



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREOGÉNICA EN
PINNÍPEDOS DE CHILE

CATHERINA ELISABETH GONZÁLEZ BURGOS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL
Proyecto ISID 9102012

SANTIAGO, CHILE



2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREOGÉNICA EN
PINNÍPEDOS DE CHILE

CATHERINA ELISABETH GONZÁLEZ BURGOS

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PATRICIO RETAMAL
PROFESOR CONSEJERO: PILAR OVIEDO
PROFESOR CONSEJERO: SERGIO BUCAREY

SANTIAGO, CHILE
2013

MEMORIA DE TITULO

“DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* DIARREOGÉNICA EN PINNÍPEDOS DE CHILE”

“DIARRHEAGENIC *ESCHERICHIA COLI* DETECTION IN PINNIPEDS IN CHILE”

Catherina Elisabeth González Burgos

Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad De Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento: Proyecto ISID 9102012

RESUMEN

Existen cepas de *Escherichia coli* patógenas productoras de enfermedades que pueden afectar a diversos hospederos terrestres y acuáticos. El objetivo de este trabajo fue la detección de cepas de *E. coli* diarreogénica, en heces de pinnípedos de diferentes regiones de Chile. De las 25 muestras analizadas mediante cultivo bacteriológico y PCR, se detectó solo una cepa de *E. coli* patógena correspondiente al subtipo STEC, en heces de un pinnípedo (*Mirounga leonina*) proveniente de Tierra del Fuego, confirmándose la presencia de este agente en mamíferos marinos en Chile.

Palabras claves: *E. coli*, pinnípedos, Chile.

ABSTRACT

There are pathogenic *Escherichia coli* strains producing diseases that can affect various terrestrial and aquatic hosts. The aim of this study was the detection of diarrheogenic *E. coli* strains in feces of pinnipeds from different regions of Chile. Among 25 samples analyzed by bacteriological culture and PCR, it was only detected a strain of the pathogenic *E. coli* subtype STEC in feces of a pinniped (*Mirounga leonina*) from Tierra del Fuego, confirming the presence of this agent in marine mammals in Chile.

Key words: *E. coli*, pinnipeds, Chile

INTRODUCCIÓN

La familia Enterobacteriaceae está constituida por una amplia gama de bacterias entéricas, que se caracterizan por ser Gram negativas no exigentes, de fácil cultivo, y anaerobios facultativos. En este sentido, se reconoce la existencia de cepas de *Escherichia coli* patógenas productoras de enfermedades, las que pueden afectar diversos hospederos terrestres y acuáticos.

El carácter zoonótico de las enterobacterias genera preocupación tanto para la salud pública como para la conservación de fauna silvestre, ya que el traspaso de estos patógenos entre animales y humanos se produce principalmente por su interacción, debido a las acciones antropogénicas, como la descarga de aguas servidas, actividades portuarias y pesqueras, entre otras.

En las poblaciones susceptibles, tal contaminación puede resultar en brotes de enfermedades que pueden llegar hasta la mortalidad o bien actuar como reservorios; la afección en especies migratorias, debido la capacidad de *E. coli* de encontrarse en distintos ambientes y superficies, puede producir diseminación de los microorganismos a otras zonas geográficas.

A pesar de lo anteriormente expuesto, la presencia de enterobacterias se ha estudiado principalmente en animales domésticos y de producción, en contraste con la escasa investigación en la fauna silvestre, como es el caso de los mamíferos marinos, incluyendo a la súper-familia Pinnipedia, que es el objetivo de este estudio.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Hospedero

La súper-familia Pinnipedia perteneciente al sub-orden Caniformia, son mamíferos marinos que poseen un cuerpo alargado de manos y pies palmeados como aletas. En Chile esta súper-familia está constituida por 10 especies dentro de las familias Otariidae y Phocidae, ver la Tabla 1.

Los fócidos poseen extremidades posteriores rígidas que no pueden retraerse y carecen de oído externo; mientras que los otáridos presentan pabellón auricular y extremidades posteriores retractiles (Iriarte 2008), lo que les permite desplazarse en tierra más fácilmente que los fócidos.

En Chile la mayoría de los pinnípedos presentan problema de conservación, que van desde vulnerables hasta insuficientemente conocidos; inclusive algunos de estos ejemplares están dentro de las listas de Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES) y otros convenios internacionales (Iriarte 2008; SERNAPESCA 2011).

En Chile se han detectado dos agentes de carácter zoonótico en pinnípedos, como *Brucella spp*, con presencia de anticuerpos anti-*brucella* en lobo fino antártico (*Artocephalus gazella*) y foca de wedell (*Leptonychotes weddellii*) del territorio antártico (Retamal et al. 2000); Además, se ha descrito la presencia de cepas de *Salmonella enterica* en lobo común (*Otaria flavescens*) del Centro Buin Marino (Sturm et al. 2011).

Escherichia coli

Es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, cuyas características son: bacilo Gram negativo, fermentador de glucosa y otros azúcares, oxidasa negativo, anaerobio facultativo, catalasa positivo, no forma esporas y reduce nitratos a nitritos. (Quinn y Markey 2003, González et al. 2010).

E. coli es un microorganismo que forma parte de la flora normal del sistema digestivo de los mamíferos, incluyendo al ser humano, siendo la mayoría de las cepas de carácter comensal (Vidal et al. 2005); es capaz de colonizar vegetales, suelo y agua (González et al. 2010), lo que potencia la diseminación a sus diversos hospederos.

El impacto en la salud se genera por cepas patógenas que presentan factores de virulencia que les permiten colonizar la mucosa y producir enfermedad. Entre estos factores

se incluyen: cápsula, endotoxinas, exotoxinas y estructuras responsables de la colonización como fimbrias adhesivas. La colonización también depende de factores predisponentes presentes en el hospedero como la edad, estado inmunológico y dosis infecciosa al que fue expuesto. Las lesiones pueden variar desde inflamación intestinal hasta toxemia, tanto en animales jóvenes como viejos (Quinn y Markey 2003, Aiello y Mays 2000).

Los tipos de *E. coli* patogénicas se diferencian en los factores de virulencia que presentan y se reconocen al menos 6: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de Shigatoxina o enterohemorrágica (STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), las que se pueden ver en la Tabla 2.

Los problemas gastrointestinales en mamíferos marinos en cautiverio son poco comunes, sin embargo, algunos autores sugieren que en pinnípedos de vida silvestre es frecuente el diagnóstico de gastroenteritis bacteriana (Dierauf y Gulland 2001).

E. coli ocupa el segundo lugar en frecuencia de aislamiento en pinnípedos, luego de *Edwardsiella tarda*, según análisis bacteriológicos de heces de lobos marinos comunes (González *et al.* 2010). Sin embargo este estudio no determinó el potencial patogénico de tales cepas.

Diagnóstico molecular de *E. coli*

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica que ha probado ser rápida, sensible y específica para la detección de agentes biológicos y genes de virulencia (Vidal *et al.* 2005).

Un protocolo de PCR múltiple fue desarrollado por Vidal *et al.* (2005) para la detección simultánea de las 6 categorías de *E. coli* diarreogénica asociadas a infecciones entéricas en humanos. En ese estudio se determinó la presencia de 5 de los 6 tipos de *E. coli* en 509 muestras pertenecientes a niños chilenos menores de 9 años que presentaban diarrea aguda. La categoría más frecuente fue EPEC, presentando cepas típicas y atípicas; Se identificó también la presencia de STEC y ETEC, en segundo y tercer lugar respectivamente. Incluso se observó DAEC y EAEC, las cuales son variedades poco comunes. No se detectó EIEC en ninguna de las muestras (Vidal *et al.* 2005).

En esta Memoria de Título se postuló como hipótesis que existen cepas de *E. coli* diarreogénicas que se encuentran infectando a pinnípedos que habitan las costas de Chile. El objetivo fue determinar la presencia de estas bacterias en pinnípedos de Chile, mediante

aislamiento bacteriológico y la implementación de una prueba de PCR múltiple para la detección de las secuencias de genes de los 6 tipos de *E. coli* diarreogénica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras:

En total para este estudio se consideraron muestras de 25 ejemplares de la súper-familia Pinnipedia. 21 muestras de heces se obtuvieron entre los meses de junio y septiembre del año 2011 desde pinnípedos trasladados por el Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA) al Centro Buin Marino, encontrados varados, desnutridos o enfermos en las costas de Chile. También se incluyeron muestras de 4 elefantes marinos (*Mirounga leonina*) que fueron gentilmente facilitadas por la Dra. Catherine Dougnac, obtenidas entre el 11 y 19 de diciembre del año 2010 en la expedición científica al Seno Almirantazgo, Tierra del Fuego, liderada y financiada por Wildlife Conservation Society (WCS) Chile, con el apoyo del Programa Global de Salud (GHP) y el Programa Marino de WCS (Ver tabla 3).

La toma de muestras se realizó mediante un torulado rectal en el caso de los ejemplares pertenecientes al Centro Buin Marino, mientras que en los 4 ejemplares de tierra del fuego las muestras se efectuaron de heces frescas. Las tómulas fueron llevadas al laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde fueron procesadas según el siguiente protocolo:

Día 1:

- En tubos de ensayo estéril con 5 mL de agua peptonada tamponada (APT) estéril se inocularon con las tómulas y se incubaron entre 18 a 24 h a 42°C.

Día 2:

- Una vez verificado el crecimiento en el caldo APT, una alícuota de esta suspensión se sembró por agotamiento en agar McConkey y se incubó 24 h a 37°C.

Día 3:

- Se seleccionaron cinco colonias compatibles (lactosa +) de cada muestra y se re-aislaron en agar McConkey, incubándolas por 24 h a 37°C.

Día 4:

- Las placas fueron refrigeradas por 24 a 48 h hasta la realización del PCR.

PCR:

Se realizó un PCR múltiple para la identificación de genes asociados a virulencia de *E. coli* (tabla 4). Se usaron como controles positivos “pools” de cepas *E. coli* de referencia 933J (*stx1*, *stx2* y *eae*), C600J (*stx1*), C600W (*stx2*), 2348/69 (*eae*), H10407 (*st* y *lt*), STEC O159 (*st*), STEC O8 (*lt*), STEC O6 (*lt*), EI.34 (*ipaH* y *virF*), F1845 (*daaE*) y O42 (*aafII*) (Vidal *et al.* 2005).

El ensayo de PCR múltiple se realizó con un volumen final de 15 uL conteniendo: 1X buffer PCR (Invitrogen ®), 1,5 mM MgCl₂, 1X desoxinucleótido trifosfato, 2 pmol de cada partidor, 1 U Taq polimerasa (Invitrogen ®), 3 uL de DNA templado y H₂O destilada ionizada (Merck ®).

Para la extracción del DNA se hizo un “pool” con las cinco cepas seleccionadas de cada muestra y se destruyeron las estructuras celulares mediante ebullición en agua destilada estéril por 20 min. Posterior a una centrifugación a 2000 G por 3 min se utilizó el sobrenadante directamente como templado de la reacción.

La reacción consideró una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, 35 ciclos consistentes en un paso de desnaturalización de 1,5 min a 94°C, una hibridación de 1,5 min a 60°C y una extensión de 1,5 min a 70°C. Finalmente, se realizó una elongación por 5 min a 72°C. Una vez terminado el PCR los productos fueron separados en geles de agarosa al 1,5% a 110 V por una hora, al cabo de este procedimiento se hizo tinción con Gel Red para luego visualizar los resultados mediante un trans-iluminador.

Las colonias que resultaron positivas por PCR fueron analizadas mediante pruebas bioquímicas para confirmar su identidad, con la siguiente metodología:

Día 1:

- Con una alícuota se eligió una colonia y se incubó en los tubos para la prueba de Rojo Metilo, Voges-Proskauer e indol. Para incubar en el tubo para la prueba de Citrato Sódico se utilizó una aguja de platino.

Día 2:

- Se añadió al tubo de la Prueba de indol 0.3 ml de reactivo para indol y luego se agitó. Se esperó 10 minutos para observar resultados.

Día 3:

- Se añadió al tubo de la Prueba de Voges-Proskauer 0.6 ml de solución naftol y 0.2 ml de solución de hidróxido potásico, luego se agitó los tubos. Se esperó de 2-4 horas para observar resultados.
- Se observaron los resultados en el tubo para la prueba de Citrato Sódico.

Día 5:

- Se añadió al tubo de la prueba de Rojo Metilo 5 gotas de la solución de Rojo Metilo y luego se agitó. Se esperó 4 horas y se observó los resultados.

RESULTADOS

Solo 1 de 25 muestras resultó positiva al análisis, lo que corresponde al 4% de las muestras totales del estudio, identificada como la muestra P221210-2 correspondiente a un elefante marino (*Mirounga leonina*) de procedencia de Tierra del fuego. Esta muestra arrojó una secuencia de alrededor de 300 pb en el estudio por PCR múltiple.

Por lo anterior, se analizó por separado cada una de las cinco colonias sospechosas, en una nueva reacción de PCR múltiple para identificar aquella que contenía la o las secuencias blanco.

Solo 1 de las 5 colonias resultó positiva con una secuencia de alrededor de 300 pb. Lo que es concordante con el gen *stx₁* de la bacteria *E.coli* productora de shigatoxina.

Se aplicó un conjunto de pruebas bioquímicas que indican que la colonia con resultado positivo al gen *stx₁* en la prueba de PCR múltiple, es efectivamente una bacteria *E. coli*.

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte de STEC en pinnípedos silvestres, y se logró mediante la detección del gen *stx*₇. Este gen codifica para la toxina STX1, cuya acción es inhibir la síntesis proteica, generando la muerte de la célula a la cual se incorporó.

La composición aminoacídica de este gen es similar a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1, sin embargo, se confirma que es una *E. coli* ya que las colonias seleccionadas desde la siembra en agar mcConkey fueron exclusivamente oxidasa negativas. *Shigella dysenteriae*, es una bacteria oxidasa positiva, no fermentadora que no crece en agar mcConkey.

Las muestras procedentes del Centro Buin Marino fueron tomadas mediante torulado rectal, pudiendo ser controlados los protocolos y buenas prácticas en todo el proceso de toma de muestra, traslado y almacenamiento; sin embargo la única muestra positiva a *E. coli* diarreogénica fue recogida en Tierra del fuego con torulado desde heces frescas, las cuales no presentan las mejores condiciones para una muestra óptima, por el posible deterioro por la exposición de las heces a las diversas condiciones ambientales, contaminación desde el ambiente o almacenamiento y traslado defectuoso.

El elefante marino que resultó positivo a STEC no tenía antecedentes de contacto con actividades humanas, a diferencia de los ejemplares trasladados por el SERNAPECA al Centro.

Aunque la actividad antrópica va ligada al traspaso de enfermedades zoonóticas, no existe un estudio fehaciente que relacione estas actividades con la infección con *E. coli* en pinnípedos, siendo información valiosa para la conservación. Desde la arista de los humanos, la STEC tiene como factor de riesgo la ingesta de carne cruda por parte de niños y adultos (Rodríguez, 2002).

El contacto entre pinnípedos con humanos en el Centro Buin Marino es alto, sin embargo las medidas de bioseguridad ofrecidas y los protocolos farmacológicos son adecuados desde que el animal ingresa al Centro. Algunas medidas de bioseguridad son: pinnípedos en zona de cuarentena, separados por edad y/o según las etapas de su proceso de rehabilitación. Los tratamientos con fármacos dependen del estado del animal, entre otros corresponden a la administración de antibióticos de uso rutinario como amoxicilina más ácido clavulánico (Synulox ®), clindamicina (Clindabone ®) y enrofloxacino.

La amoxicilina (antibiótico betalactámico) asociada a ácido clavulánico es efectiva a nivel digestivo contra Gram negativos (*E. coli*) (Sumano y Ocampo, 2007). La clindamicina derivada de la lindamicina, ataca infecciones con *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, micoplasmas y de algunos anaerobios siendo más activa que la lincomicina (Sumano y Ocampo, 2007); según Padilla et al. (2007) *E. coli* es más sensible a clindamicina que a Amoxicilina. El enrofloxacino es una quinolona de alta acción contra Gram negativos y de acción moderada contra Gram positivos y micoplasmas, dependiendo de la especie animal actúa contra diversos agentes como *E. coli* (Sumano y Ocampo, 2007).

Se debe recordar que los pinnípedos trasladados por el Serna Pesca se encontraron varados, desnutridos o enfermos, por lo que se aplicaron los protocolos correspondientes. El uso de esos fármacos en los pinnípedos ingresados afecta la detección de *E. coli*, ya que precisamente esta bacteria está dentro del espectro de acción siendo una de las posibles causas de la baja cantidad de ejemplares positivos a la prueba de PCR.

Se cumplió el objetivo del estudio, determinar la presencia de esta bacteria en pinnípedos de Chile, pero con resultados que deben ser complementados con nuevos estudios, principalmente por el limitado número de muestras obtenidas desde animales de vida libre y de animales en cautiverio sometidos a tratamientos con antimicrobianos.

REFERENCIAS

- **AIELLO S. Y MAYS A.** Manual Merck de Veterinaria. 5ta Edición en Español. Editorial Océano. Barcelona. 2000.
- **DIERAUF L. Y GULLAND F.** Marine Mammals Medicine. Section III Infectious Diseases of Marine Mammals. Second Edition. 2001.
- **GONZÁLEZ M., LATIF F., FERNÁNDEZ F., VILLANUEVA M., ULLOA J. Y FERNÁNDEZ H.** Especies de la familia Enterobacteriaceae en heces de lobo marino común, *Otaria flavescens* establecido en el río Valdivia. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2010; 45: 331 – 334.
- **HERNÁNDEZ J., PRADO V., TORRES D., WALDENSTRÖM J., HAEMING P. Y OLSEN B.** Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in antarctic fur seals *Arctocephalus gazella*. Polar Biology. 2007; 30: 1227 – 1229.
- **IRIARTE A.** Mamíferos de Chile. Lynx Ediciones. Barcelona. 2008.
- **NATARO J. Y KAPER J.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 1998; 11: 142 – 201.
- **PADILLA C., LOBOS O., PADILLA R., FUENTES L. Y NÚÑEZ L.** Aislamiento de cepas de *Escherichia coli* desde casos clínicos de infección vaginal: asociación con otros microorganismos y susceptibilidad antibacteriana. Revista Chilena Obstetricia y Ginecología. 2007; 72: 222 – 228.
- **QUINN P. Y MARKEY B.** Concise Review of Veterinary Microbiology. Blackwell Publishing. Oxford. 2003.
- **RETAMAL P., BLANK O., ABALOS P. Y TORRES D.** Detection of anti-*Brucella* antibodies in pinnipeds from the antarctic territory. The Veterinary Record. 2000; 146: 166 – 167.
- **RODRÍGUEZ G.** Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México. 2002; 44: 464 – 475.
- **SALINAS P., MORAGA R., SANTANDER E. Y SIELFELD W.** Presencia de cepas diarreogénicas de *Escherichia 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. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2010; 45: 153 – 158.

- **SERNAPESCA.** 2011. Estados de conservación en Chile. Disponible online:: http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=select&id=286 (Accedido en Julio de 2013).
- **STURM N., ABALOS P., FERNANDEZ A., RODRIGUEZ G., OVIEDO P., ARROYO V. Y RETAMAL P.** *Salmonella* entérica in Pinnipeds, Chile. *Emerging Infectious Diseases.* 2011; 17: 2377 – 2378.
- **SUMANO H. Y OCAMPO L.** *Farmacología Veterinaria.* Mc Graw Hill. México. 2006
- **VARELA G., JASINKI C., GADEA P., NOEL M., MOTA M., ARENAS C., PARDO L., GONZÁLEZ S., GONZÁLEZ G., SIROK A. Y SCHELOTTO F.** *Escherichia coli* enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas. *Revista Médica del Uruguay.* 2007; 23: 153 – 163.
- **VIDAL M., KRUGER E., DURAN C., LAGOS R., LEVINE M., PRADO V., TORO C. Y VIDAL R.** Single Multiplex PCR Assay To Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43: 5362 – 5365.
- **VIDAL J., CANIZÁLEZ A., GUTIERRES J. Y NAVARRO F. 2007.** Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* patógena. *Salud pública de México.* 2007; 49: 376 – 386.

TABLAS

Tabla 1. Especies pertenecientes a la súper familia Pinnipedia, nombre científico y común. (Iriarte 2008).

Familia	Genero/especie	Nombre común
Otariidae	<i>Arctocephalus australis</i>	Lobo fino austral
	<i>Arctocephalus gazella</i>	Lobo fino antártico
	<i>Arctocephalus philippi</i>	Lobo fino de Juan Fernández
	<i>Arctocephalus tropicalis</i>	Lobo fino subantártico
	<i>Otaria flavescens</i>	Lobo marino común
Phocidae	<i>Hydrurga leptonyx</i>	Foca leopardo
	<i>Leptonychotes weddelli</i>	Foca de Weddell
	<i>Lobodon Carcinophagus</i>	Foca cangrejera
	<i>Mirounga leonina</i>	Elefante marino
	<i>Omatophoca rossi</i>	Foca de Ross

Tabla 2. Tipos de *E. coli* diarreogénicas según patogenicidad, factores de patogenicidad, genes asociados y su estudio en pinnípedos de Chile.

Tipo	Patogenicidad	Factores de Patogenicidad	Gene	Chile
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica, posee fimbria adhesiva con la cual se adhiere a microvellosidades del intestino delgado, generando la salida de agua e iones.	LT ST	<i>Lt</i> <i>Stlh</i> <i>Stlp</i>	Sin antecedentes
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica, forma microcolonias que producen degeneración en las microvellosidades. Provoca lesiones de tipo adherencia y borramiento. Si presentan EAF (EPEC <i>adherence factor</i>) son denominadas típicas.	Intimina Bundlina	<i>Eae</i> <i>Bfp</i>	Se aislaron cepas desde pinnípedos antárticos (<i>Arctocephalus gazella</i>) en el 6% de las muestras (Hernández <i>et al</i> 2007) y desde aguas de la costa de Iquique (Salinas <i>et al</i> 2010).
STEC	<i>E. coli</i> productora de shiga-toxina o enterohemorrágica. Produce colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico. La toxina afecta la síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas.	STX Intimina Enterohemolisina	<i>stx1</i> <i>stx2</i> <i>Eae</i>	Sin antecedentes
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva, provoca una reacción inflamatoria y úlceras en el epitelio colónico. No se sabe de reservorio animal.	Enterotoxinas IPA	<i>VirF</i>	Sin antecedentes

EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa, se autoaglutina en la superficie de células epiteliales.	EASTI PET PIC AAFI/II	<i>aafII</i>	Sin antecedentes
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa, no forman microcolonias al adherirse a las células Hep-2. In vitro se identificó la presencia de protuberancias que tendrían la función de proteger la bacteria.	F1845	<i>daaE</i>	Se aisló desde un lobo marino común (<i>Otaria flavescens</i>) en Iquique (Salinas <i>et al.</i> 2010).
Referencia: Vidal <i>et al.</i> 2005; Rodríguez 2002; Varela <i>et al.</i> 2007; Nataro y Kaper 1998.				

Tabla 3. Código, especie y procedencia de muestras. 1–20 obtenidas en el Centro de Rescate Buin Marino. 21–24 tomadas en Tierra del Fuego por la Dra. Catherine Dougnac. (S/A: sin antecedentes).

N°	Código	Especie	Procedencia
1	P070611	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
2	P080611	<i>Arcthocephalus philippi</i>	Las Cruces
3	P200611-1	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
4	P200611-2	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
5	P200611-3	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
6	P200611-4	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
7	P010911-1	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
8	P010911-2	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
9	P010911-3	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
10	P010911-4	<i>Otaria Flavescens</i>	S/A
11	P010911-5	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
12	P010911-6	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
13	P010911-7	<i>Otaria Flavescens</i>	Los Vilos
14	P010911-8	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
15	P010911-9	<i>Otaria Flavescens</i>	Los Vilos
16	P010911-10	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
17	P010911-11	<i>Otaria flavescens</i>	Antofagasta
18	P010911-12	<i>Otaria Flavescens</i>	Antofagasta
19	P110711-1	<i>Otaria Flavescens</i>	S/A
20	P170810	<i>Hydrurga leptonyx</i>	S/A
21	P021110	<i>Arcthocephalus tropicalis</i>	Algarrobo
22	P221210-1	<i>Mirounga leonina</i>	Tierra del Fuego
23	P221210-2	<i>Mirounga leonina</i>	Tierra del Fuego
24	P221210-3	<i>Mirounga leonina</i>	Tierra del Fuego
25	P221210-4	<i>Mirounga leonina</i>	Tierra del Fuego

Tabla 4. Nombre de los genes, producto, secuencia y pares de bases.

Gen	Producto	Secuencia del partidor (5' - 3')	Tamaño (bp)
<i>stx₁</i>	Shigatoxina STX1	CAG TTA ATG TGG TGG CGA AGG CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG	348
<i>stx₂</i>	Shigatoxina STX2	ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G GCG TCA TCG TAT ACA CAG GAG C	584
<i>Eae</i>	Intimina	TCA ATG CAG TTC CGT TAT CAG TT GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482
<i>Bfp</i>	Pili	GGA AGT CAA ATT CAT GGG GGT AT GGA ATC AGA CGC AGA CTG GTA GT	300
<i>Lt</i>	Enterotoxina LT	GCA CAC GGA GCT CCT CAG TC TCC TTC ATC CTT TCA ATG GCT TT	218
<i>stlp</i>	Enterotoxina STII	CCT CGA CAT ATA ACA TGA TGC AAC TC AAA TTG CCA ACA TTA GCT TTT TCA	421
<i>stlh*</i>	Enterotoxina STI	AAA GGA GAG CTT CGT CAC ATT TT AAT GTC CGT CTT GCG TTA GGA C	129
<i>virF</i>	Factor transcripcional	AGC TCA GGC AAT GAA ACT TTG AC TGG GCT TGA TAT TCC GAT AAG TC	618
<i>daaE</i>	Sub unidad Adhesina Fimbrial F1845	GAA CGT TGG TTA ATG TGG GGT AA TAT TCA CCG GTC GGT TAT CAG T	542
<i>aafII</i>	Invasina Fimbria AAFII	CAC AGG CAA CTG AAA TAA GTC TGG ATT CCC ATG ATG TCA AGC ACT TC	378

Referencia: Vidal *et al.* 2005. * Comunicación personal Dr. Roberto Vidal.