

***Escherichia coli* DIARREOGÉNICAS PROCEDENTES DE AGUAS MARINAS RECREACIONALES CARACTERIZADAS POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

Diarrheagenic *Escherichia coli* from Marine Recreational Waters Characterized by Polymerase Chain Reaction

Rosa Elena Martínez-Nazaret*, Luz Bettina Villalobos de Bastardo y Lena Karina Castillo

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Postgrado en Biología Aplicada. Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

*Teléfono: 0058-414-7755678. Fax: 0293-4002270. rosamnazaret@hotmail.com

RESUMEN

Con la finalidad de detectar la presencia de cepas de *Escherichia coli* patógenas asociadas a casos de diarrea aguda en aguas marinas destinadas a actividades recreacionales, se analizaron muestras de agua de cinco playas de interés turístico en el estado Sucre, Venezuela. Para el aislamiento de *E. coli* se utilizó la técnica de filtración por membrana. La identificación de los genes de virulencia, asociados a las categorías diarreogénicas de *E. coli*, se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes evaluados fueron: *eae* y *bfp* para *E. coli* enteropatógena (ECEP), *st* y *lt* para *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *ipaH* y *virF* para *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *sxt1* y *sxt2* para *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *aafII* para *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg), y *daaE* para *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). Setenta y siete cepas de *E. coli* lograron ser identificadas. La amplificación por PCR reveló la presencia de ECEP en 16,90% de las cepas, ECEAgg en un 6,50%, ECST en un 2,60% y cepas no patógenas en un 74,00%. Los resultados demuestran que algunos de los genes asociados con factores de virulencia de *E. coli*, están circulando en aguas marinas, al menos en la zona geográfica analizada.

Palabras clave: *Escherichia coli* diarreogénica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), aguas marinas recreacionales.

ABSTRACT

In order to detect the presence of pathogenic *Escherichia coli* strains associated with acute diarrhea in marine waters for rec-

reational activities, water samples of five recreational beaches in Sucre State, Venezuela were analyzed. For the isolation of *E. coli* membrane filtration technique was used. Identification of genes associated with virulence categories of diarrheagenic *E. coli*, was made by polymerase chain reaction (PCR). Evaluated genes were: *bfp* and *eae* for enteropathogenic *E. coli* (EPEC), *st* and *lt* for enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), and *virF ipaH* for enteroinvasive *E. coli* (EIEC), *sxt2* and *sxt1* from *E. coli* shiga-toxigénica (ECST), *aafII* for enteroaggregative *E. coli* (ECEAgg), and *daae* for diffusely adherent *E. coli* (ECAD). Seventy seven strains of *E. coli* were identified. PCR amplification revealed the presence of EPEC in 16.90% of the strains, ECEAgg in a 6.50% ECST at 2.60% and non-pathogenic strains into a 74.00%. Results demonstrated that some genes associated with virulence factors of *E. coli* are circulating in sea water, at least in analyzed the geographical area.

Key words: Diarrheagenic *Escherichia coli*, polymerase chain reaction (PCR), recreational marine waters.

INTRODUCCIÓN

Las playas costeras son zonas de esparcimiento muy concurridas durante todo el año, en donde las actividades acuáticas brindan beneficios importantes para la recreación, salud y bienestar de las personas. No sólo benefician a los pobladores, también atraen a numerosos turistas cuyos desembolsos favorecen a las economías locales. Sin embargo, el baño en el agua de mar puede representar riesgos para la salud de los usuarios, debido a que las aguas pueden estar contaminadas con excretas humana; las cuales pueden contener agentes patógenos causantes de infección, enfermedad y muerte [21, 28].

Para evaluar la calidad microbiana del agua de mar, existen guías y normas de calidad que utilizan microorganismos indicadores, los cuales indirectamente sugieren la presencia potencial de microorganismos patógenos [5]. Dentro de estos indicadores se encuentran los microorganismos intestinales normales como los coliformes fecales y en particular *Escherichia coli*, los cuales se han convertido en un principio de aceptación universal en la vigilancia y evaluación de la seguridad microbiana de los cuerpos de agua [7, 9].

Existen varias razones para que *E. coli* sea el principal indicador bacteriano en agua potable, aguas residuales, aguas recreativas y aguas de cultivo de moluscos y de crustáceos. La investigación ha demostrado que *E. coli* está universalmente presente en las heces de los animales de sangre caliente en densidades de 10^8 a 10^9 UFC/gramo de heces y comprende casi el 95% de los coliformes en heces, a diferencia de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* que pueden estar presentes, pero en densidades mucho menores [15].

De acuerdo a las diversas y numerosas bibliografías existentes, *E. coli* se puede determinar en aguas a partir de métodos que no requieren de grandes inversiones que incluyan la compra de equipos sofisticados. Métodos convencionales como el número más probable (NMP), filtración por membrana y métodos cromogénicos y fluorogénicos, han resultado útiles para determinar la presencia o ausencia de este microorganismo [2, 8, 9, 14, 20, 28, 29, 30]. Sin embargo, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos [27], refiere que no hay certeza de que exista una relación significativa entre la cuantificación de *E. coli* y las enfermedades relacionadas con el baño en el agua de mar, ya que estos métodos de enumeración o estimación de densidad poblacional, no revelan necesariamente que dicho número está representado por cepas patógenas.

Para tener la información completa acerca de la capacidad patogénica de la cepa aislada es preciso detectar genéticamente los factores de virulencia mediante técnicas de biología molecular. Uno de los métodos moleculares ampliamente utilizado es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [13]. Este procedimiento ha sido probado y ha producido resultados relevantes en el estudio de las infecciones por *E. coli* enteropatógenas. Estudios como el de García y col. [6] refieren que, a partir de la técnica de PCR, se pueden detectar genes como el *stx2*, característico de *E. coli* productoras de shiga toxinas a partir de muestras ambientales. Nueve serotipos de *Escherichia coli* shigatoxigénica (ECST) que no habían sido descritos con anterioridad, pudieron ser identificados (O2:H2, O8:H31, O89:H19, O127:H-, O162:H7, O166:H21, O177:H-, O181:H20 y O181:H49), mostrando una gran variabilidad en cuanto a la combinación de diferentes genes de virulencia (*stx1*, *ehxA*, *saa* y *eaeA*), lo que podría indicar el movimiento de estos genes entre las diferentes poblaciones bacterianas que circulan en las aguas residuales urbanas de Cataluña, España [6].

La monitorización por PCR de cepas enteropatógenas de *E. coli* aisladas de aguas marinas, puede resultar ventajoso

y beneficioso para aportar información importante acerca de la epidemiología de las infecciones causadas por estos patógenos a partir del agua de uso recreacional. A pesar que la implementación de esta técnica no es una exigencia en las normativas venezolanas para valorar la calidad microbiológica de las aguas recreacionales [22], resultó de interés desarrollar un trabajo donde a partir de la utilización de la técnica de PCR, se pudieran identificar los distintos factores de virulencia en cepas de *E. coli* procedentes de aguas marinas contaminadas.

En Venezuela, no existen reportes de la aplicabilidad de este método para valorar la calidad microbiológica de un cuerpo de agua, por lo que se propuso llevar a cabo una investigación donde el objetivo principal fue caracterizar por PCR, aislados de *E. coli* procedentes de aguas marinas recreacionales del estado Sucre, Venezuela, con la única finalidad de demostrar que las aguas marinas pueden constituir un reservorio de cepas patógenas con potencial genético para causar enfermedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se analizaron muestras de agua durante un período de seis meses provenientes de cinco playas de interés turístico en el estado Sucre, Venezuela: Peñón (10°26'55" Lat. N.; 64°05'16" Long. O.), Culi (10°26'28" Lat. N.; 64°03'43" Long. O.), Güirintal (10°26'25" Lat. N.; 64°02'30" Long. O.), Tocuchare (10°26'34" Lat. N.; 64°00'25" Long. O.) y Quetepe (10°26'07" Lat. N.; 64°01'20" Long. O.) (FIG. 1). El muestreo se realizó en una sola estación por playa la cual se seleccionó al azar, a una distancia de 3 metros de la orilla y a primeras horas de la mañana. Se tomó una muestra semanal por cada playa de aproximadamente 250 mL de agua en un frasco estéril y previamente rotulado, a una profundidad de 20 cm a 30 cm y en sentido opuesto a la corriente.

Aislamiento e identificación de *Escherichia coli*

Para el aislamiento de *E. coli* se utilizó la técnica de filtración por membrana, descrita en el Compendio de Métodos Estándar para el Análisis de Agua y Agua Residual [2]. Preparado el equipo de filtración, la muestra de agua se homogeneizó agitándola vigorosamente 25 veces en un ángulo de 45°. Se tomó en un cilindro estéril, un volumen de 100 mL de agua y se vertió cuidadosamente en la copa de filtración y se aplicó vacío a 12 libras de presión, haciendo pasar la muestra a través de una membrana de nitrocelulosa con poros de 0.45 µm de diámetro (Millipore, Mosheim, Francia). Este procedimiento se hizo por duplicado. Culminado el proceso de vacío, se procedió a la transferencia e incubación de la membrana en una placa de Petri plástica estéril, preparada previamente con 4 mL de agar eosina azul de metilo (EMB Levine), por sus siglas en inglés Eosin Methylene Blue (Becton Dickinson and Company,

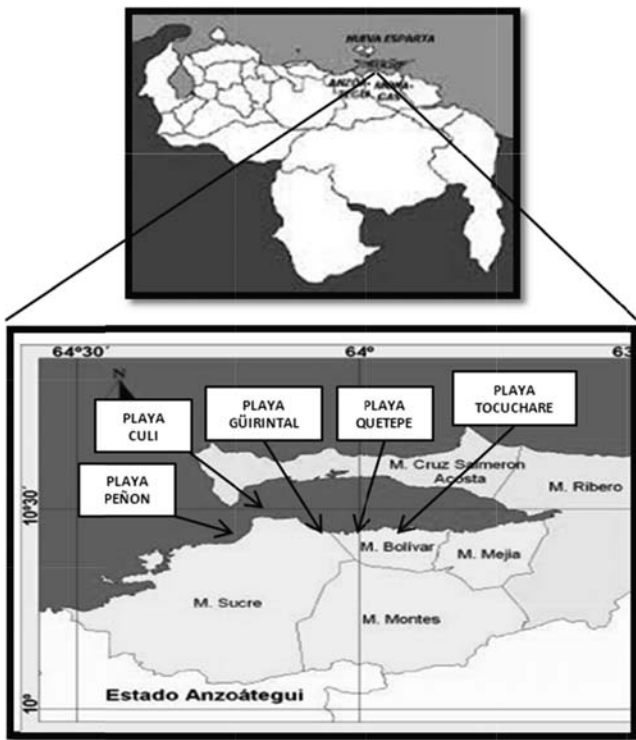


FIGURA 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS PLAYAS MUESTREADAS: PEÑÓN, CULÍ, GÜIRINTAL, QUETEPE Y TOCUCHARE. ESTADO SUCRE, VENEZUELA.

EUA). Se presionó suavemente la membrana sobre el medio de cultivo y se incubó de 22 a 24 horas a 35°C en una incubadora (Lab-Line instruments, modelo Imperial III, EUA). Una vez culminado el período de incubación, se seleccionaron aquellas colonias de color morado con o sin brillo metálico, se les realizó una tinción de Gram y la prueba de oxidasa junto con la identificación bioquímica según Koneman y col. [12]. Los medios de identificación utilizados fueron los siguientes: Agar Hierro Triple Azúcar (TSI) (Becton Dickinson and Company, EUA), Agar Motilidad indol Ornitina (MIO) (Becton Dickinson and Company, EUA), Medio rojo de metilo y Vogues Proskauer (RM y VP) (Becton Dickinson and Company, EUA) y Agar Citrato (Becton Dickinson and Company, EUA). Los resultados fueron confirmados mediante el uso de galerías Rapid 20E (BioMérieux, Francia), un sistema de identificación manual en cuatro horas, de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativo, que combina ocho pruebas convencionales y doce de asimilación en una galería con 20 microtubos conteniendo medios y/o sustratos en forma deshidratada.

Extracción del ADN genómico de las cepas de *E. coli* identificadas

Se siguió el procedimiento estándar de extracción por lisis, descrito por Rivas y col. [23], el cual consistió en suspender cinco colonias de cada una de las cepas en 150 µL de Triton 100X al 1% en buffer TE 1X. Seguidamente se llevó a ebullición por 15 min a fin de lisar por calor las células bacterianas.

Finalmente, se centrifugó a 5000 g durante 5 min (centrifuga eppendorf, modelo 5415-C, Brinkmann Instruments, Inc, EUA). Se tomó el sobrenadante como templado de ADN y se realizó una electroforesis en gel de agarosa preparada al 2% (con buffer TBE 1X y bromuro de etidio al 1%), corrida a 80 voltios por 1 h y 10 min, utilizando como vehículo de transmisión de corriente buffer TBE 1X, a fin de constatar la presencia de ADN.

Detección de genes de virulencia de *E. coli*

A todas las cepas de *E. coli* aisladas e identificadas, se les investigó por PCR los genes de virulencia *eae* y *bfp* (determinantes de adherencia y esfacelación del enterocito y producción de pili de adherencia tipo IV de *E. coli* enteropatógena ECEP) [11, 29], *st* y *lt* (enterotoxina termoestable y enterotoxina termolábil de *E. coli* enterotoxigénica ECET), *stx1* y *stx2* (Shigatoxinas tipo I y II de *E. coli* shigatoxigénica ECST) [16], *ipaH* y *virF* (proteínas de secreción que facilitan la invasión y colonización de *E. coli* enteroinvasiva ECEI), *aafIII* (fimbria de adherencia agregativa de *E. coli* enteroagregativa ECEAgg) y *daaE* (fimbria de adherencia de *E. coli* de adherencia difusa ECAD) [29] (TABLA I).

Se realizó una mezcla de reacción con un volumen final de 25 µL: 2,5µL de cada oligonucleótido (2µM), 5µL de agua libre de endonucleasas, 12,5µL de master mix (Promega, EUA: 50 unidades/mL de *Taq* DNA, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP, 3 mM MgCl₂) y 2,5µL de templado de ADN. Cada ensayo, fue evaluado con cepas controles positivos y negativos, provenientes del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos [4]. Los controles utilizados fueron: ECEP gen *eae* (Control positivo: *E. coli* CDC EDL 933; Control negativo: *E. coli* ATCC 25922) y gen *bfp* (Control positivo: *E. coli* O55:H7; Control negativo: *E. coli* ATCC 25922, ECET (Control positivo: *E. coli* O15:H11; Control negativo: *E. coli* ATCC 25922), ECST (Control positivo: *E. coli* CDC EDL 933 O157:H7; Control negativo: *E. coli* ATCC 25922), ECEI (Control positivo: *E. coli* K1a O28:NM, Control negativo: *E. coli* ATCC 25922), ECEAgg (Control positivo: *E. coli* O42; Control negativo: *E. coli* ATCC 25922) y ECAD (Control positivo: *E. coli* F-1845; Control negativo: *E. coli* ATCC 25922).

Los ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (Gene Amp Perkin-Elmer Applied Biosystems 9700, EUA) y los productos fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1500 pb (Promega, EUA) y los geles fueron fotografiados bajo luz ultravioleta, utilizando el sistema de fotodocumentación modelo Gel Doc (BioRad, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 120 muestras de agua provenientes de las playas (Peñón, Culi, Güirintal, Quetepe y Tocuchare) fueron analizadas, lográndose aislar 80 cepas presuntivas de *E. coli*.

TABLA I
SECUENCIAS, CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN Y AMPLICON ESPERADO DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA ASOCIADOS CON *E. coli* PATÓGENAS

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Programa de amplificación	Tamaño del Amplificado (bp)
<i>eae-F</i> <i>eae-R</i>	GTGGCGAATACTGGCGAGACT CCCCATTCTTTTCACCGTCG	95°C x 3min, 30 Ciclos (95°C x 20s; 58°C x 40s; 72°C x 30s) 72°C x 5min.	482
<i>bfp</i> <i>bfp-1</i>	GGAAGTCAAATTCATGGGGTT CCCCATTCTTTTCACCGTCG	94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1,5min; 60°C x 1,5min; 72°C x 1,5min) 72°C x 7min	300
genes <i>STI</i> y <i>STIa</i> SRM 148 ^a SRM148B ^a SRM149 <i>Gen LT</i> SRM152 SRM154	TCTGTATTATCTTTCCCCTCTT AGTC GTATTGTCTTTTCACCTTTCGTCC GCAGGATTACAACACATTTCA CAGC CGACAGATTATACCGTGCTGA CTC GTAATCGTTCATCAATCACAC CAA	95°C x 15min, 10 Ciclos (95°C x 30s; 65°C x 20s; 72°C x 30s) y 30 Ciclos (95°C x 30s; 60°C x 20s; 72°C x 30s) 72°C x 7min	169 466
<i>IpaH</i> <i>IpaH-1</i> <i>VirF</i> <i>virF-1</i>	CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGC GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC AGC TCAGGCAATGAAACTTTGAC AGCTCAGGCAATGAAACTTTGAC	94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1,5min; 60°C x 1,5min; 72°C x 1,5min) 72°C x 7min	933 618
<i>Stx</i> _{1,1} <i>Stx</i> _{2,1} SRM129	CTGGATTTAATGTCGCATAGTGG CTGGCGTTAATGGAGTTCAGTG TGATGATGACAATTCAGTATAACT GCC AC	95°C x 15min, 10 Ciclos (95°C x 30s; 65°C x 20s; 72°C x 30s) y 30 Ciclos (95°C x 30s; 60°C x 20s; 72°C x 30s) 72°C x 7min	313
<i>aaflI</i> <i>aaflI-1</i>	CACAGGCAACTG AAATAAGTCTGG ATTCCCATGATGTCAAGCACTTC	94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1,5min; 60°C x 1,5min; 72°C x 1,5min) 72°C x 7min	378
<i>daaE</i> <i>daaE-1</i>	GAACGTTGGTTAATGTGGGGTAA TATTCACCGGTCGGTTATCAGT	94°C x 5min, 35 Ciclos (94°C x 1,5min; 60°C x 1,5min; 72°C x 1,5min) 72°C x 7min	542

La identificación bioquímica demostró que del 100% de las cepas aisladas, 77 (96,25%) resultaron identificadas como *E. coli*, obteniéndose el mayor número de estas cepas a partir de las playas Peñón, Güirintal y Tocuchare (FIG. 2).

El porcentaje de aislamiento obtenido de *E. coli*, es un indicativo de que las playas evaluadas y en especial Peñón, Güirintal y Tocuchare están siendo sometidas a fuentes de contaminación fecal. Si bien el reservorio principal de estas cepas lo constituyen los animales de sangre caliente, también se ha observado que las descargas constantes de aguas residuales, tanto humanas como animales, podrían contribuir al mantenimiento de estas cepas en el medio ambiente, posibilitando la recolonización del intestino al entrar de nuevo en contacto con ellas, a partir del contacto directo con aguas contaminadas [10]. En el caso de las playas en estudio, esta situación es factible, ya que en las márgenes de éstas, se encuentran poblaciones humanas que están ocasionando la degradación de la costa e insalubridad de la misma, y los desagües domésticos se hacen de forma directa al mar, junto con restos de desechos sólidos.

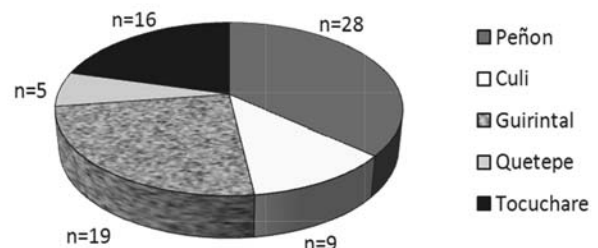


FIGURA 2. NÚMERO DE CEPAS AISLADAS E IDENTIFICADAS COMO *E. coli*, EN MUESTRAS DE AGUA PROCEDENTES DE PLAYA PEÑÓN, CULÍ, GÜIRINTAL, QUETEPE Y TOCUCHARE, ESTADO SUCRE, VENEZUELA.

Pese a que se considera que *E. coli* patógena representa menos del 1% del total de coliformes presentes en el agua contaminada [3], algunos estudios revelan que es posible cursar cuadros agudos de diarrea, producto de la inges-

ción del agua contaminada. Estudios como el de Akman y col. [1]; Samadpour y col. [24]; y Olsen y col. [19] reportan el aislamiento de cepas patógenas de ECST O157:H7 en campistas que habían acudido a lagos de uso recreacional en Estados Unidos y cursaron cuadros agudos de diarrea, producto de la ingestión del agua contaminada de esos sitios recreacionales.

La amplificación por PCR de los genes de virulencia asociados a las categorías diarreogénicas de *E. coli*, reveló que del total de las cepas aisladas, 16,90% eran del tipo ECEP, 6,50% del tipo ECEAgg, 2,60% del tipo ECST y 74,00% eran cepas no patógenas (FIG. 3).

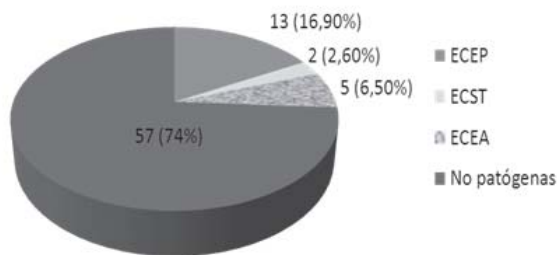


FIGURA 3. PATOTIPOS DIARREOGÉNICOS DE *E. coli*, AISLADOS E IDENTIFICADOS EN LAS MUESTRAS DE AGUAS MARINAS DE LAS PLAYAS PEÑON, CULÍ, GÜIRINTAL, QUETEPE Y TOCUCHARE, ESTADO SUCRE, VENEZUELA.

El tipo más frecuente de *E. coli* aislado fue ECEP, con el 16,90% (13/77). La corrida electroforética reveló bandas de aproximadamente 482 bp, indicando que dichas cepas portaban el gen *eae* (FIG. 4). En cinco de las cepas anteriormente citadas, además de amplificar el gen *eae* amplificó el gen *bfp* (6,50%) (FIG. 5), lo que permitió clasificar las cepas como ECEP “típicas”, mientras que las ocho cepas restantes (10,40%) fueron catalogadas como ECEP “atípicas”, porque sólo amplificó el gen *eae*. Resultados similares fueron reportados por Salinas y col. [25], quienes analizando aguas marinas de la bahía de Iquique al norte de Chile, lograron detectar 18 cepas positivas EPEC/*eae* + por la técnica de PCR, confirmando la presencia de estas cepas en las aguas de la bahía.

Se presume que las cepas típicas son más virulentas que las atípicas; sin embargo, las cepas de ECEP atípicas se siguen reportando como enteropatógenos causantes de cuadros diarreicos y en especial, en países en desarrollo [17, 18, 26], por lo que no es extraño haber encontrado un mayor porcentaje de ECEP atípicas en aguas procedentes de las playas en estudio.

Junto con ECEP, las ECST también fueron identificadas, dos (2,60%) cepas amplificaron para el gen que codifica la producción de toxinas shiga (*stx1* y *stx2*). Estos resultados fueron evidenciados en el gel de agarosa, por la presencia de amplificadores de aproximadamente 313 bp (FIG. 6). Para el patotipo ECEAgg, cinco cepas (6,50%) mostraron amplificadores de aproximadamente 378 bp, indicando la presencia del gen de patogenicidad *aaffI* (FIG. 7).

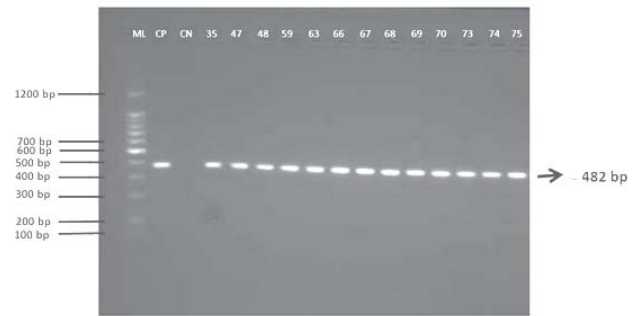


FIGURA 4. ANÁLISIS A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2% DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR PARA EL GEN *eae* (ECEP). POZOS: (1) MARCADOR DE PESO MOLECULAR; (2) CONTROL POSITIVO (*E. coli* CDC EDL 933); (3) CONTROL NEGATIVO (*E. coli* ATCC 25922); (4-16) CEPAS POSITIVAS.

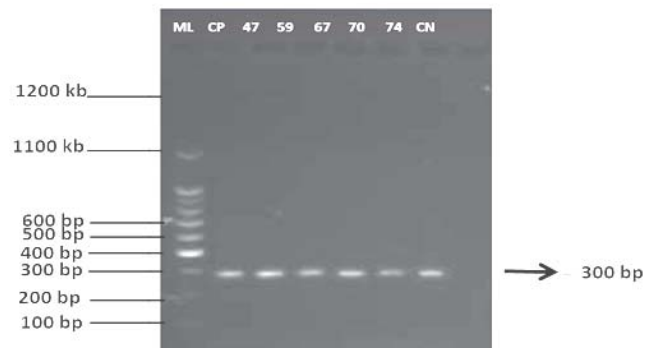


FIGURA 5. ANÁLISIS A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2% DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR PARA EL GEN *bfp* (ECEP). POZOS: (1) MARCADOR DE PESO MOLECULAR; (2) CONTROL POSITIVO (*E. coli* O55:H7); (3-7) CEPAS POSITIVAS; (8) CONTROL NEGATIVO (*E. coli* ATCC 25922).

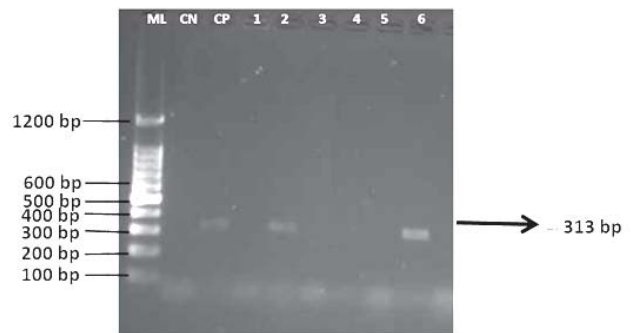


FIGURA 6. ANÁLISIS A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2% DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR PARA EL GEN *stx1* y *stx2* (ECST). POZOS: (1) MARCADOR DE PESO MOLECULAR; (2) CONTROL NEGATIVO (*E. coli* ATCC 25922); (3) CONTROL POSITIVO (*E. coli* CDC 933 O157:H7); (5,9) CEPAS POSITIVAS.



FIGURA 7. ANÁLISIS A TRAVÉS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2% DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR PCR PARA EL GEN *aaf* (ECEA). POZOS: (1) MARCADOR DE PESO MOLECULAR; (2) CONTROL NEGATIVO (*E. coli* ATCC 25922); (3-8) CEPAS NEGATIVAS; (9) MARCADOR DE PESO MOLECULAR; (10) CONTROL POSITIVO (*E. coli* 042), (11-15) CEPAS POSITIVAS.

La presencia del patotipo diarreogénico ECST ya ha sido demostrado por autores como García y col. [6], quienes analizando muestras de aguas ambientales, encontraron variantes del gen *stx2* en aislados de *E. coli*. De todas las muestras, principalmente las más expuestas a desagües domésticos, fueron las que mostraron el más alto porcentaje (45,83%) de aislados portadores del gen *stx2*, por lo que la salida de este tipo de agua hacia al ambiente, conlleva a que estos factores de virulencia puedan propagarse efectivamente a través de las poblaciones bacterianas y convertirse en una parte importante del pool de ECST en el ambiente.

Los resultados hallados en este estudio ponen en evidencia que, los genes asociados con los patotipos enteropatógeno, shigatoxigénico y enteroagregativo pueden perfectamente distribuirse y mantenerse en el ambiente marino, lo que genera un riesgo para los bañistas que acuden a estas playas, ya que al tener contacto e ingerir estas aguas contaminadas, se está exponiendo a la población y en especial a la infantil, a cursar enfermedades entéricas.

Este hallazgo es de importancia relevante, ya que este sería el primer estudio en el país que evidencia por PCR, la presencia de genes codificantes para factores de virulencia de diferentes patotipos de *E. coli* en aguas marinas, por lo que se sugiere implantar una vigilancia por parte de las autoridades sanitarias correspondientes, a modo de que se ejecuten medidas orientadas a la prevención de enfermedades transmitidas por aguas destinadas a actividades recreacionales.

CONCLUSIONES

Las playas analizadas (Peñón, Culí, Guirintal, Quetepe y Tocuchare), mostraron la presencia de *E. coli*, indicando una contaminación de naturaleza fecal.

La amplificación por PCR de los genes de virulencia asociadas a las categorías diarreogénicas de *E. coli*, reveló la presencia de los patotipos enteropatógeno (ECEP), enteroagregativo (ECEAgg) y shigatoxigénico (ECST).

El tipo más frecuente de *E. coli* aislado fue ECEP, lográndose identificar cepas típicas (gen *eae* y *bfp*) y atípicas (gen *eae*). Esta última, con los mayores porcentajes de aislamiento.

Los resultados revelan que los genes asociados con factores de virulencia de *E. coli*, están distribuidos en aguas marinas de la zona geográfica analizada, y que las descargas constantes de aguas residuales, tanto humanas como animales, podrían estar contribuyendo al mantenimiento de estas cepas en el medio ambiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACKMA, D.; MARKS, S.; MACKS, P.; CALDWELLS, M.; ROOT, T.; BIRKHEAD, G. Swimming-associated haemorrhagic colitis due to *Escherichia coli* O157:H7 infection: evidence of prolonged contamination of a fresh water lake. **Epidemiol. Infect.** 119: 1-8. 1997.
- [2] AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Ed. Washington, DC. 9222 B; 9260 B. 1999.
- [3] BARRIOS, L.; CAÑIZARES, N. Estudio preliminar de la calidad bacteriológica de las aguas del Río Neverí, Barcelona, Venezuela. **Saber.** 13 (2): 97-104. 2001.
- [4] CENTRO VENEZOLANO DE COLECCIONES DE MICROORGANISMOS (CVCM). Instituto de Biología Experimental Universidad Central de Venezuela. 295 pp. 2006.
- [5] CORTÉS, M. Importancia de los Coliformes fecales como indicadores de contaminación en la Franja Litoral de Bahía de banderas Jalisco-Nayarit. **Rev. Biomed.** 14: 121-123. 2003.
- [6] GARCÍA, C.; MUNIESA, M.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; JOFRE, J.; BLANCH, A. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **FEMS. Microbiol. Letters.** 246: 55-65. 2005.
- [7] GÓMEZ, F.; AGUIRRE, N.; BETANCOUR, J.; TORO, M. Distribución de dos indicadores bacterianos de calidad de agua en el Golfo de Urabá. **Invest.** 11 (3): 87-95. 2008.
- [8] GONZÁLEZ, M.; VILLALOBOS, L.; VÁSQUEZ, A.; GRAU, C.; GIL, H. Enumeración de aerobios mesófilos, coliformes fecales y *Clostridium perfringens* en la ostra *Crassostrea rhizophorae* procedente de laguna grande del obispo, Estado Sucre, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XXI (1): 80 - 87. 2011.

- [9] GONZÁLEZ, M.; TORRES, T.; CHIROLES, S. Calidad microbiológica de aguas costeras en climas tropicales. **Rev. Electron. Agen. Med. Amb.** 3(4). 8 pp. 2003.
- [10] IRIARTE, M. Niveles de bacterias coliformes en las descargas de aguas servidas que desembocan en la laguna de Punta de Piedras, Isla de Margarita, Venezuela. **Mem. Fund. La Salle.** 166: 81-93. 2007.
- [11] KIM, J.; KIM, S.; KWON, N.; BAE, W.; LIM, J.; KOO, H.; KIM, J.; NOH, K.; JUNG, W.; PARK, Y. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD. **J. Vet. Sci.** 6(1): 7-19. 2005.
- [12] KONEMAN, E.; ALLEN, S.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W. *Enterobacteriaceae*. Cap. III. **Diagnóstico Microbiológico**. 3ra Ed. Argentina: Editorial Panamericana. Pp. 203-267. 1997.
- [13] LÓPEZ-SAUCEDO, C.; CERNA, J.; VILLEGAS, N. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.** 9(1):127-131. 2003.
- [14] LÓPEZ, P.; SALAZAR, S.; FIGUEROA, Y.; LÓPEZ, J.; FUENTES, J. Calidad bacteriológica y fisicoquímica de aguas y sedimentos de cuatro playas de las costas del estado Nueva Esparta. **Cien.** 17(4): 271-280. 2009.
- [15] MARTIN, A.; EDBERG, S. La importancia para la salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable. En: **Reunión Regional Sobre Calidad del Agua Potable**. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). Lima 05/14-17, Perú. 8 pp. 1996.
- [16] MONDAY, S.; KEYS, C.; HANSON, P.; SHEN, Y.; WHITTAM, T.; FENG, P. Produce Isolates of the *Escherichia coli* Ont: H52 Serotype That Carry both Shiga Toxin 1 and Stable Toxin Genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 72(4): 3062-3065. 2006.
- [17] NGUYEN, R.; TAYLOR, L.; TAUSCHEK, M.; ROBINS, R. Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection and Prolonged Diarrhea in Children. **Emerg. Inf. Dis.** 12(4): 597-603. 2006.
- [18] OCHOA, T.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 102 (9): 852-856. 2008.
- [19] OLSEN, S.; MILLER, G.; BREUER, T.; KENNEDY, M.; HIGGINS, C.; WALDORF, J.; MCKEE, G.; FOX, K.; BIBB, W.; MEAD, P. A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: Implications for rural water systems. **Emerg. Infect. Dis.** 8:370-375. 2002.
- [20] PULIDO, M.; ÁVILA, S.; ESTUPIÑÁN, S.; GÓMEZ, A. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. **Nova. Public. Científ.** 3(4): 1-116. 2005.
- [21] RAMOS, L.; VIDAL, L.; VILARDI, S.; SAAVEDRA, L. Análisis de la Contaminación microbiológica (Coliformes totales y fecales) en la Bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. **Act. Biol. Colomb.** 13 (3): 87-98. 2008.
- [22] REPÚBLICA DE VENEZUELA. Gaceta oficial N° 5.021. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. Decreto 883. Caracas, Venezuela. 1995.
- [23] RIVAS, M.; LEOTTA, G.; CHINEN, I. Manual de procedimientos diagnósticos y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. Centro regional de referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. 139 pp. 2007.
- [24] SAMADPOUR, M.; STEWART, J.; STEINGART, K.; ADDY, C.; LOUDERBACK, J.; MCGINN, M.; ELLINGTON, J.; NEWMAN, T. Laboratory investigation of an *E. coli* O157:H7 outbreak associated with swimming in Battle Ground Lake, Vancouver, Washington. **J. Environ. Health.** 64:16-20. 2002.
- [25] SALINAS, P.; MORAGA, R.; SANTANDER, E.; SIELFELD, W. Presencia de cepas diarreogénicas de *E. coli* y estudio de genes de virulencia en aislados desde fecas de dos poblaciones de lobo marino común, *Otaria flavescens* en el norte de Chile. **Rev. Biol. Mar. Ocean.** 45(1):153-158. 2010.
- [26] SCALETSKY, I.; ARANDA, K.; SOUZA, T.; SILVA, N.; MORAIS, M. Evidence of pathogenic subgroups among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** 47 (11): 3756-3759. 2009.
- [27] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Improved enumeration methods for the recreational water quality indicators: Enterococci and *Escherichia coli*. Method: EPA/821/R-97/004. Office of Science and Technology. Washington, D.C. 48 pp. 2000.
- [28] VERGARAY, G.; MÉNDEZ, C.; MORANTE, H.; HEREDIA, V.; BÉJAR, V. *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. **Rev. Inst. Inv. FIGMMG.** 10 (20): 82-86. 2007.
- [29] VIDAL, M.; KRUGER, E.; DURÁN, C.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V.; TORO, C.; VIDAL, R. Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. **J. Clin. Microbiol.** 43(10):5362-5365. 2005.
- [30] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Emerging Issues in Water and Infectious Disease. France. 24 pp. 2003.