

**Universidad de Costa Rica**  
**Sede Rodrigo Facio**  
**Facultad de Microbiología**

**Trabajo final de Graduación para optar por el Grado de Licenciatura  
en Microbiología y Química Clínica**

**Evaluación de un PCR múltiplex para la detección de *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Escherichia coli* enteropatógena, en muestras de aguas, a partir de la técnica de número más probable (NMP)**

**Irene Alvarado Pérez**

**A00192**

**Enero, 2009**



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
VICERRECTORÍA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA  
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el viernes 09 de enero del año 2009 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **IRENE ALVARADO PEREZ**, carné A00192, quien se acoge al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACIÓN**, para optar por el grado académico de **LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA** y el título profesional de **DOCTORA EN MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA CLÍNICA**.

Están presentes los siguientes miembros del tribunal:

Dra. Gabriela Solano Trejos **PRESIDENTA**  
Dr. Javier Mora Rodríguez  
Dra. Lizeth Taylor Castillo  
Dra. María Laura Arias Echandi  
Dr. Norman Rojas Campos

**ARTICULO 1**

La presidenta informa que el expediente de **IRENE ALVARADO PEREZ**, contiene todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que la postulante cumplió con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes, y por lo tanto, se solicita que proceda a hacer la exposición.

**ARTICULO 2**

La postulante **IRENE ALVARADO PEREZ**, hace la exposición oral de su trabajo de graduación titulo "Evaluación de la aplicabilidad de un PCR para la detección de *Escherichia coli* enterotoxigenica(ETEC) y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en muestras de aguas, a partir de la técnica de tubos multiples (NMP)".

### ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la Postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

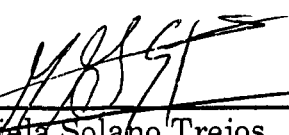
### ARTICULO 4

El tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 92

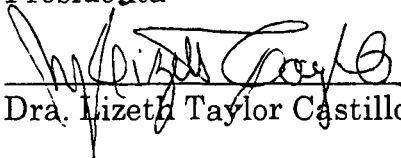
### ARTICULO 5

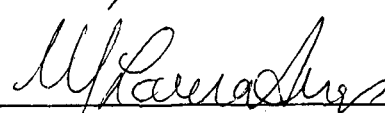
La presidenta del Tribunal comunica a la Postulante el resultado de la deliberación y la declara acreedora al grado de **Licenciada en Microbiología y Química Clínica** y al título profesional de **Doctora en Microbiología y Química Clínica**.

Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación al que será oportunamente convocada. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y la Postulante, a las 2:25 horas.

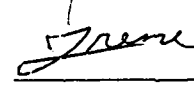
  
\_\_\_\_\_  
Dra. Gabriela Solano Trejos  
Presidenta

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Javier Mora Rodríguez

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Lizeth Taylor Castillo

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Laura Arias Echandi

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Norman Rojas Campos

  
\_\_\_\_\_  
Irene Alvarado Pérez  
Postulante

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo dedicar el presente trabajo a mi madre, Damaris, por estar siempre a mi lado y por su constante ayuda. Agradezco a mi padre, Marco Antonio, y mi hermano por su apoyo y ser una fuente de inspiración. Y un agradecimiento especial a la Dra Ximena Cotes por su persistente guía y sus valiosos aportes en la realización de este trabajo.

# ÍNDICE

<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>4</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>4</b>
<b>JUSTIFICACION</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
GENERALIDADES DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	7
<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATÓGENA (EPEC).....	7
<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC).....	9
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	10
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
1. Detección de EPEC y ETEC a partir de NMP.....	12
2. Detección de EPEC en competencia con <i>Escherichia coli</i> no patógena.....	14
3. Detección de las cepas prototipo de ETEC y prototipo de EPEC en competencia.....	14
4. Implementación de un control interno para la técnica de PCR.....	15
5. Detección de EPEC inoculada en muestras de agua contaminada.....	15
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>28</b>
<b>APÉNDICE 1</b> .....	<b>31</b>
<i>LISTA DE ACRÓNIMOS</i> .....	31
<b>APÉNDICE 2</b> .....	<b>32</b>
<i>AGARES Y CALDOS</i> .....	32
Agar McConkey.....	32
Caldo Trypticasa Soya.....	32
Caldo Lauril Tryptona.....	32
Caldo EC.....	33
<b>APÉNDICE 3</b> .....	<b>34</b>
<i>SOLUCIONES TAMPÓN</i> .....	34
Solución tampón STET.....	34

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la aplicabilidad de un PCR múltiplex para la detección de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) en muestras de aguas superficiales, a partir de la técnica número más probable.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estandarizar un protocolo para la extracción del ADN de *Escherichia coli*, partiendo de la técnica de número más probable.
2. Determinar el límite de detección de ETEC y EPEC a partir de los medios utilizados en la técnica de NMP; caldo lauril triptona y caldo *Escherichia coli*.
3. Establecer el límite de detección de EPEC y ETEC en presencia de cepas no patógenas.
4. Determinar el límite de detección en muestras de aguas residuales inoculadas en el laboratorio.

## JUSTIFICACION

Las variedades de *Escherichia coli* patógenas, tales como la enterotoxigénica (ETEC), la enteropatógena (EPEC), la enterohemorrágica (EHEC) y la enteroinvasiva (EIEC) representan un riesgo importante para la salud humana y han sido relacionadas, en mayor o menor grado, a infecciones por consumo de alimentos o aguas contaminadas. Se ha determinado que el agua de consumo es la principal fuente de microorganismos patógenos en países subdesarrollados (Ashbolt, 2004).

En América Latina y el Caribe, el rotavirus, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella*, *Campylobacter jejuni* y *Cryptosporidium parvum* se encuentran entre los agentes causales, transmitidos por agua, más importantes de las enfermedades diarreicas y la deshidratación. En algunas áreas, *Salmonella* y *E.coli* enteropatógena también se han reportado como agentes importantes (Craun *et al*, 1996).

En un estudio publicado en el año 2003 se encontró a la *E.coli* O157:H7, una de las más importantes representantes del grupo de las *E.coli* enterohemorrágicas (EHEC), en vísceras de pollo y leche no pasteurizada de Costa Rica (Reuben *et al*, 2003). La escasez de investigaciones epidemiológicas impide asegurar la importancia de cepas enteropatógenas de *E.coli* en nuestro país y su relación con aguas de consumo y riego.

Las actuales medidas de calidad microbiana del agua dependen exclusivamente de indicadores de contaminación fecal (por ejemplo, coliformes fecales). Sin embargo, no se ha establecido una correlación entre la prevalencia y concentración de estos indicadores con los patógenos, incluyendo EHEC (Shelton *et al*, 2006). Lo anterior también podría ser aplicado a otras variedades de *E.coli* patógenas.

Además, el desarrollo de una prueba más rápida y menos costosa para la detección de cepas patógenas de *Escherichia coli* permitiría la realización de estudios epidemiológicos y resultaría ventajosa, como prueba complementaria a la de coliformes, para determinar la fuente de un posible brote. La manutención de la calidad microbiológica del agua y la rápida detección de microorganismos patógenos representan desafíos en la ecotoxicología y en el mantenimiento de la salud pública (Maynard *et al*, 2005).

En Costa Rica solo el Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA) lleva a cabo los análisis para la detección de las variedades de *E.coli* patógenas, ya que, al tener que realizarlos utilizando métodos moleculares y en forma separada para cada una de las variedades, el proceso se vuelve costoso y requiere mucho tiempo. Con el

desarrollo de un método que sea capaz de detectar los tipos de *E.coli* patógenas más importantes para nuestro país, tal como un PCR múltiplex, se reducirían los costos y el tiempo de detección, con lo cual se volvería más factible la identificación de estos organismos en aguas de riego y consumo humano.



## INTRODUCCIÓN

### **Generalidades de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es una especie del género *Escherichia*, que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* la cual contiene la mayoría de los bacilos gram negativos móviles (Nataro y Kaper, 1998). Además, *E.coli* es uno de los principales componentes de la flora intestinal normal de humanos y otros mamíferos (Kuhnert *et al*, 2000).

Algunas cepas específicas de *E.coli* son patógenos primarios con potencial para causar enfermedad. Estos patógenos han sido clasificados en dos principales categorías: los patógenos entéricos y los patógenos extraintestinales (Kuhnert, 2000). De este modo las infecciones producto de *E.coli* patógenas pueden estar limitadas a las mucosas superficiales o pueden diseminarse a través del cuerpo. Tres síndromes clínicos generales resultan de la infección con cepas patógenas de *E.coli*: i) infección del tracto urinario, ii) sepsis y meningitis, iii) enfermedad diarreica (Nataro y Kaper, 1998).

Los aislamientos de *E.coli* productora de diarrea se han clasificado en grupos específicos que incluyen la *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* enteropatógena (EPEC), *E.coli* enterotoxigénica (ETEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC), y *E.coli* enteroagregativa (EAEC) según sus factores de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y serotipos definidos por una combinación específica de antígenos O y H (Nataro y Kaper, 1998; Chung *et al*, 2006).

Estudios epidemiológicos realizados en países en vías de desarrollo, incluidos Latinoamérica y México, han demostrado que ETEC y EPEC son dos de los principales patógenos aislados en los casos de diarrea infantil (Vidal *et al*, 2007).

### ***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

*E.coli* enteropatógena se refiere a ciertas cepas a las que se les atribuyó, por primera vez, brotes de diarrea infantil epidémica y esporádica, en estudios epidemiológicos de los años 40's y 50's (Frankel *et al*, 1998).

EPEC produce una abundante diarrea acuosa y los brotes se han asociado al consumo de agua contaminada y productos a base de carne (Feng y Weagant, 2001). Comúnmente, los niños menores de 2 años son los más afectados por este patógeno (Kuhnert, 2000), sin embargo también se han reportado casos en adultos. Se ha estimado que la dosis infectante de EPEC en adultos

sanos es de  $10^6$  organismos, mientras que otros reportan  $10^8$ - $10^{10}$  (Nataro y Kaper, 1998; Feng y Weagant, 2001).

De acuerdo con datos epidemiológicos obtenidos por diversos autores en México, se ha determinado que esta bacteria causa de 17 a 19% de los casos de diarrea infantil en diversas regiones de este país, y se indica que uno de cada cinco niños que enferman de diarrea puede estar infectado con ella (Vidal *et al*, 2007). En otras naciones en vías de desarrollo como Brasil y Chile, la epidemiología de EPEC es similar (Vidal *et al*, 2007). Sin embargo, EPEC continua siendo una bacteria cuya epidemiología ha sido poco estudiada tanto en nuestro país como en otros de América Latina.

La adherencia es un proceso fundamental para la patogénesis de EPEC. Los pelos formadores de penachos o BFP (**bundle forming pilus**, por sus siglas en inglés) permiten que las bacterias se agrupen entre ellas y formen microcolonias (un fenotipo conocido como autoagregación), esto corresponde a la primera fase del proceso patogénico de estas bacterias. Los BFP son pelos o fimbrias de 7 nm de diámetro y 14 a 20  $\mu\text{m}$  de largo, cuya biogénesis requiere 14 genes codificados en el plásmido de virulencia denominado factor de adherencia de EPEC o EAF (*Escherichia coli* adherence factor, por sus siglas en inglés) (Vidal *et al*, 2007). La segunda fase corresponde a la unión de las bacterias a la célula del huésped. La principal característica histopatológica de la infección es una lesión que induce la EPEC en el intestino conocida como la lesión A/E (**attaching and effacement**, adherencia y eliminación) (Vidal *et al*, 2007; Nataro y Kaper, 1998). Las bacterias se adhieren a los enterocitos y permiten la acumulación de la actina del citoesqueleto en la región apical de la célula, hasta formar una estructura de tipo “pedestal” y causar la eliminación de las microvellosidades intestinales (Vidal *et al*, 2007; Nataro y Kaper, 1998). Esta capacidad está relacionada con la posesión de una isla de patogenicidad conocida como locus de eliminación del enterocito o LEE (locus of enterocyte effacement) de 35 kb (Nataro y Kaper, 1998). La posesión de esta isla de patogenicidad está relacionada con la presencia de la secuencia *eae* que codifica por la proteína de membrana externa llamada intimina y que permite un contacto íntimo con el enterocito (Vidal *et al*, 2007 ; Nataro y Kaper, 1998). Los blancos genéticos para identificar EPEC son una secuencia genética del plásmido EAF que se emplea como sonda o la amplificación por PCR de la subunidad estructural de los BFP (*bfpA*) y el gen que codifica a la intimina (*eae*) (Vidal *et al*, 2007; Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas de *E.coli* enteropatógena se clasifican en dos grupos, el tipo I o cepas típicas y el tipo II o cepas atípicas, con base en la presencia o ausencia del plásmido EAF,

respectivamente, y el fenotipo de adherencia. Las cepas típicas (de tipo I) presentan el patrón de adherencia localizada (LA, del inglés *localized adherence*) sobre cultivos de células epiteliales y corresponden a los aislamientos más caracterizados, mientras que las cepas atípicas (o de tipo II) poseen adherencia semejante a la localizada (LAL, por sus siglas en inglés), adherencia difusa o, en algunos casos, adherencia agregativa, y se han asociado a brotes y casos esporádicos de diarrea en seres humanos (Vidal *et al*, 2007; Varela *et al*, 2007). Los grupos atípicos de EPEC son *eae* positivos, *bfp* negativos y están emergiendo como agentes prevalentes de gastroenteritis (Vidal *et al*, 2007; Varela *et al*, 2007).

### ***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

ETEC es la principal causa de diarrea en niños pequeños de países subdesarrollados y en adultos de países industrializados que viajan a esas regiones (diarrea del viajero). La contaminación fecal de alimentos y agua es la principal ruta de infección para el humano y también se ha relacionado con brotes esporádicos en Estados Unidos (Kuhnert, 2000; Feng y Weagant, 2001).

Se ha descubierto que las aguas superficiales en los países subdesarrollados albergan estos organismos y la transmisión puede ocurrir durante el baño o al utilizar el agua para la preparación de alimentos (Qadri *et al*, 2005). La enfermedad se caracteriza por una diarrea acuosa y con poca fiebre o sin ella (Feng y Weagant, 2001). La dosis infectante de ETEC en adultos se ha estimado en al menos  $10^8$  células; sin embargo esta dosis puede ser menor en grupos más susceptibles como niños y ancianos (Feng y Weagant, 2001).

La incidencia de las infecciones por ETEC en países subdesarrollados disminuye después de los 5 años de edad y vuelve a aumentar después de los 15 años y cerca del 15% de la enfermedad por ETEC se da en adultos (Qadri *et al*, 2005). Además los análisis han demostrado que los adultos mayores también son susceptibles a las infecciones por ETEC requiriendo ser hospitalizados (Qadri *et al*, 2005). La razón de porqué las infecciones por ETEC disminuyen después de la infancia y aumentan en los adultos puede deberse a factores ambientales y epidemiológicos (Qadri *et al*, 2005), además de la respuesta inmune de la persona y la aparición de nuevas cepas de ETEC con características diferentes.

ETEC pertenece a una familia heterogénea de *E.coli* fermentadora de lactosa, poseedora de una amplia variedad de tipos antigénicos O, estos producen enterotoxinas, las cuales pueden

ser termolábiles y termoestables, y factores de colonización que permiten el asentamiento en el intestino delgado donde causan diarrea (Qadri *et al*, 2005).

ETEC puede producir una toxina termolábil (LT) que es muy similar en tamaño (86 kDa), secuencia, actividad antigénica y función a la toxina del cólera (CT). También puede producir una toxina termoestable (ST) de bajo peso molecular (4 kDa) (Feng y Weagant, 2001). La prevalencia de cepas ST+, LT+ o ST + y LT+ varía de acuerdo al área geográfica.

### **Aislamiento e identificación de *Escherichia coli***

Los coliformes totales y fecales han sido utilizados por muchos años como indicadores para determinar la calidad sanitaria de aguas superficiales, recreacionales y marinas (Scott *et al*, 2002). El grupo de los coliformes se define de acuerdo a una serie de características bioquímicas y de crecimiento utilizadas en la identificación de bacterias relacionadas con contaminación fecal en mayor o menor grado (Payment *et al*, 2003). Como parte del grupo de los coliformes se encuentra *E.coli*, esta bacteria se halla en heces tanto humanas como animales, es por esto que es ampliamente utilizada como indicador de contaminación fecal en aguas.

Para la recuperación de microorganismos indicadores en aguas pueden emplearse tres métodos diferentes, estos son: la filtración a través de membranas, la prueba de presencia-ausencia y la técnica de tubos múltiples de fermentación o método de número más probable (NMP) (Köster *et al*, 2003). La filtración por membrana frecuentemente se utiliza para la detección de indicadores o de bacterias entéricas en agua filtrando muestras de 100 ml a través de membranas de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidad y sembrándolos en medios selectivos. Sin embargo, la turbidez de las aguas superficiales puede ser un problema para este método por lo que frecuentemente se utiliza la técnica de NMP (Köster *et al*, 2003).

*E.coli* es capaz de producir gas cuando crece en caldo EC a 44,5 °C (utilizando el método de NMP) o forma colonias azules cuando crecen en agar m-FC a 44,5 °C (utilizando el método de filtración por membrana) (Eaton *et al*, 1999).

La técnica de tubos múltiples de fermentación es estadística e indirecta, aplicada a muestras con bajo número de microorganismos ( $\leq 10\text{UFC/g}$ ) o con bacterias dañadas debido al calor, acidez, congelación, radiación, entre otros, y donde se busca diluir a extinción el organismo en cuestión. El NMP proporciona un estimado de la población y no identifica especies en particular; incluye una fase de enriquecimiento llamada fase presuntiva y una de selección llamada fase confirmatoria (Arias *et al*, 2006). En esta prueba se hacen diluciones seriadas de la

muestra, posteriormente se lleva a cabo la fase presuntiva o de preenriquecimiento, a partir de la cual no se hacen interpretaciones, y por último se lleva a cabo la fase confirmatoria. Esta puede realizarse en medios líquidos o sólidos y puede leerse con base en la detección de producción de gas, turbidez, detección de ácido o base, con métodos de reducción, entre otros (Arias *et al*, 2006). La prueba de NMP de coliformes fecales (utilizando el medio EC) es aplicable en investigaciones de agua de consumo, contaminación de arroyos, nuevas fuentes de agua, sistemas de tratamiento de aguas, agua de mar, y monitoreo de la calidad de agua (Eaton *et al*, 1999). Es muy usada especialmente en leche y agua, y para esos alimentos cuyas partículas puedan interferir con un correcto conteo de colonias (Feng y Weagant, 2001).

Actualmente existen diferentes tipos de técnicas para la detección de *E.coli* patógenas, tales como las pruebas serológicas, a pesar de esto las más utilizadas son las pruebas moleculares. Las cepas de *E.coli* patógenas fueron las primeras para las que se desarrollaron métodos de diagnóstico molecular. Estos métodos permanecen como los más populares y de más confianza para diferenciar las cepas generadoras de diarrea de los miembros no patógenos (Nataro y Kaper, 1998). Los marcadores serológicos, en algunas ocasiones, correlacionan muy bien con categorías específicas de *E.coli* productoras de diarrea; sin embargo, estos marcadores raramente son suficientes por si solos para identificar las cepas como patógenas. Además de su limitada sensibilidad y especificidad, la serotipificación es tediosa y cara (Nataro y Kaper, 1998). en contraste las técnicas moleculares resultan más rápidas y sensibles, sin embargo, su sensibilidad puede reducirse debido a la presencia de sustancias en las muestras que interfieran con la polimerasa durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Detección de EPEC y ETEC a partir de NMP

#### 1.1 Inoculación de la muestra y NMP

La técnica de NMP se realizó con base en el procedimiento descrito por Eaton *et al* en 1999. Por otra parte, en una placa de agar McConkey se sembró la cepa prototipo de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC, *eae* positiva, *bfp* positiva) y se incubó a 37°C por 24 horas, lo mismo se hizo con la cepa prototipo de *Escherichia coli* enterotoxigenica (toxina estable positiva, toxina lábil positiva). Con las colonias crecidas se hizo una suspensión de 5 ml al estándar de McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  bacterias/ml).

Posteriormente, esta suspensión se inoculó en 45 ml de agua destilada estéril correspondiendo a la dilución  $10^{-1}$  ( $1,5 \times 10^7$  bacterias/ml). Se procedió a hacer diluciones seriadas 1:10 de la dilución original, hasta llegar a  $10^{-6}$  en agua destilada estéril. Luego se inoculó 1 ml de cada una de las diluciones, de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ , en 5 tubos con 10ml de Caldo Lauril Triptona (CLT) con campana de Durham y se incubaron a 37°C por 24 horas.

Solo en el caso de EPEC, con los CLT en los que hubo crecimiento, se inocularon por asada caldos *Escherichia coli* (EC) con campana de Durham y fueron incubados a 37°C por 24 h. Para ETEC, los CLT que presentaron crecimiento no fueron subcultivados a caldo EC debido a que, en la prueba con EPEC, se determinó la presencia de sustancias inhibitorias en este medio.

#### 1.2 Extracción de ADN

El método de extracción empleado en este caso fue modificado de la técnica usada por Campbell *et al* en el 2006. Todos los tubos de CLT que presentaron gas y turbiedad fueron trasvasados a otros tubos de vidrio sin campana para ser centrifugados (centrífuga Eppendorf 5810R) a 4000 rpm, 4°C, por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y cada botón fue resuspendido en 1 ml de agua destilada estéril y se procedió a trasvasarlos a tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se centrifugaron (centrífuga Eppendorf 5417C) a 14000 rpm, 4°C, por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, los botones celulares se resuspendieron en 500 µl de agua destilada estéril, se volvieron a centrifugar (14000 rpm, 5 min., 4°C), y se volvieron a resuspender en 250 µl de agua destilada estéril. Los tubos fueron puestos en baño maría 100 °C por 20 minutos y, luego, se centrifugaron (14000rpm, 5 min., 4°C). El sobrenadante se trasvasó a tubos Eppendorf de 1,5 ml que se guardaron a -20 °C.

A los tubos de caldo EC, inoculados con EPEC, que presentaron gas y turbiedad se les aplicó el mismo procedimiento para la extracción del ADN, que a los tubos con CLT. Las muestras también fueron guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 1.3 Amplificación del ADN

El ADN de ETEC y EPEC obtenido de los caldos CLT y EC fue amplificado por el método PCR. La mezcla de reacción consistió de buffer para PCR 1X, 1,5 mM de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), 200  $\mu\text{M}$  de dinucleótidos, los iniciadores, *eaeA-R*, *eaeA-F*, *bfpA-R*, *bfpA-F* en el caso de EPEC o *LT1*, *LT2*, *ST-R*, *ST-F* en el caso de ETEC (tabla 1), y 0,5 U de *Taq* polimerasa (Fermentas).

Para la amplificación del ADN de EPEC se empleó el siguiente perfil : una temperatura de  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para la desnaturalización, seguida de 35 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos,  $53^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto y  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, y un ciclo para la extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. En el caso de ETEC las condiciones de la amplificación consistieron de un ciclo de desnaturalización del ADN a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, 35 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $54^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos, y  $72^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos, con un ciclo final de 10 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Las reacciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer PCR System 2400.

Tabla 1. Secuencias de los nucleótidos de los imprimadores para PCR

Subclase de E.coli	Imprimador	Secuencia de los imprimadores	Peso del producto (bp)	Referencia
EPEC	<i>eaeA-R</i>	5'-CCACCTGCAGCAACAAGAGG-3'	384	López-
	<i>eaeA-F</i>	5'-GACCCGGCACAAGCATAAGC-3'		Saucedo <i>et al</i> (2003)
	<i>bfpA-R</i>	5'-GCCGCTTTATCCAACCTGGTA-3'	324	López-
	<i>bfpA-F</i>	5'-AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC-3'		Saucedo <i>et al</i> (2003)
ETEC	LT1	5'-TCTCTATGTGCATACGGAGC-3'	322	Nguyen <i>et al</i> (2005)
	LT2	5'-CCATACTGATTGCCGCAAT-3'		
	ST-R	5'-CACCCGGTACAAGCAGGATT-3'	190	López-
	ST-F	5'-ATTTTCTTTCTGTATTGTCTT-3'		Saucedo <i>et al</i> (2003)

#### 1.4 Revelado

Las muestras amplificadas se corrieron (130 V, 110 mA, 45 minutos) en un gel de agarosa (Fermentas #R0491) al 2% con buffer Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5 X y bromuro de etidio a 25 pg/ $\mu$ l. En el caso de EPEC se utilizó como control positivo el ADN de la cepa prototipo de EPEC cultivada en caldo tripticasa soya (CTS), el cual se extrajo de igual forma que el ADN de las bacterias crecidas en CLT, haciendo lavados y calentando en baño maría por 20 minutos, para ETEC como control positivo se utilizó el ADN de la cepa prototipo de ETEC cultivada en CTS, el control negativo utilizado para ambas cepas fue agua destilada estéril.

### 2. Detección de EPEC en competencia con *Escherichia coli* no patógena

#### 2.1 Inoculación de la muestra y NMP

Se hizo una suspensión de 5 ml al McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  bacterias/ml) con colonias de la cepa de *Escherichia coli* ATCC y otra con colonias de la cepa prototipo de *E. coli* enteropatógena, ambas, crecidas en agar McConkey. A continuación, estas suspensiones se inocularon en 40 ml de agua destilada estéril. Se hicieron diluciones seriadas (1:10) hasta llegar a  $10^{-6}$  en agua destilada estéril. Se inoculó 1 ml de cada dilución, de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ , en 5 tubos con 10ml de CLT con campana de Durham y se incubaron a 37°C por 24 horas. La extracción de ADN y la amplificación, así como el revelado, se realizaron como se describió previamente.

### 3. Detección de las cepas prototipo de ETEC y prototipo de EPEC en competencia

#### 3.1 Inoculación de la muestra y NMP

Se hizo una suspensión de 10 ml al McFarland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  bacterias/ml) con colonias de la cepa prototipo de ETEC y otra con colonias de la cepa prototipo de EPEC, ambas, crecidas en agar McConkey. A continuación, de cada una de estas suspensiones se inocularon 5 ml en 40 ml de agua destilada estéril. Se hicieron diluciones seriadas (1:10) hasta llegar a  $10^{-6}$  en H<sub>2</sub>O destilada estéril.

Se inoculó 1 ml de cada dilución, de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ , en 3 tubos con 10ml de CLT con campana de Durham y se incubaron a 37°C por 24 horas.

La extracción de ADN y la amplificación, así como el revelado, se realizaron como se describió previamente.



## **4. Implementación de un control interno para la técnica de PCR**

### **4.1 Amplificación del ADN**

Se evaluaron dos volúmenes diferentes, 0,3  $\mu$ l y 0,8  $\mu$ l, de los iniciadores 16Sr y 16Sf correspondientes concentraciones de 104 y 147 pmol para el primero y 39 y 55 pmol para el segundo. Las secuencias utilizadas fueron: 16Sr 5'-TTCCCGAAGGCACATTCT-3' y 16Sf 5'-GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC-3', que originan un fragmento con un peso de 584 bp. (Tsen *et al*, 2003) La mezcla de reacción consistió de buffer para PCR 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de dinucleótidos, los iniciadores 16Sr y 16Sf, y 0,5 U de *Taq* polimerasa (Fermentas).

Las condiciones de la amplificación consistieron de un ciclo de desnaturalización del ADN a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, y 72°C por 30 segundos, y un ciclo de 2 minutos a 72°C para la extensión.

El revelado se realizó como se indicó en la sección 1.4.

## **5. Detección de EPEC inoculada en muestras de agua contaminada**

### **5.1 Inoculación de la muestra y NMP**

En una placa de agar McConkey se sembró la cepa prototipo de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y se incubó a 37°C por 24 horas. Con las colonias crecidas se hizo una suspensión de 5 ml al McFarland 0,5 en agua destilada estéril. Posteriormente, esta suspensión se inoculó en 45 ml de agua contaminada la cual fue recolectada y aportada por el laboratorio de Acueductos y Alcantarillados.

Se procedió a hacer diluciones seriadas 1:10 de la dilución original, hasta llegar a 10<sup>-6</sup> en H<sub>2</sub>O destilada estéril. Luego se inoculó 1 ml de cada dilución, de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-6</sup>, en 5 tubos con 10ml de Caldo Lauril Triptona (CLT) y se incubaron a 37°C por 24 horas.

### **5.2 Extracción de ADN**

#### **Protocolo 1**

El método de extracción empleado fue modificado de la técnica usada por Campbell *et al* en la literatura. La extracción del material genético se realizó de la misma forma que se describe en la sección 1.2

## Protocolo 2

El método utilizado fue el de "Holmes y Quigley 1981" modificado. Se tomó el botón de bacterias (ya lavado con agua destilada estéril) se resuspendió en 350 µl de solución tampón STET y 25 µl de lizosima se colocó en baño maría 20 minutos a 100 °C, se centrifugó 12 000 g, 10 min a 4 °C, posteriormente se descartó el sobrenadante y al botón se le agregó un volumen igual de isopropanol y se dejó precipitar a -18°C por 10 min, luego se centrifugó a 12 000 g por 5 min a 4 °C , se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

### 5.3 Amplificación del ADN

La amplificación del ADN de EPEC se llevó a cabo como se describe en la sección 1.3. Solamente se cambió la mezcla de reacción ya que se utilizó el 2X PCR Master Mix #K0171, de Fermentas.

## RESULTADOS

De las series de 5 tubos con caldo de enriquecimiento, caldo lauril triptona (CLT), inoculadas con las diluciones de  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  de EPEC, correspondientes a las concentraciones  $1,5 \times 10^5$  a  $10^1$  bacterias/ml, presentaron gas y turbiedad los 5 tubos inoculados con la dilución  $10^{-2}$ , dos de los inoculados con la dilución  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , y solo uno de los correspondientes a la dilución  $10^{-5}$ . Todos los tubos de caldo EC inoculados con las bacterias crecidas en CLT presentaron gas y turbiedad.

Los productos de amplificación del ADN, obtenido de las diluciones con concentraciones de  $1,5 \times 10^5$  y  $1,5 \times 10^2$  de EPEC sembradas en CLT, presentaron las dos bandas correspondientes a las secuencias *eae* y *bfp* con pesos moleculares de 384 bp y 324 bp respectivamente, sin embargo, se observó una baja intensidad de la banda correspondiente al producto de amplificación de la secuencia *bfp*. Además, se obtuvo poco o ningún producto de amplificación del ADN extraído de las bacterias crecidas en EC (fig. 1).

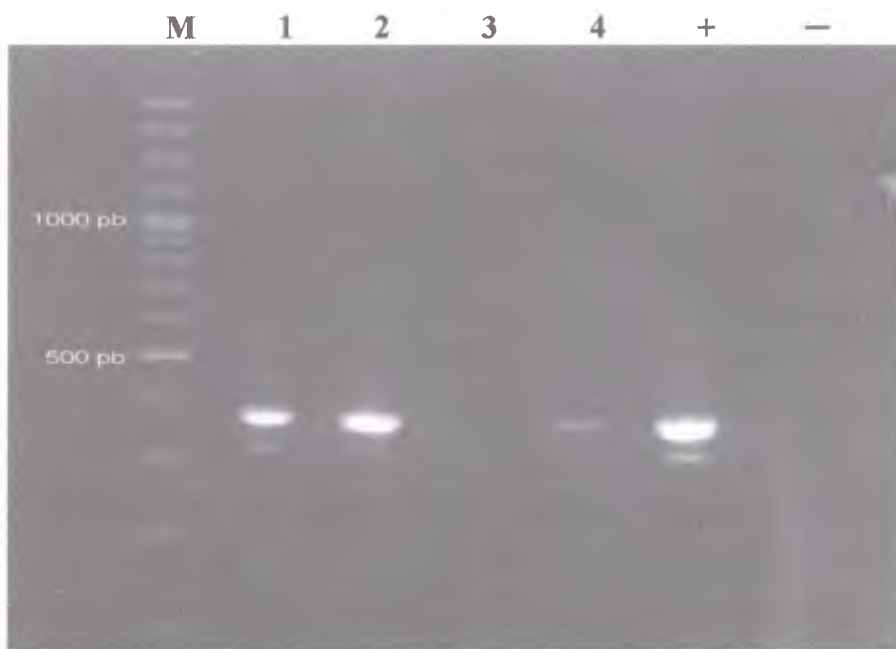


Fig. 1. PCR del ADN de EPEC, obtenido de las diluciones sembradas en CLT y EC M) marcadores de peso molecular, 1)  $1,5 \times 10^5$  bacterias/ml sembrada en CLT, 2)  $1,5 \times 10^2$  bacterias/ml sembrada en CLT, 3)  $1,5 \times 10^5$  bacterias/ml sembrada en EC, 4)  $1,5 \times 10^2$  bacterias/ml sembrada en EC, +) EPEC *eae* +, *bfp* +, -) H<sub>2</sub>O destilada estéril

En la figura 2, también puede observarse los pocos o nulos productos de amplificación del ADN extraído de los medios EC inoculados con EPEC.



Fig. 2. PCR del ADN de EPEC obtenido de las concentraciones  $1,5 \times 10^4$  y  $1,5 \times 10^3$  bacterias/ml sembradas en caldo EC M) marcadores, 1)  $1,5 \times 10^4$ , 2)  $1,5 \times 10^3$ , +) EPEC *eae* +, *bfp* +, -) H<sub>2</sub>O destilada estéril

La concentración de los imprimadores *bfpA-R* y *bfpA-F* se aumentó de  $0,2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  a  $0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  con el fin de permitir una óptima amplificación de esta secuencia. Tal y como se observa en la figura 3 se obtuvo una cantidad adecuada de productos de amplificación del ADN extraído de todos los tubos de CLT que presentaron crecimiento de EPEC, con excepción de uno.



Fig. 3. PCR del ADN de EPEC obtenido de las diluciones con concentraciones  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^4$  y  $1,5 \times 10^3$  bacterias/ml sembradas en CLT. M) marcadores, 1,2,3 y 4)  $1,5 \times 10^5$ , 5 y 6)  $1,5 \times 10^4$ , 7 y 8)  $1,5 \times 10^3$ , +) EPEC *eae* +, *bfp* +, -) H<sub>2</sub>O destilada estéril

A partir de la muestra de 45 ml de agua destilada estéril inoculada con 5 ml de ETEC al McFarland 0,5, se realizó la técnica de NMP en series de 5 tubos con CLT. Se observó gas y turbiedad en 5 de los tubos inoculados con las concentraciones  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^4$  y  $1,5 \times 10^3$  de bacterias, 3 de los inoculados con una concentración de  $1,5 \times 10^2$  y 1 inoculado con una concentración de  $1,5 \times 10$  de bacterias. Del ADN, extraído de todos los tubos con medio de enriquecimiento que presentaron gas y turbiedad, se obtuvieron los productos de amplificación esperados, correspondientes a las secuencias de la toxina termoestable y la toxina termolábil (fig.4).

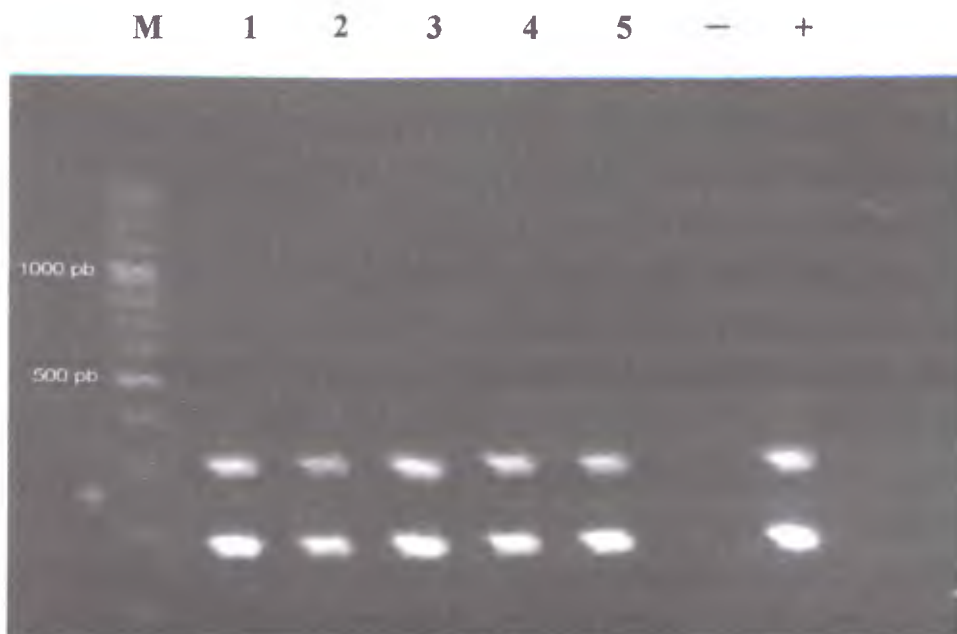


Fig. 4. PCR del ADN de ETEC obtenido de las diluciones con concentraciones  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^3$ ,  $1,5 \times 10^2$  y  $1,5 \times 10$  bacterias/ml sembradas en CLT. M) marcadores, 1)  $1,5 \times 10^5$ , 2)  $1,5 \times 10^4$ , 3)  $1,5 \times 10^3$ , 4)  $1,5 \times 10^2$ , 5)  $1,5 \times 10$ , +) EPEC ST+, LT +, -) H<sub>2</sub>O destilada estéril

Con el fin de determinar si los niveles de detección de las cepas patógenas se mantienen en presencia de competencia con otras bacterias inocuas o patógenas, se aplicó la técnica de NMP a una mezcla de EPEC y *E.coli* no patógena, y a otra mezcla de EPEC y ETEC.

Se observó crecimiento en todas las series de 5 tubos de CLT, inoculados con diluciones con concentraciones de  $1,5 \times 10^5$  a  $1,5 \times 10$  de la mezcla de EPEC y la cepa de *E.coli* ATCC 25922. Los productos de la amplificación del ADN de EPEC obtenido se pueden observar en la figura 5. De las dos pruebas de detección de EPEC realizadas, únicamente el ADN de las bacterias de una de las diluciones, cultivadas en CLT, no presentó las bandas correspondiente.

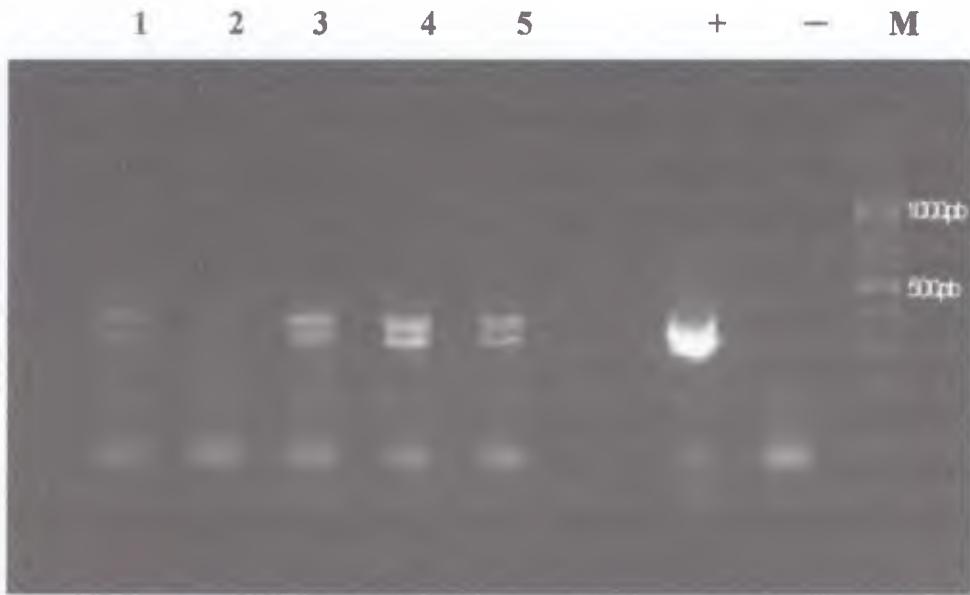


Fig. 5. PCR del ADN de las diluciones de la mezcla EPEC y *E.coli* ATCC sembradas en CLT. M) marcadores, 1)  $1,5 \times 10^5$ , 2)  $1,5 \times 10^4$ , 3)  $1,5 \times 10^3$ , 4)  $1,5 \times 10^2$  5)  $1,5 \times 10$  bacterias/ml, +) EPEC *eae* +, *bfp* +, -) H<sub>2</sub>O destilada estéril

Se obtuvo gas y turbiedad en todas las series de 3 tubos con caldo de enriquecimiento inoculadas con concentraciones de  $1,5 \times 10^5$  a  $1,5 \times 10$  de una mezcla de EPEC y ETEC. Respecto a las muestras de ADN obtenidas de la inoculación de las cepas prototipo ETEC y EPEC en conjunto en CLT, las secuencias de ETEC amplificadas por PCR presentaron resultados positivos para todas las diluciones inoculadas en los caldos (fig.6). Por otro lado, al hacer correr la electroforesis de los productos de amplificación de los genes *eae* y *bfp* de EPEC solamente una de las muestras, correspondiente a la concentración de  $1,5 \times 10^2$ , dio resultado positivo (fig.7).



Fig. 6. PCR del ADN de ETEC obtenidos de las diluciones con concentraciones  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^3$ ,  $1,5 \times 10^2$  y  $1,5 \times 10$  bacterias/ml, de la mezcla ETEC y EPEC sembradas en CLT M) marcadores, 1)  $1,5 \times 10^5$ , 2)  $1,5 \times 10^4$ , 3)  $1,5 \times 10^3$ , 4)  $1,5 \times 10^2$ , 5)  $1,5 \times 10$ , +) ETEC ST+, LT +, -) H<sub>2</sub>O destilada estéril



Fig. 7. PCR del ADN de EPEC obtenidos de las diluciones con concentraciones  $1,5 \times 10^5$ ,  $1,5 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^3$ ,  $1,5 \times 10^2$  y  $1,5 \times 10$  bacterias/ml, de la mezcla ETEC y EPEC sembradas en CLT M) marcadores, 1)  $1,5 \times 10^5$ , 2)  $1,5 \times 10^4$ , 3)  $1,5 \times 10^3$ , 4)  $1,5 \times 10^2$ , 5)  $1,5 \times 10$ , +) EPEC *eae* +, *bfp* +, -) H<sub>2</sub>O destilada estéril



Los marcadores 16S se probaron con el objetivo de confirmar que los resultados negativos no fueran producto de la inhibición de la PCR de ETEC o EPEC, y que sirvieran como un control interno de la presencia de ADN bacteriano. Como se observa en la figura 8, los imprimadores 16S-F y 16S-R utilizados en concentraciones de 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  permitieron la óptima amplificación de las secuencias de interés para *E.coli*.



Fig. 8. PCR de ADN amplificado de EPEC utilizando 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 0,8  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de los iniciadores 16S. M) marcadores, 1)  $10^{-2}$  EPEC *eae* +, *bfp* + crecida en CLT, +) EPEC *eae* +, *bfp* +, -)  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril

Para evaluar la aplicabilidad en muestras complejas se inoculó EPEC en muestras de aguas residuales y se realizó la técnica de NMP empleando medio de enriquecimiento, posteriormente se realizó la extracción del ADN utilizando el procedimiento modificado de Campbell *et al* y el de Holmes y Quigley. La figura 9 corresponde a una PCR realizada utilizando los imprimadores *eae* y *bfp* con el fin de evaluar la utilidad del método de extracción modificado de Campbell *et al* aplicado a muestras de aguas residuales.

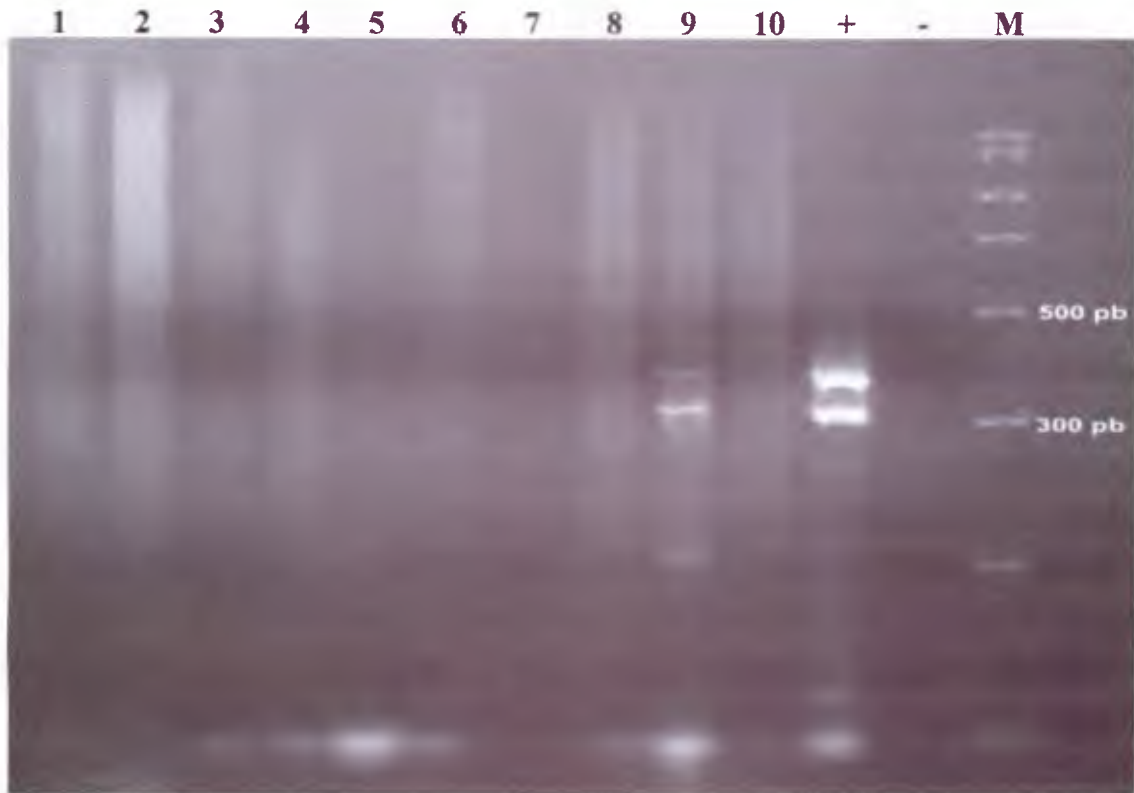


Fig. 9 PCR del ADN de EPEC inoculado en aguas residuales y extraído por el método modificado de Campbell *et al* a partir de diluciones sembradas en CLT y utilizando iniciadores *eae* y *bfp* M) marcadores, 1 y 2) Dilución  $10^{-2}$ , 3 y 4) Dilución  $10^{-3}$ , 5 y 6) Dilución  $10^{-4}$ , 7 y 8) Dilución  $10^{-5}$ , 9 y 10) Dilución  $10^{-6}$ , +) EPEC *eae* +, *bfp* +, -) H<sub>2</sub>O destilada estéril

La figura 10 corresponde a otra PCR realizada con muestras de ADN obtenidas empleando el método de extracción modificado de Holmes y Quigley con la intención de comprobar si es efectivo para eliminar inhibidores que puedan estar presentes en las muestras de aguas residuales.

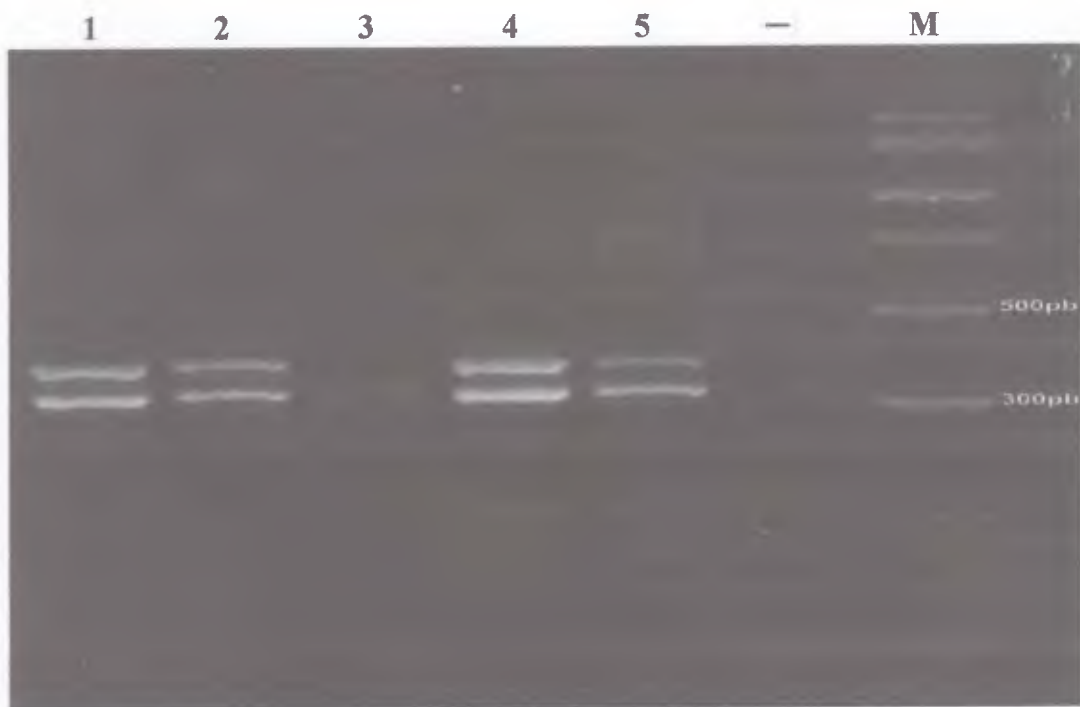


Fig. 10. PCR del ADN de EPEC inoculado en aguas residuales y extraído por el método modificado de Holmes y Quigley a partir de diluciones sembradas en CLT y utilizando imprimadores eae y bfp. M) marcadores, 1) Dilución  $10^{-2}$ , 2) Dilución  $10^{-3}$ , 3) Dilución  $10^{-4}$ , 4) Dilución  $10^{-5}$ , 5) Dilución  $10^{-6}$ , -) H<sub>2</sub>O destilada estéril

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En los métodos de detección de *E. coli* patogénicas comúnmente se utilizan filtros de celulosa o nitrocelulosa para la remoción de las bacterias y eliminar posibles inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, la presencia de un número elevado de otras bacterias puede provocar que el filtro se sature y se reduzca la sensibilidad de esta prueba ( $10^5$ - $10^6$  por gramo de muestra) (Nataro y Kaper, 1998). En el presente estudio se aplicó el método de NMP como una alternativa en la eliminación de interferentes en muestras de aguas residuales para la aplicación de la técnica de PCR.

A partir de CLT se obtuvo un límite de detección de  $1,5 \times 10^3$  UFC/ml para EPEC y de  $1,5 \times 10^2$  UFC/ml para ETEC. El medio de enriquecimiento utilizado no resultó inhibitorio para la detección mediante la técnica de PCR. Por el contrario, al ser un medio rico no selectivo permitió aumentar la población bacteriana y la recuperación de las células dañadas aumentando los genes blanco de interés. Por otro lado, sí se observó inhibición de la técnica de PCR por el uso del medio selectivo, lo cual puede deberse a que ciertas sustancias contenidas en los caldos EC, tales como sales biliares y  $\text{NaCl}^1$  en una concentración mayor a los 80 mM, se han reportado como inhibidores de la Taq polimerasa (Al-Soud y Rådström 1998). Sin embargo la concentración de esta  $\text{NaCl}$  tanto en CTL y caldo EC no es tan alta como para inhibir a la polimerasa, por lo que la inhibición pudo deberse únicamente al contenido de sales biliares.

En los últimos años, se han realizado estudios para determinar si en las cepas patógenas de *E. coli* existen ventajas o desventajas evolutivas, que puedan afectar su crecimiento; estos estudios se enfocaron en la *E. coli* O157:H7. En un estudio reciente, se realizaron experimentos de capacidad individual, bajo cuatro ambientes diferentes, que no revelaron diferencias en las tasas de crecimiento entre *E. coli* comensal y la cepa patógena *E. coli* O157:H7 (Durso *et al*, 2004). Actualmente no existe información sobre la sobrevivencia y la competencia entre los diferentes grupos patógenos de cepas de *E. coli* en fuentes de origen hídrico. En las condiciones estudiadas no se observó interferencia en la detección de EPEC por parte de la cepa no patógena de *Escherichia coli*. En la inoculación combinada de ETEC y EPEC se lograron detectar los dos grupos. En ambos casos, inoculación individual e inoculación mixtas, se observó una límite de detección mayor para la cepa de ETEC que para la cepa de EPEC, esto puede asociarse con la particularidad de cada grupo para responder a este ambiente. En las figuras 3, 5 y 7 no se presentaron todos los productos de amplificación esperados o se obtuvieron bandas debilmente positivas lo que podría explicarse por las características probabilística de la técnica de NMP, sin

<sup>1</sup> Concentración de  $\text{NaCl}$  en la mezcla para PCR conteniendo 1 ng de ADN de *L. monocytogenes*

embargo faltaron pruebas empleando un control interno como los iniciadores 16S para corroborar que no se debiera a la presencia de algún inhibidor o a un error personal.

Con el fin de contar con un control interno a la hora de realizar la PCR utilizando el ADN extraído de *E. coli* patógena inoculada en muestras reales, se evaluó la aplicabilidad de los iniciadores 16S. En la prueba, realizada por duplicado, se determinó que al utilizar una concentración de 0,3 µg/µl se obtiene una amplificación óptima de la secuencia de interés.

Para la aplicación del protocolo de detección de *E. coli* patógena en aguas residuales se debieron probar dos métodos de extracción de ADN, con esto se buscó evitar que sustancias presentes en las aguas residuales pudieran inhibir a la polimerasa. Debido a la alta concentración de interferentes en las muestras de aguas residuales no resultó de utilidad un método de extracción sencillo como el de Campbell *et al* modificado. Por el contrario el método de purificación de Holmes y Quigley modificado dio mejores resultados al eliminar los inhibidores presentes en las aguas.

A pesar del descenso de enfermedad diarreica, la OMS señala que se siguen presentado tasas elevadas de mortalidad y morbilidad (Prüss-Üstün, *et al*, 2008) (Durso *et al*, 2004). En países tropicales, ETEC y EPEC se mantienen como patógenos importantes de este cuadro que afecta principalmente a niños y turistas de zonas no endémicas. A nivel mundial, la presencia de estos agentes en aguas superficiales ha sido reportada pero no se cuenta con datos a nivel regional o local (Obi *et al*, 2004).

Aunque la aplicación de métodos moleculares no se presenta como una alternativa factible para el monitoreo de rutina, constituye una herramienta útil para obtener datos que permitan contribuir de manera significativa en esta área. Actualmente, la calidad microbiológica del agua y la rápida detección de microorganismos patógenos representan desafíos para la salud pública (Prüss-Üstün, *et al*, 2008 y Pedley y Pond, 2003). En este trabajo se propone una alternativa que aprovecha las ventajas de recuperación del método convencional y una identificación rápida y menos costosa para la detección de los dos grupos patógenos más comunes de *E. coli*.

Los resultados obtenidos en este trabajo son solo preliminares, por lo que requieren ser validados con muestras de campo, sin embargo la utilización de la técnica de tubos múltiples para la recuperación de bacterias que sean analizadas posteriormente empleando la PCR multiplex resulta ser una alternativa para la detección de cepas patógenas de *E. coli* en aguas de riego y consumo de manera eficaz y rápida lo que contribuirá a la realización oportuna de estudios epidemiológicos que contribuyan al control de la diseminación de estas cepas patógenas.

## BIBLIOGRAFÍA

### Revistas

1. Al-Soud W; Rådström P. (1998) Capacity of Nine Thermostable DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3748-3753.
2. Ashbolt N. (2004) Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*. 198: 229-238.
3. Campbell G; Prosser J; Glover A; Killham K. (2001) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and water using multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 1004-1010.
4. Chung H; Bang W; Drake M. (2006) Stress Response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5: 52-64
5. Durso L; Smith D; Hutkins R. (2004) Measurements of Fitness and Competition in Comensal *Escherichia coli* and *E.coli* O157:H7 Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 6466-6472
6. Frankel G; Phillips A; Rosenshine I; Dougan G; Kaper J; Knutton S. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*. 30: 911-921
7. Holmes D; Quigley M. (1981) A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids. *Analytical Biochemistry*. 114: 193-197
8. Kuhnert P; Boerlin P; Frey J. (2000) Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology. Rev.* 24: 107-117.
9. López-Saucedo C; Cerna J; Villegas-Sepulveda N; Thompson R; Velásquez F; Torres J; Tarr P; Estrada-García T. (2003) Single Multiplex Polymerase Chain Reaction To Detect Diverse Loci Associated with Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 127-131
10. Maynard C; Berthiaume F; Lemarchand K; Harel J; Payment P; Bayardelle P; Masson L; Brousseau R. (2005) Waterborne Pathogen Detection by Use of Oligonucleotide-Based Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 8548-8557.
11. Nataro J; Kaper J. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11: 142-201.

12. Nguyen V.T; Le Van P; Le Huy C; Nguyen Gia K; Weintraub A. (2005) Detection and Characterization of Diarrheogenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 755-760.
13. Obi C; Green E; Bessong P; de Villiers B; Hoosen A; Igumbor E; Potgieter N. (2004) Gene encoding virulence markers among *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic stool samples and river sources in rural Venda communities of South Africa. *Water SA*. 30: 37-42
14. Qadri F; Svennerholm A.M; Faruque A; Bradley R. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*. 18: 465-483.
15. Reuben A; Treminio H; Arias M.L; Chaves C. (2003) Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 53: 389-392.
16. Reuben A; Tremiño H; Arias M.L; Villalobos L. (2002) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Costa Rican food. *Rev Biomed*. 13: 273-276.
17. Scott T; Rose J; Jenkins T; Farrah S; Lukasik J. (2002) Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5796-5803.
18. Shelton D; Karns J; Higgins J; Van Kessel J.A; Perdue M., Belt K., Russell-Anelli J. DebRoy C. (2006) Impact of microbial diversity on rapid detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in surface waters. *FEMS Microbiology Lett*. 261: 95-101.
19. Varela G; Jasinski C; Gadea P; Tanzi M; Mota M; Arenas C; Pardo L; González S; González G; Sirok A; Schelotto F. (2007) *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Revista Médica Uruguaya*. 23: 153-163.
20. Vidal J; Canizález A; Gutiérrez J; Navarro F. (2007) Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*. 5: 376-386

## Libros

21. Arias M; Antillón F; Chávez C; Villalobos L. *Microbiología de aguas y alimentos: principios y prácticas de laboratorio*. Editorial UCR. San José, Costa Rica. 2006. 186p

22. Craun G.F; *et al.* La calidad del agua potable en América Latina: ponderación de los riesgos microbiológicos contra los riesgos de los Subproductos de la Desinfección Química. Organización Panamericana de la salud. Washington, Estados Unidos. 1996. 222 p.
23. Eaton A; Clesceri L; Greenberg A. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 20 edición. American Public Health Association. 1999. p.9.47-9.74
24. Feng P; Weagant S. Bacteriological Analytical Manual Online, 8th Edition. U.S. Food and Drug Administration, Center for food safety and applied nutrition. 2001
25. Köster W, Egli T., Ashbolt N., Botzenhart K., Burlion N., Endo T., Grimont P., Guillot E., Mabilat C., Newport L., Niemi M., Payment P., Prescott P., Renaud P., Rust A. Assessing Microbial Safety of Drinking Water: analytical methods for microbiological water quality testing. World Health Organization and Organization for Economic Co-operation. 2003 p. 237-239
26. Payment P., Waite M., Dufour A. Assessing Microbial Safety of Drinking Water: introducing parameters for the assessment of drinking water quality. World Health Organization and Organization for Economic Co-operation. 2003 p.46-53
27. Pedley S., Pond K. Emerging issues in water and infectious disease. World Health Organization. WHO Press, Geneva, Switzerland. 2003.
28. Prüss-Üstün A, Bos R, Gore F, Bartram J. Safer water, better health: cost, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health. World Health Organization, Geneva. 2008.



## APÉNDICE 1

### LISTA DE ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CLT	Caldo Lauril Triptona
CTS	Caldo Trypticasa Soya
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica
NMP	Número más probable
PCR	Polymerase chain reaction

## APÉNDICE 2

### AGARES Y CALDOS

#### Agar McConkey

Peptona	17 g
Peptona polipeptona	3 g
Lactosa	10 g
Mezcla de sales biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	13,5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g

pH 7,1 ± 0,2

#### Caldo Trypticasa Soya

Peptona (tripticasa)	15 g
Phytona	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	1L

pH 7,3 ± 0,2

#### Caldo Lauril Triptona

Triptosa	20 g
Lactosa	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,75 g
Sulfato lauril sodico	0,1 g
Cloruro de sodio	5 g
H <sub>2</sub> O	1L

pH  $6,8 \pm 0,2$

**Caldo EC**

Triptosa o tripticasa	20 g
Lactosa	5 g
Sales biliares	1,5 g
$K_2HPO_4$	4 g
$KH_2PO_4$	1,5 g
Cloruro de sodio	5 g
$H_2O$	1L

pH  $6,9 \pm 0,2$

## **APÉNDICE 3**

### **SOLUCIONES TAMPÓN**

#### **Solución tampón STET**

Sacarosa 8%

Triton X-100 5%

EDTA 50 mM

Trizma base 50 mM

pH 7.9