



Población y Salud en Mesoamérica
ISSN: 1659-0201
revista ccp@ucr.ac.cr
Universidad de Costa Rica
Costa Rica

Chacón-Jiménez, Luz; Hall Loría, Karolina; Rivera Navarro, Pablo César;
Reyes Lizano, Liliana; Achí Araya, Rosario; Barrantes Jiménez, Kenia
Circulación de genes de virulencia asociados a *Escherichia coli* diarrágénica
en aguas residuales del Gran Área Metropolitana de Costa Rica
Población y Salud en Mesoamérica, vol. 19, núm. 2, 2022, Enero-Junio, pp. 348-372
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica

DOI: <https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.48037>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44670274025>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en [redalyc.org](https://www.redalyc.org)



Población y Salud en Mesoamérica

Circulación de genes de virulencia asociados a *Escherichia coli* diarrágénica en aguas residuales del Gran Área Metropolitana de Costa Rica

Luz María Chacón-Jiménez, Karolina Hall Loría, Pablo César Rivera Navarro, Liliana Reyes Lizano, Rosario Achí Araya y Kenia Barrantes Jiménez

Como citar este artículo:

Chacón-Jiménez, L.M., Hall-Loría K., Rivera-Navarro, P.C., J.C., Reyes-Lizano, L., Ahí-Araya, R., Barrantes-Jiménez, K. (2022). Circulación de genes de virulencia asociados a *Escherichia coli* diarrágénica en aguas residuales del Gran Área Metropolitana de Costa Rica. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2). Doi: 10.15517/psm.v0i19.48037



ISSN-1659-0201 <http://ccp.ucr.ac.cr/revista/>

Revista electrónica semestral

[Centro Centroamericano de Población](#)

[Universidad de Costa Rica](#)

Circulación de genes de virulencia asociados a *Escherichia coli* diarrogénica en aguas residuales del Gran Área Metropolitana de Costa Rica

*Circulation of diarrheagenic *Escherichia coli* associated virulence genes in Costa Rican Great Metropolitan Area wastewaters*

Luz Chacón-Jiménez¹, Karolina Hall Loría², Pablo César Rivera Navarro³, Liliana Reyes Lizano⁴, Rosario Achí Araya⁵ y Kenia Barrantes Jiménez⁶

Resumen: Introducción: la enfermedad diarreica es una de las principales causas de muerte en niños menores de cinco años. Uno de los agentes etiológicos bacterianos más reconocido es *Escherichia coli*, que puede causar infecciones a través de diversos mecanismos asociados a la adquisición de genes de virulencia. Metodología: se recolectaron muestras de aguas residuales en los afluentes y los efluentes de cinco plantas de tratamiento de la Gran Área Metropolitana, durante tres días consecutivos, en los meses de marzo, mayo, octubre y diciembre del año 2013, a fin de cuantificar la concentración de *E. coli*, mediante la técnica de fermentación en tubos múltiples, y evaluar la presencia de los genes de virulencia *aatA*, *bfpA*, *eaeA*, *ipaH*, *lt*, *st*, *stx1* y *stx2*, vinculados con patotipos de *E. coli* diarrogénica, con la técnica de PCR punto final. Resultados: el estudio reveló niveles de *E. coli* similares a los encontrados en afluentes de otras regiones del mundo, en cambio, los efluentes presentaron concentraciones superiores a los 4 Log10 NMP/100 mL. La circulación anual de genes de virulencia fue relacionada con los patotipos enterotoxigénica, productores de toxina Shiga/enterohemorrágica, enteroagregativa y enteropatógena. No se detectaron genes referentes a la variedad enteroinvasora. Además, se determinó que no todas las plantas de tratamiento remueven significativamente la carga de *E. coli*. Conclusiones: el flujo de *E. coli* diarrogénica es común en nuestro país y su diseminación en el ambiente es posible cuando los efluentes se descargan en cuerpos de aguas superficiales

Palabras claves: bacteria, agua residual, enfermedad bacteriana, tratamiento de aguas residuales.

Abstract: Introduction. Diarrheic disease is one of the most important disease's causes in children under five years. One of the most recognized etiological agents is *Escherichia coli*. This bacterium has the capacity of causing infections by multiple mechanisms associated with the acquisition of different virulence genes. Methodology: water samples were collected from the affluents and effluents of five wastewater treatment plants located in the Costa Rican Great Metropolitan Area, during three sequential days, in March, May, October, and December from 2013. The aim was to quantify *E. coli*'s concentration by multiple tubes fermentation method and to evaluate the presence of *aatA*, *bfpA*, *eaeA*, *ipaH*, *lt*, *st*, *stx1*, and *stx2* virulence genes, related with diarrheagenic *E. coli*, by PCR end-point method. Results: The study revealed that the levels of *E. coli* into the affluents are similar to those reported in other world regions. The effluent's concentration presented higher than 4 Log10 NMP/100 mL level of *E. coli*. A year-

1 Instituto de Investigaciones en Salud, Universidad de Costa Rica, San José, COSTA RICA. Correo: luz.chacon@ucr.ac.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2506-0619>

2 Caja Costarricense del Seguro Social, San José, COSTA RICA. Correo: khall@ccss.sa.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9469-7408>

3 Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, San José, COSTA RICA. Correo: privera@aya.go.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0482-4202>

4 Instituto de Investigaciones en Salud, Universidad de Costa Rica, San José, COSTA RICA. Correo: lillianareyes@ucr.ac.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6722-184X>

5 Instituto de Investigaciones en Salud, Universidad de Costa Rica, San José, COSTA RICA. Correo: rosario.achi@ucr.ac.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4662-3073>

6 Instituto de Investigaciones en Salud, Universidad de Costa Rica, San José, COSTA RICA. Correo: kenia.barrantes@ucr.ac.cr ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2673-9220>

round circulation of virulence genes was demonstrated, and it was associated with enterotoxigenic, Shiga-toxin producers/ enterohemorrhagic, enteroaggregative, and enteropathogenic pathotypes. Genes related to enteroinvasive variety did not were detected. Not all wastewater treatment plants removed *E. coli* efficiently. Conclusions: Diarrheagenic *E. coli* circulation is common in our county with the possibility of dissemination to the environment by effluent's wastewater discharge in surface water bodies.

Key words: : bacteria, wastewater, bacterial diseases, sewage treatment.

Recibido: 11ago, 2021 | **Corregido:** 10oct, 2021 | **Aceptado:** 28oct, 2021

1. Introducción

Según la información más reciente de la Organización Mundial de la Salud, en todo el mundo la diarrea es la segunda causa de muerte más importante en niños menores de cinco años, con un total de 525 000 decesos anuales. La diarrea infecciosa es consecuencia de una infección intestinal de variada etiología (virus, bacterias o parásitos) y puede ser adquirida a través de alimentos o bebidas contaminadas, así como por contacto directo de persona a persona (World Health Organization, 2017).

El estado de la enfermedad diarreica en Costa Rica ha sido poco estudiado en los últimos 20 años. Para 2001, se reportó una incidencia de 3800 casos y una mortalidad general de 2,6, ambas por cada 100 000 habitantes, con dos picos anuales, el primero en marzo y el segundo en junio (Espinoza, 2004). Hace poco, el Ministerio de Salud informó que las ocurrencias de diarrea acumuladas para la semana epidemiológica 16 de 2021 eran 45 676, esto da una incidencia aproximada de 914 por 100 000 habitantes, con una reducción del 34 % con respecto al año anterior, lo cual podría atribuirse a un efecto colateral de las medidas de higiene tomadas por la población para prevenir la COVID-19 (Ministerio de Salud, 2021).

El Ministerio de Salud mantiene una vigilancia epidemiológica sobre las diarreas y anualmente publica el número de casos de forma colectiva, es decir, sin indicar el agente etiológico (Ministerio de Salud de Costa Rica, 2020), lo que impide identificar la causa de los cuadros ocurridos en el país. Sin embargo, existen informes puntuales de la frecuente circulación de bacterias patógenas como *Escherichia coli* (Pérez, Gómez-Duarte y Arias, 2010), parásitos (Solano Barquero et al., 2018) y virus como rotavirus (Bourdett-Stanziola et al., 2011; Bourdett-Stanziola, Jiménez y Ortega-Barria, 2008).

Debido a esta carencia de información, entre 2011 y 2018 se desarrolló un proyecto colaborativo con el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados, la Facultad de Microbiología y el Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) de la Universidad de Costa Rica, cuyo objetivo primordial fue la detección de microorganismos patógenos en aguas residuales del Gran Área Metropolitana.

Conforme a lo anterior, la hipótesis planteada suponía la posibilidad de detectar e identificar patógenos causantes de diarrea en aguas residuales. Para esto, con el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, se diseñó un muestreo que cubriera las dos estaciones climatológicas del país y

sus dos períodos de transición, a fin de reconocer adicionalmente los patrones estacionales en la circulación de patógenos. Las muestras se tomaron durante 2013 y a partir de 2014 se inició el análisis microbiológico molecular.

2. Referente teórico

La *E. coli* es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, forma parte de la microbiota intestinal del ser humano y, por lo general, no causa enfermedades (Riley, 2020). Sin embargo, desde la década de 1940 se empezaron a detectar aislamientos de *E. coli* capaces de producir cuadros de diarrea (Bray, 1945) y ya para finales de la década de 1990 se habían clasificado seis patotipos diarrogénicos: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatogénica (ECEP), *E. coli* productora de toxina Shiga/enterohemorrágica (ECTS/EH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enteroinvasora (ECEI) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) (Nataro y Kaper, 1998). En la tabla 1 se resumen sus principales características epidemiológicas.

En su mayoría, se emplean métodos moleculares para identificar estos patotipos, debido a que, con excepción del serotipo O157:H7 de ECEH, los demás son indistinguibles fenotípicamente con análisis de bacteriología tradicional. La categorización molecular sucede al hallar los genes de virulencia, responsables en gran medida de causar los cuadros de diarrea (Kaper, Nataro y Mobley, 2004); en la tabla 1 también se incluyen los más representativos y utilizados en torno a la *E. coli* diarrogénica.

Respecto a la *E. coli* diarrogénica, comúnmente aparece en muestras de heces procedentes de pacientes enfermos, sin embargo, su diagnóstico es difícil, puesto que en muchas ocasiones puede encontrarse en baja proporción. Dada la relevancia para la salud pública, en INISA, desde la década de los setenta, se inició el estudio de los patotipos diarrogénicos de *E. coli* (Reyes, Evans, Ramírez y Mata, 1978) y en los últimos años se trabajó en el desarrollo de una metodología de tamizaje molecular, desde un sistema de agrupación de aislamientos bacterianos que permite la detección simultánea de genes de virulencia mediante PCR multiplex, a fin de minimizar los costos y maximizar la eficiencia. Dicho sistema fue validado tanto en muestras de heces como en aguas residuales (Chacón, Taylor, Valiente, Alvarado y Cortés, 2012).

Más aun, en tiempos recientes, el estudio de las aguas residuales ha tenido gran auge en la investigación epidemiológica y abrió un campo de estudio denominado epidemiología basada en aguas residuales (WBE, por sus siglas en inglés) (Mao et al., 2020). Una de las ventajas importantes de realizar vigilancia epidemiológica en esta matriz es la obtención de un concentrado de muestras provenientes de un amplio sector poblacional, lo cual facilita dilucidar la presencia de patógenos y de sustancias químicas (Devault, Maguet, Merle, Péné-Annette y Lévi, 2018; Sims y Kasprzyk-Hordern, 2020), además, las aplicaciones de este enfoque incluyen la detección temprana, incluso

antes de que surjan los brotes en los sistemas de salud (Xagorarakí y O'Brien, 2020). De hecho, se ha puesto en práctica actualmente para la detección temprana de la circulación de SARS-CoV-2 (Randazzo et al., 2020).

Tabla 1

Características generales de los patotipos diarrogénicos de *Escherichia coli*

Patotipo	Vías de transmisión	Características epidemiológicas	Fisiopatología causada	Proteína/Gen marcador	Referencia
ECEP	Agua contaminada	Causante de brotes de diarrea en niños menores de 5 años	La unión a células intestinales induce a la formación de una estructura tipo pedestal que altera las microvellosidades de las células intestinales, esto interfiere con los procesos de absorción.	Intimina: eaeA Pili formador de fibras: bfpA Regulador codificado de plásmido: per	(Fleckenstein et al., 2021; Kaper et al., 2004; Nataro y Kaper, 1998; Riley, 2020)
ECET	Agua contaminada	Causante de diarrea del viajero	Colonización de superficie del intestino delgado por medio de fimbrias. Puede producir dos tipos de toxinas: la termolábil (TL) y la termoestable (TE). Desencadena indirectamente la salida de cloro de la célula y la salida de agua al lumen intestinal, causando una diarrea acuosa.	Toxina termolábil: lt Toxina termoestable: st	
ECEA	Fecal oral	Causante de diarrea persistente en niños y adultos	Colonización de la mucosa intestinal por medio de fimbrias de adherencia. Liberación de enterotoxinas y citotoxinas. Producción de respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos que puede provocar la ruptura de tejido y la secreción de fluidos.	Toxina EAST1: ast1 Transportadora de dispersina: aatA	

Patotipo	Vías de transmisión	Características epidemiológicas	Fisiopatología causada	Proteína/Gen marcador	Referencia
ECEI	Fecal oral	Causante de disentería bacilar	Penetración de las células epiteliales y replicación intracelular. Luego, invade las células aledañas, lo que causa muerte del tejido (apoptosis). Provoca colitis inflamatoria, en la mayoría de casos cursa con diarrea acuosa, ocasionalmente con disentería. Es muy similar a <i>Shigella</i> spp.	Sistema de secreción tipo III: mxi y spa Proteína IpaH: ipaH	
ECTS/EH	Alimentos contaminados (carnes, vegetales)	Diarrea por consumo de alimentos contaminados	Colonización del intestino grueso. Produce toxinas se unen a la superficie celular, las cuales se unen a los ribosomas, causando la detención de la síntesis de proteínas. Provoca colitis hemorrágica o no hemorrágica y, si la toxina accede a circulación, puede ocluir la microvasculatura llevando al síndrome urémico hemolítico. Uno de los subtipos de este patotipo es <i>E. coli</i> enterohemorrágica (ECEH), que cursa con colitis y disentería.	Toxina similar a la Shiga: stx1 y stx2 Intimina: eaeA Regulador codificado de plásmido: per	

3. Metodología

3.1 Enfoque y población

Esta es una investigación cuantitativa, de tipo exploratorio y descriptivo, con un diseño de muestreo no probabilístico, a juicio de experto. La población estudiada fue el total de plantas de tratamiento de aguas residuales ubicadas en la Gran Área Metropolitana y administradas por el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA), en el año 2013. Se utilizó la técnica de depuración mediante lodos activados.

3.2 Recolección de la muestra

Se realizaron muestreos en cinco plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) a cargo del AyA, cuya distribución geográfica se presenta en la tabla 2. De cada una se obtuvieron muestras a la entrada (afluentes) y a la salida (efluentes). A fin de incluir todos los períodos climáticos del país, fueron recolectadas durante tres días consecutivos en los meses de marzo, mayo, octubre y diciembre del año 2013, para un total de 119 correspondientes a 60 afluentes y 59 efluentes.

Dichos líquidos se recogieron en botellas color ámbar, de un galón, estériles y previamente tratadas con tiosulfato de sodio y EDTA como quelante de metales pesados, de acuerdo con el Standard Methods of Examination Water and Wastewater (SMEWW) (APHA, AWWA & WEF, 2005). Fueron transportadas a 4 °C y al llegar al laboratorio se procesaron inmediatamente.

Tabla 2

Ubicación geográfica de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) estudiadas

Planta de tratamiento	Cantón	Geolocalización
PTAR1	Moravia	9,97843, -84,04634
PTAR2	Moravia	9,97150, -84,05213
PTAR3	San Pablo	9,98746, -84,010235
PTAR4	Alajuela	9,94056, -84,27677
PTAR5	Mora	9,92083, -84,24332

3.3 Determinación de la concentración de E. Coli

En las muestras fueron procesadas con la técnica del número más probable (NMP) para la determinación de *E. coli*, según el método 9221E del SMEWW (APHA et al., 2005). Brevemente se usaron caldos lauril triptosa (Oxoid®) dobles y simples en series de cinco tubos con 10 mL de caldo. En los caldos lauril triptosa dobles se inoculó 10 mL de muestra. A la primera serie de tubos con caldo lauril simple se le agregó 1 mL de muestra. Después, se efectuaron diluciones seriadas exponenciales negativas con agua peptonada al 7 %, a propósito de obtener diluciones de 1:1 000 000 para los afluentes y 1:100 000 para los efluentes, las cuales fueron incubadas por (48 ±4) horas a (35 ±2) °C.

De seguido, los tubos fueron evaluados en busca de turbidez y gas. Aquellos que cumplieron ambos criterios se inocularon en caldo EC-MUG (Oxoid®) e incubaron por (24 ±2) horas a (44,5 ±0,5) °C. Una vez finalizado ese periodo, se analizó la presencia de gas y fluorescencia a 285 nm en los tubos (características consideradas como positivas para *E. coli*). Se utilizó como control positivo la cepa de *E. coli* ATCC 25922, como control negativo la cepa de *Salmonella* entérica serovariedad Enteritidis ATCC 13706 y como control de esterilidad el buffer de dilución. No se observó contaminación y los controles positivos y negativos arrojaron los resultados esperados.

3.4 Análisis de genes de virulencia de *E. coli*

El Siguiendo la metodología descrita por Chacón et al. (2012), para cada dilución de caldos lauril triptosa positivos se hizo una mezcla que fue inoculada con un asa bacteriológica en una placa de agar MacConkey (Oxoid®). Luego de (24 ±2) horas de incubación a (35,0 ±2) °C, se tomaron quince colonias lactosa positivas y cinco colonias lactosa negativas, la cuales se inocularon en un microtubo de reacción con 1 mL de caldo tripticase soya (Oxoid®) y estos se incubaron a (35 ±2) °C por (24 ±2) horas.

A partir de tal proceso, se obtuvieron 546 pools de bacterias, equivalentes a un pool por cada dilución decimal practicada a todas las 119 muestras recolectadas. Por cada muestra se estudiaron al menos tres diluciones decimales diferentes, a fin de determinar la presencia de genes de virulencia de *E. coli*. El análisis incluyó el tamizaje de 10 920 aislamientos bacterianos obtenidos de las aguas residuales.

Más tarde, se realizó una extracción térmica de ADN a cada uno de los pools preparados, de acuerdo con los postulados de Franck et al. (1998). Los ADN fueron almacenados a -70 °C y, previo a su uso, se cuantificó y verificó la calidad del material genético, mediante un biofotómetro Eppendorf Plus® y una dilución 1:100.

Una vez comprobada la calidad, se aplicó un PCR punto final para identificar el 16srRNA de *E. coli* y, así, constatar la presencia de esta bacteria en los pooles por analizar. En la tabla 3 se detallan los iniciadores empleados y las condiciones de amplificación. Esta última se desarrolló con el Dream Taq PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific®) y 5 μ L de ADN. El volumen final fue de 25 μ L y se llevó a cabo en un termociclador Applied BioSystem® Veriti 9902. Al finalizarla, el producto se visualizó en un gel de agarosa (Sigma) al 1 % teñido con RedGelTM Biotium. Se consideró como control positivo ADN de la cepa *E. coli* ATCC 25922, como control negativo *Salmonella* entérica serovariedad Enteritidis ATCC 13706 y agua destilada estéril como control de contaminación.

En aquellos pooles donde se determinó la presencia del gen 16srRNA de *E. coli*, se llevaron a cabo dos PCR multiplex para hallar los genes de virulencia *bfpA*, *eaeA*, *aatA*, *ipaH*, *lt*, *st*, *stx1* y *stx2*, característicos de *E. coli* diarrogénica. La secuencia de los iniciadores, las condiciones de amplificación y la composición del multiplex también se describen en la tabla 3.

Al igual que en el protocolo anterior, se recurrió a Dream Taq PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific®) para la amplificación, utilizando 5 μ L de ADN, lo cual resultó en un volumen final de 25 μ L. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Applied BioSystem® Veriti 9902 y, ya finalizada, el o los productos se visualizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 1 % teñido con RedGelTM Biotium. Como controles positivos portadores de los genes de virulencia y como controles negativos no portadores de genes de virulencia se incluyeron cepas de *E. coli* diarrogénica (EPEC [*bfpA*+/*eaeA*+], ETEC [*lt*+/*st*+], EHEC [*stx1*+/*stx2*+/*eaeA*+], EIEC [*ipaH*+], EAEC [*aatA*+]) donadas el por Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) y por la Universidad Autónoma de Nicaragua en León (UNAN-León).

3.5 Análisis de genes de virulencia de *E. coli*

Por una parte, con base en la estadística descriptiva (media y desviación estándar), se estimó la reducción logarítmica de la carga de *E. coli* para cada planta de tratamiento. Por otra parte, la hipótesis nula obtenida como resultado de la prueba Peto-Prentice fue que no había diferencias entre las concentraciones de *E. coli* en los efluentes y afluentes de la planta; esta comparación se sustentó en un valor de $p>0,05$ y $\alpha=0,05$. Finalmente, los análisis se realizaron con el programa R (R Core Team, 2019) y el paquete NADA (especializado en datos censurados) (Lee, 2017).

Tabla 3

Iniciadores y condiciones de amplificación de los PCR punto final simples y múltiples utilizados en este estudio

Gen	Iniciadores*	Tamaño del producto (pb)	Concentración de iniciadores en reacción (μg/ μL)	Condiciones de amplificación
16srRNA	5'GGGATGAAAGTTAACCTTTGC TC 3' 5' TTCCCGAAGGCACATTCT 3'	584	1,2x10-3	Desnaturalización inicial: 5 min, 94 °C 35 ciclos: Desnaturalización: 30 s, 92 °C Alineamiento: 30 s, 56 °C Elongación: 30 s, 72 °C Elongación final: 2 min, 72 °C
eaeA	5'GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC 3' 5'CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG 3' 5'AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC 3' 5' GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA3'	384	1,4x10-3	Desnaturalización inicial: 5 min, 95 °C
bfpA	5'CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G3' 5'AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC3' 5'GGC ACT GTC TGA AAC TGC	324	1,0x10-3	35 ciclos: Desnaturalización: 45 s, 92 °C Alineamiento: 45 s, 55 °C Elongación: 45 s, 72 °C
stx1	TCC 3'5'TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G3' 5'GTTCTTGACCGCCTTCCGATA CCGTC3'	150	1,8x10-3	1,8x10-3
stx2	5'GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAG TAC 3'	250	2,2x10-3	Elongación final: 10 min, 72 °C
ipaH		600	1,8x10-3	

Gen	Iniciadores*	Tamaño del producto (pb)	Concentración de iniciadores en reacción (μg/ μL)	Condiciones de amplificación
st	5' TCT GTA TTG TCT TTT TCA CC 3' 5' TTA ATA GCA CCC GGT ACA AGC 3' 5' TCT CTA TGT GCA TAC GGA GC 3' 5' CCA TAC TGA TTG CCG CAA T 3'	186	1,8x10-2	Desnaturalización inicial: 5 min, 95 °C
lt	5' TCT CTA TGT GCA TAC GGA GC 3' 5' CCA TAC TGA TTG CCG CAA T 3'	322	1,0x10-3	35 ciclos: Desnaturalización: 45 s, 92 °C Alineamiento: 45 s, 55 °C Elongación: 45 s, 72 °C
aatA	5'CTG GCG AAA GAC TGT ATC AT 3' 5'CAATGTATAGAAATCCGCTGTT 3'	630	2,0x10-2	Elongación final: 10 min, 72 °C

* Protocolo previamente publicado por Chacón et al. (2012)

4. Resultados

La concentración promedio de *E. coli* en las entradas de las PTAR, durante el año de estudio, osciló entre $5,4 \pm 2,4$ y $6,6 \pm 0,6$ Log10 NMP/100 mL; mientras que, en las salidas la concentración mínima fue de $4,7 \pm 0,8$ y la máxima de $5,5 \pm 1,0$ Log10 NMP/100 mL. Estos resultados son similares a los informados por McMinn et al. (2017) en un metaanálisis sobre indicadores microbianos de contaminación en aguas residuales.

Ahora bien, la legislación costarricense no incluye *E. coli* como parámetro microbiológico a controlar en aguas residuales, el único que se verifica es coliformes fecales, cuya concentración máxima de descarga es 3 Log10 NMP/100 mL (1000 NMP/100 mL) (Ministerio de Ambiente y Energía [MINAE], 2007). Con todo, en este trabajo se observó que las PTAR están descargando concentraciones de *E. coli* con un promedio de $4,7 \pm 0,8$ Log10 NMP/100 mL y, por cuanto esta bacteria un miembro del grupo coliforme, se puede afirmar que la descarga de coliformes fecales supera el límite establecido.

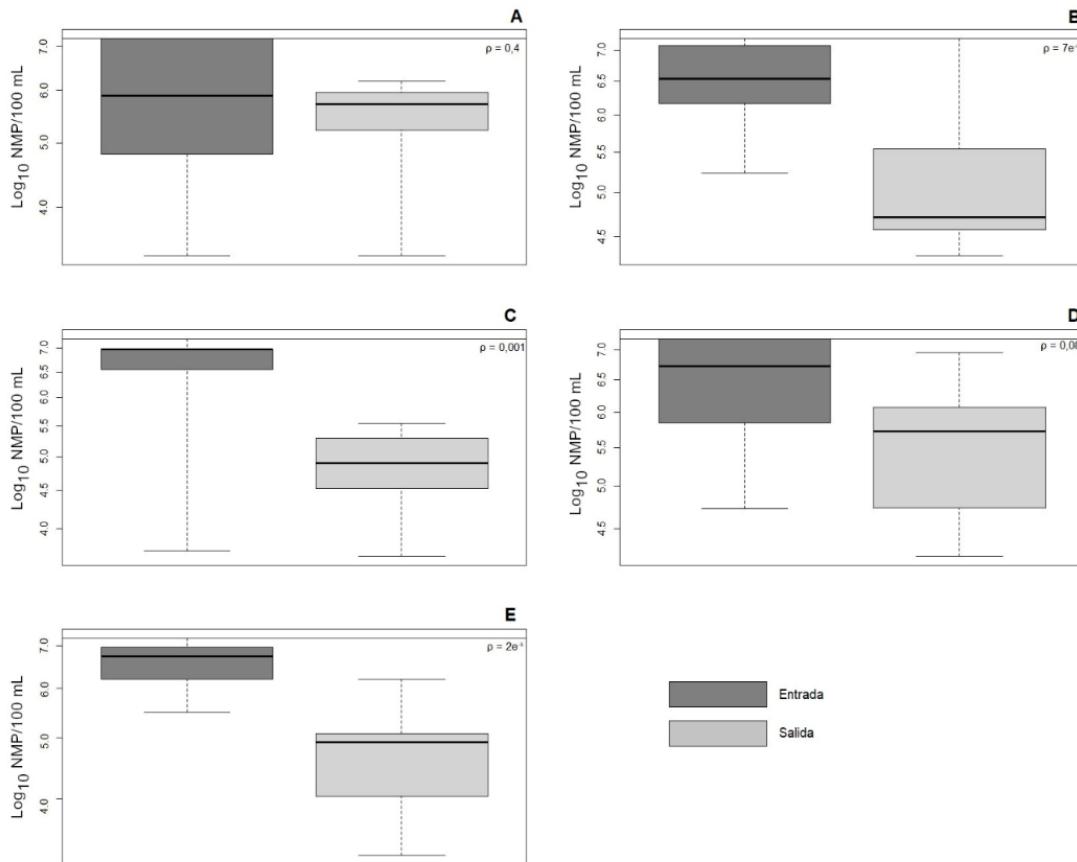
La figura 1 presenta la distribución de las concentraciones anuales de *E. coli* en las PTAR referenciadas. Al comparar la carga de *E. coli* a la entrada de la PTAR con respecto a la salida, no se observan diferencias significativas en las plantas 1 y 4 (figura 1A y 1D); al contrario, en las plantas 2, 3 y 5 (figura 1B, 1C y 1E) sí fue así ($p<0,001$). Tal hecho sugiere que estas últimas remueven notablemente los microorganismos, pero en las primeras esto es mínimo. A pesar de la disminución de la carga bacteriana, las concentraciones de *E. coli* depositadas en los cuerpos aceptores son elevadas (McMinn et al., 2017), tal como se mencionó.

También, se evaluó la eficiencia global de remoción de las cinco PTAR, conforme al periodo del año, para lo cual, se establecieron dos categorías: época seca (marzo y diciembre) y época lluviosa (mayo y octubre). Con el análisis de datos censurados, se comparó la concentración de *E. coli* en los afluentes versus los efluentes. Tanto en época seca ($p=1e-5$) como en época lluviosa ($p=1e-6$) la remoción fue notoria, esto recalca que el funcionamiento global de las plantas no está influido por la estación climatológica del año, sino, por problemas puntuales en la operación.

Un estudio reciente en Italia demostró que para la remoción eficiente de *E. coli* (alrededor del 97 %) se requiere un proceso de sedimentación primaria, seguido de un tratamiento biológico, como el de lodos activados, lo cual está acorde con los hallazgos de este estudio; sin embargo, en aras de lograr una descarga segura, se deben aplicar procesos adicionales, por ejemplo, la desinfección con hipoclorito de sodio (Raboni et al. 2016), por tanto, es altamente recomendable incorporar ese paso en las PTAR costarricenses.

Figura 2

Concentración anual de *Escherichia coli* por sitio de muestreo en cinco plantas de tratamiento de aguas residuales del Gran Área Metropolitana



Nota. A. PTAR 1, B. PTAR 2, C. PTAR 3, D. PTAR 4, E. PTAR 5.

En torno a la detección de genes de virulencia asociados a los patotipos diarrogénicos de *E. coli*, fue posible confirmar la circulación de *aatA* (ECEA), *st* y *lt* (ECET), *stx1* y *stx2* (ECST/EH) y *eaeA* y *bfpA* (ECEP). Como se observa en la tabla 4, los genes más frecuentemente encontrados fueron *stx1* (56,3 %) y *stx2* (34,5 %), semejante a lo ocurrido en Polonia en el año 2018, donde el *stx2* fue el más relevante en el estudio, ya que apareció en un 33 % de las muestras provenientes de afluentes y en un 18 % de los efluentes, en tanto que, el *stx1* se detectó en un 8 % y un 7 % de las muestras de afluentes y efluentes, respectivamente (Osińska et al. 2018).

No obstante, las observaciones citadas contrastan con el trabajo de Chacón et al. (2012), donde la frecuencia de *stx1* fue del 30,3 % y *stx2* fue imperceptible en muestras de heces de niños menores de cinco años, asintomáticos y de comunidad (CEN-CINAL de Montes de Oca). En ese mismo análisis, tampoco se precisó ninguno de los dos genes en muestras de aguas residuales de las lagunas de

estabilización en Guanacaste (Cañas, Nicoya, Liberia, Santa Cruz) y Pérez Zeledón, administradas por el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados. Por su parte, Pérez et al. (2010) expusieron la presencia de ECTS/EH con una frecuencia del 10 % en muestras clínicas de heces de niños.

Como ha sido comprobado, el grupo conformado por *E. coli* productora de toxina Shiga incluye múltiples variedades patógenas, a saber, la *E. coli* enterohemorrágica, capaz de causar cuadros de disentería, por lo que, es esperable observar las toxinas en mayor proporción en muestras clínicas de pacientes sintomáticos, en cambio, en ambiente, su presencia podría ser más elevada. Los genes que codifican las toxinas similares a la Shiga pueden transmitirse por fagos y generar desestabilización del cromosoma bacteriano, razón por la cual su expresión no siempre es exitosa ni produce cuadros clínicos sintomáticos (Bielaszewska et al., 2007), aunado a las posibles diferencias de la transmisión de estos genes entre espacios rurales y urbanos.

Ninguna de las muestras analizadas fue positiva por el gen ipaH (ECEI). Previamente, Chacón et al. (2012) no lo reportaron en muestras de heces de niños de la GAM, pero sí en el 16,7 % de las muestras de aguas residuales de las lagunas de estabilización fuera de la GAM. Además, Pérez et al. (2010) indicaron que, en niños sintomáticos donde se utilizó el ial como marcador de ECEI, la detección fue del 20 %. En otras regiones, como Mozambique, la presencia de ECEI es relativamente baja, entre el 4,8 % y el 7,7 %, en muestras clínicas de niños entre 0 y 59 meses con diarreas leves o moderadas (Garrine et al., 2020), contrariamente, en Polonia la frecuencia del gen ipaH fue de un 25 % en los efluentes de las PTAR (Osińska et al., 2018). Como se aprecia en la tabla 1, ECEI es responsable de la disentería bacilar, al igual que *Shigella spp.*, según los datos estadísticos del país, la frecuencia de ambos patógenos es sumamente baja, por lo general, asociada a brotes específicos (Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, 2013; Ministerio de Salud, 2019).

La frecuencia del gen aatA en el presente estudio fue de un 37,8 %, porcentaje mayor al informado por Chacón et al. (2012) en aguas residuales (12,5 %) y en heces de niños de comunidad (19,7 %) y por Pérez et al. (2010) en muestras clínicas (12 %). Análisis en voluntarios demostraron que una dosis infectante de ECEA correspondiente a 1010 UFC (unidades formadoras de colonias) causa un cuadro de diarrea sintomático (Huang et al. 2006). Así, por un lado, es de esperar que ECEA, en nuestras condiciones, se encuentre normalmente en el intestino sin causar patología, lo cual concuerda con las frecuencias encontradas en muestras de heces de comunidad (Chacón et al., 2012). Por otro lado, en los últimos años se ha observado que algunos serotipos de ECEA son capaces de producir infecciones en tracto urinario y, al tratarse de aguas residuales, es imposible distinguir si el aislamiento portador de los aatA proviene de vía entérica o urinaria, entonces, su prevalencia podría ser más alta de lo usual, por abarcar *E. coli* de ambos orígenes (Olesen et al., 2012).

Asimismo, la frecuencia de los genes *st* y *lt* de ECET fue del 20,2 % y el 16,0 %, respectivamente. De acuerdo con Chacón et al. (2012), ambos genes se encontraron en aguas residuales en un 12,5 % y un 25 % y Pérez et al. (2010) revelaron que el 5 % de las muestras clínicas analizadas presentaron ECET. Al respecto, en Bangladesh se observó que las diarreas causadas por ECET disminuyen con la edad (Qadri, Svennerholm, Faruque, & Sack, 2005); de igual modo, se documentó la existencia de anticuerpos contra los factores de colonización característicos de ese grupo bacteriano, lo cual explica la presencia de estas bacterias en aguas residuales y su común ausencia en cuadros clínicos (Kaper et al., 2004).

En lo concerniente a ECEP y los genes *eaeA* y *bfpA*, las conclusiones de este estudio son parecidas a las de Chacón et al. (2012) y Pérez et al. (2010). La frecuencia de *bfpA* es muy baja, con lo que, la ocurrencia de patotipos típicos de ECEP es poco habitual en el país.

En resumen, los patotipos patógenos de *E. coli* pueden residir de forma asintomática en el intestino del ser humano y existen factores que regulan la aparición de cuadros clínicos, como la cantidad de microorganismos virulentos, la respuesta inmune del hospedero y la regulación (“quorum sensing”) generada por la misma microbiota intestinal. Por ejemplo, ciertas moléculas autoinductoras (AI-2) son capaces de controlar la expresión de genes de virulencia de ECST/EH, entre ellas, la formación de biopelículas e incluso funcionar como señalizadores interespecie. Hay evidencia de que los hospederos producen AI-2 por inducción de su microbiota asociada, de hecho, se ha iniciado el diseño de terapias modificadoras de quorum sensing para maximizar la inhibición de microorganismos virulentos (Defoirdt, 2018).

Otro aspecto importante fue el hallazgo de genes de virulencia relacionados con *E. coli* en las salidas de las plantas, pero no en las entradas. Se cita el caso de la PTAR 1: durante el mes de mayo, únicamente fue posible detectar los genes *eaeA* y *bfpA* en la salida, situación que se repitió en diciembre con los *st* y *lt*. Esto ya había sido observado en el país por Chacón et al. (2012) y en Europa (Osińska et al., 2018) se ha atribuido al probable papel de las PTAR como reservorios de bacterias potencialmente patógenas y a la capacidad potencial de trasferencia horizontal de genes en estos espacios.

Aparte, se elaboró un análisis de T student en muestras no pareadas y con dos colas, a fin de averiguar si existían diferencias entre la frecuencia de detección de genes de virulencia en las salidas de las PTAR con remociones significativas de *E. coli*, frente a las que no presentaron remociones exitosas, lo cual fue negativo ($t=0,82$, $\alpha=0,05$). Esto parece indicar que el tipo de tratamiento desarrollado en las plantas no influye en la sobrevivencia de cepas de *E. coli* portadoras de genes de virulencia.

Lo dicho tiene gran importancia a nivel epidemiológico, en tanto implica la liberación de cepas potencialmente virulentas al ambiente y sus consecuencias en salud pública, sobre todo, cuando los

cuerpos receptores de los efluentes de la PTAR son destinados a la producción de agua potable o al riego de vegetales de consumo crudo. La recurrencia de *E. coli* diarrágénica en aguas superficiales ha sido documentada ampliamente en diferentes partes del mundo, téngase por caso México, donde Ramírez Castillo et al. (2013) identificaron un 60 % de aislamientos de *E. coli* portadores de algún gen de virulencia junto con resistencia a diversos grupos de antimicrobianos en muestras de agua del río San Pedro, el cual recibe aguas residuales municipales, industriales y de granjas ganaderas. En la misma línea, Petit et al. (2017), en Francia, descubrieron *E. coli* diarrágénica en agua superficial, aunque la calidad microbiológica del agua se categorizó como buena a la luz de la legislación francesa.

Como último punto, es importante destacar que la detección de genes de virulencia es una herramienta altamente específica, máxime con la metodología implicada, pues el proceso de enriquecimiento y cultivo permite seleccionar de forma certa microorganismos viables y con fenotipos similares a *E. coli*, para luego confirmar su presencia por medio de la amplificación del gen 16srRNA; además, las mezclas de aislamientos maximiza el tamizaje y, por lo tanto, se logra un resultado más fiable acerca de la circulación de bacterias portadoras de genes de virulencia.

Tabla 4

Concentración promedio de *Escherichia coli* y genes de virulencia estudiados en cinco PTAR del Gran Área Metropolitana

PT AR	Mes	Sitio de muestreo	Log10 NMP/100 mL <i>Escherichia coli</i>	aat			stx 1	stx 2	eae A	bfp A	ipa H
				A	st	lt					
1	Marzo	Entrada	6,2 ± 0	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	4,8 ± 1,3	2/3	0/3	0/3	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3
	Mayo	Entrada	>7,2	1/3	1/3	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	5,8 ± 0,2	0/3	0/3	0/3	2/3	2/3	1/3	1/3	0/3
	Octubre	Entrada	6,1 ± 1,1	1/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	6,2 ± 0	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3
2	Diciembre	Entrada	4,6 ± 2,5	1/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3
		Salida	5,4 ± 0,3	1/3	1/3	2/3	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3
	Marzo	Entrada	6,8 ± 0,5	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	0/2	0/2	0/2
		Salida	6,0 ± 1,4	0/3	0/3	0/3	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3
	Mayo	Entrada	6,2 ± 0,2	3/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	4,7 ± 0,2	3/3	1/3	1/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
3	Octubre	Entrada	6,5 ± 0,8	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	4,5 ± 0,2	0/3	0/3	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	Diciembre	Entrada	6,4 ± 1,0	2/3	0/3	0/3	3/3	1/3	1/3	0/3	0/3
		Salida	5,2 ± 0,5	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3
	Marzo	Entrada	6,8 ± 0,4	1/3	0/3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	4,6 ± 1,3	2/2	0/2	0/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2

4	Mayo	Entrada	5,9 ± 1,9	0/3	0/3	1/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	5,2 ± 0,3	0/3	3/3	1/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	Octubre	Entrada	5,6 ± 0	3/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	5,0 ± 0,3	1/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Diciembre	Entrada	6,9 ± 0,3	3/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	4,6 ± 0,4	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	Marzo	Entrada	5,2 ± 0,8	3/3	1/3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	5,3 ± 1,4	1/3	1/3	1/3	3/3	2/3	0/3	0/3	0/3
	Mayo	Entrada	7,0 ± 0,2	1/3	1/3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	6,0 ± 0,2	1/3	2/3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
	Octubre	Entrada	5,9 ± 0,0	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	6,0 ± 0,4	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Diciembre	Entrada	7,2 ± 0	1/3	0/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	4,2 ± 0	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
5	Marzo	Entrada	6,8 ± 0,5	2/3	0/3	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	4,2 ± 0,7	2/3	0/3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	0/3
	Mayo	Entrada	6,5 ± 0,6	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	4,2 ± 0,9	0/3	1/3	0/3	2/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	Octubre	Entrada	6,4 ± 0,8	1/3	1/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		Salida	5,0 ± 0,1	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Diciembre	Entrada	6,5 ± 0	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3
		Salida	5,6 ± 1,1	3/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	0/3	0/3
Frecuencia anual (%)			37, 8	20, 2	16, 0	56, 3	34, 5	4,2	1,7	0	

Nota. Las muestras cuyas tres réplicas fueron positivas (3/3) se señalan en color rojo; las muestras triplicadas que obtuvieron solo 2 resultados positivos (2/3), en color naranja; las muestras triplicadas con solo 1 resultado positivo (1/3), en color amarillo y las muestras en que no se detectó la presencia del gen, en color verde (0/3).

5. Conclusiones

Actualmente en Costa Rica, la etiología de las diarreas es poco conocida, debido a que el sistema de salud prioriza el informe de los casos, pero no la identificación exacta del agente causal. La vigilancia epidemiológica está enfocada en análisis de muestras clínicas y brotes, lo cual no es representativo de la circulación constante de patógenos causantes de diarrea. Aunado a lo anterior, las metodologías clásicas para detectar enteropatógenos son limitadas y, en muchos casos, insuficientes al momento de identificar microorganismos, en particular, aquellos considerados como fastidiosos.

En el caso de *E. coli*, la vía clásica (cultivo) brinda información deficiente, pues no permite distinguir los aislamientos que portan factores de virulencia. Por ello, la vigilancia epidemiológica en aguas

residuales representa una herramienta de gran valor, al abarcar un ámbito más amplio de la población y determinar, así, la circulación epidémica y endémica de patógenos.

Este estudio demostró que en nuestro país la descarga de efluentes de PTAR a cuerpos receptores de aguas contiene *E. coli* en concentraciones elevadas, aspecto a ser considerado en profundidad, por cuanto muchos de esos aceptores se dedican posteriormente a otras actividades, por ejemplo, el riego de vegetales. Esta situación podría facilitar el reingreso de microorganismos a la sociedad, así como propiciar su persistencia en la población, incluyendo el riesgo latente de brotes asociados.

Los métodos moleculares acoplados a un sistema de mezclas de aislamientos evidenciaron la circulación endémica, sin patrón estacional, de genes de virulencia vinculados con *E. coli* diarrogénica y su liberación potencial al ambiente. Tal resultado posee gran relevancia, en vista de que mostró la existencia de estos patotipos en la población costarricense del Gran Área Metropolitana, lo cual, como se mencionó, es difícilmente trazable utilizando procedimientos de bacteriología convencional.

La circulación constante de patotipos de *E. coli* debe ser considerada por las autoridades respectivas, a fin de minimizar la amenaza a la salud pública que conlleva. De igual modo, los hallazgos expuestos podrían servir de alerta para otras regiones con características epidemiológicas similares, donde sea probable una circulación constante de *E. coli* diarrogénica en la población, a causa de las descargas elevadas de microorganismos potencialmente patógenos provenientes de aguas residuales.

6. Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, por el financiamiento otorgado para la ejecución de este proyecto.

7. Referencias

APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) y WEF (Water Environment Federation). (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. (A. Eaton, L. Clscheri, E. Rice & A. Greenberg, Eds.) (21st ed.). Washington, DC: American Public Health Association.

Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Gärtner, J., Gallitz, I., Hacker, J., Karch, H.,... Zdziarskin J. (2007). Aspects of genome plasticity in pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(7-8), 625-639.

- Bourdett-Stanziola, L., Jiménez, C. y Ortega-Barria, E. (2008). Diversity of human rotavirus G and P genotypes in Panama, Costa Rica, and the Dominican Republic. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(6), 921–924.
- Bourdett-Stanziola, L., Ortega-Barria, E., Espinoza, F., Bucardo, F., Jimenez, C. y Ferrera, A. (2011). Rotavirus genotypes in Costa Rica, Nicaragua, Honduras and the Dominican Republic. *Intervirology*, 54(1), 49–52.
- Bray, J. (1945). Isolation of antigenically homogeneous strains of Bact. coli neapolitanum from summer diarrhoea of infants. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 57(2), 239–247.
- Chacón, L. M., Taylor, L., Valiente, C., Alvarado, I. y Cortés, X. (2012). A DNA pooling based system to detect Escherichia coli virulence factors in fecal and wastewater samples. *Brazilian journal of microbiology*, 43(4), 1319–26.
- Defoirdt, T. (2018). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends in Microbiology*, 26 (4), 313-328.
- Devault, D. A., Maguet, H., Merle, S., Péné-Annette, A. y Lévi, Y. (2018). Wastewater-based epidemiology in low Human Development Index states: bias in consumption monitoring of illicit drugs. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(28), 27819–27838.
- Espinoza, A. (2004). Comportamiento de la enfermedad diarreica en Costa Rica, de 1995 al 2001. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 13(21), 1–9.
- Fleckenstein, J. M., Matthew Kuhlmann, F. y Sheikh, A. (2021). Acute Bacterial Gastroenteritis. *Gastroenterology Clinics of North America*, 50(2), 283–304.
- Franck, S. M., Bosworth, B. T. y Moon, H. W. (1998). Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), 1795–1797.
- Garrine, M., Glória Matambisso, G., Nobela, N., Vubil, D., Massora, S., Acácio, S.,... Mandomando, I. (2020). Low frequency of enterohemorrhagic, enteroinvasive and diffusely adherent Escherichia coli in children under 5 years in rural Mozambique: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 20, 659-664.
- Huang, D. B., Mohanty, A., DuPont, H. L., Okhuysen, P. C. y Chiang, T. (2006). A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative Escherichia coli. *Journal of Medical Microbiology*, 55(10), 1303–1311.
- Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud. (2013). Informe de vigilancia basada en laboratorio Agentes causantes de diarrea y otras infecciones , por región y laboratorio , 1 – 31 de mayo de 2013 Contenidos. Tres Ríos. Recuperado de https://www.inciensa.sa.cr/vigilancia_epidemiologica/informes_vigilancia/2013/Bacterias/Agentes_causantes_de_diarrea_y_otras_infecciones_mayo_2013.pdf

Kaper, J. B., Nataro, J. P. y Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140.

Lee, L. (2017). NADA: Nondetects and Data Analysis for Environmental Data. Recuperado de <https://cran.r-project.org/package=NADA>

Mao, K., Zhang, K., Du, W., Ali, W., Feng, X. y Zhang, H. (2020). The potential of wastewater-based epidemiology as surveillance and early warning of infectious disease outbreaks. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 17, 1–7. Elsevier Ltd.

McMinn, B. R., Ashbolt, N. J. y Korajkic, A. (2017). Bacteriophages as indicators of fecal pollution and enteric virus removal. *Letters in Applied Microbiology*, 65(1), 11–26.

Ministerio de Ambiente y Energía, y Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE). (2007). Reglamento de vertido y reuso de aguas residuales (p. 56). Costa Rica. Recuperado de http://www.digeca.go.cr/sites/default/files/reglamento_vertido_reuso_aguas_residuales_0.pdf

Ministerio de Salud. (2021). Vigilancia de la Salud: Enfermedades de Notificación Individual. Consultado 8 Agosto, 2021, from <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/estadisticas-y-bases-de-datos/notificacion-individual>

Ministerio de Salud. (2021, May 21). Diarreas continúan a la baja. Centro de Prensa Ministerio de Salud. San José. Retrieved July 17, 2021, from <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/centro-de-prensa/noticias/746-noticias-2021/2101-diarreas-continuan-a-la-baja>

Ministerio de Salud de Costa Rica. (2021). Vigilancia de la Salud: Enfermedades de Notificación Colectiva. Consultado 8 Agosto, 2021, from <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/estadisticas-y-bases-de-datos/notificacion-colectiva>

Nataro, J. P. y Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142–201.

Olesen, B., Scheutz, F., Andersen, R., Menard, M., Boisen, N., Johnston, B., ..., Johnson, J. (2012). Enteropathogenic *Escherichia coli* O78:H10, the Cause of an Outbreak of Urinary Tract Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11): 3703-3711

Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M. y Niestępski, S. (2018). The prevalence of virulence genes specific for *Escherichia coli* in wastewater samples from wastewater treatment plants with the activated sludge process. *E3S Web of Conferences*, 44, 00133 .

- Pérez, C., Gómez-Duarte, O. G. y Arias, M. L. (2010). Diarrheagenic *Escherichia coli* in Children from Costa Rica. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), 292–297.
- Petit, F., Clermont, O., Delannoy, S., Servais, P., Gourmelon, M., Fach, P.,... Berthe, T.. (2017). Change in the Structure of *Escherichia coli* Population and the Pattern of Virulence Genes along a Rural Aquatic Continuum. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Qadri, F., Svennerholm, A.-M., Faruque, A. S. G. y Sack, R. B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 465–483.
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. *Vienna: R Foundation for Statistical Computing*. Recuperado de <https://www.r-project.org/>
- Raboni, M., Gavasci, R. y Torretta, V. (2016). Assessment of the fate of *Escherichia coli* in different stages of wastewater treatment plants. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227, 455
- Ramírez Castillo, F. Y., Avelar González, F. J., Garneau, P., Díaz, F. M., Guerrero Barrera, A. L. y Harel, J. (2013). Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUN), 1–16.
- Randazzo, W., Truchado, P., Cuevas-Ferrando, E., Simón, P., Allende, A. y Sánchez, G. (2020). SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area. *Water Research*, 181(5), 115942. Royal Society of Chemistry.
- Reyes, L., Evans, D. J., Ramírez, J. y Mata, L. (1978). *Escherichia coli* enterotoxigenica en niños hospitalizados en Costa Rica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Saenz Herrera*, 13(1), 23–32.
- Riley, L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 8(4).
- Sims, N. y Kasprzyk-Hordern, B. (2020). Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environment International*, 139 (March), 105689.
- Solano Barquero, M., Montero-Salguero, A., León-Alán, D., Santamaría-Ulloa, C., Mora, A. y Reyes-Lizano, L. (2018). Prevalencia de parasitosis en niños de 1 a 7 años en condición de vulnerabilidad en la Región Central Sur de Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 60(2).
- World Health Organization. (2017). *Diarrhoeal disease*. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>

Xagoraraki, I. y O'Brien, E. (2020). Wastewater-Based Epidemiology for Early Detection of Viral Outbreaks. In D. J. O'Bannon (Ed.), *Women in Water Quality* (pp. 75–97). Switzerland: Springer Nature.

Población y Salud

en Mesoamérica

¿Quiere publicar en la revista?

Ingresé [aquí](#)

O escríbanos:

revista@ccp.ucr.ac.c



Población y Salud en Mesoamérica (PSM) es la revista electrónica que cambió el paradigma en el área de las publicaciones científicas electrónicas de la UCR.

Logros tales como haber sido la primera en obtener sello editorial como revista electrónica la posicionan como una de las más visionarias.

Revista PSM es la letra delta mayúscula, el cambio y el futuro.

Indexada en los catálogos más prestigiosos. Para conocer la lista completa de índices, ingrese [aquí](#).







Revista Población y Salud en Mesoamérica -
Centro Centroamericano de Población
Universidad de Costa Rica

