venezuela con la finalidad de detectar la presencia de cepas de *Escherichia coli* patógenas asociadas a casos de diarrea aguda en aguas marinas destinadas a actividades recreacionales. Realizaron la identificación de los patógenos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En esta investigación se identificaron 77 cepas de *Escherichia coli*, de las cuales 16.90% se identificaron como *Escherichia coli* enteropatógena.

Ministerio de Salud, 2016. Realizaron el monitoreo de la concentración de coliformes fecales en las playas de la costa del Perú. Durante Marzo de 2016 realizaron la medición en 6 playas de la costa verde identificando a la playa Las Cascadas, Los Pavos y Barranquito como playas de calidad



microbiológica regular identificado una concentración 350 NMP/100 mL de Coliformes Fecales.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Área de muestreo

El muestreo se realizó en 15 playas del Circuito de Playas de la Costa Verde, el cual está constituido por la franja ribereña de la Bahía de Miraflores, comprendida desde el Cerro La Chira Distrito de Chorrillos, Provincia de Lima, hasta la saliente del Distrito de la Punta, Provincia Constitucional del Callao, Anexo 1. Cabe mencionar que esta investigación se realizó en las playas que pertenecen al Circuito de Playas de la Costa Verde, las cuales son frecuentadas por gran cantidad de bañistas durante la temporada de verano. Las playas consideradas en este estudio se enumeran en la Tabla 1.

En cada playa se tomaron muestras cada 100 metros, por ello la cantidad de muestras por playa dependió de la longitud de las mismas. Asimismo, la distancia entre la orilla y el punto de muestreo fue de 10 metros, considerando esta longitud como el área donde los bañistas tienen contacto con el agua. Las longitudes y el número de muestras de agua recogidas en cada playa del Circuito de la Costa Verde se detallan en la Tabla 1.

Respecto al número de playas muestreadas, se debe considerar que sólo se tomaron en cuenta 08 muestras en la Playa Marbella, debido al difícil acceso en los primeros 300 metros de la extensión de esta playa.

**Tabla 1.** Playas de la Costa Verde consideradas en el muestreo y número de muestras obtenidas por longitud de playa

N°	Playas	Distrito	Coordenadas (UTM)	Longitud playa (m)	Numero de muestras cada 100 m aprox.
1	Marbella	Magdalena del Mar	275269.02 m E 8660978.99 m S	1261	8
2	San Isidro	San Isidro	276381.22 m E 8660248.23 m S	640	6
3	Tres Picos	Miraflores	276852.14 m E 8659726.18 m S	763	8
4	Pampilla II	Miraflores	278002.35 m E 8658797 m S	575	6
5	Pampilla I	Miraflores	277616.85 m E 8659010.15 m S	440	4
6	Miraflores	Miraflores	277616.85 m E 8659010.15 m S	264	3
7	Makaha	Miraflores	278409.89 m E 8658285.80 m S	270	3
8	Redondo II	Miraflores	278935.23 m E 8657919.04 m S	611	6
9	Redondo I	Miraflores	279128.78 m E 8657673.85 m S	479	5
10	La Estrella	Miraflores	279234.21 m E 8657347.33 m S	241	3
11	Las Cascadas	Barranco	279260.78 m E 8657053.54 m S	430	4
12	Barranquito	Barranco	279468.02 m E 8656782.88 m S	269	3
13	Los Pavos	Barranco	279606.03 m E 8656377.94 m S	358	4
14	Los Yuyos	Barranco	279658.42 m E 8655657.01 m S	280	3
15	Las Sombrillas	Chorrillos	279627.04 m E 8655369.20 m S	483	5
<b>Total de muestras</b>					<b>71</b>

Fuente: Autoridad del Proyecto Costa Verde de la Municipalidad Metropolitana de Lima, Ley N° 26306.

## 5.2 Recolección de las muestras

Las muestras de agua de mar se recolectaron en frascos transparentes de vidrio estéril, de boca ancha, con tapa rosca y con capacidad de 250 mL. Durante la recolección de las muestras se registró el pH y la temperatura del agua de mar y se rotuló el nombre de la playa, el número de muestra, hora y fecha de muestreo, así como el nombre de quien tomo la muestra. Seguido de ello, las muestras fueron transportadas en caja conservadora donde se colocaron geles refrigerantes para mantener la temperatura de 4 °C hasta la llegada al laboratorio para los análisis respectivos.



**Figura 1.** Recolección de las muestras.

Debido a la longitud de las playas y la cantidad de muestras tomadas en cada una, las muestras se recolectaron en dos días, ya que el tiempo entre la toma de muestra y llegada al laboratorio no debía exceder las 3 horas. Las muestras se recolectaron desde las 6 am hasta las 9 am los días 15 y 16 de febrero de 2016. El primer día se muestreó desde la playa Marbella hasta la playa Redondo II y el segundo día las playas restantes.

### 5.3 Lugar de la experimentación

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología y el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, ubicada en la Avenida Benavides 5440 Santiago de Surco.

### 5.4 Procesamiento de la muestra

- **Pre-enriquecimiento de la muestra y aislamiento de Enterobacterias**

Se tomó 50 mL de agua de mar, previa homogenización de la muestra recolectada y se añadió en 150 mL de agua peptonada marca Merck, se incubó por 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  para la multiplicación y reparación de los microorganismos presentes.



**Figura 2.** Enriquecimiento e incubación de las muestras de agua de mar de las Playas del Circuito de Playas de la Costa Verde.

Después de 24 horas de incubación, se procedió al aislamiento de las bacterias coliformes en agar selectivo y diferencial Mc Conkey marca Merck, para ello se añadió 50µL de la muestra incubada sobre la superficie del agar Mc Conkey solidificado y se distribuyó con espátula Drigalski por el Método de Diseminación en Superficie de Agar; se incubó durante 24 horas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

- **Resiembra en agar EMB (Eosin Methylene Blue Agar)**

Después del desarrollo bacteriano en agar Mc Conkey, se procedió a la resiembra en agar EMB y se incubó durante 24 horas a una temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  para el desarrollo de las bacterias correspondientes.

La determinación presuntiva del aislamiento de *Escherichia coli* se realizó seleccionando las colonias que presentaron las siguientes características en el agar EMB: Colonias grandes, color negro azulado y brillo verde metálico. Estas colonias fueron seleccionadas y conservadas en cepario para los análisis confirmatorios mediante Identificación Bioquímica API 20E BioMérieux y Prueba Serológica con el Kit PROBAC.

- **Prueba de confirmación cromogénica con TBX**

Para confirmar que las colonias aisladas en el agar EMB fueron *Escherichia coli* se decidió utilizar el medio Triptona Bilis X-Glucoronida – TBX. El medio TBX contiene un agente cromogénico, X-glucoronida, el cual detecta la actividad de la glucoronidasa. La presencia de glucoronidasa diferencia la mayoría de cepas *Escherichia coli* de otros coliformes.

Las colonias aisladas en cepario fueron sembradas con asa de siembra por método de estrías en el medio y fue incubado a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

- **Prueba de confirmación bioquímica con Citrato de Simmons**

Después de realizar la prueba de confirmación cromogénica con TBX, se procedió a escoger 100 cepas con actividad positiva de la enzima glucoronidasa al azar.

Se utilizó esta prueba para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. Para ello se prepararon 100 tubos con Agar Citrato de Simmons en posición inclinada (pico de flauta). Las 100 cepas obtenidas del Agar TBX fueron sembradas por método de estría en la superficie del medio de cultivo. Se incubó en  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

- **Identificación Bioquímica mediante API 20E BioMérieux**

A partir del cepario obtenido en las etapas previas, se preparó un cultivo joven en agar nutritivo de 18 horas, el cual sirvió para inocular los pocillos de la galería API20E. Para ello, se tomó una colonia bien aislada de la bacteria y se resuspendió homogéneamente en 5 ml de solución salina (1% de NaCl) estéril. Posteriormente, se realizó la siembra en la galería API 20E. La galería API 20E se caracteriza porque contiene pocillos y cada pocillo tiene un tubo y una cúpula; se llenó con la suspensión de bacterias los tubos, no la cúpula, de todos los pocillos. Solo se llenaron las cúpulas de los pocillos CIT, VP, GEL con la suspensión de bacterias.

Se puso la galería en una cámara húmeda de incubación y se incubó a 37 °C durante 24 horas.



Figura 3. Kit API 20E BioMérieux.

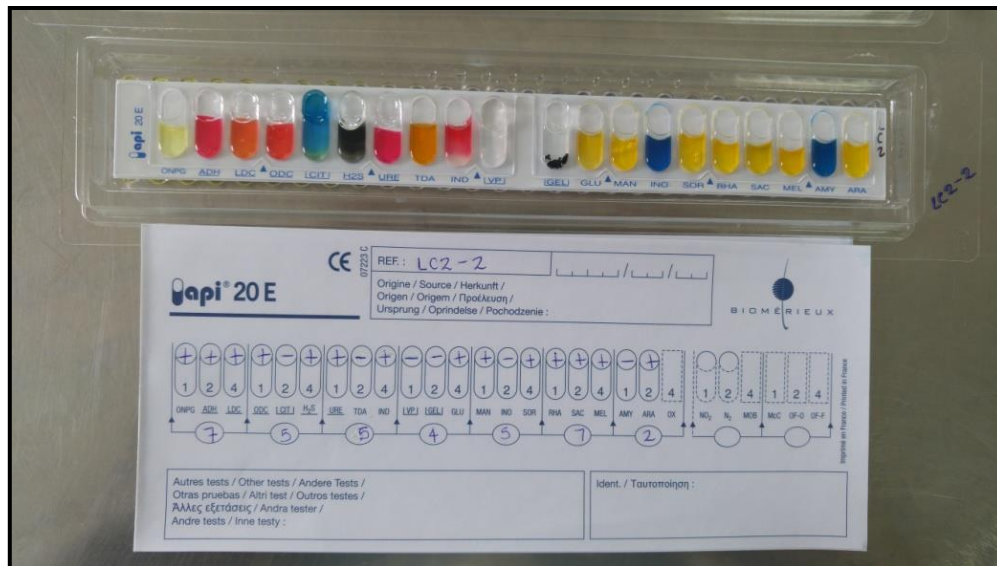


Figura 4. Aplicación de la Prueba Api 20E BioMérieux.



- **Identificación serológica de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) mediante aglutinación en lámina.**

Se realizó el procedimiento diseñado por el Laboratorio PROBAC de Brasil para los sueros anti – *E. coli* enteropatógena clásica. Se realizó lo siguiente:

1. Se realizó la limpieza de láminas de vidrio y desinfección con alcohol.
2. Para cada muestra se obtuvo una suspensión espesa, las colonias se obtuvieron directamente de la superficie de cultivos de 48 horas y se colocaron en una placa a la cual se agregó con micropipeta 0.2 mL de solución salina.
3. Se tomaron 0.2 mL de la suspensión espesa y se le agregó 0.3 mL de los sueros PROBAC. Enseguida se homogenizó la muestra haciendo que esta ocupe un área de 1 cm y se mantuvo en movimiento de vaivén por 1 a 2 minutos.

- **Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar**

• **Preparación del medio de cultivo:**

Se preparó agar Mueller - Hinton marca Merck, se calentó hasta punto de ebullición en microondas y se autoclavó. El preparado se vertió en placa petri estéril, el cual pasó por un control de calidad de 24 horas a 37°C para su posterior utilización.

- **Aplicación de los discos de antibióticos sobre las placas inoculadas:**

Las placas con agar Mueller Hinton fueron inoculadas con la bacteria mediante hisopado en su superficie. En seguida, se colocaron los discos de los 8 antibióticos sobre la superficie del agar. Cada disco fue presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Se colocaron ocho (8) discos con los siguientes antibióticos: Amicacina (MK), Ampicilina (AM), Cefotaxima (CAZ), Norfloxacino (NX), Amoxicilina-Ac. Clavulánico (AMC), Cefuroxima (CXM) y Cotrimoxazol (SXT) y Ciprofloxacino (CIP). Figura 5.

Las placas fueron invertidas y colocadas en la estufa a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  después de 15 minutos de aplicados los discos. Lo mismo se realizó para la prueba control, para la cual se utilizó una cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli*. Figura 6.



**Figura 5.** Antibióticos utilizados en la Prueba de Susceptibilidad Microbiana.



**Figura 6.** Cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli*.

## **VI. RESULTADOS**

Se recolectaron 71 muestras de agua en 15 playas del Circuito de Playas de la Costa Verde, el número de muestras por playas varió debido a su extensión, como se muestra en la Tabla 2.

La ubicación geográfica de las playas y el número de muestras realizadas en cada una se observan en la Tabla 2. El número de muestras recogidas en cada playa varió debido a la extensión de las mismas. El mayor número de muestras se recogieron en las playas Marbella y Tres Picos, y el menor número de muestras se recogieron en las playas Miraflores, Makaha, La Estrella, Barranquito y Los Yuyos.

### **6.1 Condiciones físicas de las muestras de agua de mar de las playas del circuito de la Costa Verde**

En la Tabla 3 y figura 7 se observa que los rangos de temperatura de las muestras de agua de mar de las 15 playas del circuito de la Costa Verde estuvieron entre 22,93 °C y 23,26 °C que es mayor a la esperada.

De igual manera, se aprecia que los rangos de pH de las muestras de agua de mar de las 15 playas del circuito de la Costa Verde están entre 7,68 y 7,80, lo que nos indica que es relativamente alcalina, lo cual no limita el crecimiento microbiano.

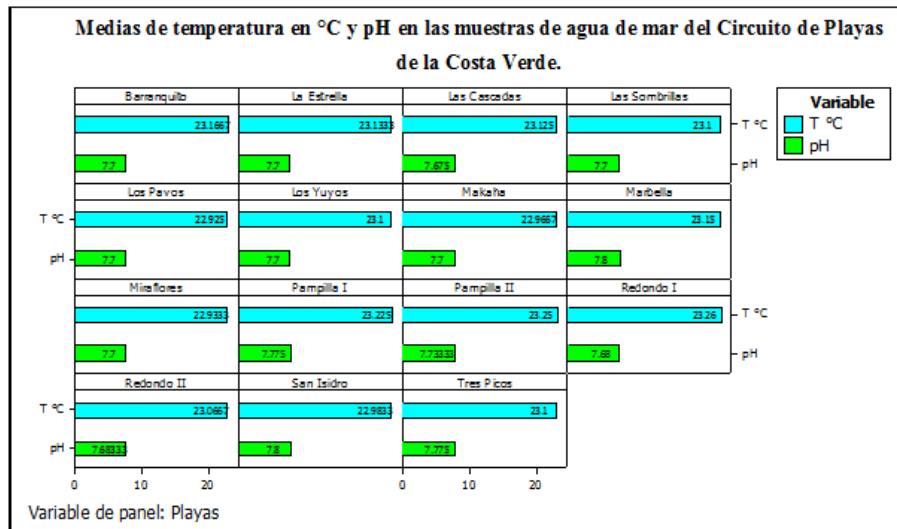
De acuerdo con los análisis realizados se observa que las muestras de agua de mar no presentan una variación notoria entre sí en cuanto a sus mediciones de temperatura y pH.

**Tabla 2.** Número de muestras recolectadas por playas del Circuito de la Costa Verde.

<b>Código</b>	<b>Playa</b>	<b>N° muestras</b>	<b>Ubicación (Coordenadas UTM)</b>
<b>1. PMB</b>	Marbella	8	275269.02 m E 8660978.99 m S
<b>2. PSI</b>	San Isidro	6	276381.22 m E 8660248.23 m S
<b>3. PTP</b>	Tres Picos	8	276852.14 m E 8659726.18 m S
<b>4. PII</b>	Pampilla II	6	278002.35 m E 8658797 m S
<b>5. PI</b>	Pampilla I	4	277616.85 m E 8659010.15 m S
<b>6. PWK</b>	Miraflores	3	277616.85 m E 8659010.15 m S
<b>7. PM</b>	Makaha	3	278409.89 m E 8658285.80 m S
<b>8. RII</b>	Redondo II	6	278935.23 m E 8657919.04 m S
<b>9. RI</b>	Redondo I	5	279128.78 m E 8657673.85 m S
<b>10. PLE</b>	La Estrella	3	279234.21 m E 8657347.33 m S
<b>11. LC</b>	Las Cascadas	4	279260.78 m E 8657053.54 m S
<b>12. PB</b>	Barranquito	3	279468.02 m E 8656782.88 m S
<b>13. LP</b>	Los Pavos	4	279606.03 m E 8656377.94 m S
<b>14. LY</b>	Los Yuyos	3	279658.42 m E 8655657.01 m S
<b>15. LS</b>	Las Sombrillas	5	279627.04 m E 8655369.20 m S
<b>NÚMERO TOTAL DE MUESTRAS</b>		<b>71</b>	

**Tabla 3.** Estadísticos descriptivos asociados a las mediciones de temperatura y pH en las muestras de agua de mar de 15 playas del Circuito de Playas de la Costa Verde

N°	Playa	N° de muestras	Temperatura		pH	
			Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
1	Marbella	8	23.15	0.053	7.80	0.000
2	San Isidro	6	22.98	0.075	7.80	0.000
3	Tres Picos	8	23.10	0.076	7.78	0.046
4	Pampilla II	6	23.25	0.055	7.73	0.052
5	Pampilla I	4	23.23	0.050	7.78	0.050
6	Miraflores	3	22.93	0.058	7.70	0.000
7	Makaha	3	22.97	0.115	7.70	0.000
8	Redondo II	6	23.07	0.121	7.68	0.041
9	Redondo I	5	23.26	0.055	7.68	0.045
10	La Estrella	3	23.13	0.058	7.70	0.000
11	Las Cascadas	4	23.13	0.050	7.68	0.050
12	Barranquito	3	23.17	0.058	7.70	0.000
13	Los Pavos	4	22.93	0.050	7.70	0.000
14	Los Yuyos	3	23.10	0.000	7.70	0.000
15	Las Sombrillas	5	23.10	0.000	7.70	0.000
<b>Total de muestras/Promedio</b>		71	23.1	0.06	7.722	0.02



**Figura 7.** Rangos de temperatura en °C y pH en las muestras de agua del Circuito de Playas de la Costa Verde.

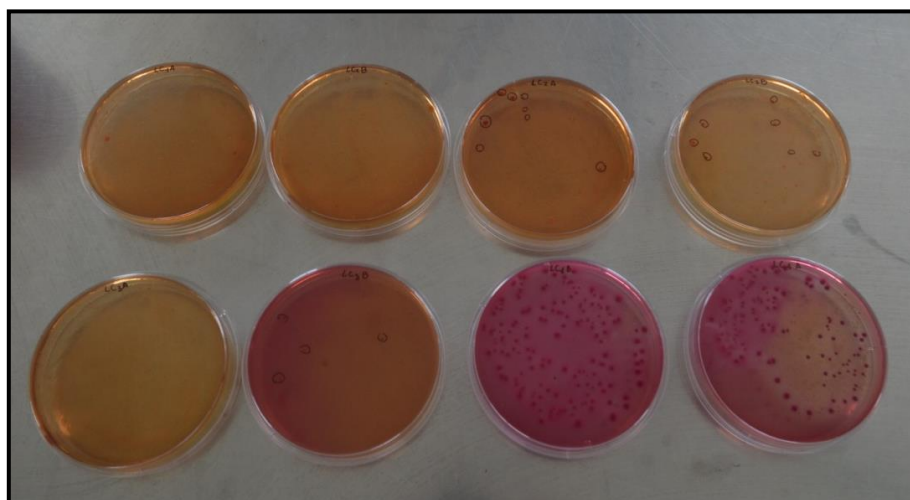
## 6.2 Pre-enriquecimiento de la muestra y aislamiento de enterobacterias

Después de transportar las muestras al laboratorio y realizar su pre enriquecimiento con agua peptonada, se realizó la prueba de proliferación de enterobacterias en agar selectivo Mc Conkey. Como resultado de esta prueba se obtuvieron dos tipos de colonias, colonias blanquecinas y colonias de color rojo grosella, Figura 8. Las colonias blanquecinas indican que no hay consumo de lactosa, por lo tanto, el indicador rojo neutro no se activó; por lo contrario, las colonias rojizas indican el consumo de lactosa del agar selectivo Mc Conkey, por lo tanto se presume que estas colonias son enterobacterias.

Se obtuvo el crecimiento de colonias características de enterobacterias en las muestras tomadas en las 12 playas, a excepción de la Playa Redondo II.



**Figura 8.** Colonias lactosa positiva y negativas en agar Mc Conkey.



**Figura 9.** Crecimiento de bacterias fermentadoras de lactosa (colonias rojo grosella).

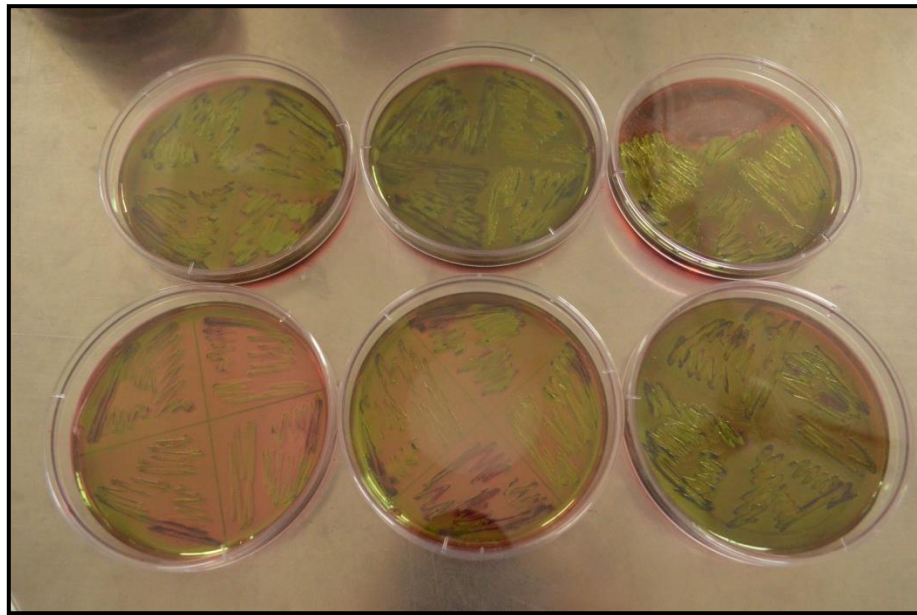
### **6.3 Resiembra en agar EMB (Eosin Methylene Blue Agar)**

Se aislaron 650 colonias de color rojo grosella y de bordes lisos del agar Mc Conkey y se sembraron por método de estría en Agar EMB a fin de identificar las colonias características de *Escherichia coli*. Después de 24 horas de



incubación las placas mostraron diferentes tipos de colonias: colonias verdes brillantes, colonias moradas y colonias incoloras.

Cabe mencionar que en esta investigación se buscó identificar a *Escherichia coli*, por lo que se dio mayor atención a las colonias azul a moradas con brillo verde metálico, característica importante para el reconocimiento de *Escherichia coli* en agar EMB. Figura 10.

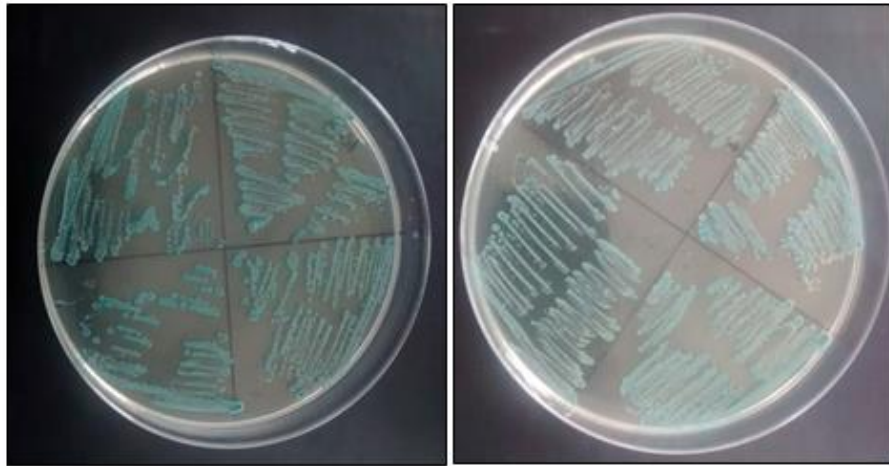


**Figura10.** Crecimiento de colonias verde metálico en diferentes muestras de agua del Circuito de Playas de la Costa Verde.

De las 15 playas muestreadas, solo 12 (80%) playas tuvieron crecimiento de colonias características de *Escherichia coli*, las cuales fueron: Pampilla II, Pampilla I, Miraflores, Makaha, Redondo II, Redondo I, La Estrella, Las Cascadas, Barranquito, Los Pavos, Los Yuyos y Las Sombrillas.

A fin de tener un mayor aislamiento de *Escherichia coli*, se utilizó el medio de cultivo cromogénico TBX. Como resultado de ello se observó el crecimiento

de colonias con coloración celeste, Figura 11, debido a que la actividad de B-D-glucoronidasa específica de *Escherichia coli* queda detectada por el agente cromogénico X-glucoronida del medio de cultivo.



**Figura 11:** Colonias celestes por la actividad de B-D-Glucoronidasa específica de *Escherichia coli*.

#### **6.4 Aislamiento de enterobacterias por cada playa muestreada**

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos por cada playa muestreada. En la playa Marbella (PMB) se recolectaron 8 muestras, de las cuales solo 7 (87.5%) muestras fueron lactosa positiva; sin embargo, estas colonias no dieron positivo para EMB y TBX, por lo cual se descartó la idea de que en esta playa se pudiera aislar *Escherichia coli*. Cabe mencionar que en esta playa el acceso de bañistas es restringido debido a la inaccesibilidad a la playa y a la presencia de desechos como desmontes y piedras de gran tamaño.

Por otro lado, conforme se avanzó en el análisis, se observó que en las playas donde existe alta afluencia de bañistas se incrementa la posibilidad de aislar *Escherichia coli*, ya que el 100% de las colonias aisladas de muestras

lactosa positiva de la playa Las Cascadas (LC) hasta la Playa Sombrillas (LS) dieron características positivas para el reconocimiento de *Escherichia coli* en EMB y TBX. Lo mismo se puede observar en las Playas Waikiki (PWK) y Makaha (PM) donde se concentran las escuelas de surf.

**Tabla 4:** Resumen de resultados de aislamiento de enterobacterias en 15 playas del Circuito de Playas de la Costa Verde.

N°	COD.	N° Muestras	T °C (promedio)	pH (promedio)	Mc Conkey* (% positivo)	EMB* (% positivo)	TBX* (% positivo)
1	PMB	8	23.15	7.8	87.5	0	0
2	PSI	6	22.98	7.8	83.3	16.67	16.67
3	PTP	8	23.1	7.775	62.5	25	25
4	PII	6	23.25	7.73	83.33	83.33	83.33
5	PI	4	23.23	7.78	100	25	25
6	PWK	3	22.93	7.7	100	100	100
7	PM	3	22.97	7.7	100	100	100
8	RII	6	23.07	7.68	16.67	33.33	33.33
9	RI	5	23.26	7.68	100	100	80
10	PLE	3	23.13	7.7	100	66.67	66.67
11	LC	4	23.13	7.68	100	100	100
12	PB	3	23.17	7.7	100	100	100
13	LP	4	22.93	7.7	100	100	100
14	LY	3	23.10	7.7	100	100	100
15	LS	5	23.1	7.7	100	100	100

\* Con relación al número de muestras tomadas en cada playa.

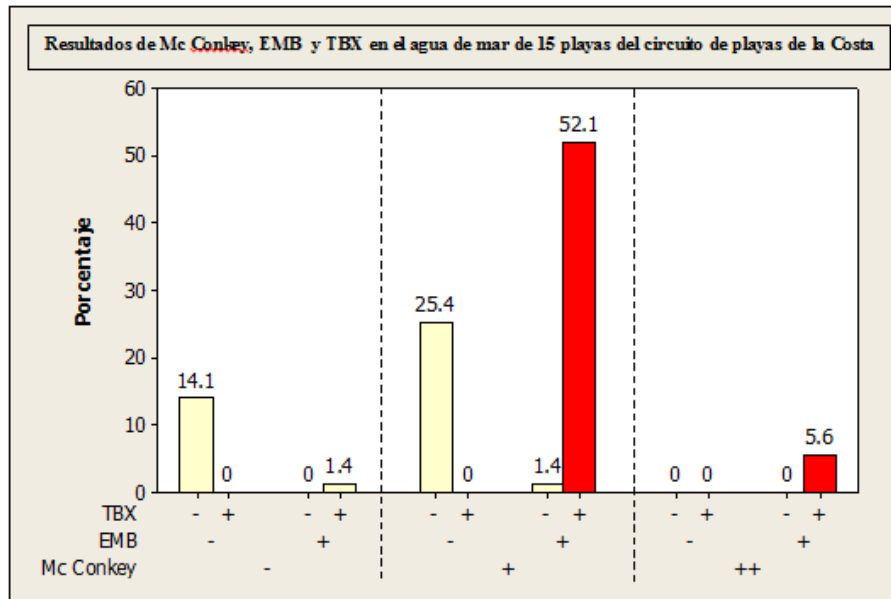
En la Tabla 5 y figura 12, se resumen los resultados obtenidos por todas las muestras procesadas en Mc Conkey, EMB y TBX. A fin de identificar la presencia de enterobacterias en las muestras de agua de mar del circuito de playas de la Costa Verde, para una posterior identificación de *Escherichia coli*. Se observa que los resultados positivos en las tres pruebas de Mc Conkey, EMB y TBX alcanzaron un porcentaje igual a 57, 7% (40 de 71 muestras recolectadas). Este porcentaje da indicios de una alta presencia de

enterobacterias que presuntivamente podrían ser *Escherichia coli* en las muestras de agua recolectadas en el Circuito de Playas de la Costa Verde.

La segunda parte de esta investigación busca identificar mediante pruebas bioquímicas a *Escherichia coli* y por pruebas serológicas la presencia de *Escherichia coli* enteropatógena.

**Tabla 5:** Porcentajes de resultados positivos y negativos de las pruebas de Mc Conkey, EMB y TBX en las muestras de agua de mar de 15 playas del circuito de playa de la Costa Verde

Mc Conkey	EMB	TBX	Porcentaje
-	-	-	14.1%
	+	+	1.4%
+	-	-	25.4%
	+	-	1.4%
		+	52.1%
++	+	+	5.6%
		Total	100.0%



**Figura 12:** Porcentajes de resultados positivos y negativos de las pruebas de Mc Conkey, EMB y TBX en las muestras de agua de mar de 15 playas del circuito de playa de la Costa Verde

## 6.5 Prueba de confirmación bioquímica con Citrato de Simmons

De las muestras positivas para enterobacterias se aislaron 650 cepas presuntivas de *Escherichia coli*, se seleccionaron 100 cepas que fueron positivas para el medio de cultivo cromogénico TBX y se les aplicó la prueba bioquímica de Agar Citrato de Simmons. El 100% de las muestras fue Citrato negativo, ya que ninguna viró a color a azul.

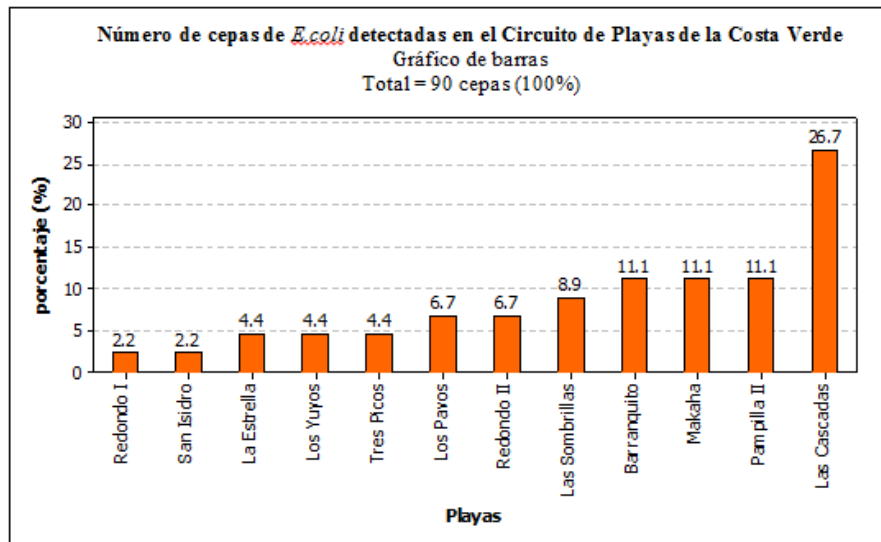


**Figura 13.** Resultado de la prueba Bioquímica Citrato de Simmons, confirmación de resultados de *Escherichia coli*.

## **6.6 Identificación Bioquímica de *Escherichia coli* mediante API 20E**

Una vez realizada la prueba bioquímica Citrato de Simmons a las 100 cepas presuntivas de *Escherichia coli* y siendo estas identificadas como citrato negativo, se procedió a utilizarlas en la prueba API 20E BioMérieux.

Se identificó que las cepas de *Escherichia coli* identificadas mediante prueba bioquímica API 20E pertenecían a 12 de las 15 playas muestreadas. Esto quiere decir que al menos una cepa de *Escherichia coli* está presente en 12 (80%) playas del Circuito de Playas de la Costa Verde, figura 14. Mediante esta prueba se identificó que las playas donde se encontró el mayor porcentaje de *Escherichia coli* fue en Barranquito, Makaha, Pampilla II y las Cascadas, sus porcentajes son mayores al 10%. Por otro lado, las playas donde se encontró menor porcentaje de *Escherichia coli* fue en las playas Redondo I, San Isidro, La Estrella, Los Yuyos y Tres Picos, sus porcentajes son menores al 5%.



**Figura 14.** Comparación de porcentajes de presencia de *Escherichia coli* que se detectaron (al menos una cepa) en las muestras de agua de mar de 12 playas del circuito de playas de la Costa Verde, ordenadas en orden creciente.

Asimismo, mediante la prueba API 20E se logró identificar los códigos de las cepas en estudio. De acuerdo con el software de API 20 E, estos códigos son identificados como *Escherichia coli*, los códigos obtenidos fueron: 5044552, 5144572, 5154572, 7144572, 7154572 y 7554572.

Como se observa en la Tabla 6, la cepa *Escherichia coli* con código 7554572 fue la cepa con mayor porcentaje de presencia en las muestras de agua de mar de 12 playas del Circuito de Playas de la Costa Verde, alcanzando un porcentaje de 55,6%, luego siguen los códigos 7154572 con 26,7%, 514572 con 8,9%, 7144572 con 4,4%, y finalmente 5044552 y 5154572 ambos con 2,2%.

**Tabla 6:** Número y porcentajes de cepas de *Escherichia coli* identificadas mediante la prueba API en las muestras del circuito de playa de la Costa Verde

Código	<i>Escherichia coli</i>	
	Cantidad	%
5044552	2	2.2%
5144572	8	8.9%
5154572	2	2.2%
7144572	4	4.4%
7154572	24	26.7%
7554572	50	55.6%
<b>Total</b>	90	100%

Por otro lado, mediante la prueba miniaturizada API 20E también se identificó a *Salmonella choleraesuis ssp arizonae* con un porcentaje de identificación de 63.8%. El número de cepas identificadas como *Salmonella choleraesuis* corresponden a 10 de las 100 cepas procesadas mediante esta prueba, lo cual correspondería al 10% de las cepas procesadas.

## **6.7 Identificación Serológica de *Escherichia coli* enteropatógena ECEP**

Para identificar serológicamente las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena, se utilizó el Kit de Sueros polivalentes anti – *Escherichia coli* enteropatógena del Laboratorio Probac, con el cual se pueden identificar grupos de suero polivalente A y B. Tabla 7.



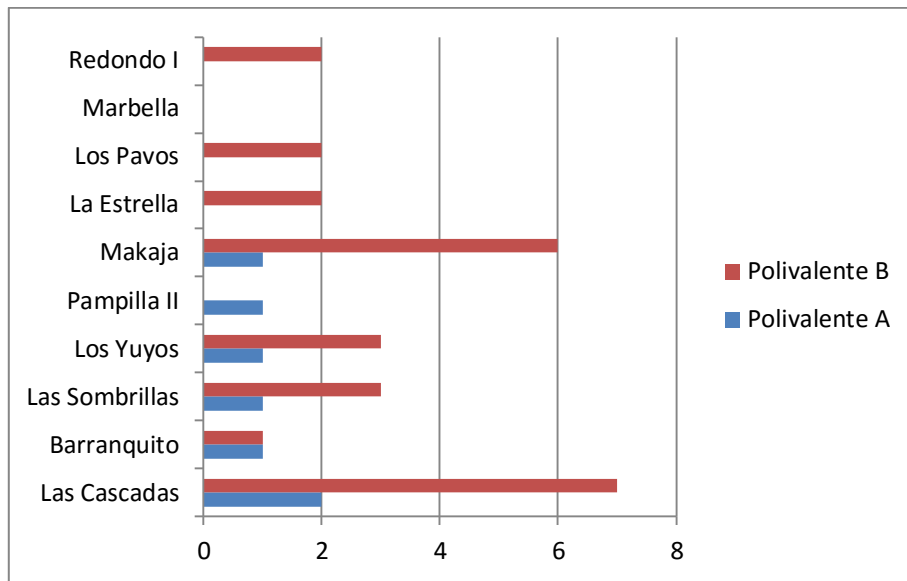
**Tabla 7.** Cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas identificadas por cada suero polivalente A y B

Polivalente A	Polivalente B
<i>Escherichia coli</i> 026	<i>Escherichia coli</i> 0114
<i>Escherichia coli</i> 055	<i>Escherichia coli</i> 0125
<i>Escherichia coli</i> 0111	<i>Escherichia coli</i> 0142
<i>Escherichia coli</i> 0119	<i>Escherichia coli</i> 0158

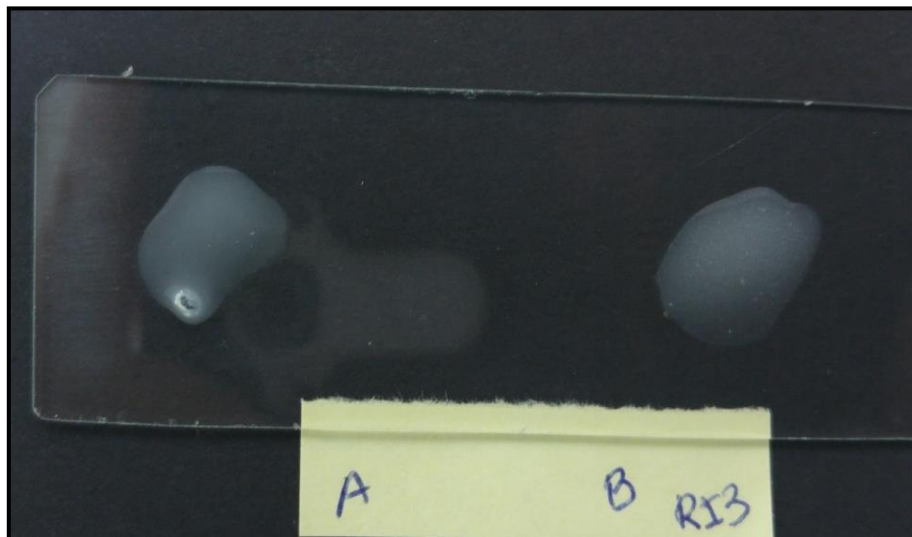
Con el Kit de Sueros polivalentes anti – *Escherichia coli* enteropatógena del Laboratorio Probac se logró identificar si las cepas aisladas e identificadas de *Escherichia coli* pertenecían al serogrupo A o B de *Escherichia coli* enteropatógena o si no pertenecían a este grupo.

Se obtuvo que, de las 100 cepas analizadas, 33 fueron identificadas como *Escherichia coli* enteropatógena que pueden pertenecer al serogrupo A o B. Estas 33 muestras identificadas pertenecen a 9 playas del circuito de playas de la Costa Verde, las cuales son: Redondo I, Los Pavos, La Estrella, Makaha, Pampilla II, Los Yuyos, Las Sombrillas, Barranquito y Las Cascadas, Figura 15.

Asimismo, se identificó que 7 cepas de *Escherichia coli* enteropatógena pertenecen al serogrupo A y 26 cepas de *Escherichia coli* enteropatógena pertenecen al serogrupo B. Para el caso del serogrupo A, se identificaron 2 cepas en la playa Makaha, y para el caso del serogrupo B, se identificaron 7 cepas en la playa Cascadas.



**Figura 15.** Resultados positivos para los Antisueros Polivalentes A y B.



**Figura 16.** Identificación Serológica de *Escherichia coli* enteropatógena con Antisueros Polivalentes A y B.

## 6.8 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar

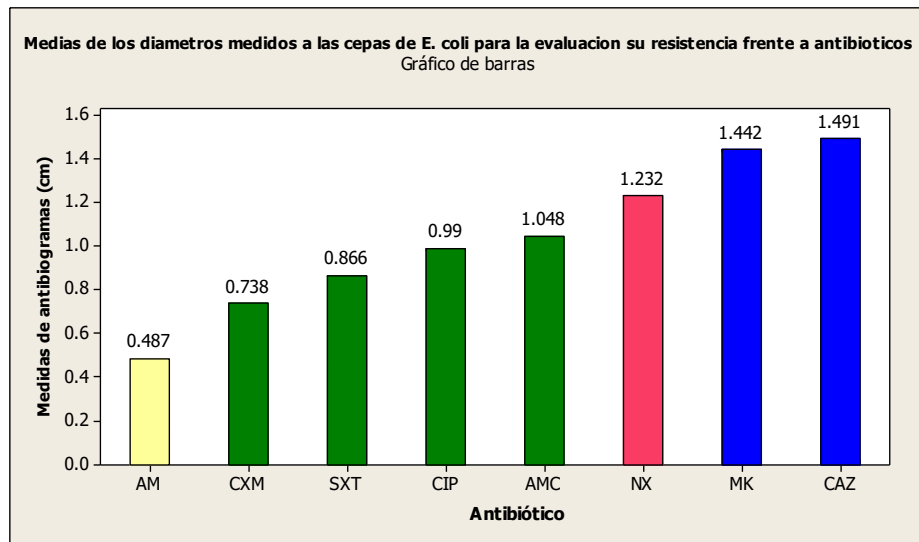
Realizando el análisis respectivo sobre la inhibición de crecimiento efectuado por 8 antibióticos se tiene evidencia de que el antibiótico AM presentó el menor halo de inhibición, en comparación con los otros 7 antibióticos, obteniendo el menor valor en la media (0,487 cm) y la mediana (0,0 cm). Tabla 8.

Por otro lado, con los antibióticos MK y CAZ se obtuvo los mayores diámetros de halos de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli*; para MK la media fue 1,44 cm y la mediana fue 1,70 cm, y para CA la media fue de 1,49 cm y la mediana fue 1,65 cm. Tabla 8.

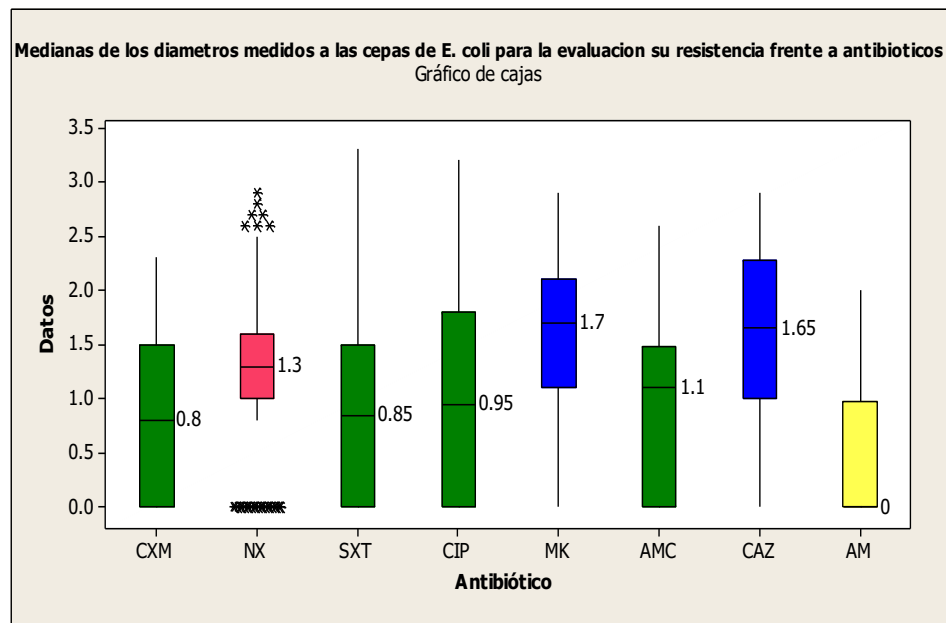
**Tabla 8.** Estadísticos descriptivos asociados a los diámetros de halo de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* efectuados por su susceptibilidad a 8 antibióticos

Antibiótico	Diámetro de crecimiento (cm)		
	Mediana	Media	Desviación estándar
<b>AM</b>	0.00	0.49	0.70
<b>CXM</b>	0.80	0.74	0.78
<b>SXT</b>	0.85	0.87	0.96
<b>CIP</b>	0.95	0.99	1.00
<b>AMC</b>	1.10	1.05	0.77
<b>NX</b>	1.30	1.23	0.81
<b>CAZ</b>	1.65	1.49	0.90
<b>MK</b>	1.70	1.44	0.85

AM: Ampicilina, CXM: Cefuroxima, SXT: Cotrimoxazol, CIP: Ciprofloxacino, AMC: Amoxicilina-Ac. Clavulánico, NX: Norfloxacino, CAZ: Ceftazidina y MK: Amicacina.



**Figura 17(a).** Comparación de las medias de los halos de inhibición detectadas para la evaluación de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en orden creciente.



**Figura 17(b).** Comparación de las medianas de los halos de inhibición detectadas para la evaluación de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli*.

Con el propósito de comparar los resultados obtenidos de la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas, aisladas de

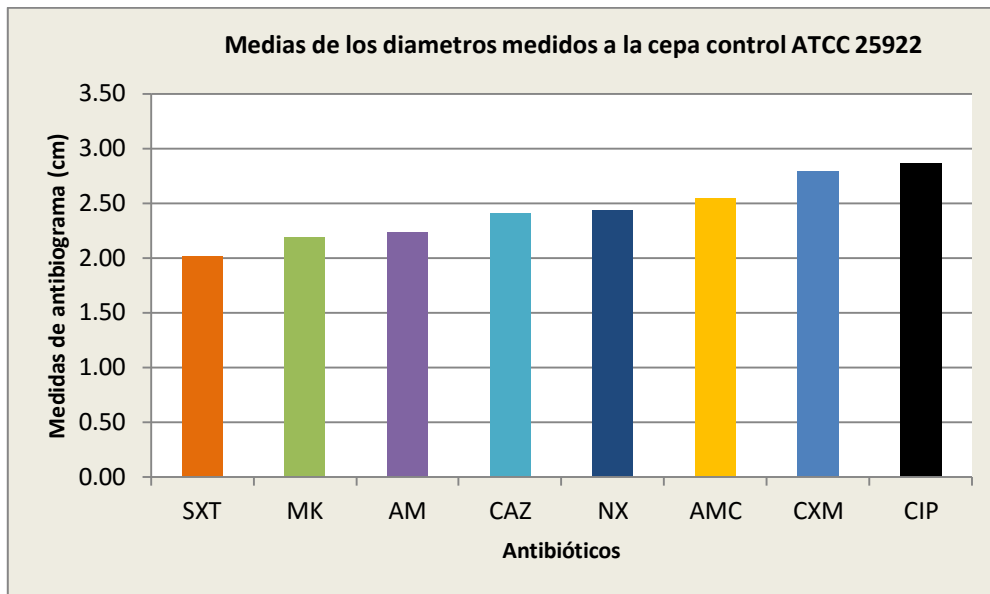
las muestras de agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde, con una cepa conocida de *Escherichia coli*, se utilizó como control la cepa ATCC 25922.

Realizando el análisis respectivo sobre la inhibición de crecimiento efectuado por 8 antibióticos en la cepa control, se obtuvo evidencia de que el antibiótico AM presentó el menor halo de inhibición, en comparación con los otros 7 antibióticos, obteniendo el menor valor de la media (2,02 cm) y la mediana (2 cm). Tabla 9.

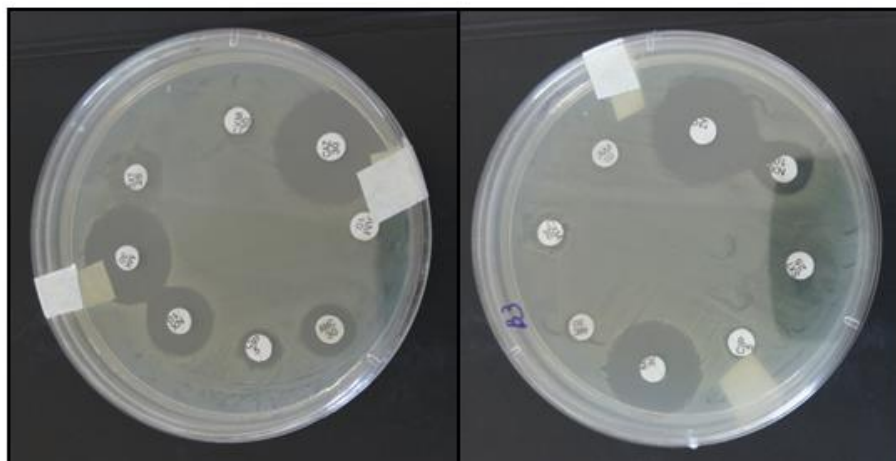
Por otro lado, con los antibióticos NX y CIP se obtuvo los mayores diámetros de halos de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli*; para NX la media fue 2,79 cm y la mediana fue 2,80 cm, y para CIP la media fue de 2,87 cm y la mediana fue 2,90 cm. Tabla 9.

**Tabla 9.** Estadísticos descriptivos asociados a los diámetros de halo de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922

Antibióticos	Diámetro de crecimiento (cm)		
	Media	Mediana	Desviación estándar
<b>SXT</b>	2.54	2.50	0.13
<b>MK</b>	2.40	2.40	0.12
<b>AM</b>	2.02	2.00	0.22
<b>CAZ</b>	2.43	2.50	0.24
<b>NX</b>	2.79	2.80	0.25
<b>AMC</b>	2.18	2.20	0.16
<b>CXM</b>	2.23	2.20	0.38
<b>CIP</b>	2.87	2.90	0.11



**Figura 18.** Comparación de las medidas de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con la prueba de susceptibilidad microbiana *Escherichia coli* ATCC 25922



**Figura 19.** Pruebas de antibiograma a las cepas aisladas del agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde.

## VII. DISCUSIÓN

Se determinó que, de las 71 muestras recolectadas de Circuito de Playas de la Costa Verde, 36 (52.1%) tenían presencia de enterobacterias. De estas muestras positivas se aislaron 100 cepas lactosa positiva y se determinó mediante pruebas bioquímicas API 20E las cepas de *Escherichia coli*. Se determinó que 90 (90%) de las cepas procesadas son identificadas como *Escherichia coli* por el software de identificación de la Prueba API. El 55.6% (50 cepas) de las cepas positivas pertenecen al código 7554572. Martínez, *et al.* 2015 mediante identificación bioquímica demostraron que el 100% de las cepas que aislaron, 77 (96,25%) resultaron identificadas como *Escherichia coli*. El porcentaje de aislamiento obtenido de *Escherichia coli* en esta investigación, es un indicativo de que las playas evaluadas están siendo sometidas a fuentes de contaminación fecal. Resultados de la investigación de Vergaray, *et al.* 2007, realizada en 8 playas de Lima en los meses de julio (invierno) del 2005 y enero (verano) del 2006, indican que la contaminación microbiana de origen fecal se elevó en forma significativa en verano, observación similar fue realizada por Guzzi, *et al.* 2006 en Mar de Plata, ello posiblemente se debió al aumento notable de los usuarios y de la población que habita en las cercanías de la playa. Cabe mencionar, que esta investigación ha sido realizada antes de la puesta en marcha de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales La Chira, la cual a partir de abril del 2016 comenzó a procesar el 100% de las aguas residuales antes de ser vertidas en las playas de la Costa Verde.

Mediante esta investigación se determinó la presencia de *Escherichia coli* enteropatógena en 9 playas del Circuito de Playas de la Costa Verde. De las 100 muestras procesadas, 26 dieron positivo para el serogrupo polivalente B y 7 para el serogrupo polivalente A. Lo cual indica que hay más probabilidad

de encontrar las Cepas: *Escherichia coli* 0114, 0125, 0142, 0158. Martínez, *et al*, 2015 identificaron que el tipo más frecuente de *Escherichia coli* aislado fue ECEP, con el 16,90% (13/77). Asimismo, resultados similares fueron reportados por Salinas *et al*, 2010 quienes analizaron aguas marinas de la bahía de Iquique al norte de Chile y lograron detectar 18 cepas positivas de ECEP por la técnica PCR. Todo esto, nos da luces de que no es atípico poder encontrar ECEP en muestras de agua procedentes de playas, como es en este caso del Circuito de Playas de la Costa Verde.

En este estudio también se evaluó la sensibilidad antibiótica de las 100 cepas identificadas como *Escherichia coli*, y se identificó que la susceptibilidad antibiótica fue menor para ampicilina y mayor para ceftazidina y amicacina. Este resultado, se repite en la investigación de Gonzales, *et al*. 2008 quienes observaron que *Escherichia coli* tenía una sensibilidad a amicacina de 97,2% y ampicilina 40,9%. Con ello, se vuelve a observar que amicacina sigue siendo una opción como tratamiento empírico, observándose también que existe una alta resistencia a los antibióticos comunes. Se debe tener en cuenta que los antibióticos de amplio espectro tienen acción sobre una gran cantidad de agentes microbianos Gram positivos y negativos. Asimismo, Quintana (1998) establece que los antibióticos pueden actuar inhibiendo la síntesis de la pared actuando sobre las proteínas de la membrana celular, inhibiendo la síntesis proteica actuando sobre el ribosoma microbiano e inhibiendo la duplicación del DNA. Es por ello, que se considera que los resultados obtenidos en la prueba antibiótica utilizando *Escherichia coli*, tienen una aproximación si se realizara con las cepas de *Escherichia coli enteropatógena*.



## VIII. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de *Escherichia coli* enteropatógena en el 60% (9) de las playas muestreadas en el Circuito de Playas de la Costa Verde.
- Se identificó la presencia de enterobacterias en las muestras de agua de mar del circuito de playas de la Costa Verde y se observó que los resultados positivos en las tres pruebas de Mc Conkey, EMB y TBX alcanzaron un porcentaje igual a 57,7% (40 de 71 muestras recolectadas), las cuales pertenecen a 12 de las playas muestreadas.
- Se identificó a *Escherichia coli* mediante prueba bioquímica rápida API 20E en el 90% (90 de 100) de las cepas analizadas. Asimismo, estas muestras positivas pertenecen al 80% (12) de las playas muestreadas.
- Mediante prueba miniaturizada API 20E también se identificó a *Salmonella choleraesuis ssp arizonae*. El número de cepas identificadas como *Salmonella choleraesuis* corresponden a 10 de las 100 cepas procesadas mediante esta prueba, lo cual correspondería al 10% de las cepas procesadas.
- De las 100 cepas de *Escherichia coli* 33 fueron *Escherichia coli* enteropatógena, de las cuales 26 fueron identificadas por el anti suero del serogrupo B y 7 por el antisuero del serogrupo A.
- Las cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas identificadas presentaron mayor susceptibilidad antimicrobiana a los antibióticos Amicacina y Ceftazidina y menor susceptibilidad antimicrobiana a Ampicilina.

## IX. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Abhirosh, C.; Sherin, V.; Thomas, A.; Hatha, A. and Mazumder, A. 2011. Potential public health significance of faecal contamination and multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* serotypes in a lake in India. Public Health, 125. 377-379.

Ajiboye, R.; Solberg, O.; Lee, B.; Raphael, E.; DebRoy, C. 2009. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. Clinical Infections diseases. 49: 365-371.

Alzahrani, A.; Gherbawy, Y.; Sawant, A. 2011. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from water springs in Al-Ahsa Región. Afrincan J Microbiol Res. 5 (2):123-130.

Barragán, I.; Barriga, G.; Calderon, F. 2005. Primer consenso nacional sobre manejo antimicrobiano de infecciones de vías urinarias en el adulto. Boletín del Colegio Mexicano de Urología. 20(2):46-57.

Bonamano, S.; Madonia, A.; Borsellino, C.; Stefani, C.; Caruso, G.; De Pasquale, F.; Piermattei, V.; Zappalà, G. and Marcelli, M. 2015. Modeling the dispersion of viable and total *Escherichia coli* cells in the artificial semi-enclosed bathing area of Santa Marinella (Latium, Italy). Marine Pollution Bulletin, 95. 141–154.

Byamukama D, Mach RL, Kansiime F, Manafi M, Farnleitner AH. 2005. Discrimination Efficacy of Fecal Pollution Detection in Different Aquatic Habitats of a High Altitude Tropical Country, using presumptive coliforms, *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* spores. Appl Environ Microbiol. 71(1):65-71.

Byrd, Jeffrey J. and Colwell, Rita R. 1993. Long term survival and plasmid maintenance of *Escherichia coli* in marine microcosms. FEMS Microbiology Ecology, 12: 9-14.

Cabello, R. y Benavente, I. 2002. Síndrome diarreico infeccioso. Editorial Médica Panamericana. España.

Chen, J.; Lee, S.Y.; Yang, B.; Lu, J.J. 2008. Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive BacT/ALERT blood cultures. J. Microbiol. Immunol Infect; 41 (6); 259-264.

FAO – División de Producción y Sanidad Animal. Sin fecha. EMPRES - Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. Visto en: <http://www.fao.org/3/a-i2530s/i2530s03.pdf>

Gonzales, D.; Jaulis, J.; Tapia, E. y Salmavides, F. 2009. Sensibilidad antibiótica de bacterias causantes de infecciones del tracto urinario en un hospital general. Enero – junio 2008. Revista Med Hered. 20(1).

Guzzi, J.; Zamora, A.; Folabella, F.; Isla, F.; Escalante, A. 2006. Situación sanitaria de la Zona Balnearia de la ciudad de Mar de Plata. Trabajo presentado en el Primer Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua.

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

Liberatore, L.; Murmura, Fe. and Scarano, A. 2015. Bathing water profile in the coastal belt of the province of Pescara (Italy, Central Adriatic Sea). Marine Pollution Bulletin, 95: 100–106.

Maravic, A.; Skocibušic, M.; Cvjetan, S.; Šamanic, I.; Fredotovic, Z.; Puizina, J. 2015. Prevalence and diversity of extended-spectrum-β-lactamase producing Enterobacteriaceae from marine beach waters. *Marine Pollution Bulletin*, 90: 60–67.

Martin, Y.; Troussellier, M. and Bonnefont, J. 1998. Adaptive responses of *Escherichia coli* to marine environmental stresses: a modelling approach based on viability and dormancy concepts. *Oceanológica Acta* - Vol. 21 (6).

Martinez, R.; Villalobos, L.; Castillo, L. 2015. *Escherichia coli* diarragénicas procedentes de aguas marinas recreacionales caracterizadas por reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Científica*, Vol. 15 (3). Universidad de Zulia.

Ministerio del Ambiente, 2015. Decreto Supremo N° 015-2015-MINAM Modifican los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua y establecen disposiciones complementarias para su aplicación. *Diario el Peruano*, Perú, 19 de diciembre de 2015.

Ministerio de Salud – Dirección General de Salud Ambiental, 2013. Calidad de las Playas de la Costa Verde, según la concentración de Coliformes termotolerantes. Programa de Protección de Zonas Costeras y Playas del Litoral Peruano. Visto en: [http://www.digesa.minsa.gob.pe/pw\\_playas/2013.htm](http://www.digesa.minsa.gob.pe/pw_playas/2013.htm)

Ministerio de Salud – Dirección General de Salud Ambiental, 2016. Calidad de las Playas de la Costa Verde, según la concentración de Coliformes fecales. Programa de Protección de Zonas Costeras y Playas del Litoral Peruano. Visto en: [http://www.digesa.minsa.gob.pe/pw\\_playas/2016.htm](http://www.digesa.minsa.gob.pe/pw_playas/2016.htm).

Nataro, JP. y Kaper, JB. 1998. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11:142-201.

Ochoa, T.; Contreras, C. y Mosquito, J. 2010. Alcances sobre la situación epidemiológica de las *Escherichia coli* diarrogénicas aisladas de niños peruanos. Instituto de Medicina Tropical "Alexander Von Humbolt", Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.

Pascual, R y Calderón, V. 2000. Microbiología Alimentaria Segunda Edición. Capítulo 5: Investigación y Recuento de *Escherichia coli*. España.

Perini, L.; Quero, G.M.; Serrano García, E. and Luna, G.M. 2015. Distribution of *Escherichia coli* in a coastal lagoon (Venice, Italy): Temporal patterns, genetic diversity and the role of tidal forcing. *Water Research* 87.155-165.

Quintana, A. 1998. Antibióticos: Bases microbiológicas del uso de antimicrobianos.

Rodríguez, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44(5):464-475.

Romero, A.; Andres, M.; Abreu, M.; and Scussel, V. 1994. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 24. 171-178.

Romeu, B. 2012. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la Habana. Tesis presentada para obtener el grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de la Habana.

Salinas, P.; Moraga, R.; Santander, E; Siel-Feld, W. 2010. Presencia de cepas diarrogénicas de *E.coli* y estudio de genes de virulencia aislados desde fecas de dos poblaciones de lobo marino común, *Otaria flavescens* en el norte de Chile. *Rev. Biol. Mar. Ocean.* 45(1):153-158.

Sardiñas O, Chiroles S, Fernández M, Hernández Y, Pérez A. 2006. Evaluación físico-química y microbiológica del agua de la presa El Cacao (Cotorro, Cuba). *Higiene y Sanidad Ambiental*. (6):202-206.

Scheutz, F. y Strockbine N. 2005. Genus I. *Escherichia*. En: Brenner, D. 2005. *The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria*. Springer (2): 607-623.

Titilawo, Y.; Obi, L. and Okoh, A. 2015. Antimicrobial resistance determinants of *Escherichia coli* isolates recovered from some rivers in Osun State, South-Western Nigeria: Implications for public health. *Science of the Total Environment*, 523:82–94.

Vergaray, V.; Méndez, C.; Morante, H.; Heredia, V y Bejar, V. 2007. *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. *Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG – Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 10(20):82-86.

Vergine, P.; Saliba, R.; Salerno, C.; Laera, G.; Berardi, G. and Pollice, A. 2015. Fate of the fecal indicator *Escherichia coli* in irrigation with partially treated wastewater. *Water Research*. 85: 66-73.

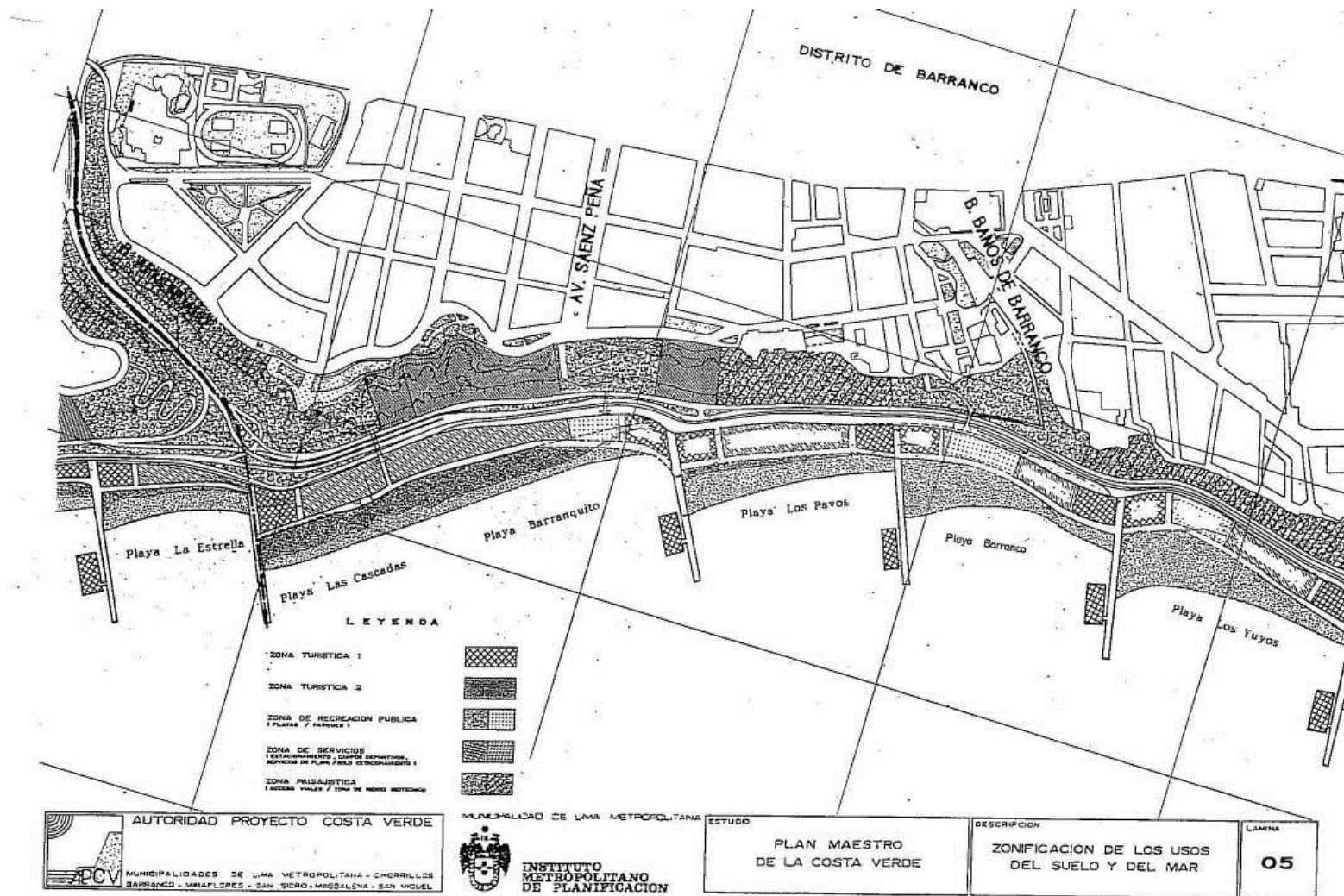
Vidal, J. 2003. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*. 9(1):188-193.

Von Baum, H y Marre, R. 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int. J. Med. Microbiol*. 295 (7): 503-5011.

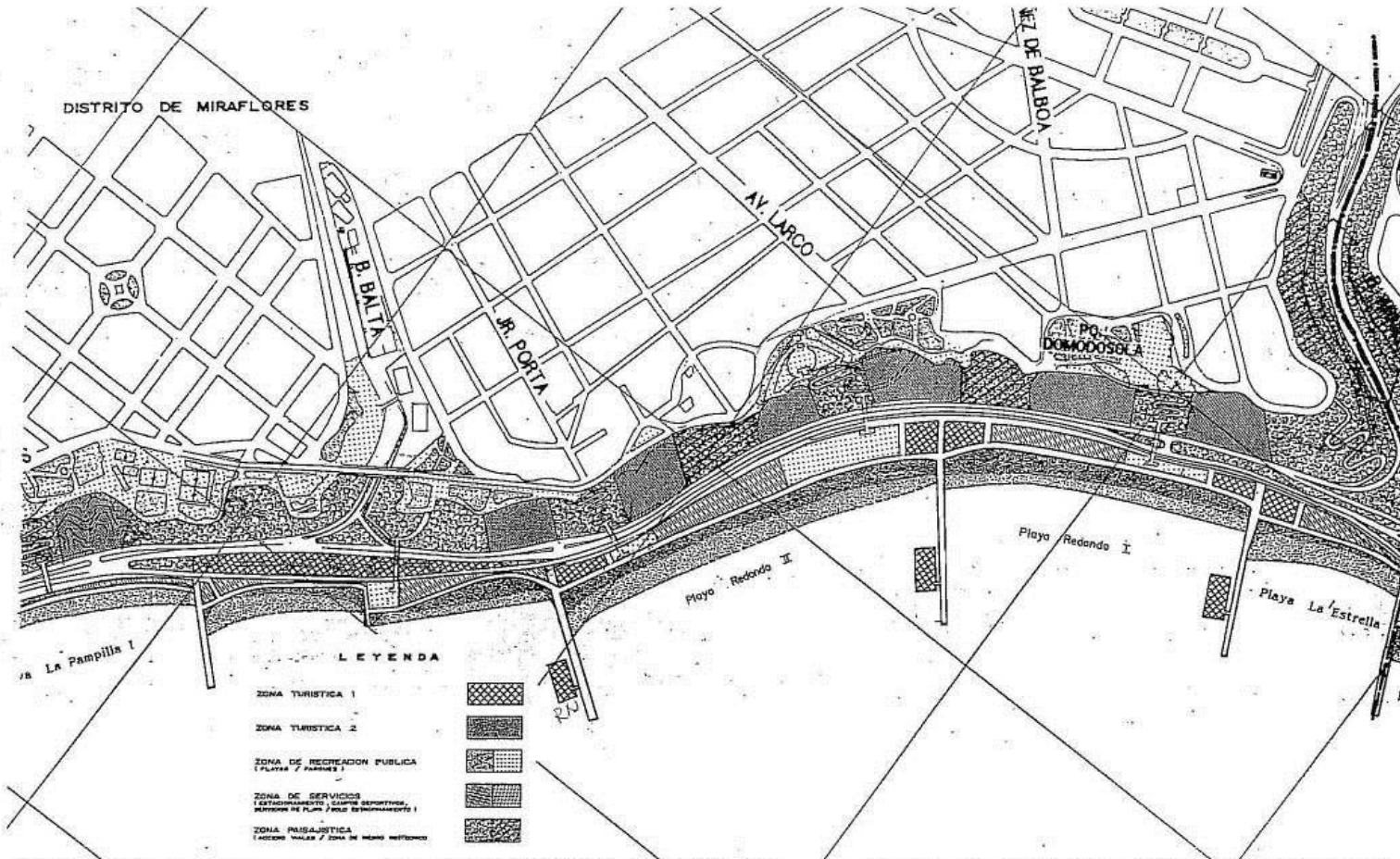
Webster, L.; Thompson, B.; Fulton, M.; Chestnut, D.; Van Dolah, A. and Leight, G. 2004. Identification of sources of *Escherichia coli* in South Carolina estuaries using antibiotic resistance analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298:179-195.

Zambrano, A. 2012. Implementación de un ensayo PCR Multiplex para la identificación de las enterovarietades de *Escherichia coli* patógenas. Tesis para obtener el Título de Ingeniera en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército.

# ANEXO 1. Mapas de distribución geográfica de las playas de la costa verde.







**AUTORIDAD PROYECTO COSTA VERDE**

MUNICIPALIDADES DE LIMA METROPOLITANA - CHORRILLOS  
 BARRANCO - MIRAFLORES - SAN SIBO - MAGDALENA - SAN VICENTE

MUNICIPALIDAD DE LIMA METROPOLITANA

**INSTITUTO METROPOLITANO DE PLANIFICACION**

ESTUDIO

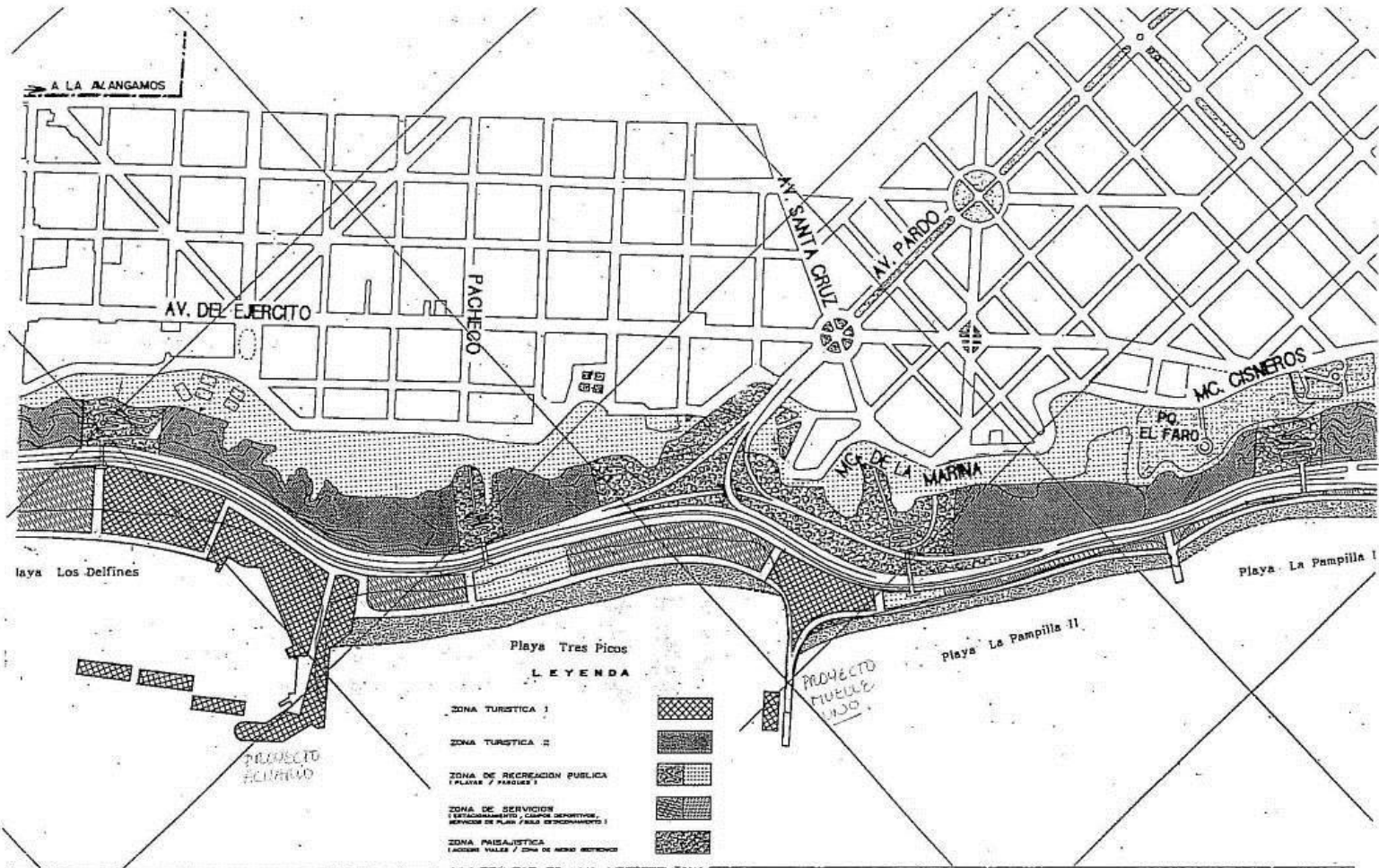
**PLAN MAESTRO DE LA COSTA VERDE**

DESCRIPCION

**ZONIFICACION DE LOS USOS DEL SUELO Y DEL MAR**

LAMINA

**06**



- LEYENDA
- ZONA TURSTICA I
  - ZONA TURSTICA II
  - ZONA DE RECREACION PUBLICA (PLAYAS Y PARQUES I)
  - ZONA DE SERVICIOS (ESTACIONAMIENTO, CASAS DEPORTIVAS, SERVICIOS DE PLAZA (PARQUE ESTACIONAMIENTO))
  - ZONA RESIDUENTICA (CASAS VALES / ZONA DE ALMOZARDO)

AUTORIDAD PROYECTO COSTA VERDE

APCV

MUNICIPALIDADES DE LMA METROPOLITANA - CHORRILLOS  
BARRANCO - MIRAFLORES - SAN ISIDRO - MONSELENA - SAN MIGUEL

MUNICIPALIDAD DE LMA METROPOLITANA

ESTUDIO

INSTITUTO METROPOLITANO DE PLANIFICACION

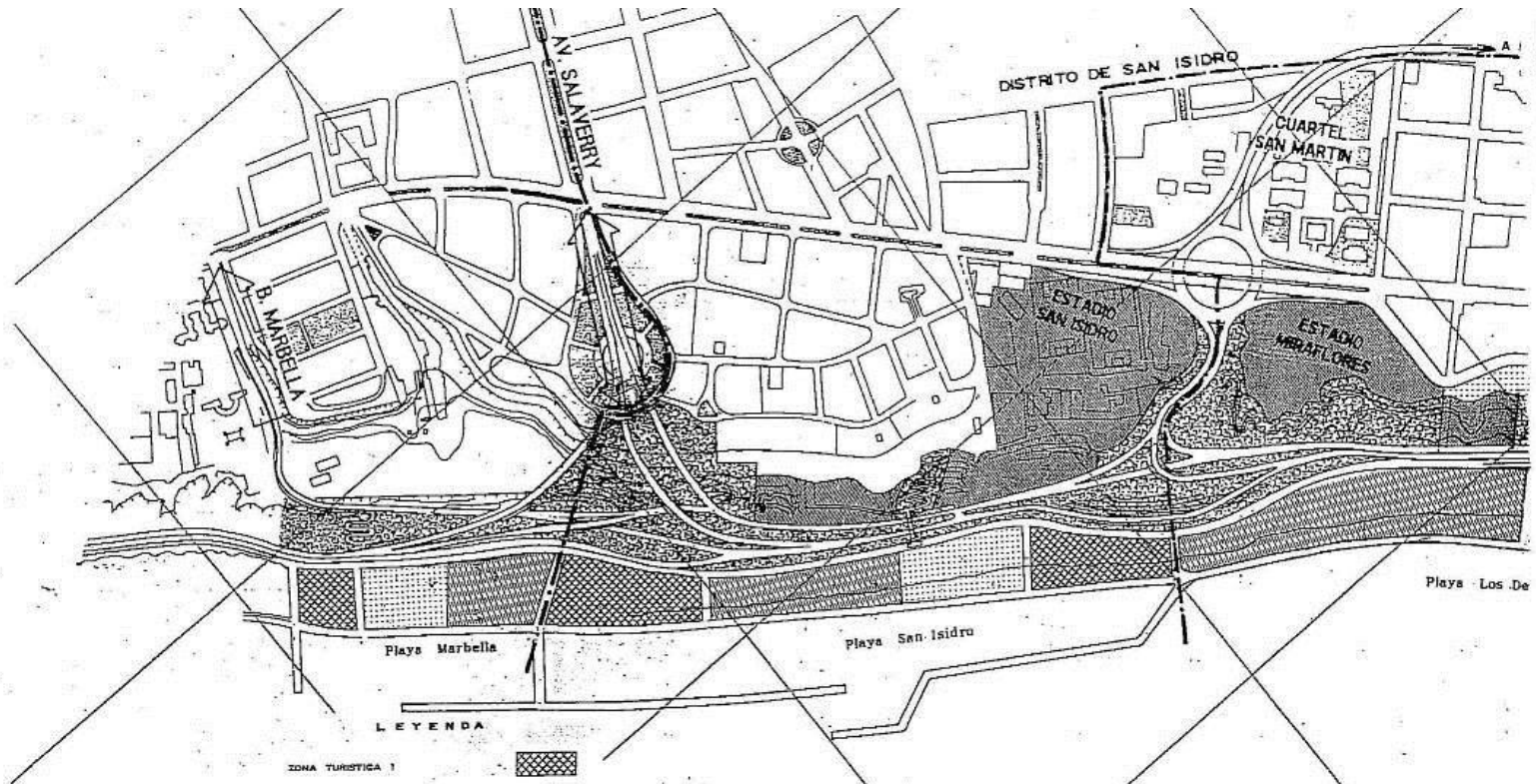
PLAN MAESTRO DE LA COSTA VERDE

DESCRIPCION

ZONIFICACION DE LOS USOS DEL SUELO Y DEL MAR

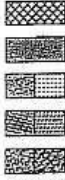
LAMINA

07



LEYENDA

- ZONA TURISTICA 1
- ZONA TURISTICA 2
- ZONA DE RECREACION PUBLICA (PLAZAS Y PARQUES)
- ZONA DE SERVICIOS (ESTACIONAMIENTO, CASAS DE REPOSICION, SERVICIOS DE PLAN / SOLO TERCIARIO)
- ZONA PAISAJISTICA (ACEROS VALLES / ZONA DE MARGEN METROPOLITANA)



**AUTORIDAD PROYECTO COSTA VERDE**

MUNICIPALIDADES DE LIMA METROPOLITANA - SHERRILLOS  
BARRANCO - MIRAFLORES - SAN ISIDRO - MADALENA - SAN MIGUEL

MUNICIPALIDAD DE LIMA METROPOLITANA

**INSTITUTO METROPOLITANO DE PLANIFICACION**

ESTUDIO

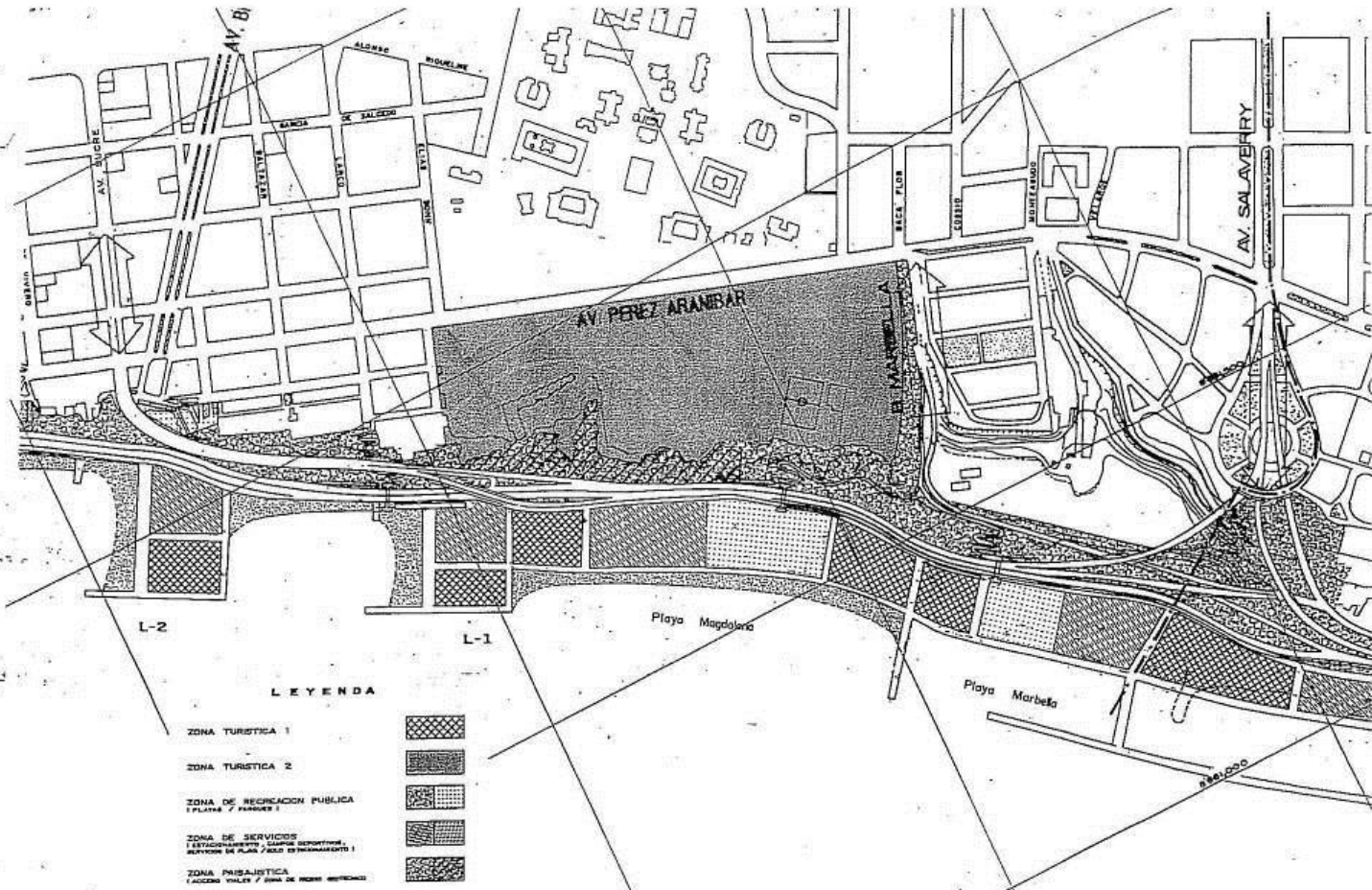
**PLAN MAESTRO DE LA COSTA VERDE**

DESCRIPCION

**ZONIFICACION DE LOS USOS DEL SUELO Y DEL MAR**

LAMINA

**08**



**LEYENDA**

- ZONA TURISTICA 1
- ZONA TURISTICA 2
- ZONA DE RECREACION PUBLICA (PLAZAS / PARQUES)
- ZONA DE SERVICIOS (ESTACIONES, CLUBES DEPORTIVOS, SERVICIOS DE PLAZA / ZONA DE TRANSITO)
- ZONA PARASITICA (HOTEL / ZONA DE SERVICIOS)

**AUTORIDAD PROYECTO COSTA VERDE**

MUNICIPALIDADES DE LIMA METROPOLITANA - CHORRILLOS  
BARRANCO - MIRAFLORES - SAN ISIDRO - MAGDALENA - SAN MIGUEL

MUNICIPALIDAD DE LIMA METROPOLITANA

**INSTITUTO METROPOLITANO DE PLANIFICACION**

ESTUDIO

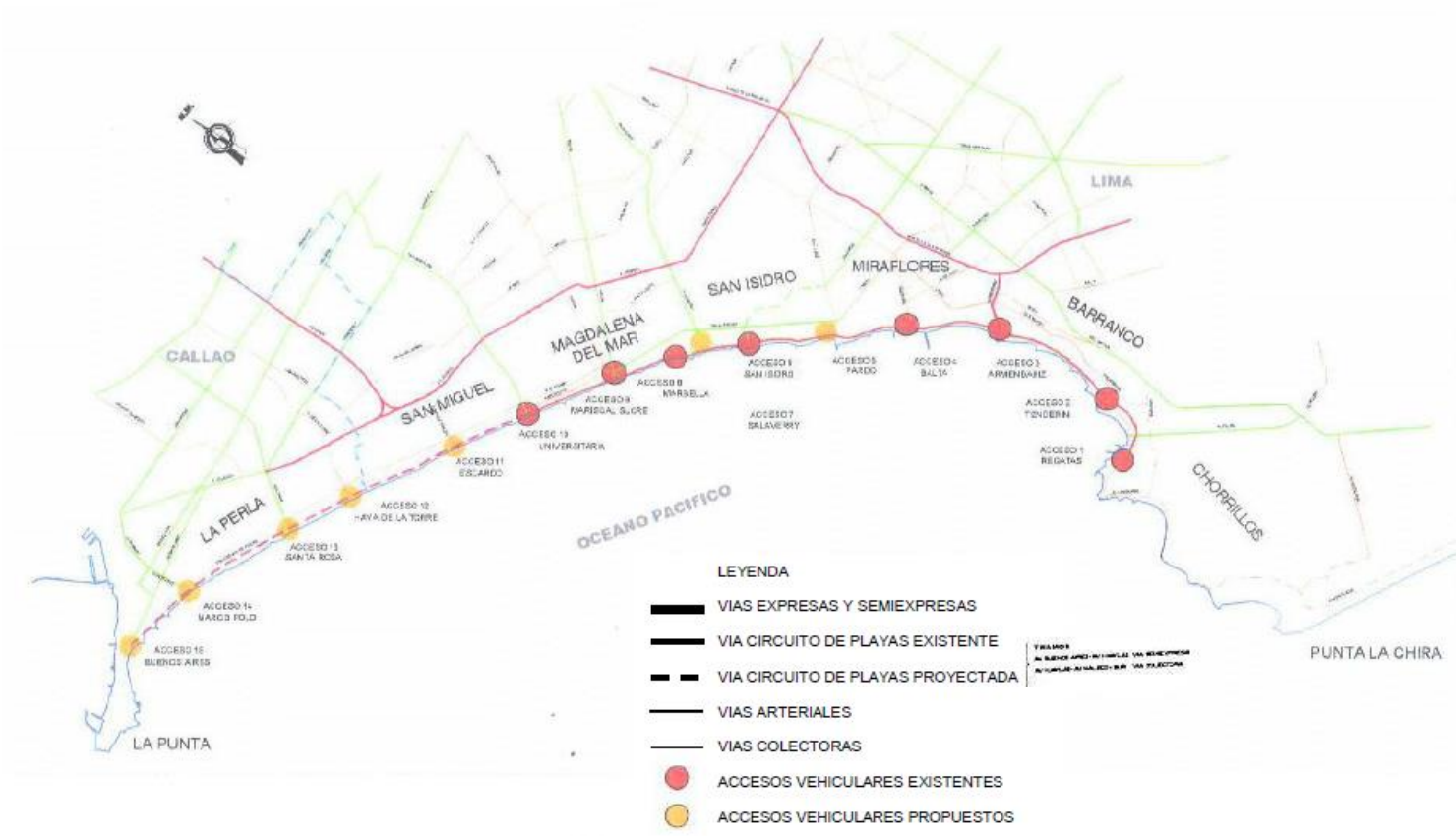
**PLAN MAESTRO DE LA COSTA VERDE**

DESCRIPCION

**ZONIFICACION DE LOS USOS DEL SUELO Y DEL MAR**

LAMINA

**09**



**AUTORIDAD PROYECTO COSTA VERDE**  
 MUNICIPALIDADES DE LIMA METROPOLITANA-CHORRILLOS  
 BARRANCO-MIRAFLORES-SAN ISIDRO-MAGDALENA-SAN MIGUEL

MANCOMUNIDAD DE LIMA METROPOLITANA  
**INSTITUTO METROPOLITANO DE PLANIFICACION**

**PLAN MAESTRO DE LA COSTA VERDE**

IDENTIFICACION DE INGRESOS Y SALIDAS EN LA COSTA VERDE

**PLANO IV.2.1**

