

IMPLEMENTACIÓN DE UN ENSAYO PCR MULTIPLEX PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ENTEROVARIEDADES DE *Escherichia coli* PATÓGENAS

Andrea Zambrano Cobos, Karina Ponce, Marcelo Grijalva, Santiago Escalante

RESUMEN

Escherichia coli patógenas se clasifican en *E. coli* Enterotoxigénica (ECET), *E. coli* Enteropatógena (ECEP), *E. coli* Enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* Enteroagregativa (ECEA), *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH) y *E. coli* difusa adherente (ECDA). El objetivo de esta tesis fue implementar un ensayo PCR multiplex para identificar cada *Escherichia coli* patógena, mediante un diseño de tipo exploratorio y confirmatorio. Primero, se obtuvieron las cepas control positivo y se aisló el ADN de cada una con un kit comercial, con el fin de optimizar las temperaturas de hibridación, evaluar la concentración final de cada primer y los tiempos del termociclador, para amplificar los genes *vt1*, *vt2*, *eae*, *estA*, *eltB*, *aggR*, *ipaH* y *Da*. La PCR multiplex fue dividida en dos, la primera amplificó las enterovariedades ECEH, ECEP y ECDA y la segunda ECET, ECEI y ECEA. Se realizó el límite de detección medido en concentración de ADN, tomando como patógenos de referencia a ECEH para la primera PCR multiplex y ECET para la segunda, con un límite de detección de 0,0029 ng/μL y 0,011 ng/μL respectivamente. La técnica propuesta presentó una alta eficiencia, sensibilidad y especificidad en los controles positivos, otras cepas y muestras de heces, en un ensayo de campo limitado.

Palabras claves: *Escherichia coli*, PCR multiplex, Límite de detección.

ABSTRACT

Escherichia coli pathogens are qualified in enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteropathogenic *E. coli* EPEC, enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), and diffusely adherent *E. coli* (DAEC). The aim of this project was implemented a PCR multiplex to identify of pathogenic *Escherichia coli*. First, the pathogens were obtained positive controls, therefore, the DNA was isolated by commercial Kit. Initially the temperatures of hybridization were optimized, there was evaluated the final concentration to each one and the times of the thermocycler to be able to amplify the genes *vt1*, *vt2*, *eae*, *estA*, *eltB*, *aggR*, *ipaH* and *Da*. PCR multiplex was divided in two, the first amplified the enteropathogens EHEC, EPEC, DAEC and another ETEC, EIEC, EAEC. For every PCR the limit of detection was realized taking like pathogens of reference to EHEC to the first PCR multiplex and ETEC for the second one, with a limit of 0,0029 ng/μL and 0,011 ng/μL respectively. The proposed of the thesis presented a high efficiency, sensibility and specificity, with the positive controls, other strains and samples of feces, in a limited field test.

Key words: *Escherichia coli*, PCR multiplex, limit of detection

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli se encuentra en la microflora intestinal de personas y animales, como anaerobio facultativo, donde por lo general es inocua y comensal inofensivo, sin embargo algunas cepas son patógenas y provocan enfermedades diarreicas, especialmente en niños, representando un problema de salud pública en los países subdesarrollados (Nataro & Kaper, 1998; Sharafi, *et al*, 2011).

Han sido clasificadas en seis grupos de acuerdo a sus factores de virulencia: *E. coli* Enteropatógena ECEP, *E. coli* Enterotoxigenica ECET, *E. coli* Enteroinvasiva ECEI, *E. coli* Enterohemorrágica ECEH, *E. coli* Enteroagregativa ECEA, *E. coli* Difusa Adherente ECDA (WHO, 2008; Nataro, 2004).

La identificación de estas patovariedades requiere de la diferenciación molecular que se basa en la presencia de genes que son codificados en el cromosoma y plásmido (Vilchez, 2009).

La PCR es una técnica de biología molecular, indicada para amplificar una región específica del ADN que permite la detección de determinado locus de virulencia (Barrera & Rodríguez, 2004). La PCR multiplex es una variante de la PCR y consiste en la amplificación de diversas secuencias, de esta forma se reduce el gasto de reactivos y tiempo invertido, especialmente cuando se analiza un gran número de muestras. Se han descrito amplificaciones múltiples de decenas de secuencias. Una de las desventajas de esta variante es que al añadir o eliminar una pareja de cebadores de una PCR múltiple, se pueden alterar los rendimientos previos del resto de secuencias amplificadas. Por ello, se recomienda hacer la optimización incluyendo desde el inicio todas las secuencias que se deseen amplificar (Innis, *et al*, 1999, Dorado, s/a).

El objetivo de esta tesis fue implementar un ensayo PCR multiplex para identificar cada *Escherichia coli* patógena.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Microbiología y Campos Pulsados del Instituto Nacional De Higiene y Medicina Tropical INHMT “Leopoldo Izquieta Pérez”. Las seis cepas puras de las variedades patógenas de *Escherichia coli* fueron proporcionadas por el Dr. PhD James Nataro de la Universidad de Virginia y Dr. Roberto Vidal del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile.

El diseño fue de tipo exploratorio-confirmativo, inicialmente comprendió la optimización del sistema de una PCR multiplex para la identificación de los genes *eltB* y *estA* de *E.coli* enterotoxigénica, *vt1*, *vt2* y *eaeA* de *E.coli* enterohemorrágica, *ipaH* de *E.coli* enteroinvasiva, *eaeA* de *E.coli* enteroagregativa y *DA* de *E.coli* difusa adherente.

La fase confirmatoria y de campo, consistió en aplicar el sistema optimizado de la PCR multiplex para la detección de las patovariedades de *E. coli* y observar su sensibilidad y especificidad con otras cepas incluyendo *E. coli* no patógenas del cepario de INHMT.

Se sembró las seis *E. coli* patógenas en agar Mac Conkey (Difco) y se incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente, a partir de suspensiones bacterianas se extrajo el ADN según el protocolo del Kit comercial Wizard Genomic DNA Purification de Promega.

Las secuencias de los cebadores fueron obtenidas de Nguyen *et al* (2005) y Aranda, *et al* (2006). Posteriormente se utilizó el programa bioinformático *ClustalX versión 2.0* para visualizar el alineamiento de los primers (Cuadro 2.1).

Las concentraciones de cebadores con las que se trabajó fueron de 0,2 µM, 0,4 µM, 0,5 µM, 0,75 µM y 1 µM, los oligos se hibridaron a temperaturas de 56°C a 68°C y se evaluó los tiempos de la amplificación para observar los productos de los genes *estA*, *eltB*, *eaeA*, *vt1*, *vt2*, *ipaH*, *aggR* y *Da*.

Se realizó dos multiplex A y B, la primera identificó los genes de las enterovariedades de *E. coli* ECEH, ECEH, ECDA y la segunda ECET, ECEA, ECEI.

Cuadro 2.1. Secuencia de cebadores de los factores de virulencia de las patovarietades de *E. coli*.

GEN	SECUENCIA PRIMERS 5'-3'	TAMAÑO (bp)	TM (C)	Microorganismo
<i>eitB</i>	5'-TCTCTATGTGCATACGGAGC-3' 5'-CCATACTGATTGCCGCAAT-3'	322	62°C 61°C	ECET
<i>estA</i>	5'-GCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA-3' 5'-CCCGGTACAAGCAGGATTACAACA-3'	147	57°C	ECET
<i>vt1</i>	5'-GAAGAGTCCGTGGGATTACG-3' 5'-AGCGATGCAGCTATTAATAA-3'	130	57°C 63°C	ECEH
<i>vt2</i>	5'-ACCGTTTTTCAGATTTTACACATA-3' 5'-TACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT-3'	298	57°C	ECEH
<i>eae</i>	5'-CACACGAATAAACTGACTAAATG-3' 5'-AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT-3'	376	63°C 69°C	ECEP
<i>ipaH</i>	5'-GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC-3' 5'-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC-3'	600	59°C 60°C	ECEI
<i>aggR</i>	5'-GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3' 5'-ACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'	230	58°C 64°C	ECEA
<i>DA</i>	5'-GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCT-3' 5'-CATCAAGCTGTTTGTTCTCCGCCG-3'	750	68°C 72°C	ECDA

La mínima concentración de ADN detectable se determinó con los dos sistemas de PCR multiplex A y B, y se tomó como referencia controles positivos de ECEH y ECET, respectivamente, partiendo de una concentración de ADN de 3 ng/μL y realizando diluciones seriadas 1:2.

Finalmente, se trabajó con 4 muestras fecales, a todas se les realizó la extracción de ADN directamente con el kit comercial Z.N.A Stool DNA kit de OMEGA.

RESULTADOS

Las pruebas bioquímicas y la galería API que fueron utilizadas con todos los controles positivos, dieron como resultado el perfil de una *E. coli*. La utilización de medios selectivos permitió identificar solo a la *E. coli* enterohemorrágica O157:H7.

Se visualizó el ADN genómico en una electroforesis para observar su integridad, en un gel de agarosa al 1% corrido por 60 minutos a 110V.

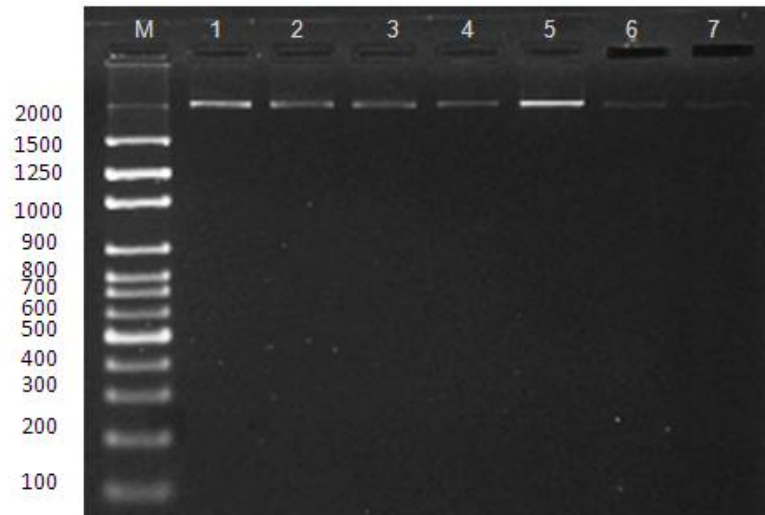


Figura 3.1. Fotografía de corrida electroforética de la extracción de ADN genómico mediante el Kit comercial de Promega Wizard Genomic DNA Purification. Carril M: Marcador molecular de 100pb (Labnet); 1: ECET; 2: ECEP; 3: ECHE; 4: ECEI; 5: ECEA; 6: ECDA; 7: *E. coli*.

Para optimizar la PCR se evaluó la temperatura de hibridación mediante un gradiente de temperatura resultando 57°C la más óptima para todos los primers. La concentración final de primer con la que se prefirió trabajar fue con 0,4µM.

Una vez optimizada la técnica se procedió a diseñar dos PCR multiplex A y B. La primera identificó las enterovarietades de ECEH, ECEP y ECDA, y la segunda para ECET, ECEI y ECEA.

Se modificó las concentraciones de primers por que hubo formación de fragmentos inespecíficos, como se puede observar en la Figura 3.2. carril 3 y 4 perteneciente a la multiplex A. Mientras que la multiplex B no tuvo ningún tipo de problemas con las concentraciones.



Figura 3.2. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de PCR multiplex A y B. Carril M: Marcador peso molecular 100 pb, 1,2: ECET (eltB, estA); 3,4: ECEI (ipaH); 5,6: ECEA (aggR); 7,8 ECEH (eae, vt1, vt2); 9,10: ECEP (eae); 11,12: ECDA (Da); 13,14: Control negativo.

En la Figura 3.3 se puede observar la optimización de la PCR multiplex A y B, identificando las seis enterovarietades.

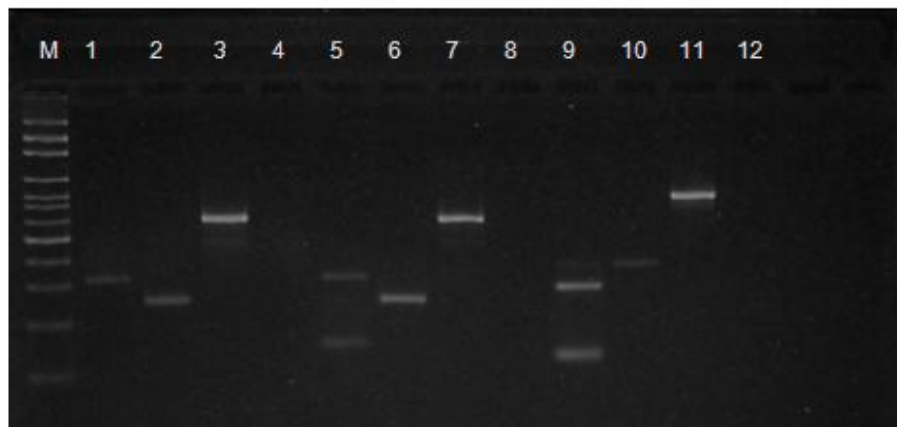


Figura 3.3. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de optimización de la PCR multiplex A y B. Carril M: marcador molecular de 100pb Labnet; 1,5: ECET (eltB, estA); 2,6: ECEA (aggR); 3,7: ECEI (ipaH); 4, 8, 12: controles negativos; 9: ECEH (eae, vt1, vt2); 10: ECEP (eae); 11: ECDA (Da).

Para determinar el límite de detección de la PCR multiplex A se partió de una concentración de ADN de 3 ng/μL y se realizó una dilución 2:1. En la Figura 3.4 la dilución 9 de ADN a 0,0058 ng/μL se observó los fragmentos de *eae* de ECEH y ECEP y en la dilución 10 de ADN a 0,0029 ng/μL se pudo observar fragmentos de la toxina vt1 y vt2 de ECEH.

El segundo sistema de PCR multiplex detectó hasta la dilución 8 (Figura 3.5) de ADN (0,011 ng/μL), partiendo de una concentración inicial de 3,0 ng/ μL.

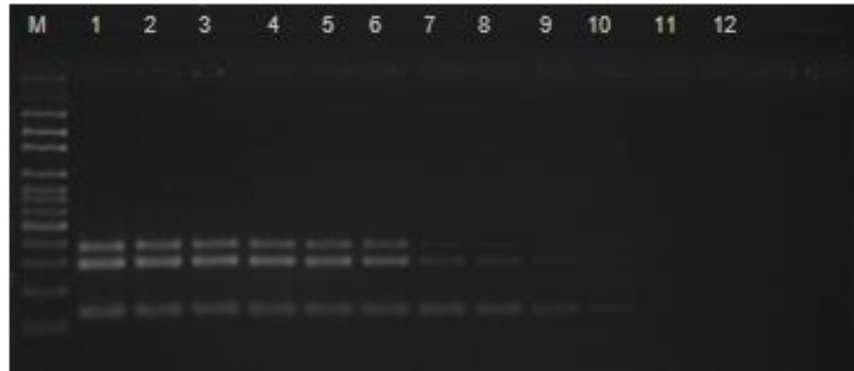


Figura 3.4. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de límite de detección del sistema de la PCR multiplex A. M: Marcador molecular 100 pb Labnet. 1= 1,5 ng/μL; 2=0,75 ng/μL; 3= 0,375 ng/μL; 4= 0,18 ng/μL; 5= 0,093 ng/μL; 6= 0,046 ng/μL; 7= 0,023 ng/μL; 8=0,011 ng/μL; 9=0,0058 ng/μL; 10= 0,0029 ng/μL; 11= control negativo.

Se tomaron en cuenta cepas *E. coli* no patógenas y otras como *Salmonella* Enteritidis, *Vibrio cholera* y *Klebsiella pneumoniae* para evaluar la especificidad.



Figura 3.5. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de límite de detección del sistema de la PCR multiplex B. M= Marcador molecular 100 pb Labnet. 1= 1,5 ng/μL; 2=0,75 ng/μL; 3= 0,375 ng/μL; 4= 0,18 ng/μL; 5= 0,093 ng/μL; 6= 0,046 ng/μL; 7= 0,023 ng/μL; 8=0,011 ng/μL; 9=0,0058 ng/μL; 10= 0,0029 ng/μL; 11= control negativo.

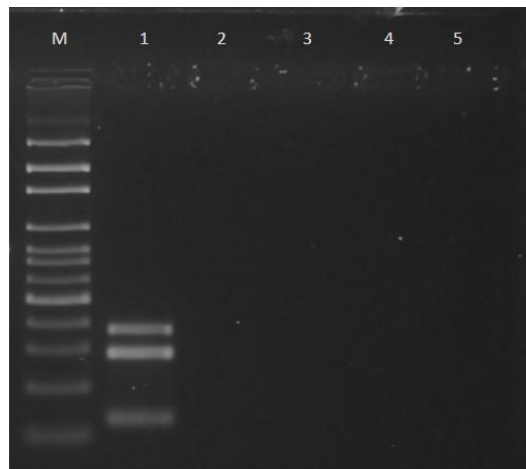


Figura 3. 6. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa que muestra los productos del ensayo de ensayo de PCR multiplex de las enterovarietades de *E. coli* en otras bacterias. M=Marcador molecular de 100pb Labnet. 1= ECEH; 2= *Salmonella* Enteritidis; 3= *Vibrio cholerae*; 4= *Klebsiella pneumoniae*, 5= Control negativo.

El sistema dio como resultados negativos a las amplificaciones de los genes de *Escherichia coli* patógenas (Ver Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Lista de bacterias usadas para la implementación de una PCR multiplex para la identificación de *Escherichia coli* patógenas.

No.	Especie	CEPA	Genes							
			vt1	vt2	eltB	estA	ipaH	eae	aggR	Da
1	<i>E. coli</i>	Enterotoxigénica	-	-	+	+	-	-	-	-
2	<i>E. coli</i>	Enterohemorrágica	+	+	-	-	-	+	-	-
3	<i>E. coli</i>	Enteroinvasiva	-	-	-	-	+	-	-	-
4	<i>E. coli</i>	Enteropatógena	-	-	-	-	-	+	-	-
5	<i>E. coli</i>	Enteroagregativa	-	-	-	-	-	-	+	-
6	<i>E. coli</i>	Difusa adherente	-	-	-	-	-	-	-	+
7	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>E. coli</i>	ATCC 51313	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>E. coli</i>	O157:H7	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Salmonella</i> Enteritidis		-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>Vibrio cholera</i>		-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-

ATCC, american type culture collection.

Se logró optimizar el sistema directamente desde las 4 muestras trabajadas (Ver Figura 3.7), solo una dio positiva a dos enterovariedades, las tres restantes fueron negativas.

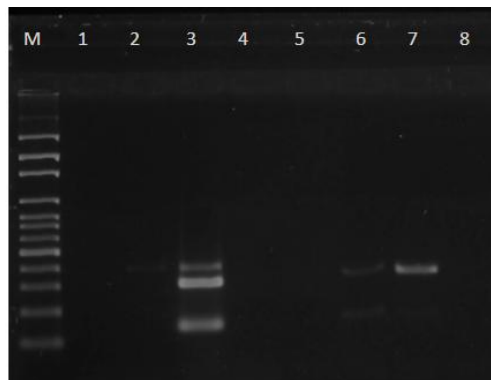


Figura 3.7. Fotografía de corrida electroforética en gel de agarosa de los productos del ensayo de muestras de heces fecales. Carril M=Marcador, Carriles de multiplex A, 1=Primera muestra; 2=Segunda muestra; 3= Control positivo ECEH; 4= Control negativo; Carriles de multiplex B, 5=Primera muestra; 6=Segunda muestra; 7= Control positivo ECET; 8= Control negativo.

DISCUSIÓN

La presente tesis diseñó un sistema de PCR multiplex para la identificación de los genes de *vt1*, *vt2* (genes de la toxina shiga 1 y 2) para ECEH; *eae* (gen estructural de la intimina) para ECEH y ECEP; *eltB*, y *estA* (genes de las enterotoxinas) para ECET; *ipaH* para ECEI; *aggR* para ECEA; y *Da* para ECDA.

La aplicación de esta técnica se dividió en dos fases: exploratoria (optimización del sistema y diseño de la PCR multiplex) y confirmatoria (límite de detección y especificidad).

Anteriores estudios se enfocan en la optimización de la enzima polimerasa, concentraciones de $MgCl_2$, temperatura de reacción e hibridación, para evitar formación de dímeros o fragmentos inespecíficos en la PCR multiplex (Innis, et al, 1999; & Brownie, et al, 1999). En la fase preliminar de la investigación se realizó una PCR monoplex para evaluar concentraciones de los cebadores entre 0,2 μM y 1 μM y temperaturas de hibridación de cada par de cebadores entre 56 a 68°C mediante un gradiente de temperatura para observar la amplificación de todos los pares de primers ya que tenían diferentes temperaturas de melting (T_m). Teniendo en cuenta la temperatura de hibridación se procedió a analizar la concentración de los cebadores en la reacción concentración que se recomienda debe estar 0,1 μM y 1 μM . Concentraciones altas de primers puede producir fragmentos inespecíficos o dímeros de primers como indica Surszycki (2002). Otro parámetro que debió ser tomado en cuenta pero se omitió fue la concentración de magnesio en el sistema; debido a que se trabajó con un máster mix comercial de Promega Go Taq Hot Start Green que contiene el substrato (dNTPs); la enzima Taq polimerasa; cloruro de magnesio con una concentración de 4mM; buffer de reacción para aumentar la densidad de la muestra y el colorante cuya función es teñir a los productos de la PCR para luego analizarlos directamente en un gel de agarosa.

En los primeros ensayos del diseño de la multiplex no se obtuvo buenos resultados por que no se amplificaron algunas *E. coli*. Se procedió a combinar dos pares de primers y dos ADN en la preparación de la máster mix, con el fin de poder agrupar las bacterias en dos grupos dependiendo del peso de las pares de bases de los fragmentos amplificados. Primero se combinó ECET con ECEA,

ECET con ECEI, ECEA con ECEI, ECEH con ECEP, y EHEC con ECDA basándose en la publicación de Nguyen en el 2005.

Luego de observar la amplificación con estas combinaciones se procedió a dividir la PCR multiplex en A y B, utilizando las mismas condiciones de la PCR monoplex. La cantidad de primers utilizados dio como resultado la generación de productos no específicos y formación de dímeros reduciendo de esta manera la especificidad y sensibilidad, pero al modificar las concentraciones se eliminaron estos problemas y el uso de una Taq Hot Start ayudó a incrementar la especificidad de la PCR (Engel, *et al*, s/a).

Otro motivo por el cual se separó la PCR multiplex fue por el tamaño de los productos amplificados por que eran similares: eltB de 322 pb, estA de 147 pb, vt1 de 130 pb, vt2 de 298 pb, eae de 376 pb, ipaH de 600 pb, aggR de 230 pb, y Da de 750 pb.

El límite de detección de los dos sistemas de PCR multiplex A y B fueron medidos en base a la concentración de ADN. Se utilizó como concentración inicial 3 ng/μL de ADN de las dos bacterias ECEH y ECET. Así se pudo visualizar que en la PCR multiplex A la concentración mínima detectada fue de 0,0029 ng/μL y en la B fue de 0,011 ng/μL de ADN.

Algunos autores han realizado la estandarización de la detección de *E. coli* patógenas desde la cepa, pero en esta tesis al trabajar directamente con muestras fecales se demostró que los dos sistemas de PCR multiplex presentados pueden ser utilizados desde la muestra o desde la cepa aislada de cada posible patógeno.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en esta tesis permitieron detectar los 8 genes virulentos de *E. coli* diarreicas en dos PCR multiplex. Este método ofreció una rápida identificación de los mecanismos patógenos.

Los parámetros que fueron optimizados en la PCR monoplex variaron al momento de diseñar la PCR multiplex, modificando las concentraciones de primers, temperatura, y ciclos del termociclador. Las concentraciones de los

primers oscilaron entre 0,1 μM a 1,25 μM , en los dos sistemas, la temperatura de hibridación optimizada fue de 57°C, el tiempo de los pasos de la PCR fueron de 45 segundos en cada uno.

El sistema de implementación se dividió en 2 PCR multiplex; la primera PCR multiplex identificó ECEH, ECEP, y ECDA; la segunda PCR a ECET, ECEI, ECEA.

El límite de detección medido en concentración de ADN del sistema de la PCR multiplex A fue de 0,0029 ng/ μL y de B fue de 0,011 ng/ μL . La especificidad se evaluó aplicando la técnica para identificación de otros microorganismos, dando como negativo la amplificación de genes de *E. coli* diarreicas. La técnica implementada fue un sistema de PCR multiplex sensible, específica, rápida y fácil de realizarla, obteniendo de esta manera resultados fiables y consistentes

La elaboración de los protocolos realizados para la identificación de las enterovariedades *Escherichia coli* patógenas permanecerán en el laboratorio del INHMT Leopoldo Izquieta Pérez para dar uso a la técnica con las muestras que deseen ser analizadas en próximos estudios y programas a nivel local y nacional.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” se agradece la colaboración al Laboratorio de Microbiología y Campos Pulsados y al Dr. PhD James Nataro de la Universidad de Virginia y Dr. Roberto Vidal del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile por proporcionar las cepas control positivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aranda, K., Fabbricotti, S., Fagundes, U., Scaletsky, I. (2006). Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children.

2. Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., Little, S. (1997). The Elimination Of Primer-Dimer Accumulation in PCR. Nucleic acids research, vol 25, Nº16. Pp. 3235-3241.
3. Engel, H., Küppers, C., & Löffert, D. (s/a). Highly efficient multiplex PCR using novel reaction chemistry. Lab Chip. QUIAGEN.
4. Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J. (1999). PCR applications, protocols for functional genomics. Academic Press. pp74-76.
5. Kim, K., Cho, J., Cheung, C., Lim, J., Cho, S., Cho, D., Kang, C., & Kim, D. (2010). Development of multiplex PCR assays to identify *Escherichia coli* pathogenic genes in food. Food Sci. Biotechnology 19(5): 1205-1210
6. Löffert, D., Karger, S., Berkenkopf, M., Seip, N., & Kang, J. (1997). PCR optimization: primer design. QUIAGEN. Issue No. 5.
7. Malorny, B., Tassios, P., Radström, P., Cook, N., Wagner, M., & Hoorfar, J. (2003). Standarization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. International journal of food microbiology 83_ 39-48.
8. Mukhopadhyay, A., Mukhopadhyay, U. (2006). Novel multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. Elsevier. Journal of Microbiological Methods. 193-200.
9. Nataro JP y Kaper JB, (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 11:142–201.
10. Rodríguez – Ángeles, G. (2002). Principales características y diagnostico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. pp: 464-475.
11. Sharifi, Y; Akbari, A; Y Soltan, D; (2011). Multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneous detection of shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eae) and invasive plasmid antigen H (ipaH) genes in diarrheagenic *Escherichia coli*. African Journal of Biotechnology Vol. 10(9), pp. 1522-1526.
12. Surzycki, S. (2000). Basic techniques in molecular biology. Berlin: Springer-Verlag.
13. Vieira, N., Bates, S., Solberg, O., Ponce, K., Howson, R., Cevallos, W., Trueba, G., Riley, L., Y Eisenberg, J. (2007). High prevalance of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote región of northern coastal Ecuador. The American journal of tropical medicine and hygiene, 76(3), pp. 528-533.

14. Vilchez, B. (2009). Molecular and phenotypic characterization of diarrhoeagenic *Escherichia coli* from Nicaraguan children. Departament of laboratory Medicine, UNAN-Leon.
15. WHO global salm. (2008). Manual de procedimientos, Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos.