

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Genotipificación de cepas de *Eschreichia coli* enteropatogénica aisladas
en una región rural de la costa ecuatoriana mediante el uso de la
electroforesis de campo pulsado.**

María Elisa Schreckinger

Proyecto final presentado como requisito para la obtención del título de Baccalaureus
Scientiae en Biotecnología

Quito

Mayo de 2008

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE PROYECTO FINAL

**Genotipificación de cepas de *Eschreichia coli* enteropatogénica aisladas
en una región rural de la costa ecuatoriana mediante el uso de la
electroforesis de campo pulsado.**

María Elisa Schreckinger

Gabriel Trueba, Ph.D
Director de Proyecto Final

.....

Stella de la Torre, Ph.D
Decana del Colegio de Ciencias
Biológicas y Ambientales

.....

Quito, Mayo de 2008

© **Derechos de autor**

María Elisa Schreckinger

2008

Resumen

La *Escherichia coli* enteropatógena corresponde a una categoría importante dentro de las cepas de *E. coli* que causan diarrea y se la ha relacionado principalmente con los casos de diarrea en niños en los países en vías de desarrollo. La electroforesis de campo pulsado (PFGE) es una técnica utilizada en la epidemiología molecular para la genotipificación de muchas bacterias patógenas. En este estudio se utilizó el PFGE para analizar 8 cepas de EPEC aisladas de distintas comunidades del norte de la provincia de Esmeraldas. El objetivo de este estudio fue el de determinar si existe o no clonalidad entre cepas de EPEC aisladas de las diferentes comunidades de la zona. Los resultados indicaron que las cepas de EPEC que se aislaron de un mismo individuo mostraron el mismo patrón de bandas en el PFGE, mientras que todas las cepas que se aislaron de individuos diferentes mostraron un patrón de bandas diferente. En conclusión no se encontró clonalidad entre las cepas EPEC aisladas de individuos diferentes. Esto podría indicar que las cepas de EPEC no se están movilizand o entre las comunidades de la zona y que éstas cepas tienen un origen diverso.

Abstract

The enteropathogenic *Escherichia coli* is an important category of diarrheagenic *E. coli* which has been linked to infant diarrhea in the developing world. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) is a technique used in molecular epidemiology for genotyping many pathogenic bacteria. PFGE was used to analyze 8 EPEC strains isolated from different communities in the north of Esmeraldas, Ecuador. The aim of this study was to determine the clonality of EPEC strains isolated from the different communities in the area. The results indicate that the EPEC strains isolated from a single individual showed the same restriction pattern, while all the strains that were isolated from different individuals showed a different pattern. Clonality was not found on EPEC strains isolated from different individuals. The study suggests that EPEC is entering the communities from multiple sources.

Tabla de Contenido

Resumen	iv
Abstract.....	v
Tabla de Contenido.....	vi
Lista de Tablas y Figuras	viii
1. Introducción.....	1
1.1 Epidemiología Molecular y Principios de la Tipificación Bacteriana.....	1
1.2. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).....	2
1.2.1. Descripción de PFGE	2
1.2.2. Procedimiento	3
1.2.3 Usos	4
1.3.4. Ventajas y desventajas.....	4
1.3. Escherichia coli enteropatógena (EPEC).....	5
1.3.1. Patogénesis.....	5
1.3.2. Epidemiología.....	7
1.3.3. Consideraciones Clínicas.....	8
1.3.4. Detección y diagnóstico.....	8
2. Objetivos.....	9
2.1. Objetivos Específicos.....	9
2.2. Objetivos Generales	9
3. Justificación.....	9
4. Area de Estudio.....	
5. Materiales y Métodos	10
5.1. Materiales	10
5.2. Métodos	12
5.1. Descripción del trabajo que realiza el proyecto de ECODESS.....	122
5.2. Determinación de las cepas EPEC positivas.....	133
5.3 Tipificación de las cepas EPEC.....	155
6. Resultados.....	177
7. Discusión	199
8. Conclusiones.....	222

9. Recomendaciones	233
10. Bibliografía.....	244
11. Tablas	266
12. Figuras	288

Lista de Tablas y Figuras

Tabla 1. Características de las comunidades incluidas en el área de estudio.	26
Tabla 2. Información sobre las cepas que resultaron positivas para EPEC.	27
Tabla 3. Resultados de los antibiogramas de las cepas de EPEC.	27
Figura 1. La lesión de adherencia y eliminación (A/E) característica de EPEC.....	28
Figura 2. Modelo de patogénesis de EPEC	28
Figura 3. Mapa de las 21 comunidades incluidas en el área de estudio	29
Figura 4. Resultados de la amplificación del <i>gen bfpA</i> mediante el uso del PCR de las muestras recolectadas entre 9 – 22 de noviembre del 2006; cada pocillo contiene ADN de cinco colonias aisladas de un mismo individuo	30
Figura 5. Resultados de la amplificación del <i>gen bfpA</i> mediante el uso del PCR de las muestras recolectadas entre 5- 20 de diciembre del 2006; cada pocillo contiene ADN de cinco colonias aisladas de un mismo individuo	31
Figura 6. Resultados de la amplificación del <i>gen bfpA</i> mediante el uso del PCR de las muestras recolectadas entre el 31 de enero y el 13 de febrero del 2007; cada pocillo contiene ADN de cinco colonias aisladas de un mismo individuo	32
Figura 7. Resultados de la amplificación del <i>gen bfpA</i> mediante el uso del PCR de las muestras recolectadas entre 11- 21 de julio del 2007; cada pocillo contiene ADN de cinco colonias aisladas de un mismo individuo.	33
Figura 8. Resultados de la amplificación del <i>gen bfpA</i> mediante PCR; cada pocillo contiene ADN de una colonia individual	34
Figura 9. Resultados de los patrones de bandas de EPEC generados por PFGE	34
Figura 10. Resultados de los patrones de bandas de las cepas de EPEC 12a y 12b generados por PFGE	35

1. Introducción

1.1 Epidemiología Molecular y Principios de la Tipificación Bacteriana.

La epidemiología molecular se puede definir como el estudio de la distribución y determinantes de enfermedades en las poblaciones humanas, que utiliza métodos de biología molecular. Esta tiene como metas principales la de determinar los microparásitos responsables de las enfermedades infecciosas y determinar su reservorio, su relación biológica, su ruta de transmisión, los genes responsables de su virulencia, los antígenos relevantes para vacunas, entre otros (Riley 2004). La investigación microbiológica con fines epidemiológicos requiere de métodos de tipificación de cepas. Un método de tipificación es aquel que puede ser usado para diferenciar entre cepas bacterianas pertenecientes a una misma especie. Los métodos de tipificación en general deben cumplir con dos requisitos principales: poder discriminar entre aislados no relacionados y ser capaces brindar resultados reproducibles entre diferentes ensayos y estables para una cepa dada obtenida de diferentes orígenes. Además de considerar estos requisitos mencionados, también es importante considerar la sencillez de realización y de interpretación de resultados. Los métodos de tipificación se pueden clasificar en dos grandes grupos: fenotípicos y genotípicos. Los métodos fenotípicos están basados en características fisiológicas o bioquímicas, como por ejemplo pruebas de serología, patrones de sensibilidad y resistencia a antibióticos, entre otros. Estos métodos son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos. Esto se debe a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían (Olive et al.1999). Por otra parte, los métodos genotípicos o de genotipificación son aquellos basados en el análisis del

material genético; específicamente se basan en el análisis de las diferencias en el contenido y/o en la secuencia de ácidos nucleicos entre dos o más organismos. La ventaja principal de los métodos genotípicos respecto a los tradicionales es su capacidad discriminatoria, logrando en muchos casos diferenciar entre cepas absolutamente idénticas en términos fenotípicos (Riley, 2004).

1.2. Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

La electroforesis de campo pulsado corresponde a un método de genotipificación que fue descrito por primera vez en 1984 por David Schwartz y Charles Cantor. Esta técnica ha tomado mucha importancia en los últimos años y actualmente se la considera el “gold estándar” para la tipificación de muchas bacterias patógenas (Barrett et al. 1994; Hunter et al. 2004).

1.2.1. Descripción de PFGE

El PFGE es una técnica que se basa en el uso de enzimas de restricción de corte raro. Dichas enzimas producen grandes fragmentos de ADN genómico, los cuales, cuando son revelados por electroforesis generan patrones con un número de bandas y una resolución adecuadas para el análisis. Normalmente éstos fragmentos grandes de ADN ($\geq 25,000$ bases), tienen una baja resolución cuando son sometidos a electroforesis con geles de agarosa convencionales. Esto se debe a que el tamaño de los poros de estos geles es insuficiente como para permitir el movimiento adecuado de fragmentos grandes. La electroforesis de campo pulsado ha logrado superar este obstáculo gracias a un sistema que utiliza 3 sets de electrodos distribuidos hexagonalmente alrededor del gel. Este aplica una corriente primero desde uno de los sets de electrodos, luego desde el segundo y luego desde el tercero y así consecutivamente. Esto causa que el ADN se mueva en el gel de un lado al otro, permitiendo así la migración de

estos fragmentos. El segundo obstáculo que se ha podido superar gracias a PFGE, es la gran cantidad de fragmentos de ADN que se auto digieren espontáneamente después de haber sido digeridos con una enzima de corte raro. Este problema fue superado embebiendo el microorganismo a estudiarse en un molde pequeño de agarosa conocido como plug (Riley 2004, Tenover et al. 1995)

1.2.2. Procedimiento

En breve el procedimiento del PFGE consiste en la introducción de los microorganismos en los pequeños moldes de agarosa, la lisis de los organismos *in situ*, y la digestión del ADN cromosómico con la enzima de restricción de corte raro. Los moldes de agarosa que contienen los fragmentos de ADN cromosómico se insertan en los pozos de un gel de agarosa, y los fragmentos de restricción se resuelven en un patrón de bandas discretas en el gel por el aparato mencionado anteriormente que cambia el sentido de la corriente de acuerdo a un patrón predeterminado. Los patrones de restricción de ADN de los aislados se comparan entre sí para determinar su relación (Riley 2004, Tenover et al. 1995). En la actualidad no existe un criterio estandarizado para analizar el patrón de bandas generado por el PFGE, por lo que esto puede llegar a ser un poco subjetivo. Para este propósito, algunos estudios han utilizado programas estadísticos como el Gel Compare Software (Krause et al. 1996) o Gel doc (Noller et al. 2003) que se basan en el cálculo del Dice Similarity Coefficient, mientras que otros solamente se han basado en observaciones visuales (Barret et al., 1994, Johnson et al. 1995). Tenover et al. 1995, establecieron un criterio para analizar los patrones de bandas del PFGE que toma en cuenta las bandas en común de ambos patrones y la ocurrencia de eventos genéticos comunes tales como mutaciones puntuales, inserciones y deleciones.

1.2.3 Usos

El PFGE se ha utilizado en diversos estudios epidemiológicos para rastrear a la cepa responsable de un brote (Johnson et al. 1995), en la diferenciación de cepas patogénicas y en el monitoreo de estas dentro de las comunidades (Izumiya et al. 1997), para establecer la relación genética entre distintas cepas (Noller et al. 2003), para medir el genoma bacteriano (Harsono et al. 1993), entre otros. Esta técnica se ha utilizado con éxito en estudios de epidemiología molecular de numerosas bacterias patógenas, incluyendo *Escherichia coli* O157: H7, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, y *Staphylococcus aureus*. (Romeshk et al. 1997, Barrett TJ et al 1994). Dentro de la especie de *Escherichia coli* se ha utilizado esta técnica principalmente para estudios de *Escherichia coli* O157: H7 (Barret et al. 1994, Krause et al. 1996, Johnson et al.1995), por el gran número de brotes que ha originado en los Estados Unidos.

1.3.4. Ventajas y desventajas

El PFGE es una técnica bastante reproducible y discriminatoria cuando se la realiza de manera adecuada. Ha permitido la diferenciación de cepas que resultaron indistinguibles por análisis de enzimas de restricción, tipificación de fagos, análisis de plásmidos (Romeshk et al. 1997) y por métodos epidemiológico tradicionales (Arbeit et al, 1990). A pesar de que su sensibilidad y su poder de discriminación dependen del organismo que está siendo tipificado y de la enzima de restricción utilizada, su relevancia a nivel epidemiológico ha hecho que este metodo sea el “gold estándar” para la tipificación de patógenos bacterianos (Barrett et al. 1994).

Sin embargo esta técnica también presenta algunas limitaciones; es bastante laboriosa, se necesita de personal capacitado, y el costo inicial para adquirir el equipo es bastante alto. (Riley

2004). También la interpretación de los patrones de bandas puede ser subjetiva, y con esta técnica, no es fácil manejar un gran número de muestras (Noller et al, 2003).

1.3. Escherichia coli enteropatógena (EPEC)

EPEC corresponde a una categoría importante dentro de las cepas de *E. coli* que causan diarrea y se la ha relacionado principalmente con los casos de diarrea en niños en los países en vías de desarrollo. A pesar de que una vez fue definida exclusivamente sobre la base de los serotipos O y H, EPEC es ahora definida en base a sus características patogénicas, como se describe a continuación (Donenberg et al. 1992).

1.3.1. Patogénesis

La característica distintiva de las infecciones por EPEC es la lesión histopatológica de adherencia y esfacelación (A / E), que puede observarse en la biopsia intestinal de pacientes o de animales infectados y puede ser reproducida en cultivos celulares (Figura 1). Esta se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades de la membrana, la adherencia íntima de la bacteria al epitelio intestinal y la formación de estructuras semejantes a pedestales entre la bacteria y el enterocito (Nataro et al. 1998). Múltiples pasos son necesarios para la producción de la lesión A/E. En 1992, Donenberg y Kaper propusieron un modelo de tres etapas para describir la patogénesis de EPEC; este modelo consta de: a) adherencia localizada, b) inyección de factores y transducción de señales, y c) contacto íntimo. La secuencia ordenada de estas etapas no está comprobada, y, de hecho, se piensa que las diferentes etapas pueden ocurrir simultáneamente (Donenberg, 2002).

1.3.1.1. Adherencia localizada (AL)

La AL se caracteriza por la adhesión inicial y relativamente distante de las bacterias con el enterocito (Figura 2A) (Nataro et al. 1998). Esta adhesión se piensa que es mediada por pilus

o estructuras similares a pelos (BFP, por sus siglas en inglés). Estos pelos tienen aprox. 7 nm de diámetro y 14 - 20 μm de largo y para su síntesis se requieren de 14 genes codificados en un plásmido de virulencia denominado factor de adherencia de EPEC o EAF. Los BFP permiten que las bacterias se agrupen entre ellas y formen microcolonias (un fenotipo conocido como autoagregación) y también que se adhieran a las microvellosidades del epitelio intestinal (Rodríguez, 2002).

1.3.1.2. Inyección de factores y transducción de señales

Una vez que la bacteria está adherida, inyecta a la célula una serie de proteínas mediante el sistema de secreción tipo III (SSTT) (Figura 2B). La mayor parte de las proteínas involucradas en este proceso están codificadas en el cromosoma de EPEC, dentro de una isla de patogenicidad de 35 kb conocida como el locus de la eliminación del enterocito o LEE. La isla de patogenicidad LEE contiene los siguientes genes: a) los genes de las proteínas que componen el SSTT; b) los genes de las proteínas que se secretan a través del SSTT las cuales se conocen con el nombre de Esp (proteínas secretadas por EPEC); y c) los genes que codifican para la adhesina bacteriana intimina y su receptor, llamado Tir que se transloca por la misma bacteria a través del SSTT hacia el interior de la célula (Donenberg, 2002; Nataro et al. 1998). Las proteínas del SSTT forman una estructura que asemeja a un complejo de aguja y se ensambla de manera coordinada por al menos 19 proteínas. Este complejo atraviesa la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa de la bacteria y permite la secreción de proteínas efectoras. Las proteínas efectoras se han clasificado en proteínas codificadas en el LEE (EspF, EspG, EspH, EspZ, Map y Tir) y no codificadas en el LEE (Cif, EspG2, NleC, y NleD). Entre estas proteínas cabe destacar a Tir que cumple un paso crucial durante la lesión A/E y la formación de los pedestales. Tir se transporta a través del SSTT al citosol del enterocito mediante una proteína

chaperona. Una vez en el citosol, un fragmento de Tir se inserta dentro de la membrana plasmática de la célula, con lo que expone hacia el espacio extracelular un fragmento conocido como TIBA. Este fragmento va a servir de receptor para la proteína de membrana externa de EPEC llamada intimina (Frankel et al, 1998).

1.3.1.3. Contacto íntimo y formación de pedestales

La última etapa de la infección por EPEC se caracteriza por la unión íntima entre la bacteria y la célula del huésped, así como la formación de los pedestales de actina. Tras la unión de Tir con la intimina, esta primera se fosforila. La forma fosforilada de Tir va a desencadenar una cascada de señales en el enterocito que dan lugar a la reorganización del citoesqueleto. En esta etapa se van a formar los pedestales por debajo de donde la bacteria está adherida y se componen sobre todo de actina polimerizada. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y fisiología normal de la región apical de las células, lo que lleva al final a la pérdida de las microvellosidades intestinales y su función (Frankel et al, 1998)

1.3.2. Epidemiología

1.3.2.1. Distribución por edades.

EPEC afecta principalmente a niños menores de dos años y tiene mayor impacto en los niños menores de 6 meses. A pesar de que algunos brotes de diarrea debido a EPEC se han registrado en adultos sanos, estos casos son poco frecuentes. El motivo de la relativa resistencia de los adultos y de los niños mayores no se conoce, pero la pérdida de receptores específicos con la edad es una de las posibilidades (Donenberg, 2002).

1.3.2.2. Transmisión y reservorios

Al igual que con otras *E. coli* causantes de diarrea, la transmisión de EPEC es fecal-oral; a través de manos contaminadas, de alimentos de infantes en la época de destete u otros objetos

contaminados. El reservorio de esta bacteria son niños sintomáticos o asintomáticos y adultos portadores asintomáticos, incluidas las madres y personas que se ocupan de los niños (Nataro, 2002).

1.3.2.3. EPEC en los países en desarrollo.

EPEC es una de las principales causas de diarrea infantil en los países en vías de desarrollo. Especialmente entre los 0 a 6 meses de edad, las cepas de EPEC son las bacterias más frecuentemente aisladas de los casos de diarrea. Estudios realizados en Brasil, México, y Sudáfrica han demostrado que el 30- 40% de los casos de diarrea infantil puede atribuirse a EPEC, y en algunos estudios la infección por EPEC supera la infección por rotavirus (Nataro et al. 1998).

1.3.3. Consideraciones Clínicas

La infección por EPEC da lugar a una diarrea acuosa que puede contener moco pero no sangre. Síntomas asociados pueden incluir fiebre, malestar, vómitos, intolerancia alimentaria, deshidratación, y pérdida de peso. La diarrea producida por EPEC a menudo dura 5 - 15 días pero puede volverse crónica y puede resultar en una tasa de mortalidad tan alta como del 50% (Donenberg, 2002). Como sucede con otros patógenos que producen diarrea, el objetivo principal para el tratamiento de EPEC es evitar la deshidratación mediante la corrección de los desequilibrios de líquidos y electrolitos. La rehidratación oral puede ser suficiente para los casos más leves, pero los casos más graves requieren rehidratación parenteral. Una variedad de antibióticos se han utilizado para tratar EPEC y han demostrado ser útiles en muchos casos, pero la resistencia a múltiples antibióticos es común para EPEC (Nataro et al. 1998).

1.2.4. Detección y Diagnóstico

Existen dos enfoques para la detección de EPEC en el laboratorio: fenotípico y

genotípico. El enfoque fenotípico requiere principalmente del uso de cultivos celulares, pruebas de serología y de microscopía de fluorescencia. En el enfoque genotípico la técnica más utilizada y la que se va a utilizar en éste estudio para el diagnóstico de EPEC es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rodríguez, 2002).

2. Objetivos

2.1. Objetivo General.

El objetivo general de éste trabajo es el de realizar un estudio sobre la epidemiología de las enfermedades diarreicas causadas por EPEC, en el norte de la provincia de Esmeraldas.

2.2. Objetivo Específico.

El objetivo específico de este estudio es el utilizar la electroforesis de campo pulsado para determinar si es que existe o no clonalidad entre cepas de EPEC aisladas de diferentes comunidades del norte de la provincia de Esmeraldas. Esto va a permitir determinar si que existe o no un patrón de contagio de las cepas de EPEC aisladas dentro de ésta región

3. Justificación

Este trabajo forma parte de un proyecto mucho más grande llamado ECODESS (Ecología, Desarrollo, Salud y Sociedad). Este proyecto, de manera general, está realizando un estudio de la incidencia de una nueva carretera en el norte de Esmeraldas, sobre la epidemiología de enfermedades diarreicas en la zona. La contribución de este trabajo en el proyecto de ECODESS sería la de determinar si existe o no una relación entre las cepas de EPEC aisladas en las distintas comunidades de esta área. Esto indicaría si las cepas de EPEC están movilizándose entre las comunidades o no. Esta información resulta útil ya que puede conllevar a estudios epidemiológicos posteriores de una importancia significativa. Por ejemplo en el caso

de que se demuestre que las cepas se están movilizándose entre las comunidades, se podrían hacer estudios sobre cuáles son los medios por los que estas bacterias se transportan (la movilización que implica la carretera? ríos locales?) y en base a esto establecer medidas de control para minimizar este flujo.

4. Área de Estudio

El área de estudio se encuentra en el Norte de la provincia ecuatoriana de Esmeraldas en el cantón Eloy Alfaro, que comprende alrededor de 150 comunidades. Las comunidades están situadas a lo largo de tres ríos: Río Cayapas, Río Santiago y Río Onzole. Todos estos ríos fluyen hacia la ciudad de Borbón, que corresponde a la población principal de la región, con alrededor de 5, 000 habitantes. Las otras comunidades de la región son más pequeñas en tamaño y densidad poblacional. En 1996 se terminó de construir la carretera que pasa por Borbón y que va hacia el oeste, hasta la costa ecuatoriana. La porción de la carretera que conecta Borbón hacia el este, con los Andes, se terminó en el 2003. A esta construcción se sumaron algunas vías secundarias para unir las comunidades entre sí. El proyecto de ECODESS seleccionó al azar una muestra de 21 comunidades y las clasificó en tres categorías dependiendo si estaban cerca, medianamente cerca o lejos de Borbón (Eisenberg *et al.* 2006). La clasificación de las comunidades y un mapa de estas se encuentran expuestos en la Tabla #1 y Figura # 3 respectivamente.

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Extracción de ADN

- Agar Nutritivo

- Palillos de dientes
- Tubos eppendorf
- Agua destilada estéril

5.1.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa

- Agua destilada estéril
- 50 mM MgCl₂ (Invitrogen)
- Buffer 10x – MgCl₂ (Invitrogen)
- 10 mM dNTP's (New England Biolabs)
- Primers: EP1 (5'-CAA TGG TGC TTG CGC TTG CT-3') y EP2 (5'- GCC GCT TTA TCC AAC CTG GT-3') (Sigma)
- Taq polimerasa (50 U/uL) (Invitrogen)
- Tubos de PCR

5.1.3. Electroforesis en Gel de Agarosa

- Agua destilada
- Agarosa (Invitrogen)
- TBE 5x
- Bromuro de etidio (Acros Organics)
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador de luz ultravioleta de Kodak.

5.1.4. Antibiogramas

- Agar nutritivo
- Solución salina 0.9 %
- Medio Muller-Hinton
- Discos de los siguientes antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol, penicilina, ciprofloxacina, ampicilina y cefotaxima.

5.1.5. Electroforesis de Campo Pulsado

- Agar BHI (Brain- Heart Infusion)
- Buffer de suspensión celular (75 mM NaCl pH 8.0 y 25 mM EDTA pH 8.0)
- Proteinasa K (20 mg/mL) (New England Biolabs)

- Agarosa para PFGE (Bio-Rad Laboratories)
- Moldes para plugs
- Buffer de lisis celular (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8 y 1% Sarcosyl)
- Agua destilada estéril
- Buffer 10x (New England Biolabs)
- BSA (albumina sérica bovina) (New England Biolabs)
- Enzima XbaI (New England Biolabs)
- Cámara de electroforesis CHEF Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories)

5.2. Métodos

5.2. Descripción del trabajo que realiza el proyecto de ECODESS.

5.2.1. Diseño del Proyecto.

El equipo de ECODESS realiza visitas a las 21 comunidades mencionadas anteriormente, de manera periódica. Estas visitas se encuentran organizadas en ciclos y cada ciclo se divide en 8 salidas. El ciclo corresponde al período de tiempo en el que se realizan las visitas y cada salida representa el área específica donde se hizo la visita. Cada visita dura 15 días, y cada mañana durante éste plazo los miembros del personal de campo visitan cada hogar para encontrar casos de diarrea y recoger muestras de heces de casos y controles. Por cada caso de diarrea que se encuentra, se toma una muestra control dentro de la familia y una dentro de la comunidad. Un caso de diarrea se define como un individuo que tiene tres o más heces líquidas o flojas en un período de 24 horas. Un control se define como alguien que no ha presentado signos de diarrea en los últimos 6 días (Eisenberg *et al.* 2006).

5.2.2. Los análisis microbiológicos.

Todas las muestras de heces recolectadas se almacenan en hielo y se procesan dentro de 48 h. Las muestras se analizan para rotavirus, *E. coli*, y *Giardia lamblia*. En el caso de *E. coli* se aíslan

y se siembran cinco colonias lactosa positivas de cada individuo (caso y control) en agar nutritivo.

5.3. Determinación de las cepas EPEC positivas.

El personal de ECODESS trae al laboratorio de la Universidad San Francisco las bacterias de la especie *E. coli* que fueron previamente aisladas de los casos de diarrea y de los controles. En este estudio se analizaron las colonias de *E. coli* aisladas de 990 muestras de heces, de las cuales 270 fueron casos de diarrea y 705 controles. Estas muestras se recolectaron entre Mayo del 2006 y Julio del 2007. Para determinar cuáles de estas cepas corresponden a EPEC, se procedió de la siguiente manera:

5.3.2. Extracción de ADN.

Se re-sembró las colonias de bacterias en agar nutritivo y se las incubó a 37 °C por una noche. Una vez realizado esto, se colocó 300 µL de agua destilada auto clavada en diferentes tubos eppendorf y se enumeró cada tubo de acuerdo con los números asignados en el cepario. Luego, con la ayuda de un palillo de dientes, se colocó en cada tubo una cantidad pequeña de cada una de las cinco cepas pertenecientes a cada individuo. Se llevó la solución bacteriana a ebullición durante 10 minutos y finalmente se guardaron los tubos en el congelador a – 20 °C.

5.3.3. PCR para identificar las cepas EPEC positivas.

Se preparó un Master mix o una solución madre de tal manera que haya las siguientes concentraciones por cada tubo de reacción: 14.55 µL de agua, 0.75 de MgCl₂, 2.5 de Buffer 10x, 0.5 de dNTP's, 2 µL de primer1, 2 µL de primer2 y 0.2 µL de Taq polimerasa. En éste caso se utilizaron primers específicos para amplificar el gen *bfpA*. Los primers utilizados fueron EP1 (5'-CAA TGG TGC TTG CGC TTG CT-3') y EP2 (5'-GCC GCT TTA TCC AAC CTG GT-3'). A continuación se colocó 22.5 µL de la solución madre y 2.5 µL del sobrenadante de la extracción

de ADN en cada tubo de reacción. Cada vez que se hizo un PCR, se preparó por lo menos un control positivo y dos controles negativos (agua y cepa de *E. coli* K12). Las condiciones de amplificación incluyeron 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, hibridación a 56°C por 2 minutos y extensión a 72°C por 1 minuto.

5.3.4. Electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

Se preparó un gel de agarosa al 1.6% con un volumen final de 350 mL. Para esto se diluyó 5.6 g de agarosa en 70 mL de TBE 5x + 280 ml de agua destilada. A continuación se colocó la solución por 3 minutos en el microondas hasta conseguir que esta adquiriera una tonalidad transparente y homogénea. Se dejó enfriar al ambiente y se agregó 5 µL de bromuro de etidio. Luego se armó el molde del gel y se lo colocó en el mismo. Se esperó a que solidifique y se llenó la cámara con TBE 1X. A continuación se colocaron las muestras, productos de la reacción de PCR, en los pocillos del gel sin olvidarse de dejar espacio para los marcadores de pesos moleculares. Se encendió la fuente de poder de la cámara y se dejó correr al gel a 70 voltios, por aproximadamente dos horas. El gel fue visualizado en el transiluminador de luz ultravioleta de Kodak.

5.3.5. Selección de las colonias positivas

Es importante recordar que, hasta éste momento, en cada tubo de reacción existía una mezcla de las cinco colonias pertenecientes a un individuo. Si alguna de estas muestras resultase positiva, el paso siguiente fue sembrar en agar nutritivo las cinco colonias. Pasadas 24 horas, se extrajo el ADN según se indicó anteriormente, con la diferencia que en este caso se colocó una cepa en cada tubo, de tal manera que por cada individuo se tuvo 5 tubos. De igual manera, después se realizó un PCR (un tubo-una cepa) y electroforesis en gel de agarosa.

5.3.6. Crioconservación de las cepas de *E. coli* patogénicas

Aquellas colonias individuales que resultaron ser positivas para EPEC fueron conservadas en refrigeración. Para esto se resembró en agar nutritivo las colonias en forma masiva. Luego de 24 horas de incubación se añadió aproximadamente 2 mL de BHI + glicerol al 10% y con una micropipeta se tomo éste sobrenadante y se lo colocó en un tubo de crioconsevación. Se etiquetó adecuadamente el tubo y se lo guardó en la congeladora a menos 80°C.

5.3 Tipificación de las cepas EPEC

5.3.1. Antibiograma

Se sembró las cepas de EPEC en agar nutritivo y se las incubo a 37°C durante la noche. Al día siguiente, se tomó con un hisopo una pequeña cantidad del crecimiento bacteriano y se lo introdujo a un tubo de ensayo con solución salina 0.9%, lo cual fue equivalente a una solución de McFarland 05. Se agitó hasta que la solución este homogénea. A continuación, se empapó el hisopo con ésta solución y se lo esparció sobre un medio Muller-Hinton hasta que se haya cubierto toda la superficie de éste. Con la ayuda de una pinza se colocaron los discos de los siguientes antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol, penicilina, ciprofloxacina, ampicilina y cefotaxima. Se incubó a las bacterias a 37° C por una noche y al día siguiente se registraron los resultados.

5.3.2. Electroforesis de Campo pulsado

Se sembraron las cepas de EPEC en agar BHI (Brain- Heart Infusion), y se las dejó a 37°C por 18 horas. Dentro de la cámara de flujo laminar, se tomó una muestra de cada bacteria a estudiar con un hisopo estéril y se suspendió las bacterias en un tubo de ensayo estéril que contenga 2 mL del buffer de suspensión celular (75 mM NaCl pH 8.0 y 25 mM EDTA pH 8.0), hasta lograr una concentración de 0,63 OD a 610 nm, lo que equivale a una solución de

McFarland 5. Se transfirió 200 μ L de la suspensión celular antes preparada a un microtubo de 1,5 mL y se añadió 10 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) por cada muestra. Se mezcló gentilmente por pipeteo o por inversión unas 5 a 6 veces. Fuera de la cámara de flujo, se añadió a cada microtubo de la solución celular 200 μ L de la solución de agarosa para plugs, se mezcló por pipeteo evitando hacer burbujas e inmediatamente se dispensó 200 μ L de ésta mezcla en los moldes (plugs). Se permitió la gelificación de los moldes por un lapso de entre 15 a 20 minutos. Dentro de la cámara de flujo laminar, se removieron los moldes (plugs) de agarosa, cada uno a un microtubo de 1,7 mL que contenía 1.3 mL de buffer de lisis celular (50 mM Tris pH 8.0, 50mM EDTA pH 8, 1% Sarcosyl y 0.1 mg/mL proteinasa K). Se colocaron los microtubos en un flotador y se los sumergió en el baño maría a 54 °C con agitación constante entre 150 a 200 rpm y se los dejó entre 12 a 16 horas. Después de haber transcurrido este tiempo se retiraron los microtubos del baño maría y se transfirieron los plugs a tubos de 50 mL estériles. Se añadió a cada tubo 25 mL de agua estéril precalentada a 50°C. Luego se colocaron los tubos en el baño maría a 50°C y con agitación entre 150 a 200 rpm por 15 minutos. Se retiraron los tubos del baño María, se descartó el agua, se añadió nuevamente 25 mL de agua estéril precalentada a 50°C y se volvió a poner los tubos en el baño María. Se lavó los plugs 4 veces más de la misma manera con TE estéril precalentado a 50 °C. Dentro de la cámara de flujo laminar se preparó la solución de enzima de restricción en microtubos estériles. Para esto se añadió 172 μ L de agua estéril, 20 μ L de Buffer 10x, 2 μ L de BSA (albumina sérica bovina) y 6 μ L de Enzima XbaI. Luego se colocó en cada microtubo el plug y se dejó a 37° C durante 12 a 18 horas. Al día siguiente se preparó 200 mL de gel de agarosa para PFGE al 1%. Para esto se pesaron 2 gramos de la agarosa diseñada para PFGE y se la colocó en un frasco de 500 mL. Luego se añadió 20 mL de TBE 5X y 180 mL de H₂O destilada estéril. Se fundió la solución en el microondas por 2 minutos y se

dejó enfriar para poder colocar en el molde que fue previamente armado. Una vez que haya solidificado el gel en el molde, se colocó un plug en cada pocillo con la ayuda de una paleta de helado estéril. Una vez hecho esto se colocó un estándar de tamaño en los dos pocillos extremos y se sellaron los pocillos con agarosa. A continuación se colocó en la cámara de electroforesis CHEF Electrophoresis Cell 2 L de TBE 0.5X + 100 μ M tiourea. Se colocó el gel en la cámara y se ajustó las condiciones de migración. Las condiciones de migración fueron: temperatura 13°C, Voltaje 6V/cm, pulso inicial 2.2 s que se incrementa hasta 54.2 s y tiempo de corrida 20 horas. Después del transcurrido el tiempo de corrida, se retiró el gel y se lo tiñó con una solución de 100 mL de agua + 1.5 μ L de bromuro de etidio durante 30 minutos. Luego fue desteñido en 100mL de agua destilada por 45 minutos y se tomó una fotografía del gel utilizando una cámara fotográfica Kodak DC120. Los patrones de bandas generados fueron analizados visualmente.

6. Resultados

6.1. PCR y Electroforesis

Las Figuras 4, 5, 6 y 7 muestran los resultados de la amplificación del gen *bfpA* del primer set de PCR, en donde se colocó 5 colonias pertenecientes a un individuo en un solo tubo de reacción. La amplificación del gen *bfpA* genera una banda de 324 pb. Esta banda se puede observar en el control positivo de todas estas figuras y está ausente en el control negativo y el K12. Debajo de cada figura se encuentra el orden en que se colocó las muestras en el gel y están marcadas con un “+” aquellas muestras que presentan la banda de 324 pb, es decir que son positivas para EPEC. Como en este caso, cada muestra contiene el ADN de 5 bacterias pertenecientes a un individuo, la presencia de la banda de 324 pb significa que por lo menos una de las 5 bacterias es positiva para EPEC. Para determinar cual o cuales de las 5 bacterias son positivas fue necesario hacer un PCR de cada una por separado. La Figura 8 justamente ilustra

éstos resultados; en otras palabras aquí se puede observar los resultados de la amplificación del gen *bfpA* para cada una de las 5 colonias que, en conjunto, mostraron la banda de 324 pb anteriormente. De igual manera se puede observar que el control positivo presenta la banda de 324 pb, la misma que está ausente en el control negativo y en la K12. De las 27 muestras que se analizaron solamente en 8 amplificó la banda de 324 pb, lo que indica que solo éstas son positivas para EPEC. Debajo de la Figura 8 se encuentra el orden en que se colocó las muestras en el gel y aquellas que son positivas están marcadas con un “+”. La Tabla 2 muestra las cepas que resultaron positivas para EPEC junto al ciclo y a la salida a la cual corresponden, el código de muestra, la fecha de recolección de la muestra, la comunidad de donde provienen, la edad del individuo del cual fueron aisladas y si son caso o control.

Un simple análisis estadístico, indica que se pudo aislar cepas de EPEC del 0.8% del total de las muestras de heces recolectadas, del 2.5% de los casos de diarrea y del 0.14% de las muestras controles.

6.2. Antibiogramas

Los resultados de los antibiogramas realizados a las cepas EPEC se muestran en la Tabla 3. Aquí se puede observar que el grupo cepas 9b, 9c, 9e y 84e presentan el mismo antibiograma; de igual manera las cepas 12a y 12b presentan el mismo patrón de resistencia y sensibilidad. Por otro lado las cepas 64b y 29e presentan cada una un antibiograma único dentro de éste grupo.

6.3. Electroforesis de campo Pulsado

En la Figura 9 se observan los resultados del PFGE. Todas las muestras, incluyendo el ladder, el control positivo y el control negativo, generaron un patrón de bandas bastante claro, a excepción de la muestra 12a. La muestra 12a se volvió a repetir junto con la muestra 12b y los controles, y se presenta de una manera más clara en la Figura 10. Se puede observar que las

cepas 9a, 9b y 9e tienen el mismo patrón de bandas. Lo mismo sucede con las cepas 12a y 12b. Por otro lado las cepas 84e, 29e y 64b muestran patrones diferentes al resto.

7. Discusión

7.1. Cepas que resultaron positivas para EPEC.

Es importante resaltar ciertos puntos de las 8 cepas de EPEC que se lograron aislar (Tabla 4). Todas las cepas provienen de niños entre 1.09 – 4.13 años. Esto concuerda con la información dispuesta en la introducción de este trabajo en donde se menciona que EPEC afecta principalmente a niños. También cabe resaltar que, si bien las cepas 84, 9, 12, y 64 corresponden a cepas de EPEC aisladas de casos de diarrea, la cepa 64 proviene de un control tomado dentro de la comunidad. Este ejemplo confirma el hecho que la presencia de EPEC en un individuo puede ser asintomática y también que los portadores sanos pueden servir de reservorio para ésta bacteria. Las cepas de EPEC aisladas provienen de comunidades diferentes a excepción de las muestras 9 y 12 que vienen de la comunidad Colon Eloy; la cepa 84 se aisló de la comunidad de Vaquerita, la 29 de la comunidad de Quinto Piso y la 64 de Borbón. Estas comunidades, como se observa en la Figura 3 están ubicadas a lo largo de diferentes ríos o de diferentes ramas de un río, y a excepción de la comunidad de Quinto Piso y de Borbón, las comunidades están bastante alejadas la una de la otra. También es importante resaltar que solamente el 2.5% de los casos de diarrea analizados fueron provocados por EPEC. A pesar de que este es un % relativamente bajo, es importante destacar que EPEC afecta principalmente a niños pequeños y por tanto su rango de infección se ve bastante reducido.

7.2. Antibiogramas

En este trabajo se utilizó el antibiograma para tener una idea inicial de la posible relación entre las cepas de EPEC aisladas, y en base a esto ubicarlas en el gel del PFGE. El hecho de

agrupar en el gel las cepas que posiblemente están relacionadas facilita el análisis de los resultados. También es de interés el comparar los resultados del antibiograma y del PFGE y de hacer una evaluación de ambos métodos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las cepas 9b, 9c, 9e y 84e podrían ser clones ya que presentan el mismo antibiograma. No llama la atención que las cepas 9b, 9c y 9e tengan el mismo patrón de resistencia y sensibilidad a los antibióticos ya que provienen de un mismo individuo y muy posiblemente sean clones; pero es interesante que la cepa 84e, que es de un individuo diferente, también presente el mismo patrón. Las cepas 12a y 12b también presentan el mismo antibiograma y debido a que provienen del mismo individuo muy posiblemente son clones. Por otro lado las cepas 64b y 29e presentan antibiogramas únicos dentro del grupo, por lo que se podría asumir que corresponden a diferentes bacterias. Es importante recalcar que debido a la facilidad con la que las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos, especialmente a través de transferencia horizontal de genes, el antibiograma no se considera como un método de tipificación confiable; pero como se mencionó anteriormente sí sirve para brindar una idea inicial de la posible relación entre cepas.

7.3. Electroforesis de Campo pulsado

Se puede decir que se realizó de manera adecuada la técnica del PFGE ya que todas las muestras y los controles muestran un patrón de bandas bastante claro. Solamente fue necesario repetir la muestra 12b ya que la bandas estaban muy poco definidas. Esto posiblemente se debe a que en el momento de introducir el plug en los pozos del gel, se lo estropeo un poco.

Los resultados muestran que las cepas 9a, 9b y 9e tienen el mismo patrón de bandas en el PFGE, y también presentan un mismo antibiograma por lo que se puede decir que son clones. Lo mismo se puede decir de las cepas 12 a y 12 b. Estos patrones de clonalidad obtenidos no son tan

significativos ya que los clones pertenecen a un mismo individuo. La cepa 84 mostró el mismo antibiograma que las cepas 9a, 9b y 9e, sin embargo esta mostró un patrón de bandas distinto en el PFGE. Debido a que el PFGE es un método más discriminatorio que el antibiograma, se puede decir que la cepa 84 es diferente a las cepas 9a, 9b y 9e. Este caso justamente confirma la importancia de los métodos de tipificación moleculares y en este caso del PFGE para establecer la relación entre dos o más bacterias. En cuanto a las cepas 29e y 64b muestran un patrón de bandas y un antibiograma diferente al resto por lo que se puede decir que son cepas diferentes. En general se puede decir que no se encontró clones de EPEC aislados de individuos distintos; solamente se encontró clones pertenecientes a un mismo individuo. Estos resultados indican que no existe una relación aparente entre las cepas EPEC aisladas de los distintos casos de diarrea, y entre la cepa de EPEC que se pudo aislar de un individuo control. A pesar de que las muestras analizadas son muy pocas, esto podría indicar que las cepas de EPEC no se están movilizándose de una manera significativa entre las comunidades de la zona. Sin embargo, es importante mencionar que un factor que puede haber influenciado en los resultados obtenidos es el hecho de que todas las comunidades de donde se aislaron las cepas, a excepción de Quinto Piso y Borbón, están relativamente distantes entre sí y están ubicadas en la orilla de diferentes ríos o de diferentes ramas de los ríos de la zona (Figura 3). El hecho de que las comunidades no estén compartiendo el agua de un mismo río, siempre constituye a un medio de transporte menos a través del cual las cepas de EPEC se pueden movilizar. También el reducido número de muestras analizadas puede haber influenciado al hecho de que no se haya encontrado clonalidad entre las cepas de EPEC aisladas de las distintas comunidades.

8. Conclusiones

En éste estudio se demostró que la técnica de PCR es una técnica adecuada para el diagnóstico de EPEC. De todas las muestras analizadas solamente 8 cepas resultaron ser positivas para EPEC; todas estas cepas fueron aisladas de niños entre 1.09 – 4.13 años. Siete de las cepas de EPEC fueron aisladas de casos de diarrea mientras que la última proviene de un individuo control dentro de la comunidad. Este ejemplo confirma el hecho que la presencia de EPEC en un individuo puede ser asintomática.

Dentro de las cepas de EPEC analizadas se encontró dos grupos de clones 9a, 9b, 9e, y 12a y 12b. Estos presentaron el mismo patrón de bandas en el PFGE y el mismo antibiograma. Esto no resulta tan sorprendente ya que cada grupo de clones pertenece a un mismo individuo. La cepa 84e mostró un antibiograma igual al de las cepas 9a, 9b, 9e, pero reveló un patrón de bandas único dentro del grupo. Debido a que el antibiograma es un método menos discriminatorio que el PFGE se puede decir que las cepas 84 y 9 son diferentes. Las cepas 64b y 29e mostraron un antibiograma y patrón de bandas único por lo que se asume que son bacterias diferentes.

Se demostró que el PFGE es un método mucho más discriminatorio que los antibiogramas ya que como se mencionó anteriormente cepas que mostraron el mismo patrón de sensibilidad y resistencia a los antibióticos, mostraron diferentes patrones de bandas en el PFGE.

Finalmente se puede decir que no se encontró clonalidad en las cepas EPEC aisladas de individuos diferentes. A pesar de que las muestras analizadas son muy pocas, esto podría indicar que las cepas de EPEC no se están movilizándose de una manera significativa entre las comunidades de la zona.

9. Recomendaciones

Los aislados positivos de EPEC que se obtuvieron y los cuales fueron utilizados como material de estudio para la tipificación mediante PFGE y los antibiogramas, fueron muy pocos. Se lograron obtener 8 cepas de EPEC, de las cuales solamente 5 correspondían a individuos diferentes. Esto sin duda limitó bastante los resultados de este trabajo. Para un estudio futuro de este tipo se recomendaría analizar una muestra más grande y más representativa, es decir que contenga muestra aisladas de un mayor número de comunidades.

10. Bibliografía

- Arbeit, R.D., M. Arthus, R. Dunn, C. Kim, R. K. Selander y R. Goldstein. 1990. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: the application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *Journal of Infectious Diseases* **161**:230–235.
- Barrett T. J., Lior H., Green J. H., Khakhria R., Wells J. G., Bell B. P., Greene K. D., Lewis J. y P.M. Griffin. 1994. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. *Journal of Clinical Microbiology* **32**: 3013-3017.
- Davis Margaret A., Hancock Dale D., Besser Thomas E. y Douglas R. Call. 2003. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**: 1843-1849.
- Donenberg Michael y Kaper James. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **60**: 3953-3961.
- Donnenberg Michael. 2002. *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen. Elsevier Science.
- Eisenberg Joseph N.S., Cevallos William, Ponce Karina, Levy Karen, Bates Sarah J., Scott James C., Hubbard Alan, Vieira Nadia, Endara Pablo, Espinel Mauricio, Trueba Gabriel, Riley Lee W. y James Trostle. 2006. Environmental change and infectious disease: how new roads affect the transmission of diarrheal pathogens in rural Ecuador. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 19460-19465.
- Frankel Gad, Phillips Alan D., Rosenshine Ilan, Dougan Gordon, Kaper James B. y Stuart Knutton. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* : more subversive elements. *Molecular Microbiology* **30**: 911-921.
- Harsono Kartika D., Kaspar Charles W. y John B. Luchansky. 1993. Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3141-3144 .
- Hunter Susan B., Vauterin Paul, Lambert- Fair Mary Ann, Van Duyne Susan, Kubota Kristy, Graves Lewis, Wrigley Donna, Barrett Timothy y Efrain Ribot. 2005. Establishment of a universal size standard strain for use for the pulse- field gel electrophoresis protocols: converting the national database to the new size standard. *Journal of Clinical Microbiology* **43.3**: 1045-1050.
- Johnson Janelle, Weagant Stephen, Linneman Karen y James L. Bryant. 1995. Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* O157:H7 during a food-borne outbreak. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 2806-2808 .

- Krause U., Thomson-Carter FM y TH Pennington. 1996. Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 959-961.
- Mitsuda Toshihiro, Muto Tetsunori, Yamada Mikiko, Kobayashi Nobuyoshi, Toba Masanori, Aihara Yukoh, Ito Akira y Shumpei Yokota. 1998. Epidemiological study of a food-borne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* O25:NM by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 652-656.
- Morse Stephen S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. The Rockefeller University, New York, New York, USA
- Nataro James P. y James B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology* **11**: 142-201.
- Noller Anna C., McEllistrem M. Catherine, Stine O. Collin, Morris J. Glenn, Boxrud David J., Dixon Bruce y Harrison Lee H. 2003. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. 2003. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 675-679.
- Olive Michael y Pamela Bean. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **37**: 1661-1669.
- Riley Lee W. 2004. Molecular epidemiology of infectious diseases: principles and practices. American Society of Microbiology Press.
- Rodriguez Ageles Guadalupe. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* **44**:464-475.
- Romeshk Gautom. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2977- 2980.
- Tenover Fred C., Arbeit Robert D., Goering Richard V., Mickelsen Patricia A., Murray Barbara E., Persing David H. y Bala Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 2233-2239.

11. Tablas

Comunidad	Tamaño de la Población	Distancia de la carretera en metros	Categoría en base distancia de Borbón	Categoría en base a cercanía de río o carretera
Ranchito	284	0.012	Cerca	Carretera
La Loma	731	0.015	Cerca	Carretera
San Agustín	78	0.022	Cerca	Cayapas
Timbire	482	0.027	Cerca	Carretera
Colon Eloy	156	0.040	Mediano	Santiago
Quinto Piso	55	0.040	Mediano	Bajo Borbón
La Peña	138	0.040	Mediano	Bajo Borbón
Rocafuerte	72	0.049	Mediano	Carretera
Wimbí	90	0.049	Mediano	Santiago
Guayabal	60	0.061	Mediano	Onzole
Playa de Oro	86	0.080	Mediano	Onzole
Naranjal	110	0.113	Mediano	Cayapas
Las Cruces	135	0.122	Mediano	Santiago
Vaquerita	83	0.140	Lejos	Onzole
Tangare	300	0.152	Lejos	Santiago
Arenales	228	0.155	Lejos	Santiago
Santo Domingo	79	0.158	Lejos	Cayapas
El Rosario	268	0.165	Lejos	Cayapas
Telembi	28	0.173	Lejos	Onzole
Trinidad	443	0.190	Lejos	Onzole
San Miguel	130	0.198	Lejos	Cayapas
Borbon	864	0		

Tabla 1. Características de las comunidades incluidas en el área de estudio (Eisenberg

ERROR: syntaxerror
OFFENDING COMMAND: --nostringval--

STACK:

68
6330
2