



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Evaluación de la resistencia bacteriana de *Escherichia coli*
Enteropatógena (EPEC) de aguas residuales en Lima- Callao en el 2019

TESIS

Para optar el título profesional de Licenciada en Biología

AUTORA

Novoa Busso, Lorena Maria

ORCID: 0000-0003-2113-5791

ASESOR

Ramos Gorbeña, Juan Carlos

ORCID: 0000-0002-9713-2653

Lima, Perú

2022

Metadatos Complementarios

Datos de autor

Novoa Busso, Lorena María

Tipo de documento de identidad del AUTOR: DNI

Número de documento de identidad del AUTOR: 45169390

Datos del(a) asesor(a)

Ramos Gorbeña, Juan Carlos

Tipo de documento de identidad: DNI

Numero de documento de identidad: 10243429

Datos de los Miembros del Jurado

Presidente: Agurto Saenz, Tomás Rene

DNI: 07207844

ORCID: 0000-0001-5186-9265

Secretario: Chavieri Salazar, Andrés Ricardo

DNI: 08014597

ORCID: 0000-0002-2644-959X

Vocal: Porras López, Graciela Marbetty

DNI: 43354966

ORCID: 0000-0003-2720-0750

Datos de la investigación

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.01

Código del Programa: 511206

DEDICATORIA

A Dios en primer lugar y a mis padres por su apoyo desde mis inicios educativos e inculcarme valores y ser la profesional que soy ahora.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Juan Carlos Ramos por su orientación y apoyo y a la Universidad Ricardo Palma para la elaboración de mi Proyecto de tesis.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
2.1. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
2.2. OBJETIVOS	7
2.3. MARCO TEÓRICO.....	8
2.4. ANTECEDENTES	21
2.5. HIPÓTESIS.....	37
III. MATERIALES Y METODOLOGÍA	39
3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN	39
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN	39
3.3. VARIABLES	39
3.4. OPERALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	40
3.5. MUESTREO	40
3.6. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS	42
3.7. ASPECTO ÉTICO	60
IV. RESULTADOS	62
V. DISCUSIONES	66
VI. CONCLUSIONES.....	70
VII. RECOMENDACIONES.....	71
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
IX. ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Medias del Diámetro del Halo de Inhibición (mm) de la Actividad Antimicrobiana de <i>E. coli</i> EPEC frente a los Antibióticos Utilizados.....	63
Figura 2.	Diagrama de Cajas donde se Compara la Sensibilidad de <i>E. coli</i> EPEC frente a los Diversos Antibióticos a los cuales fue Expuesto medido en Longitud del Halo de Inhibición (mm)	63
Figura 3.	Prueba de Normalidad de Shapiro Wilk realizada a los Datos Obtenidos de la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana con los Diversos Antibióticos Empleados	64
Figura 4.	Muestras de aguas residuales de diversas plantas de tratamiento de aguas de Lima y Callao.	81
Figura 5.	Análisis de una muestra de agua residual desde la dilución inicial de 10ml en tubos de 20 x 150 de doble concentración (2X) hasta la dilución 10^{-5} en tubos de 16x150 de simple concentración (X)	81
Figura 6.	Inoculación de muestra de agua residual a un tubo de ensayo con medio “Lauril triptosa” con púrpura de bromocresol	82
Figura 7.	Realización de la técnica “Número Más Probable” (NMP) con tubos de ensayo con medio “Lauril triptosa” con púrpura de bromocresol	82
Figura 8.	Lectura de un tubo de ensayo a las 24+/-2 ; 48+/-3 horas de incubación a 35+/-0.5 T°C, positivo a <i>E. coli</i> por el cambio de medio a color amarillo por la acidez generada por el metabolismo de la bacteria y por presentar burbujas y turbidez	83
Figura 9.	Evaluación de tubos de ensayo con medio “Lauril triptosa” para identificar presencia de burbujas, cambio de color del medio o turbidez	83
Figura 10.	Batería de tubos de ensayo con el medio “EC - MUG” y muestra de agua residual los cuales permitirán identificar e identificar cepas de <i>E. coli</i> enteropatógena.....	84

Figura 11. Análisis de presencia de fluorescencia en cepas aisladas en la cámara UV	84
Figura 12. Presencia de fluorescencia en cepas aisladas de <i>E. coli</i>	85
Figura 13. Tubo de ensayo con cepa de <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) lo cual se comprobó al dar fluorescencia.	85
Figura 14. Lectura de las placas de TBX con colonias puras aisladas de <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	86
Figura 15. Proceso de preparación y esterilización del Agar Muller Hinton (MH).....	86
Figura 16. Materiales de trabajo.....	87
Figura 17. Preparación y esterilización del caldo BHI para la activación de las cepas <i>E. coli</i>	87
Figura 18. Tubos con caldo BHI con cepas <i>E. coli</i> . reactivadas después de 24 horas de incubación.	87
Figura 19. Plaqueo del medio Agar Muller Hinton (MH) en placas petri estériles de 16 x 100 mm.....	88
Figura 20. Con ayuda de un hisopo estéril, se estrió la cepa en toda la superficie de la placa petri con medio Agar Muller Hinton (MH).....	88
Figura 21. Se colocaron los discos con antibióticos con pinzas planas estériles en la superficie del agar inoculado.	89
Figura 22. Incubación de las placas a 35°C por 16 a 18 horas.....	89
Figura 23. Distribución de los discos de antibióticos manteniendo una distancia de 25 mm uno del otro en la placa de agar MH antes de la incubación.....	89
Figura 24. Lectura de las placas posterior a la incubación donde se muestra crecimiento del halo de inhibición.	90
Figura 25. Análisis de la varianza Kruskal-Wallis, programa PAST vs 4.05. P valor 0.00	90
Figura 26. Análisis de la varianza Kruskal-Wallis, programa PAST vs 4.05. P valor 0.00	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Variables a Analizar en el Presente Trabajo de Investigación.....	39
Tabla 2.	Descripción de las Variables, Tipos de Variables, Niveles de Medición e Indicadores.....	40
Tabla 3.	PTAR's y los Distritos de donde se Reciben las Muestras de Agua	42
Tabla 4.	Volumen para Preparar el Medio "Lauril triptosa" y la Cantidad de Muestra que se debe Inocular	46
Tabla 5.	Valores para Hallar el NMP Según Combinaciones de Resultados Positivos y Negativos de Tubos de Ensayo un Volumen de 20 ml	48
Tabla 6.	Valores para Hallar el NMP Según Combinaciones de Resultados Positivos y Negativos de Tubos de Ensayo un Volumen de 10 ml	48
Tabla 7.	Valores para Hallar el NMP Según Combinaciones de Resultados Positivos y Negativos de Tubos de Ensayo a Varias Concentraciones de Muestra de Agua.....	49
Tabla 8.	Ejemplos de Combinaciones de Tres Tubos Positivos de Cinco Diluciones Diferentes para Hallar el NMP.....	50
Tabla 9.	Relación de Antibióticos que se Emplearon en las Pruebas de Antibiograma	60
Tabla 10.	Resultados de la Media del Halo (mm) Comparados con los Parámetros de Resistente y Sensible a Antibióticos	62

RESUMEN

Las aguas residuales, su inadecuado tratamiento y posterior disposición constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes en el Perú en la actualidad. Ésta descarga incontrolada de aguas residuales sin tratamiento, contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras, generando un deterioro de los ecosistemas y causan numerosas enfermedades. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) causa diarrea y gastroenteritis en niños y se encuentra presente en cuerpos de aguas contaminados y aguas residuales. El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el comportamiento y resistencia bacteriana de *E. coli* EPEC frente a diversos antibióticos: amicacina, ampicilina, ceftazidima, cloranfenicol, amoxicilina - ácido clavulánico, tetraciclina, estreptomicina y gentamicina. Los resultados indicaron que *E. coli* EPEC fue sensible al antibiótico Amoxicilina/Ác. Clavulánico con respecto a los otros antibióticos.

Palabras clave: Aguas residuales, *Escherichia coli* enteropatógena, resistencia bacteriana, antibióticos

SUMMARY

Wastewater, its inadequate treatment and subsequent disposal constitute one of the most important health problems in Peru today. This uncontrolled discharge of untreated wastewater pollutes surface and underground water resources and coastal areas, causing a deterioration of ecosystems and causing numerous diseases. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) causes diarrhea and gastroenteritis in children and is present in polluted water bodies and wastewater. This research work aims to evaluate the behavior and bacterial resistance of *E. coli* EPEC against various antibiotics: amikacin, ampicillin, ceftazidime, chloramphenicol, amoxicillin- clavulanic acid, tetracycline, streptomycin and gentamicin. The results indicated that the data do not present a normal distribution, in addition to the fact that the antibiotic Amoxicillin/Ac. Clavulanic compared to the other antibiotics.

I. INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales son efluentes derivados de residuos domésticos o de procesos industriales, los cuales principalmente por razones de salud pública, no pueden ser vertidos sin un tratamiento adecuado.

El tratamiento de aguas residuales, para su apropiada disposición, constituye uno de los problemas de salud inherente a la actividad humana diaria. Ésta descarga incontrolada de aguas residuales sin tratamiento, contaminan los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras, generando un deterioro de los ecosistemas y causando numerosas enfermedades. Uno de los principales microorganismos patógenos que se encuentra en los cuerpos de agua contaminados y que sirve como indicadores de contaminación fecal es la bacteria *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Ante este problema, se evaluará la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) aislada de aguas residuales de diferentes distritos de Lima y Callao ante los antibióticos: amikacina, ampicilina, ceftazidima, cloranfenicol, amoxicilina con ácido clavulánico, tetraciclina, estreptomina y gentamicina.

Esto permitirá destacar la importancia sanitaria de la prevención sobre la distribución de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), ya que es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como alta prioridad por sus tasas de mortalidad y morbilidad significativas.

Por esta razón, el objetivo del presente trabajo de investigación consistirá en evaluar la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) presentes en aguas residuales de diversos distritos de Lima y en el Callao frente a diversos antibióticos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las aguas residuales están compuestas por aguas domésticas, urbanas y los residuos líquidos industriales eliminados, tal como lo menciona Tapia, J & Cedillo, L:

“Las fuentes de contaminación más importantes son las descargas industriales y municipales”. Asimismo, dichos efluentes son generados en diversas zonas de Lima y Callao y Estas descargas presentan contaminación química, física y biológica. Dentro de la contaminación biológica destaca la presencia de microorganismos, principalmente enterobacterias” (Tapia, J. & Cedillo, L. 2005, p. 151).

Por lo cual, la OEFA indicó lo siguiente:

“El Perú genera aproximadamente 2,217 946 m³ por día de aguas residuales descargadas a la red de alcantarillado de las EPS Saneamiento y el 32% de estas recibe tratamiento. Es decir, cada habitante en el Perú genera 142 litros de aguas residuales al día. Por otro lado, Lima genera aproximadamente 1 202 286 m³ por día de aguas residuales descargadas a la red de alcantarillado de las Empresas Prestadoras de Servicio (EPS) de Saneamiento y el 20,5% de estas recibe tratamiento; lo cual representa que cada habitante en Lima genera 145 litros de aguas residuales al día” (Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental “OEFA”, 2014, p.16).

Las personas y empresas disponen de aguas residuales diariamente, sin embargo, dicha disposición no es la adecuada, tal como lo señaló OEFA:

“La disposición de aguas residuales sin tratamiento alguno y las aguas residuales tratadas inadecuadamente contaminan los cuerpos de agua natural. A su vez, por infiltración en el subsuelo contaminan las aguas subterráneas, por lo que se convierten en focos infecciosos para la salud de las poblaciones, así como para la flora y fauna del lugar” (OEFA, 2014, p.5).

Las aguas residuales son direccionadas a las PTAR, donde reciben un tratamiento especial; sin embargo, algunas de estas no tienen la infraestructura adecuada y el tratamiento que

reciben es insuficiente para cumplir los estándares de calidad ambiental (ECA) establecidos por el estado peruano, por consiguiente, la OEFA mencionó:

“Hay sobrecarga de aguas residuales en las plantas de tratamiento cuya infraestructura es insuficiente, lo cual origina que los efluentes tratados excedan los límites máximos permisibles (LMP), y no se cumplan con los estándares de calidad ambiental (ECA). Esto genera problemas ambientales como la contaminación de los cuerpos de agua y la generación de malos olores que causan conflictos con la población”. (OEFA, 2014, p.5).

Así mismo, la mayoría de las plantas no cumplen con todos los niveles de tratamiento, principalmente la desinfección.

Por otro lado, la ingesta de aguas residuales no tratadas correctamente puede provocar serias consecuencias negativas en la salud, según SUNASS:

“La ingesta directa de agua por fuentes contaminadas o indirecta a través de alimentos de consumo crudo de tallo bajo regados por aguas residuales o de tallo alto sin tratar o insuficientemente tratadas, así como el contacto con campos regados con aguas residuales insuficientemente tratadas y sin tomar las debidas restricciones, representan un elevado riesgo de infección parasítica (giardiasis, amebiasis, teniasis, ascariasis), vírica (hepatitis, diarreas por rotavirus) y bacteriana (cólera, tifoidea, EDAS en general)” (Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento “SUNASS”, 2008, p.6).

Entre las bacterias presentes en las aguas residuales en su mayoría son de origen fecal, siendo *Escherichia coli* la bacteria de mayor abundancia, causante de un amplio espectro de enfermedades gastrointestinales como diarrea, infecciones urinarias, enfermedades respiratorias, infecciones sanguíneas, entre otras, e incluso hasta la muerte; como lo indicó Cuevas et. al:

“Se confirmó que *E. coli* O157:H7 ha provocado casos de gastroenteritis por el

consumo de lechugas, germinados de alfalfa, jugo de naranja, zanahorias y espinacas regadas con aguas residuales”. (Cuevas, O. et al., 2009, p.120).

En el caso de la acción resistente de esta bacteria frente a los antibióticos las consecuencias serían peores. Es por esto que la presencia de *Escherichia coli* en aguas residuales sin haber recibido un tratamiento tienen repercusiones negativas en salud pública.

La administración desmedida de antibióticos puede causar perjuicios en la sociedad, debido a que estos pueden ser vertidos a las aguas subterráneas, las cuales forman parte de las aguas residuales, tal como lo mencionó Chiriboga en el 2019:

“Cuando se suministra un antibiótico para uso médico o veterinario, éste solo se metaboliza parcialmente por lo tanto gran parte del antibiótico llegará a las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR) a través de las orinas y heces. Los antibióticos y los productos de su degradación serán vertidos posteriormente al medio ambiente a través de los efluentes de estas instalaciones.” (Chiriboga, I., 2019, p.2).

Además, otro problema está enfocado en el autoconsumo de antibióticos por parte de la población, donde al padecer de alguna infección no acuden al doctor, dirigiéndose a comprar medicinas sin receta médica.

El Perú cuenta con abundantes cuencas hidrográficas de las cuales no se realiza el tratamiento debido de las aguas residuales y por ello, según el MINAM:

“El agua superficial disponible en el Perú es relativamente abundante, considerando su desigual distribución espacial. Sin embargo, su calidad es crítica en algunas regiones hidrográficas. Las principales causas de esta deficiente calidad del agua son el insuficiente tratamiento de las aguas residuales domésticas y vertimientos de aguas residuales no tratadas” (Ministerio del Ambiente “MINAM”, 2015, p. 371).

Este es un problema grave, pues genera efectos negativos en el ambiente, contaminado y consumiendo nuestro principal recurso no renovable: el agua siendo la fauna y flora

perjudicadas por el vertimiento de aguas residuales, tal como lo indica SUNASS:

“Se presenta asfíxia en peces, incremento temporal de plancton, reducción de la producción de zooplancton y bentos, proliferación de parásitos en peces, reducción de la fecundidad y reproducción de peces, modificación de la cadena trófica, producción excesiva de algas y plantas acuáticas, bioacumulación de metales, etc. (SUNASS, 2008, p.75).

Además, dichos vertimientos de aguas residuales ocasionan también contaminación de los suelos, alterando su composición y causando pérdidas en la biodiversidad e interrupciones en las redes tróficas.

2.1. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las aguas residuales son aguas contaminadas con residuos industriales, domésticos y hospitalarios, según Nuñez *et al.*:

“Pueden definirse como los líquidos residuales domiciliarios provenientes de duchas, lavado de ropa, alimentos y vajilla. Por su origen, este tipo de agua transporta una significativa carga microbiana cuyas características dependerán de las actividades domésticas desarrolladas en la comunidad” (Nuñez, L. *et al.*, 2012, p. 237).

Además, este tipo de agua posee diversos microorganismos, entre ellos: hongos, bacterias y virus, tal como lo mencionó Nuñez *et al.*:

“La detección de microorganismos de contaminación fecal en aguas residuales indica una potencial presencia de enteropatógenos. (Nuñez, L. *et al.*, 2012, p. 237).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) contienen aguas residuales con diversas de sustancias químicas vertidas desde industrias, desechos domiciliarios constituidos por orina y excretas, las cuales pueden contener múltiples bacterias patógenas para el ser humano, según Pazda:

“Son probables puntos críticos para la diseminación de genes que confieren

resistencia a todas las clases de antibióticos, así como plásmidos, transposones y bacteriófagos. Parece que las PTAR con los procesos de tratamiento convencionales no son capaces de reducir significativamente dichos elementos genéticos de resistencia bacteriana a antibióticos.” (Pazda, M., 2019, p. 1).

Las bacterias resistentes a antibióticos son un problema global y en la actualidad se están investigando métodos alternativos para erradicarlos de los residuos de agua domiciliarios y hospitalarios, según lo indicó Nuñez *et al.*:

“La incidencia de bacterias resistentes a antibióticos en el medio acuático se ha incrementado como consecuencia de la utilización a gran escala de los antibióticos. La resistencia a los antibióticos se ha detectado en bacterias presentes en líquidos cloacales urbanos, en líquidos residuales hospitalarios, en barros cloacales, en aguas subterráneas, en ríos contaminados con descargas cloacales” (Nuñez, L. *et al.*, 2012, p. 236).

E. coli enteropatógena (EPEC) es una bacteria gran negativa que se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial y tiene como principal hábitat el tracto digestivo de mamíferos y seres humanos, por lo cual también se puede encontrar en los desechos líquidos tales como aguas residuales; tal como lo indicó Farfán, A. *et al.*:

“Es el agente causal de diarrea en niños bajo dos años, que causa frecuentemente brotes epidémicos en lugares cerrados como guarderías y hospitales. La enfermedad puede ser moderada a grave y se ha asociado a alta mortalidad (10-40%), principalmente en los países en vías de desarrollo. En el año 2010 se notificaron 121.455 muertes por este patotipo¹³. El período de incubación es de 3 a 24 h y el cuadro diarreico puede tornarse persistente y acompañarse de fiebre y vómito.” (Farfán, A. *et al.*, 2016, p. 438).

El análisis de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) que se realizará en el presente trabajo tendrá como objetivo dar a conocer el porcentaje de resistencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) de los distritos: Cercado de Lima, Chorrillos, San Juan de

Lurigancho, Cieneguilla, Chosica, Lurín y Ventanilla; y así poder determinar la prevalencia de la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en la población peruana. Asimismo, es necesario concientizar a la población con el fin de evitar la automedicación y generar resistencia a las bacterias. Esto hará que mejore la salud de las personas, evitará gastos innecesarios y favorecerá a la disminución de bacterias farmacoresistentes en las aguas residuales.

Luego de realizar una evaluación del comportamiento de colonias de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) frente a diversos antibióticos, se podrá obtener información relevante y proponer un tratamiento que impida que las aguas residuales con *E. coli* puedan ocasionar consecuencias negativas en la fauna y flora de los diversos ecosistemas ubicados en Lima y Callao, y según lo indicó SUNASS:

“Cuando las aguas residuales sin tratar son vertidas a los cuerpos de agua, el hábitat de la vida acuática y marina se verá afectada por la acumulación de sólidos, el oxígeno disminuirá por la descomposición aerobia de la materia orgánica, y los organismos acuáticos pueden perjudicarse aún más por la presencia de sustancias tóxicas, lo que puede extenderse hasta los organismos superiores por la bioacumulación en la cadena alimentaria” (SUNASS, 2008, p.6).

Por ello, al evaluar la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) ante diversos antibióticos, se obtendrá información importante para poner en conocimiento y alertar a la comunidad médica y a la población sobre los diferentes porcentajes de resistencia bacteriana. Además, dicha información servirá para mejorar la prescripción de antibióticos por parte del personal médico y disminuir la automedicación de los mismos por parte de la población, con el fin de lograr un control sanitario de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y como consecuencia, la población posea una mejor calidad de vida.

2.2. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) de aguas residuales de diferentes distritos de Lima, tales como Cercado de Lima, Chorrillos, San Juan de Lurigancho, Cieneguilla, Chosica, Lurín, Callao y Ventanilla durante el 2019.

Objetivos Específicos

- Cuantificar el número de bacterias de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) termotolerante mediante la técnica de Numero Más Probable (NMP) desarrollada en el Standar Methods (Vol. 23, 2017).
- Aislar e identificar *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) termotolerante de aguas residuales en medio selectivo y diferencial.
- Evaluar la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) termotolerante mediante prueba de susceptibilidad con los antibióticos: Amicacina (K), ampicilina (A), ceftazidima (CAZ), cloranfenicol (C), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), tetraciclina (TE), estreptomycin (EM) y gentamicina (GE).

2.3. MARCO TEÓRICO

Desde 1928, cuando Alexander Fleming descubrió la penicilina, empezó el desarrollo de los antibióticos a nivel mundial. Los antibióticos son sustancias empleadas en el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas, tal como lo menciona Morejón en el 2013:

“La aplicación de las penicilinas en el año 1940 se vio aparejada con el descubrimiento de la resistencia bacteriana, Edward P. Abraham y Ernest Chain, quienes habían participado junto con Howard Florey y Heatley en la purificación y aplicación de las penicilinas, observaron en ciertos cultivos de *Escherichia coli* la inactivación de las soluciones de penicilinas por una sustancia producida por dichas bacterias. Años después, Kirby identificaría que existían cepas de

Staphylococcus aureus que producían una sustancia capaz de inactivar las penicilinas, resultaron ser las penicilinasas. Más adelante, con el surgimiento de la ampicilina, en 1960, fue descrita una nueva enzima que cumplía la misma función, fue llamada betalactamasa, específicamente TEM-1.

Posteriormente, fue aislada una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de una betalactamasa capaz de inactivar tanto a las aminopenicilinas como a las incipientes cefalosporinas de primera generación, carboxipenicilinas y las ureidopenicilinas, le llamaron SHV-1.3 Las enzimas que inactivan penicilinas y cefalosporinas son llamadas betalactamasas, las mismas son capaces de romper el puente amida del anillo penicilánico o cefalosporánico y producir derivados ácidos sin propiedades bactericidas p, esto evita que dichos antibióticos puedan unirse a las proteínas transportadoras (PBP) y de esta forma impedir la formación de la pared bacteriana, por lo que no se logra la lisis bacteriana” (Morejón, M. 2013, p. 273).

Actualmente, la aparición de microorganismos resistentes a antibióticos ha ido en aumento a causa de un mayor número de casos de enfermedades entéricas y al uso de antibióticos que no son prescritos por los médicos, según lo indicado por Vinueza, A *et al.*:

“La resistencia antimicrobiana es definida como la capacidad de una bacteria para sobrevivir a concentraciones de antibiótico que destruirían a otras bacterias de su misma especie”. Además, la resistencia antimicrobiana “Es una propiedad inherente a todos los microorganismos y constituye uno de los aspectos sobre la cual se desarrolla la evolución bacteriana. Esta se encuentra determinada por cambios genotípicos generados por variaciones ambientales (exposición antibiótica), lo que genera adaptación al nuevo ambiente y asegura su posterior descendencia” (Vinueza, A. *et al.*, 2019, p.45).

Existen dos mecanismos distintos: las mutaciones, donde ocurren cambios en la secuencia de bases de los cromosomas, que son transmitidos por generaciones; y la

trasmisión de material genético extracromosómico de otras bacterias (como plásmidos, integrones y transposones). Es así como las bacterias adquieren la resistencia a uno o varios agentes sin necesidad de haber estado en contacto directo con el antibiótico.

Estas bacterias farmacoresistentes ponen en peligro a la salud por la incapacidad de tratar enfermedades infecciosas comunes (neumonía, tuberculosis, gonorrea, ETAs) donde los antibióticos han perdido eficacia, causando graves infecciones en humanos y animales, incluso ocasionando la muerte.

Los antibióticos son comercializados indiscriminadamente y producidos en demasía, según Vinueza, A. *et al.*:

Por ello, “Existe una clara relación entre la producción industrial de antibióticos y el posterior desarrollo de resistencia antibacteriana” y aproximadamente 63 000 toneladas de antibióticos son utilizadas en la industria animal como medida terapéutica y como inductor del crecimiento. El uso de antibióticos como inductores del crecimiento requiere el uso de dosis subterapéuticas, que a su vez promueven el establecimiento de un ambiente ideal para que emerjan cepas con alta resistencia antimicrobiana. El estudio realizado por Jakobsen *et al.*, demostró que los genes (blaTEM-52) responsables de la síntesis β lactamasas por parte de *E.coli* uropatógena pueden ser transmitidos desde aves de corral hacia humanos a través de plásmidos en condiciones *in vitro*.” (Vinueza, A. *et al.*, 2019, p.48).

Otro de los factores que determinan el crecimiento de la resistencia antimicrobiana es la errónea prescripción médica de antibioticoterapia, según Vinueza, A. *et al.*:

“Diversos estudios han demostrado que entre el 30% y 50% de las prescripciones médicas presentan errores en la elección del antibiótico dosis y tiempo de empleo. Lo que resulta de la errónea prescripción es la variación en la farmacocinética del antibiótico empleado. Se ha demostrado que niveles subinhibitorios de aminoglucósidos inducen una mayor formación de biofilm por parte de *E. coli* (la síntesis de biofilm es un factor de virulencia que contribuye a la resistencia antimicrobiana a través de un estado de infección crónica.” (Vinueza, A. *et al.*,

2019, p.48).

El costo económico y asistencial de la resistencia antimicrobiana es ominoso, según Vinueza, A. *et al.*:

“En Estados Unidos anualmente cerca de dos millones de personas desarrollan infecciones producidas por bacterias con alta resistencia antimicrobiana de las cuales fallecen 90 000. El costo de la resistencia antimicrobiana asumido por las finanzas norteamericanas en relación a la atención sanitaria y pérdida de productividad laboral se estima entre 20 y 35 billones de dólares, respectivamente. Es por ello que se deben implementar políticas de salud pública encaminadas a estudiar y controlar la resistencia antimicrobiana en nuestro medio.” (Vinueza, A. *et al.*, 2019, p.48).

Los coliformes son microorganismos comprendidos dentro de un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos, tal como lo indicó Ramos en el 2008:

“Los coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo los humanos. La presencia de bacterias coliformes es un indicio de que el agua puede estar contaminada con aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo.” (Ramos, L. *et al.*, 2008, p.88).

La familia enterobacteriaceae es un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más), según Carroll, K *et al.*:

“Algunos microorganismos entéricos como *Escherichia coli* son parte de la microbiota normal y en algunas ocasiones originan enfermedades, pero otros

como las salmonelas y las shigelas siempre son patógenos para los seres humanos. La familia Enterobacteriaceae son bacilos anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Las enterobacterias, los bacilos gramnegativos entéricos y las bacterias entéricas son términos que se utilizan en este capítulo, pero estas bacterias también se denominan coliformes” (Carroll, K. *et al.*, 2016, p. 500).

“La familia enterobacteriaceae tiene diversas características que la representa, tales como: bacterias gram negativas, la mayoría bacilos, otros cocobacilos y otros pleomórficos; son oxidasa negativo, reducir nitrato en nitrito, son anaeróbicos facultativos y son fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas.

“La familia enterobacteraceae contiene bacilos gramnegativos, ya sea móviles con flagelos peritricos o no móviles; se multiplican en medios con peptona o extracto de carne sin que se añada cloruro de sodio u otros complementos; se multiplican bien en agar de MacConkey; proliferan en medios aerobios y anaerobios (son anaerobios facultativos); fermentan en vez de oxidar glucosa, a menudo produciendo gas; son catalasa positiva, oxidasa negativa (excepto *Plesiomonas*) y reducen nitrato a nitrito; y tienen un contenido de DNA de G + C de 39 a 59%. Pueden diferenciarse a nivel de especie por un conjunto grande de pruebas bioquímicas” (Carroll, K. *et al.*, 2016, p.500).

Los principales organismos causales de la infección del tracto urinario (ITU) pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, y dentro de este grupo, *Escherichia coli* es el más frecuente, tanto en pacientes hospitalizados como de la comunidad, según Galván:

“En los últimos años se ha observado un aumento de las tasas de resistencia de estos uropatógenos frente a los antibióticos considerados de primera elección, jugando un papel importante la presión selectiva producida por el uso

indiscriminado de estos antimicrobianos. Además, el principal mecanismo de resistencia de las enterobacterias es la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), codificadas por los genes bla (TEM, SHV, CTX-M, entre otros), frecuentemente asociadas a plásmidos. Estos elementos extracromosómicos suelen ser portadores de genes que confieren resistencia a otros grupos de antibióticos, generando bacterias multirresistentes” (Galván, F. *et al.*, 2016, p. 23).

Las pruebas bioquímicas nos permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h, tal como lo indicó Fernández, A. *et al.* en el 2010:

“La prueba de la catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. El principal objetivo de esta prueba es separar Micrococaceae (positiva) de *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativa). Por otro lado, la prueba de ureasa determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoníaco por acción del enzima ureasa. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de *Proteus* y se usa sobre todo para diferenciar este género de otras enterobacterias que dan negativo o positivo retardado. La prueba también se utiliza para diferenciar *Physobacter phenylpyruvicus* de *Moraxella spp.*, *Helicobacter pylori* y *Brucella spp.* Además, la prueba de indol detecta la liberación de indol en un cultivo bacteriano, la cual se debe a la degradación del aminoácido triptófano mediante la enzima. Asimismo, “Mediante la prueba oxido-reducción se determina si la utilización de los hidratos de carbono por parte de un microorganismo se realiza por vía

oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno). También, la prueba de coagulasa permite determinar la capacidad de coagular el plasma por la acción de la enzima coagulasa. Se utiliza para diferenciar *Staphylococcus aureus* (coagulasa positivo) de otras especies de *Staphylococcus*. Por su lado, la prueba de fenilalanina – desaminasa determina la capacidad de un microorganismo para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpirúvico por la actividad enzimática de la fenilalanina desaminasa, con la consiguiente acidez resultante. Esta actividad enzimática es característica de todas las especies de los géneros *Proteus*, *Providencia* y *Morganella* por lo que se utiliza para separar estos tres géneros de otros géneros de enterobacterias. Además, la prueba de citrato sirve para determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacales como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Entre las enterobacterias estas características se dan en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter* y algunas especies de *Salmonella*. Sin embargo, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* son incapaces de crecer utilizando citrato como única fuente de carbono” (Fernández, A. et al., 2010, p. 8).

Escherichia es un género de bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, gram negativa, no formadora de esporas, anaerobia facultativa. En aquellas especies que forman parte de la flora intestinal de los animales de sangre caliente, *Escherichia* provee una porción de su producción de vitamina K para su huésped y algunas de estas especies son patógenas. Además, el género lleva este nombre en honor a Theodor Escherich, descubridor de *E. coli*.

Escherichia coli es una bacteria “Bacilo gram negativo, capaz de desarrollarse en presencia de sales biliares u otros agentes (tensoactivos) que tengan propiedades similares e inhibitorias del crecimiento, según lo indicado por Navarro en el 2007:

“Son capaces de fermentar la lactosa a temperaturas de 35°C +/- 2°C, con producción de ácido, gas y aldehído en un lapso de 18 a 48 horas. Oxidasa negativa, no esporógena y reduce el nitrato a nitrito. También es capaz de producir indol a partir de triptofano a una temperatura de 44°C +/-0.5 en un tiempo de 21+/- 3 horas. Poseen la enzima B-glucoronidasa, la cual es detectada por medios cromógenos o fluorógenos”. (Navarro, M., 2007, p.3).

Entre los indicadores de contaminación fecal más utilizados se encuentran los coliformes totales y termotolerantes, *Escherichia coli* y enterococos. Las bacterias indicadoras permiten realizar la clasificación sanitaria de las aguas para diferentes usos, la determinación de criterios para las normas de calidad, la identificación de contaminantes, el control de procesos de tratamiento de agua y estudios epidemiológicos.

“La presencia de *Escherichia coli* indica contaminación fecal en agua, ya que este microorganismo es habitante normal del tracto digestivo de animales de sangre caliente y rara vez se encuentra en agua o suelo que no haya sufridoalgúntipo de contaminación fecal, por ello se considera como indicador universal. Este microorganismo genera una alerta a cualquier sistema de suministro de agua ya que su presencia por si sola puede generar gastroenteritis y causar la muerte como el caso de la cepa *E coli* O157:H7 Enterohemorrágica o puede sugerir la presencia de otros microorganismos altamente patógenos como son la *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Listeria*, etc” (Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia, 2007, p.2).

Las bacterias, en este caso, las enterobacterias pueden provocar enfermedades a los diferentes órganos del cuerpo humano, tal como lo menciona Lluque, A. *et al.*:

E. coli “Puede causar una amplia gama de enfermedades que abarcan desde el tracto gastrointestinal a otros sitios extraintestinales tales como las vías urinarias, torrente sanguíneo, y el sistema nervioso central. Entre los patógenos intestinales

existen 6 categorías: *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de Adhesión Difusa (DAEC)” (Pérez, J., 2010, p. 9). “Estos patógenos son también prevalentes en nuestro medio, siendo responsables del 30% de casos de diarrea en niños menores de 1 año en zonas peri-urbanas de Lima, y están asociadas con altos niveles de resistencia a antibióticos” (Lluque, A. *et al.*, 2010, p. 122).

En el presente proyecto de investigación se aisló la bacteria *E. coli* Enteropatógena (EPEC), la cual tiene una distribución 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, según Vidal en el 2003:

“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.” (Benvenuto, 2017, p.18).

Asimismo, “Los síntomas de la enfermedad inducidos por EPEC suelen ser graves, la característica principal de la enfermedad es la diarrea acuosa que puede ocurrir en diversos grados de severidad. Adicional a la diarrea, muy a menudo pueden presentarse vómitos y fiebre en el cuadro clínico. El período de incubación de la infección varía entre las 3 a 24 horas después que el individuo ingiere un inóculo grande de bacterias (10^9 a 10^{10}) (Vidal, J., 2003, p. 188).

La *E. coli* Enteropatógena (EPEC) “Fue reconocida como una causa importante de muerte en brotes epidémicos en guarderías de países como Estados Unidos e Inglaterra a mediados del siglo pasado, desde 1998, se sabe que la infección tiene una tasa alta de morbilidad y mortalidad entre la población infantil de países en vías de desarrollo” (Vidal, J., 2003, p. 188).

Los microorganismos emplean diversos mecanismos para poder desarrollarse, multiplicarse y asegurar su sobrevivencia dentro del ser vivo infectado, según Vidal:

“EPEC utiliza una variedad de factores de virulencia para causar el daño mediante un mecanismo complejo. A nivel intestinal induce una alteración histopatológica conocida como la lesión A/E (adherencia y esfacelamiento) que se caracteriza por la degeneración de las microvellosidades del enterocito. La lesión se induce principalmente por la acumulación de la actina intracelular en la región apical de la célula, justo por debajo de la bacteria adherida, este desarreglo que sufre el citoesqueleto parece formar una estructura tipo pedestal. Es por ello que, esta estructura de tipo pedestal que se forma en el enterocito se produce principalmente debido a la polimerización y nucleación de los filamentos de actina y otras proteínas relacionadas a actina como a actinina, fimbrina, miosina, talina, ezrina, entre otras, justo por debajo de donde se encuentra la bacteria adherida a la célula, con lo que se forma una estructura de tipo pedestal en la membrana epitelial que se extiende hasta 10 nm de la región apical de la célula. Debido a que la bacteria produce este fenómeno a nivel intestinal, la EPEC se define como un virotipo diarreogénico de *E. coli* que causa la lesión A/E en células epiteliales in vitro e in vivo y que no secreta al medio extracelular la toxina Shiga como lo hacen otros virotipos” (Vidal, J., 2003, p. 189).

Para la identificación de EPEC se han utilizado diversos esquemas, entre los que se incluyen la serotipificación, el ensayo de adherencia en células HEp-2, la prueba de FAS y técnicas de biología molecular, según Vidal:

“La serotipificación permite diferenciar a los serotipos de EPEC involucrados históricamente en la diarrea mediante un kit comercial de serotipificación, con el cual se pueden identificar uno o más factores de patogenicidad asociados a EPEC. A pesar de la marcada correlación de la serotipificación con los factores de virulencia asociados a EPEC, la serotipificación no es una técnica ampliamente utilizada en nuestro medio debido a los costos y disponibilidad de los antisueros. Por otro lado, el ensayo fenotípico considerado como el estándar de oro para la identificación de EPEC es el ensayo de adherencia sobre células HEp-2, este

método permite identificar a la bacteria gracias a que se dispone en cúmulos sobre las células epiteliales en cultivo, esta forma de adherirse a la célula se conoce como patrón de adherencia localizada (LA). Con esta técnica también se pueden identificar a otras categorías diarreogénicas de *E. coli* como enteroagregativa (EAEC) y enteroadherente difusa (DAEC). Además, La prueba de FAS (tinción fluorescente para actina, por sus siglas en Inglés) es una técnica alternativa que ha sido ampliamente usada para la identificación de EPEC en estudios epidemiológicos e investigación básica. Mediante el ensayo de FAS se puede observar la acumulación de actina en zonas por debajo de las bacterias adheridas a la célula (rearrreglo del citoesqueleto) utilizando para ello un microscopio de fluorescencia. En la técnica se utiliza un compuesto fluorescente (faloidina rodaminada) el cual se une constitutivamente a la actina por lo que se puede observar el desarreglo del citoesqueleto de actina. La prueba se puede realizar directamente en biopsias intestinales de niños con enfermedad diarreica en donde se sospecha de infección por EPEC. Por otro lado, se puede reproducir in vitro la acumulación intracelular de actina utilizando a la cepa aislada y poniéndola en contacto con cultivos de células eucarióticas HEp-2 durante 4 horas en presencia de D-manosa, subsecuentemente las células se fijan y se tiñen mediante FAS". Asimismo, dentro de los estudios moleculares que se han diseñado para la identificación de EPEC se encuentran las sondas de ácidos nucleicos (secuencias específicas de DNA) que reconocen o capturan el DNA de EPEC en muestras clínicas, comúnmente se utilizan sondas sintetizadas a partir de la secuencia genética del plásmido de virulencia EAF (eaf), del pili BFP (bfpA) o del gen de la intimina (eae) que se encuentra a nivel genómico.²⁴ También se cuenta con una serie de iniciadores reportados en la literatura que permiten amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) secuencias específicas de genes que se han localizado típicamente en las cepas de EPEC como lo son los genes de la intimina (eae), plásmido EAF (eaf) y el pili BFP (bfpA)" (Vidal, J., 2003, p. 191).

Los mecanismos de resistencia antimicrobiana comprenden la síntesis de proteínas o enzimas que actúan sobre diversos componentes celulares del organismo huésped, según Vinueza:

“Los mecanismos de resistencia antimicrobiana de *E. coli* consisten en inactivación enzimática, modificación de la diana terapéutica y alteración de la permeabilidad bacteriana al antibiótico empleado” (Vinueza, A. *et al.*, 2019, p.45).

El mecanismo de resistencia antimicrobiana de *E. coli* más conocido es la síntesis de las enzimas β -lactamasas, según lo indicó Morejón en el 2013:

“Las enzimas β -lactamasas son capaces de inactivar los antibióticos de la familia betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, y carbapenémicos). Asimismo, con el surgimiento y uso repetitivo de nuevos betalactámicos, penicilinas semisintéticas y cefalosporinas fueron apareciendo nuevas variantes de betalactamasas, hasta que en 1983 se describen por primera vez las llamadas betalactamasas de espectro extendido capaces de inactivar las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima) y el aztreonam” (Morejón, M., 2013, p. 272).

De esta manera, las β -lactamasas rompen el anillo betalactámico presente en la estructura molecular de todos los antibióticos, desactivando las propiedades antimicrobianas de la molécula.

Es posible determinar la resistencia antimicrobiana mediante la ejecución de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, que indican cuán vulnerable es una especie bacteriana a un determinado antibiótico, según lo indicado por Vinueza, A. *et al.*:

“Son diversos los métodos empleados para la determinación de la resistencia antimicrobiana (PCR, inmunotomatografía, microarrays) pero el método más ampliamente utilizado es el antibiograma disco – placa (técnica de Kirby & Bauer).” (Vinueza, A. *et al.*, 2019, p.45).

Asimismo, según información oficial de la ONU, el 80% de las aguas residuales mundiales no se descontaminan antes de su reúso o vertimiento, ocasionado contaminaciones en el ecosistema, enfermedades y muertes. Las Plantas de Tratamiento de Aguas (PTAR) se encargan de transformar las aguas residuales en aguas aptas para su reúso (riego, industrial, consumo humano) o ser devueltas a los cuerpos de agua. Éstas eliminan los sólidos, desde plásticos, trapos y vísceras hasta arena y partículas más pequeñas que se encuentran en las aguas residuales, reducen la materia orgánica y los contaminantes y restauran el oxígeno. El proceso de tratamiento asegura que el agua puesta de nuevo en nuestros ríos o lagos tiene suficiente oxígeno para soportar la vida, según SUNASS:

“El 82% de las PTAR en funcionamiento o en transferencia a las Empresas Prestadoras de Servicios (EPS) se encuentran en la costa” (SUNASS, 2015, p. 41).

Sin embargo, hay sobrecarga de aguas residuales en las plantas de tratamiento cuya infraestructura es insuficiente, lo cual origina que los efluentes tratados excedan los límites máximos permisibles (LMP), y no se cumplan con los estándares de calidad ambiental (ECA), según lo indicado por OEFA:

“Esto genera problemas ambientales como la contaminación de los cuerpos de agua y la generación de malos olores que causan conflictos con la población” (OEFA, 2014, p.5).

Por ende, el estado peruano debería invertir en mejorar la infraestructura y las metodologías de limpieza de las aguas residuales de todo el país; además, se deben cumplir con los índices de calidad señalados en la normativa (Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM).

En Europa se demostró que existe una correlación entre las bacterias resistentes presentes en la población y las bacterias que llegan de los desagües domésticos. Se han hallado bacterias resistentes a los antibióticos luego de la purificación del agua residual.

Un posible causante de este problema serían las plantas de tratamiento antiguas o un proceso de purificación donde las bacterias tengan mayor contacto entre ellas, según lo indicado por Parnanen, *et al.* en el 2019:

“Es necesario que toda PTAR cumpla con los procedimientos de remoción de antibióticos incluyendo los pasos de adsorción, biodegradación, desinfección y separación de membrana. Además, es importante considerar realizar el tratamiento de forma anual, no solo de manera estacional” (Parnanen, K. *et al.* 2019, p.1).

El control de los vertimientos autorizados está a cargo de la Autoridad Nacional del Agua (ANA), que es la responsable de la caracterización del cuerpo receptor, información necesaria para evaluar si la tecnología de la PTAR permite el cumplimiento de los ECA Agua. Además “Actualmente en el Perú el “70% de las aguas residuales domesticas e industriales son vertidas sin previo tratamiento” (Agencia Peruana de Noticias “Andina”, 2010, p.1).

2.4. ANTECEDENTES

Fernández, F.; López, J.; Ponce, L. & Machado, C. (2003). *Resistencia bacteriana.*

Realizaron una revisión sobre la resistencia bacteriana, afirmando que la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y ha surgido el problema de la resistencia a estos por la aparición en las bacterias, virus, hongos y protozoarios de mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción destructiva de estas sustancias. Por consiguiente, las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de ellos es mediante un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos y el segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada.

Vidal, J. (2003). *Escherichia coli Enteropatógena (EPEC): Una Causa Frecuente de*

Diarrea Infantil. En este artículo de revisión se exponen que *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) es una bacteria que infecta principalmente a niños menores de dos años provocando diarreas de diversos grados. Asimismo, se explica el mecanismo de infección de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), el cual consiste en que a nivel intestinal induce una alteración histopatológica conocida como la lesión A/E (adherencia y esfacelamiento) que se caracteriza por la degeneración de las microvellosidades del enterocito. La lesión se induce principalmente por la acumulación de la actina intracelular en la región apical de la célula, justo por debajo de la bacteria adherida, este desarreglo que sufre el citoesqueleto parece formar una estructura tipo pedestal que se extiende hasta 10 mm de la región apical de la célula.

Organización Panamericana de la Salud. (2003). *Reunión anual regional de los países participantes en la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos.* Este documento comprende de la información sobre bacterias resistentes a antibióticos presentes en los países de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Guatemala, México, Nicaragua, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela. Asimismo, menciona que en el Perú, las especies evaluadas fueron *Vibro cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pneumoniae* y se analizó el tamaño del halo del antibiograma para determinar el porcentaje de resistencia a antibióticos. Obteniendo que *E.coli* tuvo 83% de resistencia a la ampicilina, 66% de resistencia a la cefalocina, 64% de resistencia a la ciprofloxacina, 15% de resistencia a la amikacina, 71% de resistencia a la trimetoprim- sulfametozaxol, 40% de resistencia a la gentamicina, 42% de resistencia al cefaclor, 10% de resistencia a la piperacilina /tazobactam y no se obtuvo datos significativos de la resistencia a imipenem.

Rivera, J. & Cedillo, L. (2005). *Evaluación de la resistencia a antibióticos en enterobacterias aisladas de aguas contaminadas.* Buscaron evaluar la resistencia

de enterobacterias aisladas de aguas de ríos contaminados en Puebla, México. El 44% de bacterias aisladas fueron *Escherichiacoli*, el 17% *Klebsiella sp.*, el 13% *Serratia sp.* y *Enterobacter sp.* con 10%. En conclusión, *Escherichia coli* presentó mayor resistencia frente a carbenicilina y en similares concentraciones frente a ampicilina, cefotaxima, trimetropim y cloranfenicol.

Navarro, M. (2007). *Determinación de Escherichia coli y Coliformes Totales en Agua por el Método de Filtración por Membrana en Agar Chromocult.* Menciona las definiciones de coliformes totales y *E. coli*, refiriéndose a los primeros como bacterias gram negativas, no esporoformadoras, oxidasa negativa, con capacidad de crecimiento aeróbico y facultativamente anaeróbico en presencia de sales biliares, que a temperatura especificada de 35°C +/- 2°C causan fermentación de lactosa con producción de gas y poseen la enzima B-galactosidasa; y a *E. coli* como bacilo gram negativo, capaz de desarrollarse en presencia de sales biliares u otros agentes (tensoactivos) que tengan propiedades similares e inhibitorias del crecimiento y que son capaces de fermentar la lactosa a temperaturas de 35°C +/- 2°C, con producción de ácido, gas y aldehído en un lapso de 18 a 48 horas, oxidasa negativa, no esporógena, reduce el nitrato a nitrito, capaz de producir indol a partir de triptofano a una temperatura de 44°C +/- 05 en un tiempo de 21 +/- 3 horas y poseen la enzima B-glucoronidasa, la cual es detectada por medios cromógenos o fluorógenos.

Martínez, R. & Villalobos, L. (2008) *Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de Escherichia coli aisladas de alimentos y aguas residuales en Cumaná, Venezuela.* Buscaron determinar la susceptibilidad a antimicrobianos de importancia clínica aislados de aguas servidas. Se realizó la identificación de las cepas *Escherichia coli* pruebas bioquímicas y empleando galerías API ID 32, donde se realizó ensayo de susceptibilidad mediante la técnica estandarizada por Bauer *et al* (1966) con los antibióticos: cloranfenicol (30ug), ampicilina (10ug), cefotaxima (30ug), ceftazidima (30ug), tobramicina (10ug), piperaciclina (100ug),

gentamicina (10ug), tobramicina (10ug), ácido nalidixico (30ug), levofloxacin (5ug), ciprofloxacina (5ug), trimetropim-sulfametoxazol (23.75ug+25ug), y tetraciclina (30ug). Los resultados fueron interpretados según la normativa NCCLS (2005). El 100% de cepas de *Escherichia coli* aisladas de alimentos y el 80% de cepas aisladas de aguas presentaron resistencia a los antibióticos trabajados. Se observó la más alta resistencia frente a ampicilina.

Ramos, L.; Vidal, L.; Vilardy, S. & Saavedra, L. (2008). *Análisis de la Contaminación Microbiológica (Coliformes Totales y Fecales) en la Bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano.* En su proyecto de investigación, recolectaron muestras de agua para medir las concentraciones de coliformes totales y fecales de 11 estaciones y dos niveles de profundidad (1y 20 m). Para la época de mayores precipitaciones se encontraron altos valores de coliformes totales y fecales, en los dos niveles de profundidad; presentándose una condición similar para la época seca. Ellos atribuyen estas altas concentraciones de coliformes totales y fecales en las muestras de agua de mar de la bahía de Santa Marta, ya que esta se ubica próxima a las zonas urbanas, trayendo consigo procesos de descarga de aguas residuales y desechos de origen doméstico.

Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS). (2008). *Diagnóstico Situacional de los Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales en las EPS del Perú y Propuestas de Solución.* Este documento proporciona información acerca de las Plantas de Tratamientos de Aguas (PTARs) asociadas a las Empresas Prestadoras de Servicios (EPS). Menciona datos importantes como que durante el 2007 los sistemas de alcantarillado recolectaron aproximadamente 747,3 millones de metros cúbicos de aguas residuales, producto de las descargas de los usuarios conectados al servicio. De ese volumen, sólo 29,1% ingresaron a un sistema de tratamiento de aguas residuales, muchos de los cuales con deficiencias operativas y de mantenimiento, y el resto se descargó directamente a un cuerpo de agua (mar, ríos o lagos), se infiltró en el suelo o se usó clandestinamente para fines

agrícolas.

López, O.; León, J.; Jiménez, M. & Chaidez, C. (2009). *Detección y resistencia a antibióticos de Escherichia coli y Salmonella sp. en agua y suelo agrícola.* Buscaron cuantificarla presencia de *Escherichia coli* provenientes de aguas y suelos en cuatro regiones del Valle Culiacán Sinaloa, México. Además, determinaron el perfil de resistencia frente a tetraciclina, estreptomicina y gentamicina. De las muestras de aguas el 98% estaban contaminadas con *Escherichia coli* y de las 46 cepas analizadas 29.9% fueron resistentes a tetraciclina, 6.2% fueron resistentes a estreptomicina y un 3.1% fue resistente a gentamicina.

Decreto Supremo N° 003 – 2010 – MINAM. (2010). *Aprueba Límites Máximos Permisibles para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales.* Este decreto define a los límites máximos permisibles (LMP) e impone los valores de los mismos para las aguas tratadas por las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR). Por un lado, los LMP son las medidas de la concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, que caracterizan a una emisión, que al ser excedida causa o puede causar daños a la salud, al bienestar humano y al ambiente. Asimismo, su cumplimiento es exigible legalmente por el MINAM y los organismos que conforman el Sistema de Gestión Ambiental. Por otro lado, los LMP para los efluentes de las PTAR son 20 mg/L para el parámetro aceites y grasas, 10.000 NMP/100 mL para el parámetro coliformes termotolerantes, 100 mg/L para el parámetro demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), 200mg/L para el parámetro demanda química de oxígeno (DQO), 6.5 a 8.5 para el pH, 150 mL/L para el parámetro sólidos totales en suspensión y temperaturas menores o iguales a 35 °C para el parámetro temperatura.

Fernández, A. et al. (2010). *Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología.* Este documento menciona los principales métodos de identificación bacteriana, haciendo énfasis en las pruebas bioquímicas que

permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas; por otro lado, otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h. Además, se mencionan las definiciones de las principales pruebas bioquímicas para la detección de enterobacterias las cuales son: prueba de catalasa, ureasa, indol, oxido – fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, coagulasa, citrato, etc.

Lluque, A. et al. (2010). *Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para Escherichia Coli Enteropatógena (EPEC).* Este estudio menciona que en la actualidad existen seis categorías de *E. coli* asociadas a diarreas, las cuales han sido clasificadas en base a sus características clínicas, epidemiológicas y por la presencia de proteínas y genes específicos de virulencia; los cuales son: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), productora de Shiga toxina (STEC), enteroagregativa (EAEC), enteropatógena (EPEC) y de adherencia difusa (DAEC). Siendo la *E. coli* enteropatógena (EPEC) responsable del 30% de casos de diarrea en niños menores de 1 año de edad en zonas peri-urbanas de Lima, las cuales están asociadas con altos niveles de resistencia a antibióticos. Asimismo, se describen las diversas metodologías empleadas para el diagnóstico de *E. coli* enteropatógena (EPEC) las cuales incluyen: serotipificación, ensayo de adherencia con células HEp-2, prueba de FAS (tinción fluorescente para actina) y técnicas de biología molecular para amplificar el gen de intimina (*eaeA*), el cual está presente en *E. coli* enteropatógena (EPEC).

Núñez, L. et al. (2012). *Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario.* En este trabajo buscaron evaluar la prevalencia de bacterias resistentes y el perfil de resistencia a antibióticos pertenecientes a aguas grises de canales localizados en Ingeniero Budge, provincia de Buenos Aires. Se

utilizó la técnica de difusión en Agar Muller-Hinton con los siguientes antibióticos: imipenem, meropenem, gentamicina, ampicilina, ciprofloxacina, trimetropina-sulfametoxazol, ampicilina-sulbactam, cefalotina, cefepima, ceftazidima, cefotaxima, piperaciclina-tazobactam. En todas las muestras se detectaron coliformes resistentes a cefalotina y ceftazidima; el 90% de coliformes fueron resistentes a ampicilina y ceftriaxona. Los aislamientos de coliformes resistentes fueron identificados como *Escherichia coli* los cuales presentaron multiresistencia.

Morejón, M. (2013). *Betalactamasas de Espectro Extendido*. Señala que la producción de betalactamasas es uno de los principales mecanismos de resistencia bacteriana. Así, las betalactamasas son enzimas capaces de inactivar los antibióticos de la familia betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos) y las betalactamasas de espectro extendido pueden ser producidas por cualquiera de las enterobacterias, incluido *E. coli*. Además, el desarrollo de las betalactamasas ha provocado la creación de distintas clasificaciones, desde la de Sawai en 1968, pasando por la conocida de Richmond y Sykes, en 1973, hasta la más moderna: la creada por Ambler, en 1980, basada en la estructura molecular y la secuencia de aminoácidos de las betalactamasas. Esta reconoce 4 tipos moleculares denominados; A, B, C y D. Los tipos A, C, D poseen serina (serinoenzimas) en su zona activa, las del grupo B poseen una o más moléculas de zinc (metaloenzimas). Sin embargo, la clasificación más utilizada en la actualidad es la desarrollada por Bush, Medeiros y Jacoby, en 1995, basada en los sustratos que las enzimas hidrolizan y en la inhibición de su actividad por el ácido clavulánico, EDTA, aztreonam u oxacilina.

Bianchi, V. et al. (2014). *Evaluación de Escherichia coli Resistente a Antibióticos como Especie Bioindicadora de Contaminación Fecal en Agua y Peces en la Cuenca Inferior del Río San Juan*. En este trabajo de investigación se analizó la presencia de *E. coli* en el agua recolectada de cuatro puntos del río San Juan en

Argentina, presencia de *E. coli* en los músculos e intestinos de los peces *Astyanax sp.*, capturados en dichos sitios, a fin de determinar si actúan como reservorios de *E. coli* y si las cepas de *E. coli* aisladas del agua y de los tejidos de los peces poseen resistencia a distintos antibióticos usados en medicina y veterinaria. Así, se detectó un aumento de la densidad de *E. coli* en las muestras de agua con un incremento significativo en el mes de Abril, se lograron aislar cepas de *E. coli* del intestino de los peces capturados en Pinar en el mes de Abril. Además, se aislaron poblaciones de *E. coli* resistente a antibióticos, obteniéndose mayor resistencia a la ampicilina, seguido por colistina, amicacina/ cefalotina, nitrofurantoina/ácido nalidixico, y menor resistencia a la gentamicina/cloranfenicol. Por consiguiente, la presencia de *E. coli* resistente a antibióticos, tanto en agua como en peces, indicaría el deterioro de la cuenca inferior del Rio San Juan por acción de la contaminación fecal.

Muñoz, A.; Pucci, O. & Pucci, G. (2014). *Cepas bacterianas resistentes a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, clindamicina, gentamicina, imipenem, meropenem y vancomicina, aisladas de agua de mar en la ciudad de Comodoro Rivadavia (Argentina).* Este trabajo tuvo como objetivo buscar bacterias resistentes a antibióticos: ampicilina, cefotaxima, ceftazidima, clindamicina, gentamicina, imipenem, y vancomicina, en el vertido de líquido cloacal en la playa de Km. 8 de Comodoro Rivadavia. Se obtuvieron cuatro cepas de *Enterococcus faecalis*, cuatro cepas de *Proteus mirabilis* y dos cepas de *Streptococcus mitis*, siendo resistentes a ampicilina 70ug/ml, imipenem 40 ug/ml y meropenem 40 ug/ml.

Millán, Y.; Hernández, E. Millán, B. & Araque, M. (2014). *Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de Escherichia coli uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Venezuela.* En este estudio se determinó el perfil de distribución de grupos filogenéticos y la detección genética de factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena (ECUP) productoras de β -lactamasa CTX-M-15. Por lo cual, fueron aisladas veintiocho cepas de pacientes con infección del tracto

urinario (ITU) que asistieron al Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, Venezuela, durante enero del 2009 y Julio del 2011. La determinación de los grupos filogenéticos y la detección de seis genes de virulencia (fimH, fyuA, kpsMTII, usp, PAI y papAH) se realizó mediante amplificación por PCR. Por consiguiente, se identificaron quince cepas de 28 que se ubicaron principalmente en el filogrupo A, seguidos por el B2 (12/28) y D (1/28). Sin embargo, no se observó una relación directa entre la recurrencia o gravedad de la ITU y la distribución de los filogrupos. Todos los factores de virulencia estudiados se encontraron con la frecuencia más alta en el grupo B2. El perfil de virulencia prevalente estuvo conformado por la asociación de tres genes principales: fi mH, fyuA y kpsMTII y en menor frecuencia, por la presencia de otros determinantes como usp, PAI y/o papAH.

Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental “OEFA”. (2014). *Fiscalización*

Ambiental en Aguas Residuales. Este documento expone las nociones básicas referidas a las aguas residuales, aborda sus diferentes clasificaciones y menciona a las entidades públicas involucradas en su adecuado manejo y fiscalización ambiental. Además, incluye cifras importantes sobre la generación y el manejo de las aguas residuales en el país, tales como que el Perú genera aproximadamente 2 217 946 m³ por día de aguas residuales descargadas y sólo el 32% de estas recibe tratamiento. Además, se plantean los principales problemas asociados a éstas, como que las aguas residuales sin tratamiento alguno y las aguas residuales tratadas inadecuadamente contaminan los cuerpos de agua natural y se convierten en focos infecciosos para la salud de las poblaciones, así como para la flora y fauna del lugar.

Bolaños, D. & Mora, L. (2015). *Evaluación de la resistencia a Ceftriaxona, Amikacina*

y Oxacilina en Escherichia coli presente en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E. en Bogotá. Realizaron una evaluación de la presencia de resistencia bacteriana en el agua residual del Hospital de Suba aplicando dos métodos diferentes: el método de difusión de Kirby-Bauer y el método de dilución en dos muestras de agua residual antes de la PTAR y después

de la PTAR utilizando tres antibióticos diferentes: amikacina, ceftriaxona y oxacilina. Se observó que la *Escherichia coli* presentó resistencia múltiple a los antibióticos estudiados, sin embargo, la amikacina tubo menor concentración mínima inhibitoria antes y después del proceso.

Rocha, C.; Reynolds, N. & Simons, M. (2015). *Resistencia Emergente a los Antibióticos: una Amenaza Global y un Problema Crítico en el Cuidado de la Salud.* Este estudio indica que después del desarrollo y la comercialización en masa de los antibióticos, las bacterias patógenas y ambientales han desarrollado resistencia a los antibióticos desde el siglo pasado, de modo que la infección causada por organismos resistentes a los antibióticos (ORAs) podría ser considerada como una infección emergente. Debido a ello, su control debe ser priorizado, ya que constituye una amenaza para todas las naciones, sin reparar en su territorio y situación económica.

Carroll, K. et al. (2016). *Medical Microbiology.* Este libro contiene información detallada sobre los microorganismos: clasificación, características de los diversos grupos, medios de cultivo, crecimiento y metabolismo y genética. Asimismo, aborda temas como inmunología, virología, micología y parasitología. Además, contiene casos clínicos y diagnósticos microbiológicos. Este libro menciona que los microorganismos tienen un enorme impacto en la vida y en la composición físicoquímica de nuestro planeta, por consiguiente, los microorganismos se encargan de llevar a cabo ciclos de elementos químicos indispensables para la vida, tales como los ciclos del carbono, nitrógeno, azufre, hidrógeno y oxígeno. Así, los océanos contienen 100 millones más bacterias que las estrellas que contiene el universo conocido, a frecuencia de infecciones virales en los océanos es de aproximadamente 1×10^{23} infecciones por segundo, se calcula que en la tierra existen 5×10^{30} células microbianas y éstas constituyen el 90% de la biomasa de toda la biosfera. Los seres humanos también tienen una relación cercana con los microorganismos; más del 90% de las células de nuestros cuerpos corresponde a

microbios. Las bacterias del intestino del ser humano promedio pesan alrededor de 1 kg y un adulto excretará su propio peso en bacterias fecales cada año.

Galván, F.; et al. (2016). *Caracterización Fenotípica y Molecular de Escherichia coli Productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido en Pacientes Ambulatorios de Lima, Perú.* Evaluaron 53 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infección de tracto uterino, las cuales por dos métodos fenotípicos: Jarlier y CLSI, el perfil de susceptibilidad se realizó mediante disco difusión y la caracterización genotípica mediante PCR para los genes blaCTX- M, blaTEM y blaSHV. Por consiguiente, los resultados demostraron que sólo el 16,30% del total de aislados de *E. coli* son productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), enzimas que degradan el anillo betalactámico presente en todos los antibióticos, siendo estas enzimas responsables de la resistencia a antibióticos de las bacterias. Asimismo, se evidenció resistencia al 100% a ampicilina, cefalotina y ceftriaxona, al 87% a evofloxacina, al 92% a norfloxacino, al 94% a ciprofloxacino y ácido nalidíxico al 96% a cefuroxima, al 70% a trimetoprim-sulfametoxazol, al 75% a aztreonam y al 85% a tobramicina.

Coila, G. (2017). *Resistencia a Antibióticos y a Metales Pesados en Bacterias Coliformes Aisladas de la Laguna de Oxidación Espinar de la Ciudad de Puno.* En su tesis para obtener el título profesional, evaluó la resistencia a los antibióticos cefalexina (30 μ g), cloranfenicol (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), cefotaxima (30 μ g) y eritromicina (10 μ g) y metales pesados como el Pb, Cd y Hg de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* y *Citrobacter sp* aisladas a partir de muestras de agua de cuatro zonas de la laguna de oxidación Espinar. Se aislaron las enterobacterias en placas de agar EMB, hasta llegar a cultivo puro previa identificación bioquímica mediante las pruebas de TSI, LIA, Citrato e Indol, posteriormente se evaluó en cada bacteria la respuesta antimicrobiana mediante el método de Kirby Bauer y para la evaluación de la resistencia a los metales pesados (Pb, Hg y Cd), se realizó mediante la adición de las concentraciones de 1, 10, 30 y

50 mg/L de cada metal en agar APC. Los análisis estadísticos aplicados fueron el análisis de varianza y de Tukey y los resultados fueron que *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp*, presentaron sensibilidad a los antibióticos ceftriaxona, cefalexina y cefotaxima, respectivamente; *E. coli* y *Enterobacter sp* fueron sensibles a cloranfenicol, mientras que *Klebsiella sp* presentó resistencia intermedia, las tres bacterias presentaron respuesta intermedia a eritromicina, sin y todas las bacterias aisladas, presentaron resistencia a los metales pesados en todas las concentraciones experimentadas.

Decreto Supremo N° 004 – 2017 – MINAM. (2017). *Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen Disposiciones Complementarias.* Este decreto clasifica los tipos de agua en cuatro categorías: Poblacional y recreacional, Extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales; riego de vegetales y bebida de animales y conservación del ambiente acuático. Además, indica los ECAS (Estándares de Calidad Ambiental) de variables fisicoquímica, orgánicas, inorgánicas y biológicas para la evaluación de muestras de agua y poder así determinar si las muestras de agua cumplen los ECAS y son aptas para consumo humano, riego de vegetales, actividades recreacionales, etc.

El Comercio. (2017) *¿Existen sistemas para tratar aguas residuales en el Perú?* En este artículo periodístico señala que aproximadamente solo el 15% de aguas residuales es tratada y el resto revierte a nuestros ríos, lagos y al mar; y según la Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS), en el Perú la cobertura de aguas residuales todavía es muy limitada y el tratamiento de aguas servidas de las EPS grandes (de 40 mil hasta 1 millón de conexiones) llega al 58%, mientras que en las EPS medianas (desde 15 mil hasta 40 mil conexiones) y pequeñas (hasta 15 mil conexiones) tan solo es de 36% y 10%, respectivamente. A nivel nacional, las PTAR tienen una capacidad de 29,6 metros cúbicos por segundo (m^3/s), entre las cuales destacan Taboada y La Chira. Siendo, la PTAR de Taboada, la que se encarga del tratamiento de agua de 27 distritos de Lima y Callao, y esta

posee una capacidad de procesamiento de 19 m³/s. Además, menciona que existirían, además, 9 PTARs que no se encuentran en funcionamiento debido a la oposición de los vecinos, el colapso del afluyente, procesos legales, etc.

Benvenuto Vargas, V. (2017). *Determinación de Escherichia coli enteropatógena (ECEP) en agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde.* Tuvo como objetivo determinar la presencia de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en el Circuito de Playas de la costa Verde en Lima Metropolitana. Se aislaron las muestras usando Agar Mac Conkey, EMB y TBX para luego realizar pruebas bioquímicas y determinación serológica. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por la técnica de difusión en agar Mueller-Hinton, colocando ocho discos con los siguientes antibióticos: amicacina, ampicilina, ceftazidima, norfloxacino, amoxicilina-ácido clavulánico, cefuroxima, cotrimoxazol y ciprofloxacino. Las cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas identificadas presentaron mayor susceptibilidad antimicrobiana a los antibióticos amicacina y ceftazidima y menor susceptibilidad a ampicilina.

Sánchez, M. (2017). *Las aguas residuales en Perú. Realidad al 2017.* En este artículo periodístico señala que según información oficial de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), el 80 % de las aguas residuales mundiales no se descontaminan antes de su vertimiento o rehúso, lo que ocasiona, no sólo la contaminación de la flora y fauna, sino, enfermedades y muertes prematuras que cuestan anualmente varios cientos de miles de millones al PBI del planeta. Asimismo, menciona que a lo largo del país existen varias plantas de tratamiento de agua residual que no funcionan de forma correcta, que han sido sobre dimensionadas y que no son eficientes y que cuentan con una tecnología no recomendada para el clima en el que han sido instaladas; que son módulos importados que no necesariamente tienen que funcionar en la realidad peruana;

Collacci, A. (2018). *La situación de las aguas residuales en Lima.* El artículo del portal web de la Pontificia Universidad Católica del Perú señala que las aguas residuales

que provienen de los procesos productivos, como la minería, la agroindustria, la energética, reciben el nombre de “aguas residuales industriales” y que estos terminarán en cuerpos receptores (ríos, lagos, quebradas secas o el mar). Además, sostiene que el déficit de tratamiento de aguas residuales se debe a que la infraestructura de las PTAR es insuficiente para los volúmenes diarios generados. Lo que causa la contaminación de los cuerpos de agua natural, ya sean superficiales o subterráneos, además de la formación de focos infecciosos y generación de malos olores.

Mejía, C. (2018). *El nuevo régimen de vertimiento de aguas residuales tratadas en el Perú.* En este artículo periodístico del SERVINDI (Comunicación Intercultural para un Mundo Más Humano y Diverso) se señala que en el año 2010 el 70% de aguas residuales industriales y domésticas se vertieron a los cursos de agua sin tratamiento(2), dos años después la Autoridad Nacional del Agua (ANA) indicó que más del 50% de los recursos hídricos superficiales evaluados registraban un alto grado de contaminación poniendo en grave riesgo su uso, debido a la afectación de la calidad del agua por vertimiento de aguas residuales municipales, agrícolas, industriales, mineros (informales), de pasivos ambientales, la erosión de suelos y la contaminación. Asimismo, menciona que resulta importante contar con una adecuada legislación, que regule el vertimiento de agua residual debido a su intrínseca relación con la calidad del agua.

Organización Mundial de la Salud “OMS”. (2018). *Resistencia a los antibióticos.* El portal web de la Organización Mundial de la Salud “OMS” indica que la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos, se está observando un creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia, la gonorrea o las enfermedades de transmisión alimentaria, y esos son cada vez más difíciles —y a veces imposibles— de tratar, a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia, debido a que allí donde los antibióticos se pueden adquirir sin receta médica para uso humano o veterinario, la aparición y

propagación de la farmacorresistencia empeora. Por ello, las medidas que la OMS propone ante esta problemática son: Tomar antibióticos únicamente cuando los prescriba un profesional sanitario certificado, no solicitar antibióticos si los profesionales sanitarios dicen que no son necesarios, seguir siempre las instrucciones de los profesionales sanitarios con respecto al uso de los antibióticos y no utilizar los antibióticos que le hayan sobrado a otros.

Villena, J. (2018). *Calidad del Agua y Desarrollo Sostenible*. Menciona que la calidad del agua es un valor ecológico esencial para la salud y para el crecimiento económico y que la relación de la calidad de agua con la salud, es evidente y es una prioridad sanitaria desde siempre. Además, menciona que en la Conferencia Internacional sobre el Agua y el Medio Ambiente (CIAMA), la Declaración de Dublín de 1992, estableció los principios para atender la relación agua y desarrollo sostenible. Con esta declaración se inicia a nivel mundial una nueva visión, de la relación del agua con el desarrollo sostenible, los cuatro principios son plenamente vigentes en la actualidad y pueden conducir los esfuerzos mundiales hacia las metas de la Agenda del Desarrollo Sostenible al 2030 de las Naciones Unidas.

Chiriboga, I. (2019). *Bacterias Resistentes a Antibióticos en Estaciones Depuradoras de Agua Residual*. En su estudio señala que la resistencia a los antibióticos se da por las modificaciones genéticas que sufre unas especies bacterianas, éstas pueden ser por mutación o por adquisición de genes de resistencia. La transferencia de genes de resistencia se da por la inserción de dichos genes a las plataformas móviles genéticas: plásmidos, transposones e integrones, capaces de propagarse en el agua y en comunidades bacterianas del suelo.

Parnanen, K. et al. (2019). *Antibiotic Resistance in European Wastewater Treatmentplants Mirrors the Pattern of Clinical Antibiotic Resistance Prevalence*. Este estudio evaluó las aguas residuales de 12 PTARs de los países: Finlandia, Noruega, Alemania, Irlanda, España, Portugal y Chipre. Este estudio evidenció que el número de genes de resistencia a los antibióticos en las aguas residuales se

corresponde con el número de bacterias de este tipo halladas en muestras recolectadas de pacientes en esa región, es decir las aguas residuales revelan los niveles de resistencia a los antibióticos en una región específica. Por ende, se llegó a la conclusión que una planta de tratamiento funciona como una incubadora de resistencia a los antibióticos bajo ciertas condiciones; sin embargo, menciona que las plantas de tratamiento de aguas residuales modernas y que funcionan bien parecen ser bastante efectivas para eliminar las bacterias resistentes a los antibióticos del agua durante el proceso de tratamiento.

Pérez, J. (2019). *Infecciones Sintomáticas por Escherichia coli Enterotoxigénica en Niños ≤ 5 Años de León y su Correlación con los Fenotipos Lewis y Secretor.* En su tesis menciona que *E. coli* es un bacilo gram negativo, lactosa positiva y oxidasa negativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae y puede crecer tanto en ambiente aerobio y anaerobio preferiblemente a 37°C. Además, por lo general *E. coli* y el huésped humano coexisten en beneficio mutuo durante décadas y las cepas de *E. coli* rara vez causan enfermedades, en tal caso, estas abarcan desde el tracto gastrointestinal a otros sitios extraintestinales tales como las vías urinarias, torrente sanguíneo, y el sistema nervioso central. Entre los patógenos intestinales existen 6 categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adhesión difusa (DAEC).

Vinueza, A. et al. (2019). *Resistencia Antibacteriana de Escherichia coli Aislada en Orina en el Hospital General Puyo.* Señalan que la *resistencia* antimicrobiana se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir a concentraciones de un antibiótico que destruirían a otras bacterias de su misma especie. Además, sostienen que la resistencia antimicrobiana es una propiedad inherente a todos los microorganismos y constituye uno de los aspectos sobre la cual se desarrolla la evolución bacteriana. Esta se encuentra determinada por cambios genotípicos generados por variaciones ambientales (exposición antibiótica), lo que genera

adaptación al nuevo ambiente y asegura su posterior descendencia. Asimismo, es posible determinar la resistencia antimicrobiana mediante la ejecución de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, que indican cuán vulnerable es una especie bacteriana a un determinado antibiótico y que son diversos los métodos empleados para la determinación de la resistencia antimicrobiana (PCR, inmunoelectroforesis, microarrays) pero el método más ampliamente utilizado es el antibiograma disco – placa (técnica de Kirby & Bauer).

Ayodeji, A. et al. (2020). *Antibiogram and beta-lactamase genes among cefotaxime resistant E. coli from wastewater treatment plant.* Aislaron 75 cepas de *E. coli* de las cuales el 23,3% pertenecientes a *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), el 46.7% pertenecientes a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) pero no se detectó ninguna cepa de *E. coli* enteropatógena (EPEC). Estas cepas fueron aisladas de muestras de agua provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Durban, Sudáfrica, el cual recibe efluentes municipales, industriales y hospitalarios. Se cuantificó la concentración de *E. coli* con el método estándar de filtración de membrana y las muestras de agua fueron colocadas en filtros de acetato y estos fueron agregaron a placas Petri con el medio coliformes fecales de membrana agar(m-FC) con 4 mg/L y 8mg/L de cefotaxima y se incubaron a 37 °C por 24 h. Asimismo, se realizó PCR para identificar a las cepas de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), enteroagregativa (EAEC) y enteropatógena (EPEC). Como resultado, se obtuvo que de 75 cepas de *E. coli* aisladas de 51 cepas fueron resistentes a cefotaxima, 36 cepas resistentes a colistina y 48 cepas resistentes a gentamicina.

2.5. HIPÓTESIS

Hipótesis general

H₀ = Si se logra observar la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) de aguas residuales de diferentes distritos de Lima, tales como Cercado de Lima, Chorrillos, San Juan de Lurigancho, Cieneguilla, Chosica, Lurín y de Callao, tales como Ventanilla, se podrían prevenir problemas de salud pública y ambiental.

H₁ = Si no se logra observar la resistencia bacteriana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) de aguas residuales de diferentes distritos de Lima, tales como Cercado de Lima, Chorrillos, San Juan de Lurigancho, Cieneguilla, Chosica, Lurín y de Callao, tales como Ventanilla, no se podrían prevenir problemas de salud pública y ambiental.

Hipótesis específicas

H₂ = Si hubiese un recuento que excede los límites máximos permisibles de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), entonces existiría una mayor contaminación antropogénica e industrial de las aguas residuales.

H₃ = Si existiera la presencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), en aguas residuales, entonces habría una falta de monitoreo y control de calidad en el tratamiento de aguas residuales.

H₄ = Si al evaluar la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), no hubiera presencia de susceptibilidad frente a los antibióticos amicacina, ampicilina, ceftazidima, cloranfenicol, amoxicilina-ácido clavulánico, tetraciclina, estreptomicina y gentamicina, entonces habría una falta de monitoreo y control de calidad en el tratamiento de aguas residuales.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El recojo y procesamiento de muestras se realizó en el laboratorio de Inspectorate Services Perú S.A.C., así como el aislamiento de las cepas y la identificación de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Por otro lado, la evaluación antimicrobiana y de resistencia bacteriana se realizó en el laboratorio de Parasitología (LA79) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación que se efectuará será de carácter experimental, ya que el objetivo es analizar la resistencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) a los antibióticos amicacina, ampicilina, ceftazidima, cloranfenicol, amoxicilina-ácido clavulánico, Tetraciclina, Estreptomina y Gentamicina. Asimismo, se empleará el razonamiento hipotético-deductivo, muestras representativas, un diseño experimental bifactorial como estrategia de control y metodología cuantitativa para analizar los datos.

3.3. VARIABLES

Tabla 1. Variables a Analizar en el Presente Trabajo de Investigación

Tipo de variable	Variable	Definición	Naturaleza
Independiente	Densidad microbiana (UFC/ml) de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	Cepas de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC) aisladas de muestras de aguas residuales de diversas Plantas de Tratamiento de Agua (PTAR).	Cuantitativa discreta
Independiente	Tamaño (mm) de halos formados	Eficacia de los antibióticos amicacina, ampicilina, ceftazidima, cloranfenicol, amoxicilina – ácido clavulánico, tetraciclina, estreptomina y gentamicina medida en milímetros.	Cuantitativa discreta

Fuente: Elaboración propia.

3.4. OPERALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 2. Descripción de las Variables, Tipos de Variables, Niveles de Medición eIndicadores

Variable	Indicadores	Tipo de variable	Nivel de medición	Valor final
Densidad microbiana (UFC/ml) de <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC)	Concentración bacteriana (UFC/mL)	Cuantitativa discreta	Nominal	UFC/mL
Tamaño (mm) de halos formados	Milímetros (mm)	Cuantitativa discreta	Nominal	mm

Fuente: Elaboración propia.

3.5. MUESTREO

Según el Standard Methods (Vol. 23, 2017), una sola muestra es insuficiente para identificar, aislar y evaluar al microorganismo *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), por lo cual el número requerido de muestras para evaluar el recurso agua se puede estimar de la siguiente manera:

$$N \geq \frac{ts^2}{U}$$

Dónde:

N = Número de muestras

t = Nivel de confianza para el estadístico Student

ts = Desviación standard

U = Nivel aceptable de incertidumbre Reemplazamos las variables:

t = 95% = 0.95

s = 0.5

$$U = 0.2$$

Reemplazamos en la fórmula:

$$N \geq = (U^2 s^2)$$

$$N \geq \left(\frac{0.95 \times 0.5^2}{0.2} \right)$$

$$N \geq \left(\frac{0.475^2}{0.2} \right)$$

$$N \geq 5.64$$

$$N \geq 6$$

El número de muestras a evaluar sería 6 por cada punto de muestreo, las cuales serán muestreadas en diferentes días, representando dichas repeticiones, para ello se determinó evaluar 84 muestras para obtener mayor número de cepas a aislar e identificar, además de que esto conlleva una mayor probabilidad de poder identificar y aislar *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Se recepcionarán 84 muestras de aguas residuales provenientes de diversos distritos de Lima, tales como Cercado de Lima, Chorrillos, San Juan de Lurigancho, Cieneguilla, Chosica, Lurín, Callao y Ventanilla, las cuales serán posteriormente analizadas en el Laboratorio Acreditado Inspectorate Service Peru S.A.C. en Lima, Perú.

Relación de PTARs de donde provienen las muestras de agua a ser evaluadas en el presente trabajo de investigación:

Tabla 3. PTAR's y los Distritos de donde se Reciben las Muestras de Agua

PTAR	Distrito
Santa Clara	Cercado de Lima
Huáscar	Cercado de Lima
Nestlé	Cercado de Lima
Parque 26	Cercado de Lima
José Gálvez	Cercado de Lima
La Chira	Chorillos
Aquacif	San Juan deLurigancho
Cieneguilla	Cieneguilla
San Antonio de Carapongo	Chosica
Julio C. Tello	Lurín
San Pedro de Lurín	Lurín
Taboada	Callao
Santa Rosa	Ventanilla
Pachacútec	Ventanilla

Fuente: Elaboración propia.

3.6. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

PROCEDIMIENTOS

A. AISLAMIENTO DE COLIFORMES

Las muestras serán analizadas según el Standard Methods (Vol. 23, 2017) para aguas residuales, la cual se describe a continuación

Técnica de Fermentación de Múltiples Tubos para Coliformes

La técnica de fermentación se puede utilizar para detectar coliformes en agua potable o cuantificar coliformes en agua potable y no potable. Cuando se utilizan varios tubos, la densidad de coliformes se estima mediante una tabla de número más probable (NMP). Este número, generado usando fórmulas de probabilidad específicas, es una estimación de la densidad media de coliforme en la muestra.

La información se obtendrá cuando el inóculo de la muestra sea examinado y muestre acidez y/o producción de gas y la muestra de inóculo de muestra más pequeña no muestre acidez ni presencia de gas en ninguno o la mayoría de los tubos.

La densidad bacteriana se estima mediante la fórmula dada o usando la tabla y

verificando el número de tubos positivos en las diluciones múltiples.

La concentración de muestra se registrará por la precisión deseada para los resultados.

Las tablas del Número Más Probable (NMP) se basan en la suposición de la distribución de Poisson (Dispersión aleatoria). Sin embargo, si la muestra no se agita adecuadamente antes de retirar las alícuotas, el valor del NMP será una subestimación del valor real de la densidad bacteriana.

Calidad del Agua Potable

Al analizar el agua potable para determinar si cumple con los Estándares de la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU (EPA), se debe analizar una muestra de 100 ml utilizando la técnica de fermentación con 10 tubos de réplica los cuales tienen que contener 10 ml, 5 tubos de réplica de 20 ml o un frasco de dilución con 100 ml de muestra.

Al analizar el agua potable mediante la técnica de fermentación, se deben procesar todos los tubos que muestren crecimiento con producción de acidez y gas. Además, las muestras de agua que demuestren ser positivas para coliformes totales, deben ser analizadas para coliformes termotolerantes (fecales) y *Escherichia coli*.

Los análisis de muestras de agua residuales o de suministros públicos, el objetivo de la prueba de coliformes es para determinar la eficiencia de las operaciones de la planta de tratamiento y la integridad del sistema de distribución, además la prueba también se utiliza para detectar la presencia de contaminación fecal.

La presencia de coliformes en un sistema de distribución como el alcantarillado, pueden atribuirse al crecimiento o supervivencia de coliformes mediante crecimiento de bacterias en biofilms y no a las fallas en los tratamientos de las plantas de tratamiento de aguas ni a la contaminación externa del sistema de distribución de aguas residuales. Debido a que es difícil discernir si los coliformes

ingresan al sistema de distribución o los coliformes ya están presentes en estos mediante biofilms, se afirma que todos los coliformes se originan en una fuente fuera del sistema de distribución de aguas residuales.

Al analizar aguas no potables, se debe inocular la muestra en tubos con diluciones decimales (múltiplos de 10 ml) basado en la densidad probable de coliformes (NMP).

Generalmente, el objetivo de analizar el agua residual es para estimar la densidad bacteriana, determinar una fuente de contaminación y hacer cumplir los estándares de calidad de agua o identificar la fuente de contaminación por microorganismos.

La técnica de fermentación de múltiples tubos se puede utilizar para obtener estimaciones de NMP estadísticamente válidas de la densidad de coliformes y examinar un número considerable de muestras de agua para producir resultados representativos para cada punto de muestreo.

Técnica de Fermentación Estándar para Coliformes Totales

Control de Calidad

Se deben utilizar medios deshidratados y los medios de cultivo preparados deben ser almacenados en tubos o frascos de dilución bien tapados hasta por 3 meses, en oscuridad a temperaturas entre 1 y 10 °C y evaporación inferior al 10% del volumen original.

Si los tubos de ensayos serán refrigerados después del proceso de esterilización, deben incubarse durante toda la noche a temperatura ambiente (20 °C) antes de su uso y los que muestran crecimiento o presencia de burbujas deben descartarse para evitar resultados de falsos positivos.

La esterilidad, el volumen de medio por tubo y el pH también deberán verificarse y registrarse.

Los falsos positivos y negativos pueden diferir entre varios medios, por ello los usuarios deben seleccionar cuidadosamente el medio y el procedimiento que mejor se adapte a sus necesidades.

Fase Presuntiva

Se debe utilizar el caldo lauril triptosa en esta fase del tubo múltiple siguiendo las pautas de control de calidad descritas anteriormente.

Se debe agregar los ingredientes deshidratados a un envase y agregar agua destilada, mezclar bien y calentar para disolver. Luego, agregue caldo de púrpura de bromocresol, esto para determinar la producción de ácido ya que es un indicador de resultados positivos para coliformes.

Antes de esterilizar, se deberán preparar tubos Durham para posteriormente colocarlos de manera invertida dentro de los tubos de ensayo. Luego, realice la esterilización mediante una autoclave a 121 °C de 12 a 15 minutos, asegurarse de que los viales invertidos estén libre de burbujas de aire y el pH del caldo lauril triptosa debe ser 6.8 ± 0.2 luego de la esterilización.

Procedimiento

1) Organizar los tubos de ensayo para la fermentación en filas de cinco o diez tubos cada uno en una gradilla. El número de filas y los volúmenes de medio en cada tubo de ensayo dependen de la calidad y cantidad de la muestra a ser examinada. Para muestras de agua potable, se deben analizar 100 ml y usar cinco porciones de 20 ml, diez porciones de 10 ml o una porción de 100 ml. Por otro lado, para agua potable se debe analizar cinco tubos por dilución para 10 ml, 1 ml y 0.1 ml, etc. Al hacer las diluciones, agite la muestra vigorosamente durante 5 segundos (unas 25 veces). Luego, realizar 5 réplicas de cada dilución.

En la siguiente tabla se detallan las cantidades de inóculo que se deberá

agregar en cada tubo de ensayo con diferente volumen de medio (ml).

Tabla 4. Volumen para Preparar el Medio “Lauril triptosa” y la Cantidad de Muestra que se debe Inocular

TABLE 9221-I: PREPARATION OF LAURYL TRYPTOSE BROTH			
Inoculum <i>mL</i>	Amount of Medium in Tube <i>mL</i>	Volume of Medium + Inoculum <i>mL</i>	Dehydrated Lauryl Tryptose Broth Required <i>g/L</i>
1	10 or more	11 or more	35.6
10	10	20	71.2
10	20	30	53.4
20	10	30	106.8
100	50	150	106.8
100	35	135	137.1
100	20	120	213.6

Fuente: Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2017.

- 2) Incubar rápidamente los tubos de ensayos inoculados a 35 ± 0.5 °C. Luego de 24 ± 2 horas girar cada tubo de ensayo y examinarlo para ver si hay crecimiento, producción de gas o reacción de acidez (cambio de tono a amarillo) y si no hay presencia de gas ni reacción ácida, reincubar y re-examinar luego de 48 ± 3 horas. Anotar la presencia o ausencia de gas y/o producción de acidez.

Interpretación

La detección de una reacción ácida (cambio de color a amarillo) y/o presencia de gas en los tubos de ensayo dentro de las 48 ± 3 horas, constituye una reacción presuntamente positiva y por ello, enviar los tubos de ensayo con reacción presuntamente positiva a la fase confirmada.

La ausencia de reacción ácida y formación de gas o burbujas luego de las 48 ± 3 horas complementarias de incubación, constituye una prueba negativa.

Estimación de la Densidad Bacteriana

La prueba de fermentación de tubos múltiples no es muy precisa a menos que se examinen muchas cantidades de muestra, así que debe tener cuidado al

interpretar cualquier resultado sobre coliformes. Esta precisión mejora enormemente cuando se usan varias muestras de un determinado punto de muestreo y luego se calcula el promedio de este.

Aunque las tablas y cálculos del “Número Más Probable” (NMP) están descritos para su utilización en coliformes, también pueden ser utilizados para determinar el NMP de cualquier organismo.

Existen tablas de NMP disponibles en internet, pero verifique los resultados del NMP con las tablas que se muestran en este documento.

Uso de Tablas para estimar el NMP

Debe registrar la concentración de coliformes como NPM/100 ml. Los valores de NPM para tubos que registren resultados negativos y positivos se encuentran en las tablas n° 9221: II, III y IV. Los valores de las tablas 9221: II y III son para muestras de agua potable y la tabla 9221: IV ilustra los valores de NMP para combinaciones positivas y negativas de muestras de agua no potable. Si los volúmenes de las cantidades de muestra analizadas son idénticos a los que se encuentran en las tablas, luego se debe registrar el valor correspondiente a la combinación apropiada de resultados positivos y negativos.

Sin embargo, si las series de diluciones son diferentes a los descritos anteriormente, se debe seleccionar el valor de NMP de la tabla 9221: IV que corresponde a la combinación de resultados positivos y calcular el NMP real usando la siguiente fórmula:

$$\frac{NMP}{100} ml = \frac{\text{Valor de tabla del NMP}}{100 ml} \times \frac{10}{V}$$

Donde: V = Volumen de la muestra a la menor dilución realizada

Si los tubos de ensayos con el inóculo de la muestra poseen más de tres

diluciones, utilice las siguientes pautas para seleccionar los tres tubos de ensayo con las diluciones más apropiadas y luego use la tabla 9221: IV y la anterior fórmula para calcular el NMP.

Consulte la tabla 9221: V que proporciona varios ejemplos (A – G) de combinaciones de resultados positivos. Primero, elimine la dilución más alta (el volumen de muestra más pequeña, es decir, más diluida). A continuación, retire la dilución más baja (mayor volumen de la muestra). De acuerdo con estas pautas, las tres diluciones en el ejemplo A se seleccionarán mediante la eliminación de dilución más alta (0,001 ml) y la dilución más baja (10 ml). Si la dilución más baja no tiene todos los tubos positivos y varias de las diluciones más altas tienen todos los tubos negativos, entonces se debe eliminar las negativas más altas (Ejemplo B).

Tabla 5. Valores para Hallar el NMP Según Combinaciones de Resultados Positivos y Negativos de Tubos de Ensayo un Volumen de 20 ml

TABLE 9221:II. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR ALL COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS WHEN FIVE 20-ML PORTIONS ARE USED			
No. of Tubes Giving Positive Reaction Out of 5 (20 mL Each)	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits (Exact)	
		Lower	Upper
0	<1.1	–	3.5
1	1.1	0.051	5.4
2	2.6	0.40	8.4
3	4.6	1.0	13
4	8.0	2.1	23
5	>8.0	3.4	–

Fuente: Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2017.

Tabla 6. Valores para Hallar el NMP Según Combinaciones de Resultados Positivos y Negativos de Tubos de Ensayo un Volumen de 10 ml

TABLE 9221:III. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR ALL COMBINATIONS OF POSITIVE AND NEGATIVE RESULTS WHEN TEN 10-ML PORTIONS ARE USED			
No. of Tubes Giving Positive Reaction Out of 10 (10 mL Each)	MPN Index/ 100 mL	95% Confidence Limits (Exact)	
		Lower	Upper
0	<1.1	–	3.4
1	1.1	0.051	5.9
2	2.2	0.37	8.2
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	6.9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.8	34
9	23	8.1	53
10	>23	12	–

Fuente: Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2017.

Tabla 7. Valores para Hallar el NMP Según Combinaciones de Resultados Positivos y Negativos de Tubos de Ensayo a Varias Concentraciones de Muestra de Agua

TABLE 9221:IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATIONS OF POSITIVE RESULTS WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION (10 mL, 1.0 mL, 0.1 mL)*

Combination of Positives	MPN Index/100 mL	Confidence Limits		Combination of Positives	MPN Index/100 mL	Confidence Limits	
		Low	High			Low	High
0-0-0	<1.8	—	6.8	4-0-3	25	9.8	70
0-0-1	1.8	0.090	6.8	4-1-0	17	6.0	40
0-1-0	1.8	0.090	6.9	4-1-1	21	6.8	42
0-1-1	3.6	0.70	10	4-1-2	26	9.8	70
0-2-0	3.7	0.70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5.5	1.8	15	4-2-0	22	6.8	50
0-3-0	5.6	1.8	15	4-2-1	26	9.8	70
1-0-0	2.0	0.10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4.0	0.70	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6.0	1.8	15	4-3-0	27	9.9	70
1-1-0	4.0	0.71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6.1	1.8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8.1	3.4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6.1	1.8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8.2	3.4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8.3	3.4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10	3.5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	11	3.5	22	5-0-0	23	6.8	70
2-0-0	4.5	0.79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6.8	1.8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9.1	3.4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6.8	1.8	17	5-1-0	33	10	100
2-1-1	9.2	3.4	22	5-1-1	46	14	120
2-1-2	12	4.1	26	5-1-2	63	22	150
2-2-0	9.3	3.4	22	5-1-3	84	34	220
2-2-1	12	4.1	26	5-2-0	49	15	150
2-2-2	14	5.9	36	5-2-1	70	22	170
2-3-0	12	4.1	26	5-2-2	94	34	230
2-3-1	14	5.9	36	5-2-3	120	36	250
2-4-0	15	5.9	36	5-2-4	150	58	400
3-0-0	7.8	2.1	22	5-3-0	79	22	220
3-0-1	11	3.5	23	5-3-1	110	34	250
3-0-2	13	5.6	35	5-3-2	140	52	400
3-1-0	11	3.5	26	5-3-3	170	70	400
3-1-1	14	5.6	36	5-3-4	210	70	400
3-1-2	17	6.0	36	5-4-0	130	36	400
3-2-0	14	5.7	36	5-4-1	170	58	400
3-2-1	17	6.8	40	5-4-2	220	70	440
3-2-2	20	6.8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-0	17	6.8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-1	21	6.8	40	5-4-5	430	150	1100
3-3-2	24	9.8	70	5-5-0	240	70	710
3-4-0	21	6.8	40	5-5-1	350	100	1100
3-4-1	24	9.8	70	5-5-2	540	150	1700
3-5-0	25	9.8	70	5-5-3	920	220	2600
4-0-0	13	4.1	35	5-5-4	1600	400	4600
4-0-1	17	5.9	36	5-5-5	>1600	700	—
4-0-2	21	6.8	40				

Results to two significant figures.

Fuente: Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2017.

Pueden quedar tres a más diluciones después de retirar los tubos positivos de la menor dilución y los tubos negativos de las diluciones altas. En este caso, use los tubos positivos de la dilución más alta y los tubos positivos de dos diluciones inmediatamente inferiores. En el ejemplo C, la dilución más alta con todos los tubos positivos es de 0.1 ml, comprende dos diluciones de 0.001 ml, que posee un tubo positivo. En el ejemplo D, la mayor dilución con todos los tubos positivos es de 0.01 ml que comprende a dos diluciones de 0.001 ml, los cuales producen una combinación 4 – 5 – 1. Si después de descartar la dilución más baja de todos los tubos positivos no queda ningún tubo positivo de ninguna dilución, se debe seleccionar las dos diluciones más bajas y asignar la suma de las diluciones restantes a la tercera dilución.

Tabla 8. Ejemplos de Combinaciones de Tres Tubos Positivos de Cinco Diluciones Diferentes para Hallar el NMP

Example	Volume mL					Combination of Positives	MPN Index No./100 mL
	10	1	0.1	0.01	0.001		
A	5	5	1	0	0	x-5-1-0-x	330
B	4	5	1	0	0	4-5-1-x-x	48
C	5	2	5	2	1	x-x-5-2-1	7000
D	4	5	4	5	1	x-x-4-5-1	4800
E	5	4	4	0	1	x-4-4-1-x	400
F	4	3	0	1	1	4-3-2-x-x	39
G	4	3	3	2	1	x-x-3-2-1	1700

Fuente: Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2017.

En el ejemplo E, la dilución más alta con todos los tubos positivos contienen 10 ml, esta dilución se debe eliminar, quedando cuatro diluciones con todos los tubos positivos. En esta situación, seleccione las dos diluciones más bajas restantes correspondientes a 1 y ml de la muestra. Para la tercera dilución, agregue el número de tubos positivos de todas las diluciones superiores (0,001 y 0,0001 ml) para poder producir una combinación final de 4 -4 – 1.

Si ninguna dilución tiene todos sus tubos positivos (Ejemplo F), se deberá seleccionar el tubo de las dos diluciones más bajas (10 y 1 ml de muestra).

Para la tercera dilución, agregue el número de tubos positivos de las diluciones restantes (0.1, 0,01 y 0,001 ml de la muestra) para producir una combinación final de 4 – 3 – 2. Si a la tercera dilución se le asignan más de cinco tubos positivos entonces la combinación seleccionada no estará incluida en la tabla 9221: IV. Si las tres diluciones seleccionadas no se encuentran en la tabla 9221: IV, debe haberse cometido un error al momento de hacer las diluciones en las diluciones. En este caso, no se aplicarían los métodos habituales para calcular el NMP presentados en el presente documento.

Si no se puede recolectar o procesar una nueva muestra y aún se desea hallar el NMP, se debe utilizar el tubo positivo del tubo con la dilución más alta y las dos diluciones más bajas. En el ejemplo G, la primera combinación 4 – 3 – 6 (el resultado de las tres diluciones más altas) no se encuentra en la tabla 9221: IV porque 6 es mayor que 5. A segunda selección, de acuerdo a las pautas anteriores, sería 3 – 2 – 1. Si esta segunda selección no se encuentra en la tabla 9221: IV, se debe utilizar la siguiente fórmula para calcular el NMP.

$$\frac{230.3}{Z_s} \log_{10} \left(\frac{X_s Z_s}{\sum_j^K = s n_j Z_j} \right)$$

Donde:

Z_s = La cantidad de muestra original inoculada en cada tubo de la dilución “s”

X_s = Número de tubos positivos en la dilución número “s”

K = Número de diluciones

j = Una dilución

s = La dilución más alta con al menos un tubo positivo

n_j = El número de diluciones a la dilución número “j”

Q_j = La cantidad de muestra original inoculada en cada tubo de la dilución “j”

Por ejemplo, en la serie $x - x - 3 - 0 - 0$, donde la tercera dilución nivel (Q_s) es igual a 0.1 ml, $X_s Q_s = 0.3$ y $\sum n_j Q_j = 0.555$. Por lo tanto, el NMP calculado será $7800/100$ ml. Esta fórmula también se aplica a las diluciones en serie que tienen todos sus tubos positivos y puede servir como una aproximación para resultados como $5 - 5 - 5 - 0 - 0$, donde se utilizan 5 tubos por dilución usando sólo las últimas cuatro diluciones.

La tabla 9221: IV muestra todos los tubos positivos improbables para una serie de tres diluciones. Al probar 10 muestras, hay un 99% de posibilidades de encontrar todos los resultados entre estos 95 resultados. Si las combinaciones no tabuladas ocurren con una frecuencia superior al 1%, esto indica que la técnica es defectuosa o que los supuestos estadísticos subyacentes a la estimación del NMP no se cumplirán (por ejemplo, la inhibición del crecimiento a bajas diluciones).

El NMP de combinaciones que no aparecen en la tabla o para otras combinaciones de tubos o diluciones pueden estimarse de la siguiente manera: Primero, se debe seleccionar la dilución más baja que no tenga todos sus tubos con resultados positivos. En segundo lugar, seleccione la dilución más alta con al menos un resultado positivo. Finalmente, seleccione todas las diluciones entre ellas. Por ejemplo, de (10/10, 10/10, 4/10, 1/10, 0/10) use sólo (-, - 4/10, 1/10, -) correspondientes a 4/10 a 0.1 ml de muestra/tubo y a 0.01 ml de muestra/tubo. Asimismo,

de (10/10, 10/10, 10/10, 0/10, 0/10), selecciones sólo (-, -, 10/10, 0/10), correspondiente a 10/10 0.1 ml de la muestra/tubo y 0/10 0.01 ml muestra/tubo. Utilice solo las diluciones seleccionadas en la siguiente fórmula de Thomas:

$$\text{NMP}/100 \text{ ml (aprox.)} = 100 \times P / (\text{N} \times \text{T})^{1/2}$$

Donde:

P = Cantidad de resultados positivos

N = Volumen de muestras en porciones negativas combinadas (ml)

T = Volumen total de las muestras en las diluciones seleccionadas (ml)

$j = s$ Es decir, $N = \sum_{j=1}^s$

$$(n_j x_j) Q, P = \sum x_j, \text{ y } T = \sum n_j Q_j,$$

donde las sumatorias son entre las diluciones seleccionadas y $x_j =$ número de resultados positivos en la dilución número "j"

$$\text{NMP}/100 \text{ ml (aprox.)} = 100 \times 5 / (0.69 \times 1.1)^{1/2} = 500/0.87 = 570/100 \text{ ml}$$

En el segundo ejemplo anterior,

$$\text{NMP}/100 \text{ ml (aprox.)} = 100 \times 10 / (0.1 \times 1.1)^{1/2} = 1000/0.332 = 3000/100 \text{ ml}$$

Los dos ejemplos se comparan bien con los verdaderos valores del NMP, 590/100 ml y 2400/100 ml, respectivamente.

El segundo ejemplo, es un caso especial para calcular una solución exacta directamente de dos diluciones seleccionadas. Si se desea resumir los resultados de las muestras con un solo valor de NMP, utilice la media

geométrica o la mediana. La media geométrica se calcula promediando los valores logarítmicos, por ejemplo, la media geométrica de A, B y C es 10^L donde:

$L = (\log_{10} A + \log_{10} B + \log_{10} C) / 3$ Los valores medio se consideran como el antilog de L.

Procedimiento para el uso de sustrato fluorogénico con cepas de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria miembro de la flora fecal autóctona de animales de sangre caliente. La presencia de *E. coli* en el agua es considerado como un indicador específico de contaminación fecal y la posible presencia de patógenos entéricos. Las pruebas para *E. coli* son aplicables para el análisis de aguas potables, superficiales, terrestres y residuales. Las pruebas para *E. coli* se pueden realizar usando la técnica del tubo múltiple, el método de filtro de membrana o por el sustrato de enzima cromogénica

Para la prueba de *E. coli* con el medio de cultivo EC - MUG, se define a *E. coli* como la especie de bacterias coliformes que posee la enzima β - glucuronidasa, la cual puede separar el sustrato fluorogénico 4 - metilumbeliferil - β - D - glucuronido (MUG), liberando así fluorógeno dentro de 24 ± 2 horas o menos cuando se cultiva en medio EC - MUG a 44.5 ± 0.2 °C.

Prueba de *Escherichia coli* en el medio EC - MUG

El uso del medio EC - MUG para detectar *E. coli* es aplicable a investigaciones de agua potable, contaminación de arroyos, agua sin filtrar, sistemas de tratamiento de aguas residuales, agua proveniente de baños, aguas de mar y monitoreo general de la calidad del agua.

No utilice el medio EC - MUG para el aislamiento directo de *E. coli*, re

requiere un enriquecimiento previo del medio para un resultado óptimo.

Utilice el medio EC – MUG para analizar *E. coli* en un cultivo de coliformes positivo.

a) Medio EC – MUG:

Prepare el medio EC – MUG.

Agregue el medio deshidratado al agua, mezcle bien y caliente para disolver. Antes de la esterilización, colocar el medio en tubos que no emitan fluorescencia bajo luz ultravioleta (UV) de longitud de onda de 365 – 366 nm. No son necesarios tubos invertidos. Se debe cerrar los tubos con metal o tapas de plástico resistentes al calor.

El pH promedio debe ser de 6.9 ± 0.2 luego de la esterilización por 15 minutos a 121°C .

b) Procedimiento:

- 1) Agite o gire suavemente los tubos o botellas que muestren crecimiento, gas acidez para resuspender los organismos. Use un asa estéril de 3 – o 3.5 mm de diámetro para transferir la muestra del tubo o botella con medio lauril triptosa al medio EC – MUG. Alternativamente, inserte un aplicador de madera estéril al menos a los 2.5 cm del tubo, retire rápidamente y sumergir el aplicador hasta el fondo del tubo que contiene el medio EC – MUG.
- 2) Coloque todos los tubos con el medio EC – MUG en baño maría por 30 minutos luego de haber sido inoculados. Incubar los tubos con EC – MUG y los controles negativos por 24 ± 2 horas en baño maría (preferiblemente cubiertos) y mantenerlos a $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$. Mantener un volumen de agua apropiado y suficiente en la incubadora de baño maría para sumergir los tubos hasta la mitad.

c) Interpretación:

Examine todos los tubos que muestren fluorescencia utilizando una lámpara Uv de 6W y de 365 – 366 nm. La presencia de fluorescencia azul brillante se considera un resultado positivo para *E. coli* y lo contrario, la ausencia de fluorescencia se considera un resultado negativo. Para ayudar con la interpretación de resultados y evitar la identificación errónea de autofluorescencia débil del medio o tubos de vidrio como respuesta positiva, incluir en el ensayo un control positivo (un cultivo conocido de *E. coli* MUG – positivo). Un control negativo (Una cepa de *Klebsiella pneumoniae* termotolerante en cultivo MUG negativo) y un medio sin inocular como control.

La distancia entre la lámpara UV y los tubos de ensayo debe ser tal que el control positivo de *E. coli* muestre una fluorescencia distinta mientras que los controles MUG negativos y sin inocular no presentarán fluorescencia. Si usa varios tubos, calcule el NMP para *E. coli* a partir del número de tubos con caldo EC – MUG positivos. Cuando se usa solo un tubo o se subcultiva a partir de una sola cepa, se debe informar la presencia o ausencia de *E. coli*.

Determinación simultánea de coliformes termotolerantes y *E. coli*

La presencia de coliformes termotolerantes y *E. coli* puede ser determinado simultáneamente mediante la inclusión de un vial invertido (tubo de Durham) en tubos con caldo EC – MUG.

a) Primera etapa:

Antes de realizar la esterilización, coloque suficiente medio para cubrir el vial invertido al menos de la mitad a dos tercios del tubo y tapar con tapas metálicas resistentes al calor. El pH del medio debe ser 6.9 ± 0.2

después de la esterilización la cuál debe ser dura 15 minutos a 121 °C.

b) Procedimiento:

- 1) Agite o gire suavemente los tubos con el medio lauril triptosa que muestren crecimiento, gas o acidez para resuspender los microorganismos. Usando un asa estéril de 3 a 3.5 mm de diámetro transfiera una porción de muestra a un tubo concaldo EC – MUG. Alternativamente, inserte un aplicador de madera estéril de al menos 2.5 cm en el tubo de cultivo, retire rápidamente y sumerja el aplicador al fondo del tubo de ensayo con el medio EC – MUG.
- 2) Coloque todos los tubos con medio EC – MUG en baño maría por 30 minutos luego de haber sido inoculados. Luego, incubar los tubos con medio EC – MUG inoculados en baño maría, junto con los controles positivos y negativos durante 24 ± 2 horas preferiblemente cubiertos y mantenga un volumen de agua suficiente en la incubadora de baño maría para sumergir los tubos de ensayo hasta un poco más de la mitad de los tubos.

c) Interpretación:

Examine todos los tubos de ensayo que presenten crecimiento y/o gas y para saber si hay posee fluorescencia usando una lámpara de UV de 6W y de 365 – 366 nm. El crecimiento y la producción de gas se consideran como resultados positivos para coliformes termotolerantes. La presencia de fluorescencia azul brillante se considera un resultado positivo para *E. coli*. Los tubos con crecimiento y/o presencia de gas y fluorescencia se

consideran positivos tanto para coliformes termotolerantes como para *E. coli*. Los tubos de ensayos con crecimiento y/o gas pero sin fluorescencia azul brillantes se consideran positivos para coliformes termotolerantes y negativo para *E. coli*.

Debido a la autofluorescencia autóctona de los medios y los tubos de vidrio dentro de los tubos de ensayo. Tenga cuidado al interpretar los resultados, para esto incluya un control positivo (Una cepa de *E. coli* conocida cultivada en medio de cultivo MUG y con resultado positivo), un control negativo (Una cepa termotolerante como una de *Klebsiella pneumoniae* cultivada en medio MUG y con resultado negativo) y un tubo de ensayo con medio MUG no inoculado como control. La distancia entre la lámpara UV y los tubos deben ser tales que el control positivo de *E. coli* muestre una fluorescencia distinta mientras que los tubos de ensayo con medio EC - MUG negativos y sin inocular no deberán mostrar fluorescencia.

Si se utilizan varios tubos, calcule el NMP para *E. coli* y coliformes termotolerantes de los tubos de ensayo con medio EC – MUG positivos.

Cuando se usa solo un tubo o se subcultiva a partir de una sola cepa, se debe informar la presencia o ausencia de *E. coli* y coliformes termotolerantes.

B. ASILAMIENTO DE ESCHERICHIA COLI

Los tubos positivos (con presencia de fluorescencia) fueron separados. Se reactivará la cepa en Caldo BHI por 24 horas, para luego estriarlo en Agar TBX y obtener colonias puras.

C. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR

➤ Preparación del Agar Muller Hinton

El proceso de preparación y esterilización se realizará a partir de la base deshidratada según las indicaciones del fabricante. Finalmente, se distribuirá en placas Petri estériles de 16 x 100 mm.

➤ Preparación del estándar (0.5 Mc Farland) para el inóculo

Se agregarán 0.5 ml de una solución de BaCl_2 0.048 M ($\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ al 1.175% P/V) a 99.5 ml de una solución de H_2SO_4 0.18 M (0.36M) (1% P/V) con el fin de estandarizar la densidad del inóculo. A continuación, se agitará con ayuda del vórtex para mantener la suspensión. Asimismo, se empleará el espectrofotómetro para verificar la densidad correcta del estándar, la cual consta de una absorbancia a 625 nm entre 0.08 y 0.10. Luego, se distribuirá la solución de BaCl_2 0.048 M en 5ml en tubos con tapa rosca y serán conservados a temperatura ambiente evitando su exposición directa a la luz.

➤ Inoculación

Se seleccionarán 5 colonias aisladas del mismo tipo morfológico en el agar TBX. Luego, se distribuirán las colonias a un tubo con 5 ml de Caldo BHI y se llevarán a incubar a 35°C hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar Mc Farland N° 0.5 (absorbancia a 625 nm entre 0.08 a 0.10). Después, con ayuda de un hisopo estéril, se estriará la cepa en toda la superficie de la placa Petri con Agar Muller Hinton en tres direcciones, para posteriormente tapar la placa y dejar secar de 3 a 5 minutos (sin exceder los 15 minutos).

Acto seguido, se colocarán los discos con antibióticos con pinzas planas estériles en la superficie del agar inoculado, realizando una ligera presión sobre cada disco, manteniendo una distancia de 25 mm uno del otro. Luego de 15 minutos se invertirán las placas y se llevarán a incubar a 35°C. Finalmente,

se revisarán las placas luego de 16 a 18 horas de incubación y se procederá a medir los diámetros de los halos de inhibición.

➤ **Lectura e Interpretación de Resultados**

Se medirán los diámetros de los halos de inhibición completa (incluyendo al disco) con una regla.

Tabla 9. Relación de Antibióticos que se Emplearon en las Pruebas de Antibiograma

ANTIBIOTICO	RESISTENTE	SUSCEPTIBLE
Amikacina (AK)	≤ 14 mm	≥ 17 mm
Amoxicilina-Acido Clavulanico(AMC)	≤ 13 mm	≥ 18 mm
Ampicilina (A)	≤ 13 mm	≥ 17 mm
Ceftazidima (CAZ)	≤ 14 mm	≥ 18 mm
Cloramfenicol (C)	≤ 12 mm	≥ 18 mm
Estreptomina (ST)	≤ 6 mm	≥ 10 mm
Gentamicina (GE)	≤ 12 mm	≥ 15 mm
Tetraciclina (TE)	≤ 11 mm	≥ 15 mm

Fuente: Elaboración propia.

Procesamiento y Análisis de datos

Todos los datos obtenidos de la exposición de *E.coli* enteropatógena frente a los diferentes antibióticos serán dispuestos en una tabla de Excel para un mejor procesamiento de datos estadísticos. Se empleó el programa estadístico Past versión 4.5, en el cual se realizarán los estadísticos descriptivos media, desviación estándar, error, valor mínimo y valor máximo, también se elaboró un gráfico de barras y un diagrama de cajas. Se procedió al test estadístico para saber si los datos presentan distribución normal, luego se procederá a usar las pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney pairwise.

3.7. ASPECTO ÉTICO

Para el presente trabajo de investigación, no aplica el factor ético, ya que no se

trabajarán con humanos ni con animales mayores, solamente con microorganismos.

Asimismo, el desarrollo de esta investigación tiene el consentimiento y aprobación del laboratorio Inspectorate Services Peru S.A.C., el cual recibe frecuentemente muestras de aguas de diversas Plantas de Tratamiento de Aguas (PTAR).

IV. RESULTADOS

Tabla 10. Resultados de la Media del Halo (mm) Comparados con los Parámetros de Resistente y Sensible a Antibióticos

Antibiograma N°	Antibiótico	Media del halo (mm)	Desviación estándar (mm)	Error	Min (mm)	Max (mm)	<i>E.coli</i> EPEC sensible o resistente
1	Amikacina	22.0	1.76	0.19	17	25	Sensible
2	Amikacina	21.4	1.55	0.17	19	26	Sensible
3	Ampicilina	19.8	3.56	0.39	1	25	Sensible
4	Ampicilina	19.4	0.55	0.36	9	25	Sensible
5	Ceftazidima	21.1	4.57	0.51	11	29	Sensible
6	Ceftazidima	21.4	4.77	0.53	2	28	Sensible
7	Cloranfenicol	17.4	5.84	0.65	0	27	Resistente
8	Cloranfenicol	18.2	5.11	0.50	0	25	Sensible
9	Amoxicilina/Ác. Clavulanico	24.9	4.50	0.50	16	36	Sensible
10	Amoxicilina/Ác. Clavulanico	24.4	4.12	0.46	15	32	Sensible
11	Tetraciclina	14.9	5.44	0.60	0	22	Resistente
12	Tetraciclina	15.2	4.96	0.55	0	22	Resistente
13	Estreptomicina	20.12	3.50	0.39	8	27	Sensible
14	Estreptomicina	20.53	3.28	0.36	5	27	Sensible
15	Gentamicina	19.53	1.77	0.19	15	24	Sensible
16	Gentamicina	20.12	2.07	0.23	17	31	Sensible

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla n° 10 podemos ver la diferencia entre las media, desviación estándar, error y valor mínimo y máximo. De la tabla n° 10 podemos inferir que el antibiograma n° 9 que empleó el antibiótico Amoxicilina/Ác. Clavulánico, tiene una media 24.9 mm siendo la más alta del grupo, la mayor desviación estándar se evidenció en el antibiograma n° 11 que empleó el antibiótico Tetraciclina, es decir, que en este grupo de datos se alejan más de la media. Por otro lado, el antibiograma n° 7 que empleó el antibiótico Cloranfenicol mostró mayor error con 0,65 mm.

En la figura n° 1 se puede apreciar que el antibiótico Amoxicilina/Ác. Clavulánico tiene una mayor medias de 24.9 mm y 24.4 mm, seguido del antibiótico Amikacina con medias 22 mm y 21.4 mm; finalmente, en tercer lugar tenemos el antibiótico Ceftazidima con medias de 21.1 mm y 21.4 mm.

Figura 1. Medias del Diámetro del Halo de Inhibición (mm) de la Actividad Antimicrobiana de *E. coli* EPEC frente a los Antibióticos Utilizados

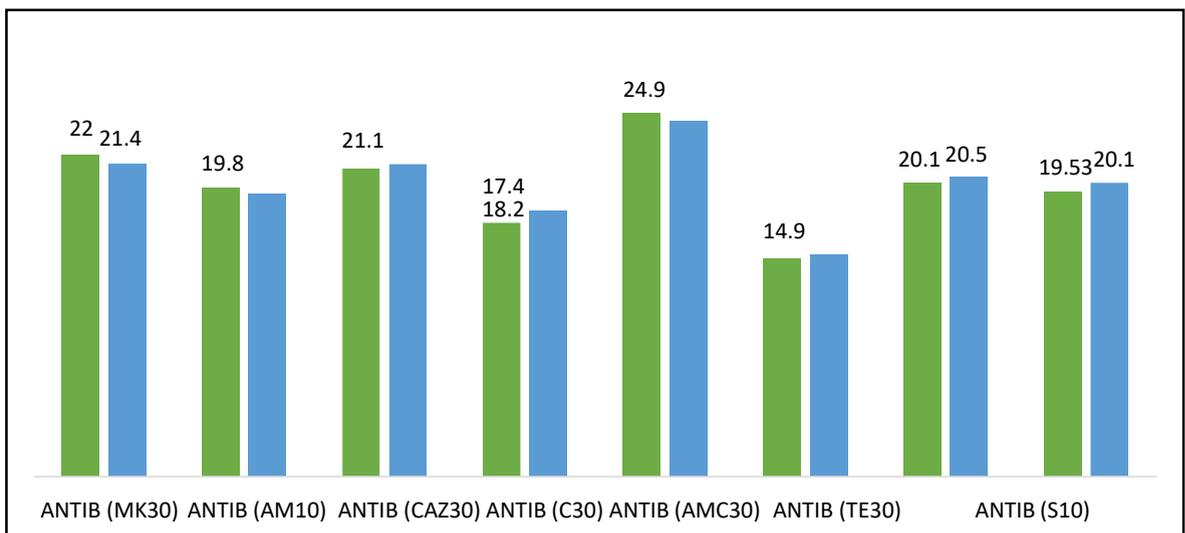
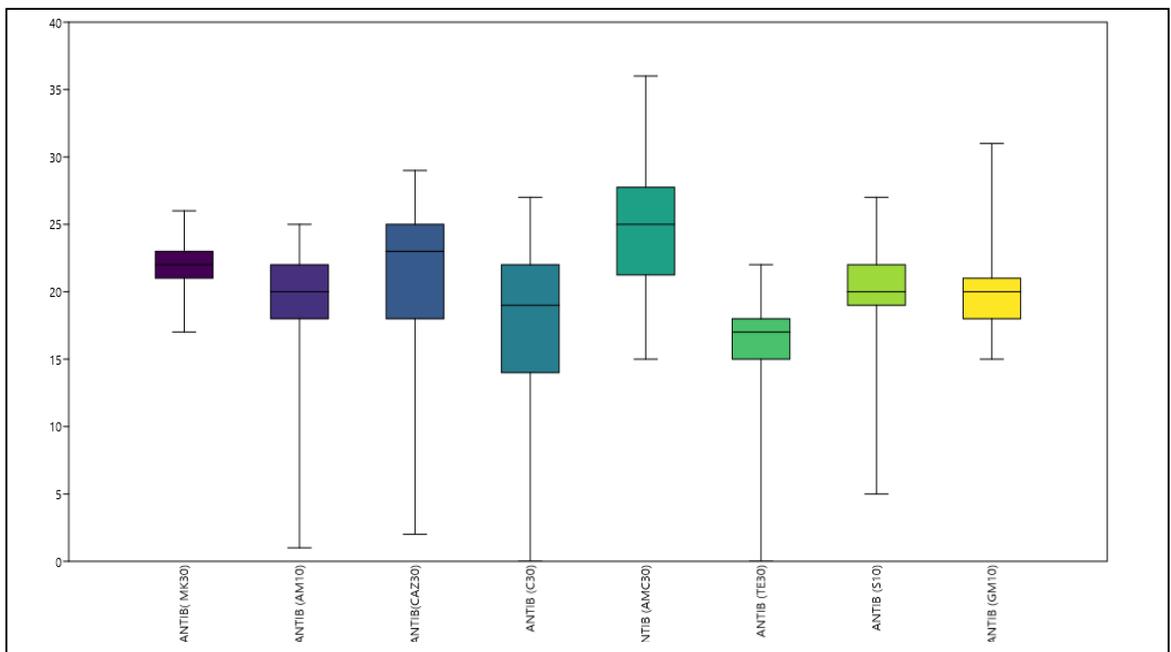


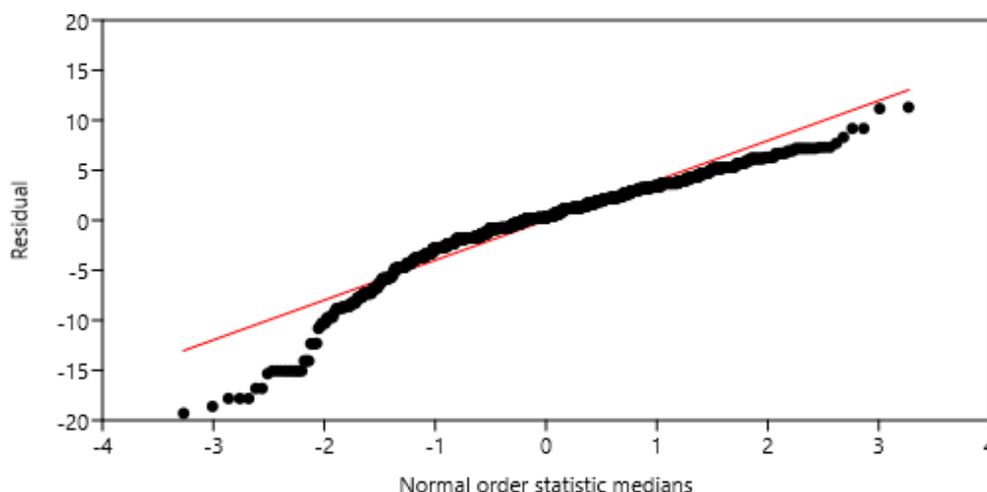
Figura 2. Diagrama de Cajas donde se Compara la Sensibilidad de *E. coli* EPEC frente a los Diversos Antibióticos a los cuales fue Expuesto medido en Longitud del Halo de Inhibición (mm)



La figura n° 2 nos muestra la dispersión de los datos, la línea al centro de la caja muestra la posición de la mediana. Además, el antibiótico Amoxicilina/Ác. Clavulánico tiene mayor rango del halo de inhibición y por el contrario, el antibiótico Amikacina tiene menor rango del halo de inhibición y también tiene menor variabilidad de los datos.

Luego de realizar la estadística descriptiva pasamos a realizar la prueba de distribución normal para conocer si se emplearan estadísticos paramétricos o no paramétricos.

Figura 3. Prueba de Normalidad de Shapiro Wilk realizada a los Datos Obtenidos de la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana con los Diversos Antibióticos Empleados



H_0 : Los datos no presentan una distribución normal con un $\alpha = 0.05$ H_1 : Los datos presenta una distribución normal con un $\alpha = 0.05$

En este caso, si “ α ” es mayor a 0.05 no se rechaza H_0 . Sin embargo, con la prueba de normalidad de Shapiro Wilk realizada con los datos obtenidos, se obtuvo un $\alpha = 0.00$ por lo tanto, los datos obtenidos en el presente trabajo de investigación no presentan una distribución normal.

Debido a que los datos no presentaron tener una distribución normal, se emplearon estadísticos no paramétricos, por ende, para el análisis de varianza se utilizó la prueba de Kruskal Wallis, para lo cual se postularon las siguientes hipótesis:

H_0 : Las medianas de los halos de inhibición de los antibióticos son iguales.

H_1 : Las medianas de los halos de inhibición de los antibióticos no son iguales. Al menos un par de grupos tienen medianas diferentes.

Al obtener un " α " con valor de 0.00, se rechazó la hipótesis nula, por lo tanto, existe diferencia significativa entre los tratamientos.

Por otro lado, para identificar las diferencias entre los distintos tratamientos con diversos antibióticos, se realizó la prueba estadística no paramétrica de Mann Whitney Pairwise en el programa estadístico Past Versión 4.5. Por consiguiente, se evidenció una diferencia significativa entre el tratamiento constituido con el antibiótico Amikacina, respecto del tratamiento constituido por el antibiótico Ceftazidima. Además, se evidenció una diferencia significativa entre el tratamiento con el antibiótico Ampicilina con respecto al tratamiento aplicado con el antibiótico Gentamicina.

V. DISCUSIONES

Martínez, R. & Villalobos, L. (2008) realizaron un ensayo de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *E. coli* aisladas de alimentos y aguas residuales provenientes de la planta de aguas residuales en Cumaná de Venezuela aisladas durante un año entre 2005 y 2006, frente a los antibióticos: cloranfenicol, ampicilina, cefotaxime, ceftazidime, piperacilina, gentamicina, tobramicina, ácido nalidixico, levofl oxacina, ciprofl oxacina, trimetoprim-sulfametoxazol y tetraciclina. Se evidenció que las cepas de *E. coli* aisladas a partir de alimentos, poseían mayor resistencia a antibióticos que las cepas de *E. coli* aisladas de aguas residuales. Además, se evidenció una resistencia del 30% al 9% de los 12 antibióticos expuestos, mostrando una mayor resistencia al antibiótico ampicilina con una resistencia del 20% de parte de cepas de *E. coli* aisladas de alimentos y una resistencia del 22% por parte de cepas de *E. coli* aisladas de aguas residuales. Por lo tanto, las cepas de *E. coli* aisladas de las aguas residuales de la planta de tratamiento demostraron poseer menor resistencia a antibióticos debido a que esta planta de tratamiento de agua no recibe descargas de aguas de producción agrícola, clínica, veterinaria o de poblaciones aledañas, solo las originadas por el sector industrial donde ella opera, lo que explicaría que las cepas ambientales recolectadas no habrían tenido hasta el momento intercambio ni contacto con cepas de otros orígenes, como cepas de importancia médica provenientes de aguas residuales de clínicas que posean resistencia a diversos antibióticos y fármacos en general. Por el contrario, en el presente trabajo de investigación se analizaron sólo muestras de agua residuales provenientes de diversas PTAR's de Lima y Callao, no se analizaron muestras de alimentos. Además, en el presente trabajo de investigación se obtuvo una mayor inhibición a las colonias de *E. coli* (EPEC) con el antibiótico amoxicilina/ác. clavulánico y no con el antibiótico ampicilina, con el cual Martínez, R. & Villalobos, L. obtuvieron mayor índice de inhibición.

Asimismo, López, O. *et al.* (2009) colectaron 51 muestras de agua de canales de riego del valle agrícola de Culiacán en Sinaloa y 23 muestras de suelo agrícola provenientes del valle

agrícola de la misma ciudad mexicana. Para lo cual, aislaron cepas de *Salmonella* provenientes de las muestras de agua en agar de soya y tripticaseína (TSA) y de muestras de suelo con el caldo de enriquecimiento Rappaport Vassiliadis. Además, sólo se pudieron aislar cepas de *E. coli* de las muestras de agua con el método de filtración por membrana, descrita en el Compendio de Métodos Estándar para el Análisis de Agua y Agua Residual (APHA, 1999), para luego añadir las muestras de agua en caldo de soya y tripticaseína (TSB) para luego incubar las bacterias a 37 °C por 24 h, sin embargo, no fue posible aislar cepas de *E. coli* a partir de muestras de suelo. Así, la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó con los siguientes antibióticos: ampicilina, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, estreptomina y gentamicina. Por consiguiente, de las 20 cepas de *Salmonella* aisladas, 60 % presentaron resistencia a tetraciclina y sólo una cepa de *Salmonella* presentó resistencia intermedia a estreptomina. Por otro lado, se aislaron 46 cepas de *E. coli* se les evaluó la susceptibilidad antimicrobiana, observándose que un 19.5 % de las cepas fueron resistentes a tetraciclina, un 82.6 % de las cepas fueron resistentes a estreptomina y un 2.1 % de las cepas presentó resistencia a gentamicina. Por el contrario, en el presente trabajo de investigación se obtuvo que la única cepa de *E. coli* (EPEC) aislada de las aguas residuales de las PTAR's de Lima y Callao tuvieron mayor resistencia al antibiótico tetraciclina.

Por otro lado, Bolaños, D. & Mora, L. (2015) evaluaron la resistencia de *E. coli* presente en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E de Bogotá con respecto a los antibióticos: ceftriaxona, amikacina y oxacilina, para lo se realizó la evaluación de la presencia de resistencia bacteriana en el agua residual del Hospital de Suba aplicando el método de difusión de Kirby – Bauer y el método de dilución en dos muestras de agua residual del ducto de salida del tanque de almacenamiento del Hospital de Suba II Nivel E.S.E (antes de la PTAR) y dos muestras de agua en la caída del vertimiento del agua (después de la PTAR). Por lo cual, se observó que las cepas de *E. coli* presentaron una resistencia múltiple a los antibióticos estudiados, observando una mayor resistencia por parte del agua residual después de la PTAR, ya que los halos de inhibición fueron de menor

tamaño. Se obtuvo también resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), en el caso de la amikacina, se obtuvo una CMI de 250 $\mu\text{g/ml}$ para las muestras de agua residuales antes y después de la PTAR, por el contrario, para la ceftriaxona para las muestras de agua residuales después de la PTAR, en las cuales las bacterias aisladas aumentaron en un orden de magnitud de 33 $\mu\text{g/ml}$ pasando a 333 $\mu\text{g/ml}$. Además, se evidenció que un resultado similar con el antibiótico oxacilina para las muestras de agua residuales antes de la PTAR con una CMI de 3330 $\mu\text{g/ml}$ y con respecto a las muestras de agua residuales después de la PTAR con 33300 $\mu\text{g/ml}$. No obstante, en el presente trabajo de investigación se emplearon muestras de agua no antes ni después del vertimiento de aguas en la PTAR, si no en áreas dentro de la PTAR's de Lima y Callao. Además, en el presente trabajo de investigación, se obtuvo que el antibiótico amikacina estuvo como el tercer antibiótico con mayor inhibición, lo cual refuta los resultados obtenidos por Bolaños,

D. & Mora, L., quienes obtuvieron que la amikacina no tenía una buena capacidad inhibitoria y por el contrario, las cepas de *E. coli* aisladas tenían más resistencia ese antibiótico. Asimismo, en el presente trabajo de investigación no se halló la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antibióticos empleados en la investigación.

Ayodeij, A. *et al.* (2020) aislaron cepas de *E. coli* de muestras de agua provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Durban en Sudáfrica, el cual recibe efluentes municipales, industriales y hospitalarios, las cuales fueron enfrentadas a los antibióticos cefotaxima, colistina y gentamicina mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Por consiguiente, Ayodeij, A. *et al.* aislaron 23,3% de cepas pertenecientes a *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), 46,7% de cepas de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y ninguna cepa de *E. coli* enteropatógena (EPEC). Así, de las 75 cepas de *E. coli* aisladas, 51 cepas fueron resistentes a cefotaxima, 36 cepas resistentes a colistina y 48 cepas resistentes a gentamicina. Además, 35,3% de los genes resistentes al antibiótico cefotaxima (CREC) aislados de *E. coli* mostraron resistencia al antibiótico amoxicilina – ácido clavulánico, 36% a la colistina sulfato, 47% al ciprofloxacino, 87,5% a la gentamicina y 11,8% tuvieron

resistencia intermedia a meropenem. Por el contrario, en el presente trabajo de investigación, la única cepa que se evaluó perteneció a *E. coli* enteropatógena (EPEC), obteniéndose mayor resistencia a los antibióticos tetraciclina y cloranfenicol y menor resistencia o mayor inhibición a los antibióticos amoxicilina-ácido clavulánico y amikacina.

VI. CONCLUSIONES

- Se aisló una cepa de *E. coli* EPEC de las muestras de aguas residuales de los PTAR evaluados, debido a su inadecuado tratamiento y posterior disposición que constituyen uno de los problemas de salud pública más importantes en el Perú en la actualidad.
- *E. coli* EPEC evidenció ser sensible frente al antibiótico Amoxicilina/Ác. Clavulánico, ya que se obtuvieron radios del halo de inhibición de mayor tamaño (mm), partiendo desde donde está el disco del antibiótico hasta donde se inhibió el crecimiento (mm) en la exposición con dicho tratamiento, debido a la combinación de amoxicilina y ácido clavulánico, donde su nivel de acción de uno es detener el crecimiento bacteriano mientras que el otro inhibe la destrucción de la amoxicilina respectivamente.
- *E. coli* EPEC demostró mayor sensibilidad frente al antibiótico Amoxicilina/Ácido Clavulánico donde el radio del halo de inhibición fue mayor en comparación a los demás antibióticos utilizados, por lo que esto permitirá destacar la importancia sanitaria de la prevención sobre la distribución de *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC), ya que es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como alta prioridad por sus tasas de mortalidad y morbilidad significativas.
- Se observaron también diferencias significativas entre los tamaños del radio del halo de inhibición (mm), obtenidos en la prueba de sensibilidad antimicrobiana con los antibióticos Amikacina y Ceftazidima y Ampicilina y Gentamicina.

VII. RECOMENDACIONES

Realizar el ensayo de resistencia bacteriana y la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar con los antibióticos evaluados amicacina, ampicilina, ceftazidima, cloranfenicol, amoxicilina-ácido clavulánico, tetraciclina, estreptomina y gentamicina frente a otras bacterias enteropatógenas de importancia médica, tales como: *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp*, *Serratia sp*, *Proteus sp*, *Listeria sp*, etc.

Asimismo, realizar el ensayo de resistencia bacteriana con los antibióticos empleados en el presente trabajo de investigación frente a las bacterias *E. coli* de las categorías de interés importancia médica: *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de Adhesión Difusa (DAEC).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abejew, A.; Denboba, A. & Mekonnen, A. (2014). *Prevalence and Antibiotic Resistance Pattern of Urinary Tract Bacterial Infections in Dessie area, North East Ethiopia*. BMC Research Notes. Vol. 7(687): 1 – 7.
- Alikhani, M.; Hashemi, S.; Aslani, M. & Farajnia, S. (2013). *Prevalence and Antibiotic Resistance Patterns of Diarrheogenic Escherichia coli Isolated from Adolescents and Adults in Hamedan, Western Iran*. *Iran Journal of Microbiology*. Vol. 5(1): 42 – 47.
- American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. (2017). *Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23ava Edición.
- Ayodeji, A.; Ezinne, C.; Ayobami, O.; Stenström, T. A. & Ifeanyi, A. (2020). *Antibiogram and Beta-lactamase Genes Among Cefotaxime Resistant E. coli from Wastewater Treatment Plant*. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. Vol. 9(46): 1 – 12.
- Bianchi, V.; Varela, P.; Flores, D. & Durando, P. (2014). *Evaluación de Escherichia coli Resistente a Antibióticos como Especie Bioindicadora de Contaminación Fecal en Agua y Peces en la Cuenca Inferior del Río San Juan*. *Revista Natura Neotropicalis*. Vol. 1(45): 45-69.
- Benvenuto, V. (2017). *Determinación de Escherichia coli Enteropatógena (ECEP) en Agua de Mar del Circuito de Playas de la Costa Verde*. (Tesis de Pregrado). Universidad Ricardo Palma.
- Bolaños, D. & Mora, L. (2015). *Evaluación de la Resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y Oxacilina en Escherichia coli Presente en Vertimientos de Agua Residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E. en Bogotá*. (Tesis de Pregrado). Universidad Santo Tomas.
- Boovaragamoorthy, G.; Anbazhagan, M.; Piruthiviraj, P.; Pugazhendhi, A.; Kumar, S. Al – Dhabhi, N. Ghilan, A.; Arasu, M. & Kaliannana, T. (2019). *Clinically Important Microbial Diversity and Its Antibiotic Resistancepattern Towards Various Drugs*.

Journal of Infection and Public Health. Vol. 12(6): 783– 788.

Canizalez, A.; Gonzalez, E.; Vidal, J.; Flores, H. & León, N. (2013). *Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of Diarrheagenic Escherichia coli Strains Isolated from Food Items in Northwestern Mexico*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 164: 36 – 45.

Carroll, K.; Hobden, J.; Miller, S.; Morse, S.; Mietzner, T.; Detrick, B.; Mitchell, T.; McKerrow, J. & Sakanari, J. (2016). *Medical Microbiology*. Editorial McGraw Hill. 27ava Edición. 867 pp.

Coila, G. (2017). *Resistencia a Antibióticos y a Metales Pesados en Bacterias Coliformes Aisladas de la Laguna de Oxidación Espinar de la Ciudad de Puno*. (Tesis de Pregrado). Repositorio Institucional de la Universidad Nacional del Altiplano. UNA – Puno. 71 pp.

Coll, C.; Bier, R.; Li, Z.; Langenheder, S.; Gorokhova, E. & Sobek, A. (2020). *Association between Aquatic Micropollutant Dissipation and River Sediment Bacterial Communities*. Environmental Science and Technology. Vol. 54(22): 14380 – 14392.

Collacci, A. (2018). *La Situación de las Aguas Residuales en Lima*. Recuperado de: <https://www.pucp.edu.pe/climadecambios/noticias/la-situacion-de-las-aguas-residuales-en-lima/>

Chandran, A.; Hatha, A.; Varghese, S. & Sheeja, M. (2008). *Prevalence of Multiple Drug Resistance Escherichia coli Serotypes in a Tropical Estuary, India*. Microbes and Environments. Vol. 23(2): 153 – 158.

Chiriboga, I. (2019). *Bacterias Resistentes a Antibióticos en Estaciones Depuradoras de Agua Residual*. (Tesis de Posgrado). Universidad de Alcalá.

Dalahmeh, S. & Baresel, C. (2014). *Reclaimed Wastewater Use Alternatives and Quality Standards From Global to Country Perspective: Spain versus Abu Dhabi Emirate*. IVL Swedish Environmental Research Institute. 1 – 34.

- Davies, J. & Davies, D. (2010). *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 74(3): 417 – 433.
- D’Costa, V.; King, C.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding, B.; Poinar & Wright, G. (2011). *Antibiotic Resistance is Ancient*. Nature. Vol 477: 457 – 461.
- Decreto Supremo N° 003 – 20170 – MINAM. (2010). *Aprueba Límites Máximos Permisibles para los Efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales*. Diario Oficial “El Peruano”. 1 – 2.
- Decreto Supremo N° 004 – 2017 – MINAM. (2017). *Aprueban Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y Establecen Disposiciones Complementarias*. Diario Oficial “El Peruano”. 10 – 19.
- Eltai, N.; Al Thani, A.; Hadidi, S.; Al Ansari, K. & Yassine, H. (2020). *Antibiotic Resistance and Virulence Patterns of Pathogenic Escherichia coli Strains Associated with Acute Gastroenteritis Among Children in Qatar*. BMC Microbiology. Vol 20(54): 1 – 12.
- Fernández, A.; García, C.; Saéz, J. & Valdezate, S. (2010). *Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología*. Procedimientos en Microbiología Clínica. Vol. 29(8):601 – 608.
- Fernández, F.; López, J.; Ponce, L. & Machado, C. (2003). *Resistencia Bacteriana*. Revista Cubana de Medicina Militar, 32(1).
- Galván, F.; Agapito, J.; Bravo, N.; L, J. & Tamariz, J. (2016). *Caracterización Fenotípica y Molecular de Escherichia coli Productoras de β -Lactamasas de Espectro Extendido en Pacientes Ambulatorios de Lima, Perú*. Revista Médica Herediana 27(1): 22-29.
- Gao, P.; Munir, M. & Xagorarakis, I. (2012). *Correlation of Tetracycline and Sulfonamide Antibiotics with Corresponding Resistance Genes and Resistant Bacteria in a Conventional Municipal Wastewater Treatment Plant*. Science of Total Environment.

Vol. 421: 173 – 183.

- Hatha, M.; Vivekanandhan, A.; Joice, J. & Christol, G. (2005). *Antibiotic Resistance Pattern of Motile Aeromonads from Farm Raised Fresh Water Fish*. International Journal of Food Microbiology. Vol. 98: 131 – 134.
- Karkman, A.; Do, T.; Walsh, F. & Virta, M. (2018). *Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water*. Trends in Microbiology. Vol. 26(3): 220 – 228.
- LaPara, T.; Burch, T.; McNamara, P.; Tan, D.; Yan, M. & Eichmiller, J. (2011). *Tertiary-Treated Municipal Wastewater is a Significant Point Source of Antibiotic Resistance Genes into Duluth-Superior Harbor*. Environmental Science and Technology. Vol. 45: 9543 – 9549.
- López, O.; León, J.; Jiménez, M. & Chaidez, C. (2009). *Detección y Resistencia a Antibióticos de Escherichia coli y Salmonella sp. en Agua y Suelo Agrícola*. Revista Fitotecnia mexicana, 32(2), 119-126.
- Lluque, A.; Mercado, E.; Riveros, M.; Alvarado, L.; Carlos, E.; Colichón, A.; Salazar, E. & Ochoa, T. (2010). *Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para Escherichia Coli Enteropatógena (EPEC)*. Revista de Gastroenterología del Perú. Vol. 30(2):121-125.
- McGowan, J. (1994). *Do Intensive Hospital Antibiotic Control Programs Prevent the Spread of Antibiotic Resistance?* Infection Control and Hospital Epidemiology. Vol. 15(7): 477 – 483.
- Mao, D.; Yu, S.; Rysz, M.; Luo, Y.; Yang, F.; Li, F.; Hou, J.; Mu, Q. & Alvarez, J. (2015). *Prevalence and Proliferation of Antibiotic Resistance Genes in Two Municipal Wastewater Treatment Plants*. Water Research. Vol. 85(15): 458 – 466.
- Marti, E.; Jofre, J. & Balcazar, J. (2013). *Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Composition in a River Influenced by a Wastewater Treatment Plant*. Plos One. Vol. 8(10): 1 – 8.

- Martínez, E. & Villalobos, L. (2008). *Susceptibilidad Antimicrobiana de Cepas de Escherichia coli Aisladas de Alimentos y Aguas Residuales en Cumaná, Venezuela*. SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente 20.2: 172-176.
- Mejía, C. (2018). *El Nuevo Régimen de Vertimiento de Aguas Residuales Tratadas en el Perú*. Recuperado de: <https://www.servindi.org/actualidad-noticias/13/07/2018/el-nuevo-regimen-de-vertimiento-de-aguas-residuales-tratadas-en-el>
- Millán, Y.; Hernández, E. Millán, B. & Araque, M. (2014). *Distribución de grupos Filogenéticos y Factores de Virulencia en Cepas de Escherichia coli Uropatógena Productora de β -lactamasa CTX-M-15 Aisladas de Pacientes de la Comunidad en Mérida, Venezuela*. Revista Argentina de Microbiología. Vol. 46(3):175-181.
- Ministerio del Ambiente (MINAM). (2015). *ESDA: Estudio de Desempeño Ambiental 2003 – 2013*.
- Morejón, M. (2013). *Betalactamasas de Espectro Extendido*. Revista Cubana de Medicina. Vol. 52(4): 272-280.
- Munita, J. & Arias, C. (2016). *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. Microbiol Spectrum. Vol 4(2): 481 – 511.
- Muñoz, A.; Pucci, O. & Pucci, G. (2014). *Cepas Bacterianas Resistentes a Ampicilina, Cefotaxima, Ceftazidima, Clindamicina, Gentamicina, Imipenem, Meropenem y Vancomicina, Aisladas de Agua de Mar en la Ciudad de Comodoro Rivadavia (Argentina)*. Higiene y Salud Ambiental. Vol.14 (4):1253-1257.
- Navarro, M. (2007). *Determinación de Escherichia coli y Coliformes Totales en Agua por el Método de Filtración por Membrana en Agar Chromocult*. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. 1 – 17.
- Nguyeng, T.; Le, P.; Le, C. & Weintraub, A. (2005). *Antibiotic Resistance in Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella Strains Isolated from Children in Hanoi, Vietnam*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 49(2): 816 – 819.

Nuñez, L.; Tornello, C.; Puentes, N. & Moretton, J. (2012). *Bacterias Resistentes a Antibióticos en Aguas Grises como Agentes de Riesgo Sanitario*. Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science. Vol. 7(1), 235-243.

Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA). (2014). *Fiscalización Ambiental en Aguas Residuales*. 1 – 42.

Organización Mundial de la Salud. (2018). *Resistencia a los antibióticos*. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

Organización Panamericana de la Salud. (2003). *Reunión Anual Regional de los Países Participantes en la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos*. Asunción, Paraguay.

Parnanen, K.; Narciso, C.; Berendonk, T.; Cacace, D.; Thuy, T.; Elpers, C.; Fatta-Kassinos, D.; Henriques, I.; Jaeger, T.; Karkman, A.; Martínez, J.; Michael, S.; Michael-Kordatou, I.; O’Sullivan, K.; Rodríguez, S.; Schwartz, T.; Sheng, H.; Sorum, H.; Stedfeld, R.; Tiedje, J.; Della, S.; Walsh, F.; Vaz- Moreira, I.; Virta, M. & Manaia, C. (2019). *Antibiotic Resistance in European Wastewater Treatmentplants Mirrors the Pattern of Clinical Antibiotic Resistance Prevalence*. Revista Sciences Advance. Vol. 5: 1 – 10.

Pazda, M.; Kumirska, J.; Stepnowski, P. & Mulkiewicz, E. (2019). *Antibiotic Resistance Genes Identified in Wastewater Treatment Plant Systems – A Review*. Science of Total Environment. Vol. 697: 1- 21.

Pérez, J. (2019). *Infecciones Sintomáticas por Escherichia coli Enterotoxigénica en Niños ≤ 5 años de León y su Correlación con los Fenotipos Lewis y Secretor*. (Tesis de Posgrado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.

Presiner, M.; Neverova-Dzipak, E. & Kowalewski, Z. (2020). *An Analytical Review of Different Approaches to Wastewater Discharge Standards with Particular Emphasis*

on Nutrients. Environmental Management. Vol. 66: 694 – 708.

- Ramos, L.; Vidal, L.; Vilardy, S. & Saavedra, L. (2008). *Análisis de la Contaminación Microbiológica (Coliformes Totales y Fecales) en la Bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano*. Acta Biológica Colombiana. Vol. 13(3): 87 – 98.
- Rehman, M.; Rashid, M.; Sheikh, J. & Bhat, M. 2014. *Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance Pattern of Enteropathogenic Escherichia coli Isolated from Bovines and Their Handlers in Jammu, India*. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research. Vol. 1(4): 177 – 181.
- Rivera, J. & Cedillo, L. (2005). *Evaluación de la Resistencia a Antibióticos en Enterobacterias Aisladas de Aguas Contaminadas*. Revista Biomédica, 16(2),151-152.
- Rocha, C.; Reynolds, N. & Simons, M. (2015). *Resistencia Emergente a los Antibióticos: Una Amenaza Global y un Problema Crítico en el Cuidado de la Salud*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. Vol. 32(1):139-45.
- Saleem, M. (2007). *Pharmaceutical Wastewater Treatment: A Physicochemical Study*. Journal of Research. Vol. 18(2): 125 – 134.
- Sánchez, M. (2017). *Las aguas Residuales en Perú. Realidad al 2017*. Recuperado de <https://www.iagua.es/blogs/maria-sanchez-montes/aguas-residuales-peru-costo-improvisacion>
- Seidman, J.; Johnson, L.; Levens, J.; Mkocho, H.; Muñoz, B.; Silbergeld, E.; West, S & Coles, C. (2016). *Longitudinal Comparison of Antibiotic Resistance in Diarrheagenic and Non-pathogenic Escherichia coli from Young Tanzanian Children*. Frontiers in Microbiology. Vol. 7: 1 – 8.
- Sharada, R.; Ruban, W.; Thiyageeswaran, M. (2010). *Isolation, Characterization and Antibiotic Resistance Pattern of Escherichia coli Isolated from Poultry*. American – Eurasian Journal of Scientific Research. Vol. 5(1): 18 – 22.
- Stachler, E.; Crank, K. & Bibby, K. (2019). *Co-Occurrence of crAssphage with Antibiotic*

Resistance Genes in an Impacted Urban Watershed. Environmental Science and Technology. Vol. 6(4): 216 – 221.

Subramanian, K.; Selvakkumar, C.; Vinaykumar, K.; Goswami, N.; Meenakshisundaram, S.; Balakrishnan, A. & Lakshmi, B. (2009). *Tackling Multiple Antibiotic Resistance in Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Clinical Isolates: a Diarylheptanoid from Alpinia Officinarum Shows Promising Antibacterial and Immunomodulatory Activity Against EPEC and its Lipopolysaccharide-induced Inflammation*. International Journal of Antimicrobial Agents. Vol. 33: 244 – 250.

Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS). (2008). *Diagnóstico Situacional de los Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales en las EPS del Perú y Propuestas de Solución*.

Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS). (2015). *Diagnóstico de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en el Ámbito de Operación de las Entidades Prestadoras de Servicios de Saneamiento*.

Thakur, N.; Jain, S.; Changotra, H.; Shrivastava, R.; Kumar, Y.; Grover, N. & Vashistt, J. (2017). *Molecular Characterization of Diarrheogenic Escherichia coli Pathotypes: Association of Virulent Genes, Serogroups, and Antibiotic Resistance Among Moderate-to- Severe Diarrhea Patients*. Journal of Clinical Laboratory Analysis. Vol. 1(26): 1 – 11.

Vidal, J. (2003). *Escherichia coli enteropatógena (EPEC): Una Causa Frecuente de Diarrea Infantil*. Revista Salud en Tabasco. Vol. 9(1): 188 – 193.

Villena, J. (2018). *Calidad del Agua y Desarrollo Sostenible*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. Vol. 35(2): 304 – 308.

Vinueza, A.; Mejía, A.; Romero, E.; Socola, R. & Toro, Y. (2019). *Resistencia Antibacteriana de Escherichia coli Aislada en Orina en el Hospital General Puyo*. Revista Científica Digital y Arbitrada de la Facultad de Salud Pública dela ESPOCH - Escuela Superior

Politécnica de Chimborazo, Ecuador. Vol. 10(2):44 – 50.

Volkman, H.; Schwartz, T.; Bischoff, P.; Kirchen, S. & Obst, U. (2003). *Detection of Clinically Relevant Antibiotic-resistance Genes in Municipal Wastewater Using Real-time PCR (TaqMan)*. Journal of Microbiological Methods. Vol. 56: 277 – 286.

Von Spearling, M. & de Lemos Chernicharo, C. (2002). *Urban Wastewater Treatment Technologies and the Implementation of Discharge Standards in Developing Countries*. Urban Water. Vol. 4: 105 – 114.

Zhang, X.; Zhang, T. & Fang, H. (2009). *Antibiotic Resistance Genes in Water Environment*. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 82: 397 – 414.

Zhou, Y.; Zhu, X.; Hou, H.; Lu, Y.; Yu, J.; Mao, L.; Mao, L. & Sun, Z. (2018). *Characteristics of Diarrheagenic Escherichia coli Among Children Under 5 Years of Age with Acute Diarrhea: A Hospital Based Study*. BMC Infectious Diseases. Vol.

IX. ANEXOS



Figura 4. Muestras de aguas residuales de diversas plantas de tratamiento de aguas de Lima y Callao.



Figura 5. Análisis de una muestra de agua residual desde la dilución inicial de 10ml en tubos de 20 x 150 de doble concentración (2X) hasta la dilución 10^{-5} en tubos de 16 x150 de simple concentración (X)



Figura 6. Inoculación de muestra de agua residual a un tubo de ensayo con medio “Lauril triptosa” con púrpura de bromocresol.



Figura 7. Realización de la técnica “Número Más Probable” (NMP) con tubos de ensayo con medio “Lauril triptosa” con púrpura de bromocresol.



Figura 8. Lectura de un tubo de ensayo a las 24+/-2 ; 48+/-3 horas de incubación a 35+/-0.5 T°C, positivo a *E. coli* por el cambio de medio a color amarillo por la acidez generada por el metabolismo de la bacteria y por presentar burbujas y turbidez.

Figura 9. Evaluación de tubos de ensayo con medio “Lauril triptosa” para identificar



presencia de burbujas, cambio de color del medio o turbidez.

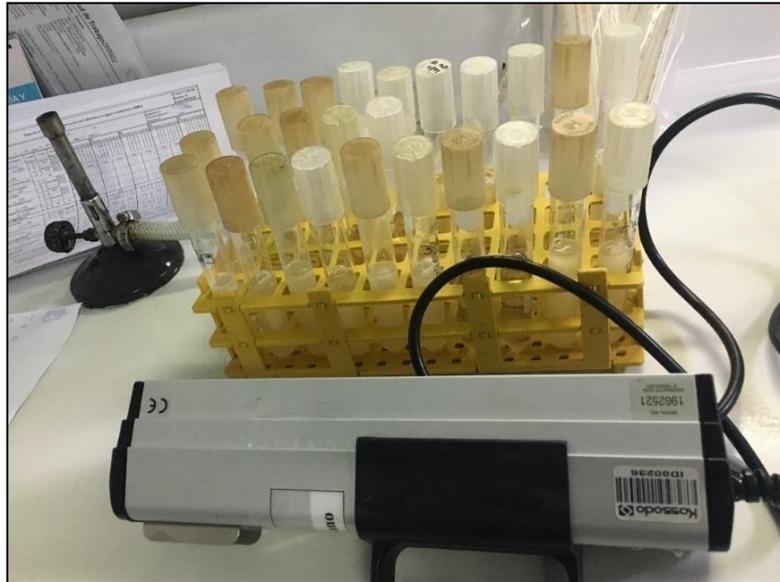


Figura 10. Batería de tubos de ensayo con el medio “EC - MUG” y muestra de agua residual los cuales permitirán identificar e identificar cepas de *E. coli* enteropatógena.

Figura 11. Análisis de presencia de fluorescencia en cepas aisladas en la cámara UV.



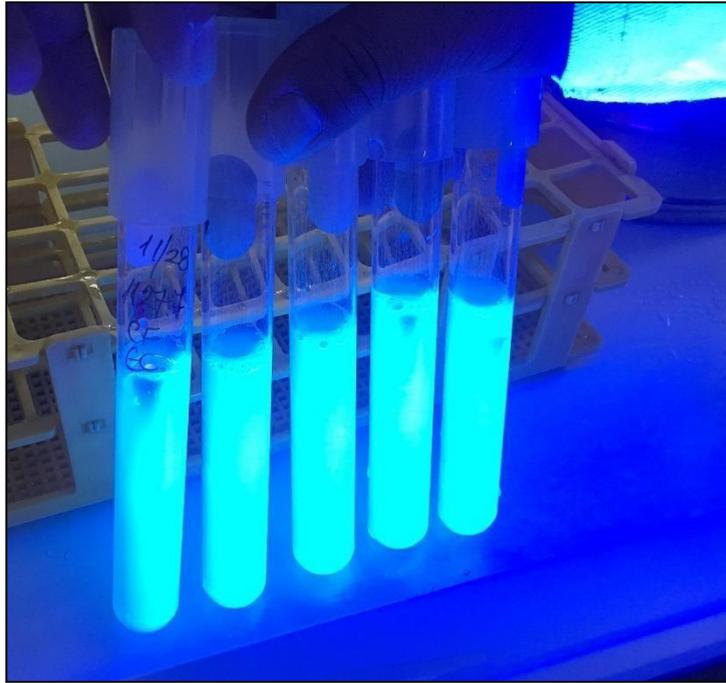
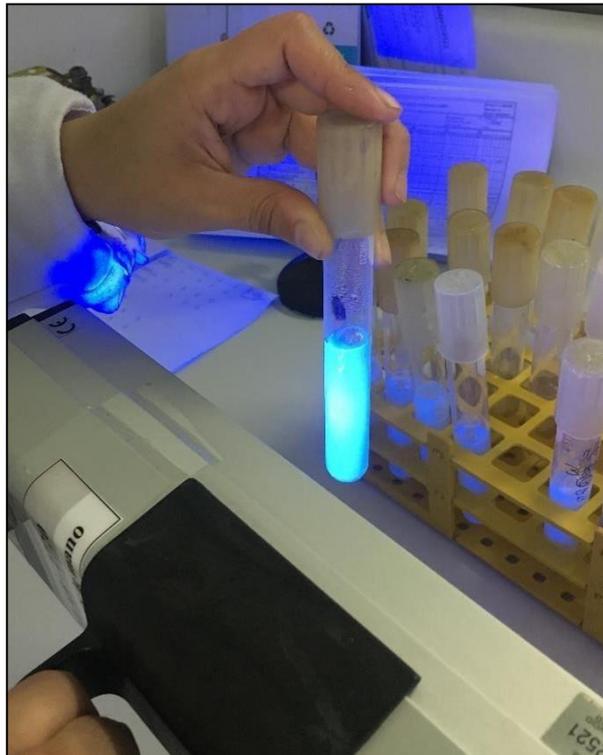


Figura 12. Presencia de fluorescencia en cepas aisladas de *E. coli*.

Figura 13. Tubo de ensayo con cepa de *E. coli* enteropatógena (EPEC) lo cual se



comprobó al dar fluorescencia.



Figura 14. Lectura de las placas de TBX con colonias puras aisladas de *E. coli* enteropatógena (EPEC).

Figura 15. Proceso de preparación y esterilización del Agar Muller Hinton (MH)





Figura 16. Materiales de trabajo



Figura 17. Preparación y esterilización del caldo BHI para la activación de las cepas *E coli.*

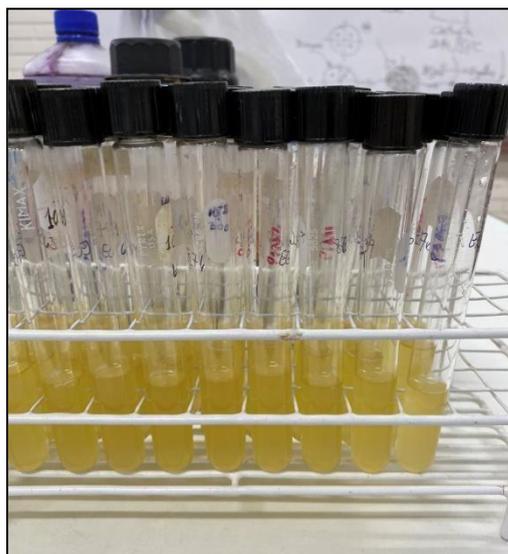


Figura 18. Tubos con caldo BHI con cepas *E coli.* reactivadas después de 24 horas de

incubación.



Figura 19. Plaqueo del medio Agar Muller Hinton (MH) en placas petri estériles de 16 x100 mm.



Figura 20. Con ayuda de un hisopo estéril, se estrió la cepa en toda la superficie de la placapetri con medio Agar Muller Hinton (MH).



Figura 21. Se colocaron los discos con antibióticos con pinzas planas estériles en la superficie del agar inoculado.



Figura 22. Incubación de las placas a 35°C por 16 a 18 horas



Figura 23. Distribución de los discos de antibióticos manteniendo una distancia de 25 mmuno del otro en la placa de agar MH antes de la incubación.



Figura 24.. Lectura de las placas posterior a la incubación donde se muestra
crecimiento del halo de inhibición.

Kruskal-Wallis test for equal medians	
$H(ch^2)$:	411.2
H_C (tie corrected):	414
p (same):	2.411E-85
There is a significant difference between sample medians	

Figura 25. Análisis de la varianza Kruskal-Wallis, programa PAST vs 4.05. P valor
0.00

	ANTIB (MK30)	ANTIB (AM10)	ANTIB(CAZ30)	ANTIB (C30)	ANTIB (AMC30)	ANTIB (TE30)	ANTIB (S10)	ANTIB (GM10)
ANTIB (MK30)		4.116E-10	0.1431	5.875E-13	7.008E-14	3.668E-48	4.89E-06	4.243E-19
ANTIB (AM10)	4.116E-10		1.785E-06	0.0102	1.532E-23	1.479E-22	0.04215	0.5225
ANTIB(CAZ30)	0.1431	1.785E-06		4.695E-10	1.804E-10	2.963E-24	0.001038	5.247E-07
ANTIB (C30)	5.875E-13	0.0102	4.695E-10		1.189E-26	2.44E-07	3.909E-05	0.01379
ANTIB (AMC30)	7.008E-14	1.532E-23	1.804E-10	1.189E-26		8.619E-43	2.215E-19	1.715E-25
ANTIB (TE30)	3.668E-48	1.479E-22	2.963E-24	2.44E-07	8.619E-43		3.296E-31	1.68E-31
ANTIB (S10)	4.89E-06	0.04215	0.001038	3.909E-05	2.215E-19	3.296E-31		0.001728
ANTIB (GM10)	4.243E-19	0.5225	5.247E-07	0.01379	1.715E-25	1.68E-31	0.001728	

Figura 26. Análisis de la varianza Kruskal-Wallis, programa PAST vs 4.05. P valor
0.00

Evaluación de la resistencia bacteriana de Escherichia coli Enteropatógena (EPEC) de aguas residuales en Lima- Callao en el 2019

INFORME DE ORIGINALIDAD

11 %	%	%	11 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	1 %
2	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1 %
3	Submitted to Universidad Continental Trabajo del estudiante	1 %
4	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	1 %
5	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	1 %
6	Submitted to Universidad Anahuac México Sur Trabajo del estudiante	<1 %
7	Submitted to Universidad de Piura Trabajo del estudiante	<1 %

8	Submitted to Aliat Universidades	<1%
	Trabajo del estudiante	
9	Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD,UNAD	<1%
	Trabajo del estudiante	
10	Submitted to Universidad Catolica De Cuenca	<1%
	Trabajo del estudiante	
11	Submitted to Universidad Privada Antenor Orrego	<1%
	Trabajo del estudiante	
12	Submitted to Universidad Cooperativa de Colombia	<1%
	Trabajo del estudiante	
13	Submitted to SAINT DOMINIC SCHOOL	<1%
	Trabajo del estudiante	
14	Submitted to Universidad Estatal a Distancia	<1%
	Trabajo del estudiante	
15	Submitted to Universidad del Istmo de Panamá	<1%
	Trabajo del estudiante	
16	Submitted to Pontificia Universidad Catolica del Peru	<1%
	Trabajo del estudiante	
17	Submitted to Universidad Wiener	<1%
	Trabajo del estudiante	

18 Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia <1%
Trabajo del estudiante

19 Submitted to Escuela Politecnica Nacional <1%
Trabajo del estudiante

20 Submitted to Universidad Santo Tomas <1%
Trabajo del estudiante

21 Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru <1%
Trabajo del estudiante

22 Submitted to Universidad San Francisco de Quito <1%
Trabajo del estudiante

23 Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León <1%
Trabajo del estudiante

24 Submitted to ipn <1%
Trabajo del estudiante

25 Submitted to Universidad Peruana Los Andes <1%
Trabajo del estudiante

26 Submitted to Universidad Católica San Pablo <1%
Trabajo del estudiante

27 Submitted to unj <1%
Trabajo del estudiante

28	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA	<1%
	Trabajo del estudiante	
29	Submitted to Submitted on 1689129411751	<1%
	Trabajo del estudiante	
30	Submitted to Unviersidad de Granada	<1%
	Trabajo del estudiante	
31	Submitted to Universidad EAFIT	<1%
	Trabajo del estudiante	
32	Submitted to Universidad Andina Nestor Caceres Velasquez	<1%
	Trabajo del estudiante	
33	Submitted to Universidad Nacional de Trujillo	<1%
	Trabajo del estudiante	
34	Submitted to Universidad de Murcia	<1%
	Trabajo del estudiante	
35	Submitted to Universidad de la Rioja	<1%
	Trabajo del estudiante	
36	Submitted to Chungnam National University	<1%
	Trabajo del estudiante	
37	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia	<1%
	Trabajo del estudiante	
38	Submitted to Universidad Tecnologica del Peru	<1%

Trabajo del estudiante

< 1%

39

Submitted to Imperial College of Science,
Technology and Medicine

Trabajo del estudiante

< 1%

10

Submitted to Universidad Alas Peruanas

Trabajo del estudiante

< 1%

41

Submitted to Universidad Privada San Juan
Bautista

Trabajo del estudiante

< 1%

12

Submitted to Napier University

Trabajo del estudiante

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo