

**CAMPUS IZTAPALAPA**

**“Presencia de Escherichia coli O157:H7 en alimentos y  
demostración mediante biología celular de algunos factores de  
virulencia”**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**Q.B.P. XÓCHITL NOCHEBUENA PELCASTRE**

**Tutor:**

**Dr. Carlos Vázquez Salinas**

**Asesores:**

**Dr. Edmundo Bonilla González**

**Dr. José Mariano García Garibay**

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
RESUMÉN.....	v
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 ANTECEDENTES.....</b>	<b>1</b>
<b>I.2 CLASIFICACIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>I.3 CARACTERÍSTICAS DE Escherichia coli O157:H7.....</b>	<b>2</b>
I.3.1 MORFOLOGÍA.....	2
I.3.2 CONDICIONES PARA SU SOBREVIVENCIA.....	2
<b>I.4 MECANISMO DE TRANSMISIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>I.5 RESERVORIOS.....</b>	<b>3</b>
<b>I.6 ALIMENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>I.7 PATOGENIA.....</b>	<b>5</b>
I.7.1 DOSIS.....	5
I.7.2 PERIODO DE INCUBACIÓN Y SINTOMATOLOGÍA.....	5
I.7.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.....	7
I.7.4 BROTES.....	8
<b>I.8 FACTORES DE VIRULENCIA.....</b>	<b>10</b>
I.8.1 TOXINAS SHIGA.....	10
I.8.2 ADHERENCIA.....	10
I.8.2 ADHERENCIA.....	11
I.8.4 HEMOLISINA.....	11
<b>I.9 ANTIBIÓTICOS.....</b>	<b>12</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>III. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>III.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>15</b>

<b>IV. METODOLOGÍA.....</b>	<b>16</b>
<b>IV.1 CRITERIO DE SELECCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>IV.1.1 PRODUCTOS DE LA PESCA .....</b>	<b>16</b>
<b>IV.1.2 HORTALIZAS.....</b>	<b>16</b>
<b>IV.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....</b>	<b>17</b>
<b>IV.2.1 NÚMERO MÁS PROBABLE DE ORGANISMOS COLIFORMES FECAL (OCF).....</b>	<b>18</b>
<b>IV.2.1.1 PRUEBA PRESUNTIVA.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.2.1.2 PRUEBA CONFIRMATORIA.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.2.2 IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI O157:H7.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.2.3 OBTENCIÓN DE LAS TOXINAS.....</b>	<b>19</b>
<b>IV.2.4 ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES.....</b>	<b>19</b>
<b>IV.2.5 ANÁLISIS DE ADHERENCIA EN LA LÍNEA CELULAR HEP-2.....</b>	<b>20</b>
<b>IV.2.5.1 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>IV.2.5.2 PREPARACIÓN DE LA MICROPLACA.....</b>	<b>20</b>
<b>IV.2.6 ANÁLISIS DE INVASIVIDAD EN LA LÍNEA CELULAR HEP-2.....</b>	<b>21</b>
<b>IV.2.6.1 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>IV.2.6.2 PREPARACIÓN DE LA MICROPLACA.....</b>	<b>21</b>
<b>IV.2.7 ANÁLISIS DE HEMOLISINA.....</b>	<b>22</b>
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>VI. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>40</b>
<b>APENDICE.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Aislamiento de Escherichia coli O157:H7 en hortalizas.....	28
2. Aislamiento de Escherichia coli O157:H7 en productos de la pesca.....	31
3. Efecto citotóxico producido por las toxinas de Escherichia coli O157:H7 en las líneas celulares VERO y MA-104.....	35
4. Adherencia de Escherichia coli O157:H7 en células Hep-2.....	36
5. Adherencia difusa de Escherichia coli O157:H7 en células Hep-2.....	37
6. Invasividad producida por Escherichia coli O157:H7 en células Hep-2.....	38

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>1. Brotes asociados con Escherichia coli O157:H7 por el consumo de alimentos.....</b>	<b>8</b>
<b>2. Nombre científico y común de los productos de la pesca seleccionados.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Nombre científico y común de las hortalizas analizadas.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Muestra positivas de hortalizas para Escherichia coli O157:H7.....</b>	<b>24</b>
<b>5. Unidades Formadoras de Colonias identificadas como Escherichia coli O157:H7.....</b>	<b>26</b>
<b>6. Productos de la pesca analizados para el aislamiento de Escherichia coli O157:H7.....</b>	<b>29</b>
<b>7. Confirmación de Unidades Formadoras de Colonias de Escherichia coli O157:H7.....</b>	<b>30</b>
<b>8. Efecto citotóxico en la línea celular VERO.....</b>	<b>33</b>
<b>9. Efecto citotóxico en la línea celular MA-104.....</b>	<b>34</b>
<b>10. Citotoxicidad, hemolisina, adherencia e invasividad de las cepas de Escherichia coli O157:H7 aisladas.....</b>	<b>40</b>

## RESUMÉN

*Escherichia coli* O157:H7 ha sido reconocida como un patógeno humano desde 1982 al asociarse como agente causal del síndrome urémico hemolítico y la colitis hemorrágica. El principal factor de patogenicidad son las toxinas shiga like 1 y 2 (Stx 1 y Stx 2 respectivamente), existiendo variantes de la toxina shiga like 2 como son Stx 2c, Stx 2v, Stx 2e, entre las más importantes. Por lo tanto se consideró importante evidenciar su presencia en alimentos y evaluar algunos factores de virulencia. Se utilizó la técnica del Número Más Probable para organismos coliformes fecales, a partir del caldo EC, se aisló en agar Mac Conkey sorbitol, a las UFC sorbitol negativo se les hizo Gram, identificación bioquímica y serología. A las cepas confirmadas como *Escherichia coli* O157:H7 Se les determinó la presencia de algunos factores de virulencia mediante biología celular utilizando las líneas VERO, MA-104 y Hep-2 para observar efecto citotóxico, adherencia e invasividad. De las 357 muestras (150 de hortalizas, 105 de pescado y 102 de ostiones), de las cuales 26 fueron positivas (19 para hortalizas, 5 de pescado y 2 de ostiones), para *Escherichia coli* O157:H7. De las cepas aisladas de hortalizas 9 correspondieron a verdolaga, 4 de espinaca, 3 de cilantro, 2 de perejil y una de lechuga. En cuanto a los aislados de *E. coli* O157:H7 a partir de los productos de la pesca 5 procedieron de pescado y 2 de ostiones. Observándose en ocho de las 19 cepas aisladas de hortalizas un efecto citopático en la línea celular VERO del 100 % de destrucción celular, en las 11 restantes el porcentaje vario entre el 50 y 90 %. En cuanto a la línea celular MA-104 nueve cepas destruyeron el 100 % de la monocapa y las 10 restantes entre el 60 y 80 %. En 15 de las cepas se observó una adherencia difusa en células Hep-2 y el resto no fue adherente en esta línea celular. Ninguna de las cepas tuvo la capacidad de invadir la línea celular Hep-2. En el caso de productos de la pesca de las 207 muestras analizadas (102 de ostión y 107 de pescado) se aislaron 7 cepas de *Escherichia coli* O157:H7, de las cuales 2 fueron a partir de ostión y 5 de pescado. Las cepas aislada de ostión produjeron un 70 y 100 % de destrucción de la monocapa de células VERO y un 70 y 90 % en células MA-104; una de estas cepas presentó adherencia difusa en la línea celular Hep-2 y ambas fueron incapaces de invadir dicha línea celular. Las cepas obtenidas de pescado causaron 3 de ellas el 100 % de destrucción celular en la línea celular VERO, una el 60% y otra el 70 %, en la línea celular MA-104 dos destruyeron el 100 % de la monocapa, dos el 80 % y una el 90%; tres

cepas presentaron adherencia difusa en las células Hep-2 y ninguna pudo invadir a estas células. En las 26 cepas aisladas de *E. coli* O157:H7 tanto de hortalizas como de productos de la pesca se demostró la actividad de la hemolisina produciendo todas las cepas una  $\alpha$ -hemólisis. La importancia de este trabajo fue el demostrar la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en hortalizas, ostiones y pescado; además de evidenciar la presencia de algunos factores de patogenicidad como la producción de toxinas shiga like, hemolisina, así como, la capacidad de estas cepas para adherirse en la línea celular Hep-2.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 ANTECEDENTES

Diferentes serotipos de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) productoras de toxinas shiga (Stx) han surgido como agente etiológico de enfermedades transmitidas por alimentos en países desarrollados, siendo el O157:H7 predominante dentro del grupo EHEC, aislado también en pacientes de Estados Unidos, Canadá y Japón. Cepas EHEC pertenecientes a serotipos diferentes al O157 han sido responsables en Europa de brotes y casos esporádicos de enfermedades en humanos (Smith y Scotlan, 1988; Gyles *et al.*, 1998).

*Escherichia coli* O157:H7 fue reconocida como patógeno humano en 1982 después de dos brotes de colitis hemorrágica (Riley *et al.*, 1983; Boyce *et al.*, 1995). Este microorganismo, es la causa de la gran mayoría de los casos de colitis (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) en Estados Unidos, Canadá (Gransden *et al.*, 1986; Neill *et al.*, 1987; Karmali 1989; Martín *et al.*, 1990; Tauxe, 1997), Gran Bretaña y otras regiones de Europa (Cutter y Siragusa, 1994). En Australia los serotipos más comunes causantes del SUH son O111:H<sup>-</sup> y O157:H<sup>-</sup> (Goldwater y Bettelheim, 1995), y una alta frecuencia de O157:H<sup>-</sup> sorbitol positivas han sido descritas en Europa central (Bitzan *et al.*, 1993).

## I.2 CLASIFICACIÓN

A las cepas de *E. coli* que producen gastroenteritis tanto en niños como en personas adultas se les denomina enteropatógenas. Las cepas de *E. coli* asociadas a enfermedades de tipo alimentario se clasifican en cinco grupos; con base en sus propiedades de virulencia, síndromes clínicos, diferencias en su epidemiología y distintos serotipos O:H (Levine, 1987): enteropatógeno (EPEC), enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroadherente (EAEC) y enterohemorrágico (EHEC) (Edberg, 1989; Cleary, 1992) y recientemente, se incluyó el grupo de enteroagregativas (EaggEC) (Buchanan y Doyle, 1997).

El grupo enterohemorrágico de *E. coli*, propuesto por Levine (1987), incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7, considerado como el prototipo del grupo, señalando

además la asociación de EHEC con la etiopatogenia de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). Otros serotipos pertenecientes a este grupo son: O4:H<sup>-</sup>, O11:H<sup>-</sup>, O26:H11, O45:H2, O103:H2, O104:H21, O111:H48 y O145:H<sup>-</sup> (Griffin y Tauxe, 1991; Beutin *et. al.*, 1994).

### **I.3 CARACTERÍSTICAS DE *Escherichia coli* O157:H7**

#### **I.3.1 MORFOLOGÍA**

Son bacilos Gram negativos de 1.1 – 1.5 x 2 –5 µm, no esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, solo o en pares, posee microcápsula, móvil por flagelos peritricos, mesofílico, fermenta la lactosa en 48 horas, produce colonias en agar MacConkey sorbitol circulares, húmedas, de 1 a 2 mm de diámetro, brillantes, convexas, con bordes enteros, ambarinas y no fermentadoras del sorbitol, semejando perlas transparentes muy pequeñas (Hitchins *et. al.*, 1992).

#### **I.3.2 CONDICIONES PARA SU SOBREVIVENCIA**

La sobrevivencia de esta bacteria en los alimentos, depende de la interacción de varios factores intrínsecos y extrínsecos, tales como temperatura, pH y actividad de agua. La temperatura mínima para el crecimiento es de 8-10°C (Rajkowski y Marmer, 1995). Puede crecer y producir gas en caldo *Escherichia coli* (EC) incubado a 44.5 °C (Hitchins *et. al.*, 1992). El tipo y concentración de ácido orgánico e inorgánico utilizado para la conservación de alimentos en la industria influye sobre el crecimiento del microorganismo (Cutter y Siragusa, 1994).

La ácido tolerancia de *E. coli* es un fenómeno complejo, depende de la fase de crecimiento de la bacteria y es inducible. Las células en la fase estacionaria son substancialmente más ácido tolerantes que en la fase exponencial (Small *et. al.*, 1994; Arnold y Kaspar, 1995; Rowbury, 1995; Cheville *et. al.*, 1996). Estudios recientes indican que la inducción de la ácido tolerancia también incrementa la resistencia del microorganismo al calentamiento, la radiación y los antimicrobianos (Rowbury, 1995).

La capacidad de *E. coli* O157:H7 de sobrevivir en las condiciones ácidas del estómago y la baja dosis infectiva de esta bacteria, se debe a tres sistemas de resistencia al ácido: sistema oxidativo (expresado cuando la bacteria crece con un metabolismo oxidativo), sistema dependiente de glutamato y sistema dependiente de la arginina. Estos dos últimos protegen al microorganismo de un pH de 2.5, solo si este medio es suplementado con glutamato o arginina respectivamente (Glass *et. al.*, 1992; Besser *et. al.*, 1993; Leyer *et. al.*, 1995; Lin *et. al.*, 1995; Lin *et. al.*, 1996). Aún no se conoce el mecanismo exacto de la regulación del pH, pero se especula que por la descarboxilación intracelular de estos aminoácidos y el concomitante consumo de protones se mantiene el pH intracelular (Jordan *et. al.*, 1999).

También se ha demostrado que cuando *E. coli* crece a niveles altos de NaCl se induce un incremento en la termotolerancia y resistencia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hengge-Aronis *et. al.*, 1993). Puede además, sobrevivir con mínimas cantidades de humedad, particularmente, a temperaturas de refrigeración (Bagi y Buchanan, 1993). En los alimentos, como salchicha, sidra y jugo de manzana su sobrevivencia aumenta cuando se almacenan a temperaturas de refrigeración (Nestles y Siragusa, 1994; Lin *et. al.*, 1996).

#### **I.4 MECANISMO DE TRANSMISIÓN**

En un porcentaje importante de casos de *E. coli* O157:H7 no se ha identificado el origen, pero se ha confirmado la asociación con el consumo de alimentos (Steele *et. al.*, 1982; Spika *et. al.*, 1986; Carter *et. al.*, 1987; Morgan *et. al.*, 1993). Además se puede considerar la transmisión de persona a persona (Pai *et. al.*, 1988; Bryant *et. al.*, 1989; Griffin y Tauxe, 1991; Belongia *et. al.*, 1993; O'Brien *et. al.*, 1993; Rowe *et. al.*, 1993; Parry *et. al.*, 1998) o de animal a persona (Wilson *et. al.*, 1996; Chinen *et. al.*, 2001).

#### **I.5 RESERVORIOS**

Se han identificado varios reservorios y fuentes de *E. coli* O157:H7 entre los que se encuentran: la asociación de este microorganismo con carne molida mal cocinada, leche cruda (Cutter y Siragusa, 1994), leche mal pasteurizada, heces de ganado sano (Martín *et. al.*, 1986; Johnson *et. al.*, 1995; Uhtil *et. al.*, 2001), pollos (Beery *et. al.*, 1985), cerdos (Doyle y Shoeni, 1987; Rios *et. al.*, 1999), venados (Keene *et. al.*, 1997), ovejas (Kudva *et. al.*, 1996), los

alimentos derivados de estos animales (Abdul-Raouf *et. al.*, 1993), agua para beber y para uso recreativo (Faith *et. al.*, 1996; Keene *et. al.*, 1994).

## **I.6 ALIMENTOS**

Dentro de los alimentos involucrados en casos y brotes causados por *E. coli* O157:H7 está la carne molida (Pai *et. al.*, 1988; Griffin y Tauxe, 1991; Le Saux *et. al.*, 1993) insuficientemente cocida y sin alteración visual (Knight, 1993; Blanco *et. al.*, 1995), asociada a la mayoría de los brotes por lo que a la afección se le denomina “ la enfermedad de las hamburguesas ”.

En 1980 se produjo un brote de SUH en donde el jugo de manzana fresco fue el alimento involucrado (Steele *et. al.*, 1982). El jugo y la sidra de manzana mal pasteurizados han causado brotes locales y multiestatales (Besser *et. al.*, 1993). Se demostró que, en el salami crudo curado en seco este microorganismo puede sobrevivir a la fermentación aún en bajas concentraciones celulares (Tilden *et. al.*, 1996). El consumo de leche cruda también puede producir SUH (CDC, 1996).

Otros alimentos como: lechuga, papas, rábanos, germinado de alfalfa, productos fertilizados con estiércol, yogurt, emparedados, agua y quesos se han visto involucrados como vehículo en la transmisión de esta bacteria (Steele *et. al.*, 1982; Spika *et. al.*, 1986; Carter *et. al.*, 1987; Morgan *et. al.*, 1993).

El origen, las características físicas y estructurales, la composición química, el uso de fertilizantes orgánicos, el tipo de agua de riego, así como, la manipulación post-cosecha de las hortalizas son determinantes en su contenido cualitativo y cuantitativo de este microorganismo. Las hortalizas contienen en cantidades reducidas proteínas y lípidos, sus principales componentes son el agua, fibra, almidones, algunas vitaminas y minerales. En la dieta humana estos alimentos tienen un importante papel como fuente de nutrientes y en el adecuado funcionamiento del aparato digestivo. Son productos semiperecederos y susceptibles de deterioro microbiano, por lo anterior podrían considerarse potencialmente contaminadas por microorganismos patógenos (Frazier y Westhoff, 1993).

Productos como el pescado y los mariscos, son considerados alimentos proteicos básicos en la mayor parte del mundo seguidos de la carne de mamíferos y aves. El mejoramiento de procesos como la congelación y el enlatado, han permitido aumentar la vida de anaquel del pescado y sus derivados, de esta manera los productos marinos pueden consumirse en cualquier parte del mundo garantizándose al consumidor la calidad sanitaria de dichos alimentos.(Fapohunda *et. al.*, 1994).

El músculo del pescado fresco es un excelente substrato para el desarrollo microbiano debido a su gran actividad de agua, pH neutro y altos niveles de nutrientes solubles. La alteración del pescado se describe corrientemente como un proceso “proteolítico”. En cambio, el deterioro de los moluscos implica la degradación del glucógeno con el consiguiente descenso del pH a medida que se acumula el ácido. Bajo los aspectos nutritivo y bioquímico las bacterias del pescado y mariscos frescos se describen más como proteolíticas que como sacarolíticas (CIEMA,1980).

## **I.7 PATOGENIA**

### **I.7.1 DOSIS**

La dosis infectiva relacionada con enfermedades transmitidas por alimentos contaminados con *E. coli* O157:H7 no ha sido a la fecha definida (Buchanan y Edelson, 1996). Una explicación hipotética de la baja dosis infectiva que puede ser desde 1 hasta 100 UFC (Paton y Paton, 1998) de este microorganismo es su capacidad para sobrevivir en las condiciones ácidas del estómago (Arnold y Kaspar, 1995; Benjamín y Datta, 1995; Conner y Kotrola, 1995).

### **I.7.2 PERIODO DE INCUBACIÓN Y SINTOMATOLOGÍA**

*Escherichia coli* O157:H7 puede producir un amplio espectro de enfermedades que van desde una fase asintomática y una diarrea sin complicaciones, hasta colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y la muerte (Gransden *et. al.*, 1986; Ryan *et. al.*, 1986; Carter *et. al.*, 1987; Pai *et. al.*, 1988).

La sintomatología de la enfermedad producida por esta bacteria se inicia generalmente de 1 a 2 días después de haber ingerido el alimento contaminado; aunque, existen reportes sobre periodos de 3 a 5 días (Wells *et. al.*, 1983).

Los síntomas se inician con diarrea sin sangre, seguida por contracciones abdominales con dolor y niveles cortos de fiebre, la diarrea inicial incrementa su intensidad durante las próximas 24 a 48 horas, para iniciar una fase de 4 a 10 días, con abundante sangre, acompañada por fuertes dolores abdominales y deshidratación moderada (Padhye y Doyle, 1992; Boyce *et. al.*, 1995). La enfermedad es normalmente autolimitante (Pai *et. al.*, 1988).

En el síndrome urémico hemolítico, causado por *E. coli* O157:H7, la lesión del endotelio capilar y arteriolar en el riñón da lugar a un fenómeno de coagulación localizada, la anemia microangiopática se debe a la lesión de los hematíes cuando atraviesan los vasos alterados. La trombocitopenia, se debe a la adherencia y lesión de las plaquetas a nivel intrarenal, este síndrome es más frecuente en niños menores de 4 años de edad (Behrman, 1992; Mead y Griffin, 1998).

El síndrome urémico hemolítico también incluye: ataques, coma, apoplejía, perforación del colón, pancreatitis e hipertensión. Aproximadamente el 15% de los casos presentan una evolución temprana de daño renal crónico, un pequeño número de ellos con síndrome urémico hemolítico pueden ser recurrentes (Siegler *et. al.*, 1993).

En las personas que solo sufren de diarrea, la recuperación es en general completa; sin embargo, después de algunos años, cerca de la tercera parte de los enfermos pueden sufrir colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico. El 8% de las personas con síndrome urémico hemolítico tienen otras complicaciones de por vida, tales como elevación de la presión sanguínea, ceguera, parálisis y los efectos de tener una parte del intestino dañada (CDC, 1996).

La infección por *E. coli* O157:H7 es asociada con la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT), esta condición se parece al síndrome urémico hemolítico que causa mayor daño renal; provoca importantes daños neurológicos, el deterioro del sistema nervioso

central y apoplejía. Estos síntomas se presentan principalmente en adultos. A medida que la enfermedad progresa el cerebro y los riñones resultan cada vez más afectados y su disfunción es la causa final de la muerte (Boyce *et. al.*, 1995).

### **I.7.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD**

Las toxinas shiga de *E. coli* están formadas por una subunidad A (32 kDa) que tiene una actividad de RNA-glicohidrolasa y 5 subunidades B (7.7 kDa cada una) responsables de enlazar la toxina con su receptor Gb<sub>3</sub> (globotriaocilceramida; Gal $\alpha$ [1→4]Gal $\beta$ [1→4]Glc-ceramida), excepto para la variante Stx 2e cuyo receptor es preferentemente el Gb<sub>4</sub> (glotetraocilceramida; GalNAc $\beta$ [1→3]Gal $\alpha$ [1→4]Gal $\beta$ [1→4]Glc-ceramida) (Stein *et. al.*, 1992).

Altos niveles de Gb<sub>3</sub> se pueden encontrar en células endoteliales que están presentes en el colon, el sistema nervioso central, el páncreas, la microvasculatura del glomérulo renal y células del tejido renal (Schmidt *et. al.*, 1995).

Las toxinas una vez unidas a su receptor son introducidas a la célula por endocitosis. En algunas células las vesículas que contienen la toxina se unen a lisosomas que degradan la toxina, pero en aquellas células sensibles, las toxinas son transportadas al aparato de Golgi, llevadas al interior del retículo endoplásmico y posteriormente llegan al citoplasma. Durante este proceso, la subunidad A es cortada por una proteasa, generando un fragmento A<sub>1</sub>(27 kDa N-terminal) con actividad catalítica y un fragmento A<sub>2</sub> (4 kDa C-terminal), las cuales permanecen unidas por un puente disulfuro, al romperse este puente disulfuro se activa el componente A<sub>1</sub>.(Lea *et. al.*, 1999).

El fragmento A<sub>1</sub> tiene actividad de una RNA N-glicosidasa y se une específicamente al enlace N-glicosídico del rRNA 28S, interfiriendo con la unión del aminoacil-tRNA de la subunidad 60S ribosomal, al actuar sobre el factor de elongación 1 se inhibe el paso de la elongación de la cadena peptídica de la síntesis de proteínas y por último causa la muerte de la célula (Hurley *et al.*, 1999).

## I.7.4 BROTOS

Desde que en 1982 *Escherichia coli* O157:H7 fue reconocida por primera vez como un patógeno humano, desde entonces numerosos brotes y casos aislados han ocurrido en varios países del mundo (cuadro 1) (Riley *et. al.*,1983).

Cuadro 1. Brotes asociados con *Escherichia coli* O157:H7 por el consumo de alimentos

Año	Lugar	Alimento involucrado	Número de enfermos	Número de muertes	Referencia
1982	Oregon	Hamburguesas poco cocidas	26	-	Riley <i>et. al.</i> , 1983
1982	Michigan		21	-	
1984	Nebraska	Carne molida	-	-	Rowe <i>et. al.</i> , 1993
1986	Wisconsin	Leche bronca	-	-	Martín <i>et. al.</i> , 1986
1986	Alberta	Carne molida	Ocurrieron tres brotes		Griffin <i>et. al.</i> , 1988
1987	Utah	Carne molida	-	-	Pavia <i>et. al.</i> , 1990
1987	Ontario	Emparedados	128	38	Carter <i>et. al.</i> , 1987
1988	Minnesota	Hamburguesas	32	-	Belongia <i>et. al.</i> , 1993
1989	Missouri	Agua no clorada	243	4	Armstrong <i>et. al.</i> , 1996
1990	Saitama, Japón	Agua para beber	366	2	Hamano <i>et. al.</i> , 1993
1990	Alberta	Carne molida	-	-	Griffin <i>et. al.</i> , 1988
1991	Canadá	Persona-a-persona	15	-	Rowe <i>et. al.</i> , 1994
1991	Oregon	Agua de alberca	21	-	Keene <i>et. al.</i> , 1994
	Missouri	Agua para beber	243	4	Swerdlow <i>et. al.</i> , 1992
	Massachussets	Sidra	4	-	Besser <i>et. al.</i> , 1993

Año	Lugar	Alimento involucrado	Número de enfermos	Número de muertes	Referencia
1992 1993	Washington, Idaho, Nevada y California	Hamburguesas	732	4	CDC, 1993
1993	Oregon	Hamburguesas	40-50	-	Zhao y Doyle, 1994
1993	Área de Seattle-Tacoma, Washington	Hamburguesas	477	-	O'Brien <i>et. al.</i> , 1993
1994	Egipto	Hamburguesas y productos lácteos	-	-	WHO, 1997
1994	Washington California	Salami curado en seco	17	-	Tilden <i>et. al.</i> , 1996
1995	Oregon	Carne de venado	11	-	Keene <i>et. al.</i> , 1997
1996	Kyoto, Japón	Germinado de rábano	3328	-	Watanabe <i>et. al.</i> , 1999
1996	Sakai, Japón		6000	12	NIIDICD, 1997
1997	Yokohama y Gamamori, Japón		126	-	Itoh <i>et. al.</i> , 1998
1997	Estados Unidos	Semillas de alfalfa	85	-	Taormina <i>et. al.</i> , 2001
1998	Estados Unidos	Semillas y/o germinado de alfalfa y trébol	8	-	Taormina <i>et. al.</i> , 2001
1999	Ciudades de Estados Unidos (ocurrieron 37 brotes)	Sidra de manzana, carne molida, tacos dorados, lechuga romana, hamburguesas, ensalada de verduras con mayonesa, carne asada y algunos desconocidos	1897	4	CDC, 2001
2000	Estados Unidos	Diversos alimentos	249	-	CDC, 2002
2001	Estados Unidos	Diversos alimentos	3294	-	CDC, 2003

## **I.8 FACTORES DE VIRULENCIA**

### **I.8.1 TOXINAS SHIGA**

Las toxinas shiga-like (Stx) son el principal factor de patogenicidad de *Escherichia coli* O157:H7. Las Stx de *E. coli* son una familia de proteínas son citotóxicas para células eucarióticas que expresan el glicolípido receptor globotrioacilceramida (Gb<sub>3</sub>) (Schmidt *et al.*, 1999; Fagan *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 2000). La capacidad para producir toxinas shiga-like fue adquirida a partir de bacteriófagos, presumiblemente directa o indirectamente de *Shigella* (Buchanan y Doyle, 1997).

Los miembros de la familia de las Stx de *E. coli* comparten características genéticas, estructurales y funcionales, y están formadas por las Stx1, Stx2 y variantes de Stx2. La Stx1 es semejante a la Stx de *Shigella dysenteriae* serotipo 1, comparte en forma idéntica solo el 56% con la secuencia de aminoácidos de la Stx2 y el 62% con la Stx 2e, siendo Stx2 y Stx 2e diferentes inmunológicamente a Stx1. Además, las Stx 1 y Stx 2 no son neutralizadas con los antisueros heterólogos (Stein *et al.*, 1992; Hurley *et al.*, 1999).

### **I.8.2 ADHERENCIA**

*E. coli* O157:H7 es capaz de producir lesiones de anclaje y esfacelamiento (A/E) en cultivos de células epiteliales y en el intestino de animales inoculados experimentalmente. El proceso de adherencia y esfacelamiento consiste en la unión íntima de la bacteria con su correspondiente receptor en las células epiteliales, posteriormente hay una destrucción de las microvelocidades y un reordenamiento del citoesqueleto de actina en las células huésped. Un factor muy importante que participa en la adherencia de esta bacteria a células epiteliales *in vitro* y la colonización de animales inoculados experimentalmente es la proteína de membrana externa (PME) intimina (94 a 97 kDa) la cual está codificada en el gene *eae* (Gansheroff *et al.*, 1999).

Un estudio reciente muestra que existe la acumulación de actina en el citoplasma apical de células intestinales, localizándose en el área del ataque bacteriano, correspondiente a la lesión A/E (Toth *et al.*, 1990).

Se ha demostrado que la intimina secretada por *Escherichia coli* O157:H7 es capaz de mediar la unión de dicha bacteria a las células Hep-2 cuando es expresada en forma endógena (como proteína nativa) o exógena (como una proteína purificada) (McKee y O'Brien, 1995).

### **I.8.3 INVASIVIDAD**

En reportes sobre la invasividad de esta bacteria en células Hep-2 (carcinoma de laringe humana), intestino 407 (células de intestino fetal humano) (Sherman *et. al.*, 1987) y HCT-8 (células ileocecales humanas) (McKee y O'Brien, 1995), los investigadores concluyen al finalizar su trabajo que este microorganismo puede adherirse pero es incapaz de invadir las células de estas tres líneas celulares.

### **I.8.4 HEMOLISINA**

Las hemolisinas han sido descritas como un importante factor de virulencia en bacterias causantes de infecciones gastrointestinales, sus células blanco pueden ser linfocitos, granulocitos, monocitos, células endoteliales, eritrocitos y células del epitelio renal de ratón, rumiantes y primates (Schmidt *et. al.*, 1995).

El plásmido de 60 MDa (pO157) comúnmente encontrado en las cepas de O157:H7 contiene los genes que codifican para la hemolisina o enterohemolisina. La enterohemolisina se encuentra en casi todas las cepas de O157:H7 y está ampliamente distribuida entre las cepas de *E. coli* no-O157:H7 productoras de shiga-like toxinas. La hemolisina es producida como una protoxina inactiva que es activada intracelularmente por la proteína HlyC sintetizada al mismo tiempo que la protoxina (Stanley *et. al.*, 1994; Gyles *et. al.*, 1998). Además para la secreción de la hemolisina se requiere de las proteínas llamadas Hly B, Hly D y Tol C (Wandersman y Delepelaire, 1990).

Los monómeros de la hemolisina actúan combinándose con la membrana de las células eucarióticas para formar poros a través de los cuales es liberada la hemoglobina (Menestrina *et. al.*, 1994; Stanley *et. al.*, 1998).

## **I.9 ANTIBIÓTICOS**

El uso de antibióticos para el tratamiento de infecciones por *Escherichia coli* O157:H7 puede ser nocivo por dos razones: primero, porque la lisis de las bacterias por algunos antibióticos puede incrementar la liberación de toxinas, al menos *in vitro*; segundo, la terapia con antibióticos puede matar otras bacterias intracolónicas de ese modo se incrementa la absorción sistémica de las toxinas.

El uso de agentes antimovilidad como la loperamida definitivamente están prohibidos, ya que existen evidencias de que el uso de estos agentes pueden incrementar el riesgo de SUH, posiblemente porque al disminuir el movimiento del intestino incrementa la absorción del intestino (Nataro y Kaper, 1998).

## II. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades infecciosas del tracto gastrointestinal son un serio problema de salud pública, siendo de gran importancia aquellas que son transmitidas por el consumo de alimentos contaminados.

Desde 1982 *Escherichia coli* O157:H7 ha sido reconocido como un importante agente etiológico de enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos, con un alto índice de morbilidad y mortalidad. Este microorganismo tiene diversos factores de virulencia entre los que se encuentran las toxinas shiga-like, la hemolisina, la intimina y otros.

En México no existen publicaciones sobre el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en pacientes, sin embargo, si existen informes de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico de etiología desconocida, por lo que es de suma importancia conocer si este microorganismo se encuentra en nuestro país y si sus características fenotípicas están relacionadas con las cepas aisladas en otros países.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia de algunos factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* O157:H7 aisladas de alimentos.

### **III.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- ÿ Evidenciar la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en hortalizas recolectadas en la Central de Abastos del Distrito Federal.
- ÿ Aislar a *Escherichia coli* O157:H7 de productos de la pesca (ostiones y pescados).
- ÿ Estimar la presencia de la hemolisina como factor de virulencia.
- ÿ Evaluar el efecto citotóxico de las cepas aisladas de *Escherichia coli* O157:H7 en las líneas celulares VERO y MA-104.
- ÿ Valorar la capacidad de las cepas aisladas de adherirse e invadir células Hep-2.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **IV.1 CRITERIO DE SELECCIÓN**

#### **IV.1.1 PRODUCTOS DE LA PESCA**

Los pescados y ostiones se transportaron en bolsas de plástico selladas y etiquetadas de manera individual para evitar que se contaminaran. Las muestras se colocaron en hieleras con capas de hielo seco. El tiempo entre la recolección y el análisis fue entre 20 y 30 horas.

Los ostiones se lavaron con un cepillo y abundante agua para eliminar el lodo, algas y almejas, posteriormente se desconcharon en condiciones asépticas. Al pescado se le eliminaron las vísceras, la cabeza a la altura de las branquias y la cola. En el caso de los ostiones las muestras se conformaron entre 20 a 30 ejemplares, en lo que se refiere al pescado el número de animales fue de 5 a 10 de diversas especies como se señala en el cuadro 2.

#### **IV.1.2 HORTALIZAS**

Las muestras se adquirieron en las naves mayores de la Central de Abastos de la Ciudad de México. Cada muestra con un peso entre 1 y 4 kilogramos que se colocaron en bolsas de plástico selladas y etiquetadas de manera individual para evitar su contaminación. El tiempo entre la recolección y el análisis fue de 3 a 4 horas. Los nombres científico y común de las hortalizas seleccionadas se indican en el cuadro 3.

### **IV.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO**

La metodología utilizada para el análisis microbiológico en la determinación de la presencia de coliformes fecales y la de *E. coli* O157:H7, fue la recomendada por el Manual de Bacteriología Analítica de la Administración de Alimentos y Medicamentos (Hitchins *et. al.*, 1992).

De cada homogeneizado de ostión y pescado se pesaron 25 g y se colocaron en 225 mL de agua peptonada amortiguada para tener una dilución  $10^{-1}$ .

Cuadro 2. Nombres científico y común de los productos de la pesca seleccionadas.

NOMBRE COMÚN	NOMBER CIENTÍFICO
Bagre	<i>Ariidae Cathorops melanopus</i>
Aguja	<i>Belonidae Strongylura marina</i>
Lenguado	<i>Bothidae Citharichthis spilopterus</i>
Robalo	<i>Centropomidae Centropomus undecimalis</i>
Tilapia	<i>Cichlidae Tilapia sp.</i>
Lacha	<i>Clupeidae Dorosoma anale</i>
Charal	<i>Engraulidae Anchoa mitchilli</i>
Chile	<i>Gobiidae Gobionellus hastatus</i>
Lisa	<i>Mugilidae Mugil cephalus</i>
Lebrancha	<i>Mugilidae Mugil curema</i>
Coruina	<i>Sciaenidae Bairdiella chrysoura</i>
Mojarra	<i>Sparidae Algodón romboides</i>
Ostión	<i>Crassostrea virginica</i>

En el caso de las hortalizas se tomaron 50 gramos que se pesaron en condiciones asépticas depositándose en una bolsa de plástico, y se lavaron por frotación con 450 mL de agua peptonada amortiguada para tener la dilución  $10^{-1}$ .

Cuadro 3. Nombres científico y común de las hortalizas analizadas

NOMBRE COMÚN	NOMBER CIENTÍFICO
APIO	<i>Apium graveolus</i> variedad Dulce (L)
BROCOLI	<i>Brassica oleracea</i> variedad Italica (L)
CILANTRO	<i>Coriandrum satirum</i> (L)
ESPINACA	<i>Spinacea oleracea</i> (L)
LECHUGA	<i>Lactuca sativa</i> (L)
PEREJIL	<i>Petroselinum hortence</i> (H)
PÁPALO QUELITE	<i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq)
VERDOLAGA	<i>Portulaca oleracea</i> (L)

#### IV.2.1 NÚMERO MÁS PROBABLE DE ORGANISMOS COLIFORMES FECALES (OCF)

##### IV.2.1.1 PRUEBA PRESUNTIVA

1. A partir de la dilución  $10^{-1}$  se realizaron las diluciones decimales  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Se utilizó la serie 3:3:3.
2. Se inoculó 1 mL de cada dilución a cada uno de los 3 tubos con caldo lauril sulfato triptosa.
3. Se tomaron las lecturas a las  $24 \pm 2$  horas en los tubos y se observó si hubo producción de gas en la campana de Durham, de ser negativa la incubación se continuó hasta las  $48 \pm 2$  horas.

#### **IV.2.1.2 PRUEBA CONFIRMATORIA**

1. Se agitaron suavemente los tubos con caldo lauril sulfato triptosa que resultaron positivos.
2. Se transfirieron de dos a tres asadas de cada tubo a tubos con caldo *Escherichia coli*. Se incubaron a  $44.5 \pm 0.2$  °C en baño de agua de 24 o 48 horas  $\pm 2$ .
3. La producción de gas en cualquier cantidad, dentro de las 48 horas de incubación, hizo la prueba positiva.

#### **IV.2.2 IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI O157:H7 (Hitchins *et. al.*, 1992).**

1. De cada tubo con caldo *EC* positivo (que se presentó crecimiento y producción de gas) se sembró una asada por estría cruzada en placas con medio de agar MacConkey sorbitol (Farmer y Davis, 1985) y se incubó a 37°C durante 24 horas.
2. Se seleccionaron cinco colonias características (circulares, de 1 a 2 mm de diámetro, húmedas, brillantes, convexas, con bordes enteros, ambarinas y no fermentadoras del sorbitol), se sembraron en tubos que contenían caldo infusión cerebro corazón (BHI), y se incubaron de 8 a 12 horas a 37°C (March y Ratman, 1986).
3. A cada UFC seleccionada se le realizó la tinción de Gram para verificar las características microscópicas y la pureza del cultivo (Bacilos Gram negativo).
4. Cada colonia crecida en BHI se sembró en agar indol movilidad ornitina (MIO), triple azúcar hierro (TSI), citrato de Simmons, caldo manitol, caldo urea, caldo glucosado para las pruebas de rojo de metilo y Voges Proskauer. Se incubaron a 37 °C/ 18-24 horas, se tomaron las lecturas de las pruebas bioquímicas de cada cepa.
5. A los aislados confirmados mediante pruebas bioquímicas como *E. coli* se les realizó las pruebas de aglutinación, las cuales se hizo por triplicado con el suero monovalente O157. Cada una de las colonias se resuspendió en una solución de NaCl al 0.85% que contenía formalina al 0.5% (v/v).

6. Para el antígeno H7, se sembraron los aislados en agar base sangre y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Transcurrido el tiempo cada colonia se sembró en dos tubos con agar movilidad, añadiendo a uno de ellos una gota del suero H7, se incubó a 35-37°C durante 24 horas. Las cepas que presentaron movilidad en el tubo al que no se le agregó el suero y que no se observó movilidad en el tubo al que se le agregó el suero, se consideraron O157:H7.

#### **IV.2.3 OBTENCIÓN DE LAS TOXINAS**

1. Se sembraron las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 en caldo soya tripticaseina y se incubaron a 37°C/18 horas/ con agitación (150rpm). Se centrifugaron a 2500 x g/ 20 min/ 4 °C.
2. El sobrenadante se filtró con un filtro de membrana de 0.22 µm de diámetro y se almacenó a -20 °C (Pruimboom-Brees *et al.*, 2000).

#### **IV.2.4 ANÁLISIS DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES**

1. A las microplacas de 96 pozos con el 100% de confluencia de la monocapa de células VERO (células de riñón de mono verde africano) y MA-104 (células de riñón de mono *Rhesus*) se les lavó 3 veces con PBS estéril (en condiciones de esterilidad), desechándose el último lavado.
2. En cada pozo de la microplaca se colocaron 80 µL de medio MEM + 20 µL de la toxina, esto se realizó por triplicado. Se dejaron 3 pozos con 100 µL de MEM y 3 pozos con 80 µL de medio MEM + 20 µL de caldo soya tripticaseina.
3. Se incubaron las microplacas durante 72 horas/37 °C/5% de CO<sub>2</sub>.
4. Posteriormente se eliminó el medio, se lavó 3 veces con PBS estéril, se fijaron las células con metanol durante 1 minuto.
5. Se lavó 3 veces con PBS estéril, se tiñó con Giemsa durante 20 minutos, se lavaron los pozos con agua destilada hasta que el agua saliera sin colorante.

6. Se observó en el microscopio invertido el efecto citopático que causan las toxinas en las células VERO y MA-104.

#### **IV.2.5 ANÁLISIS DE ADHERENCIA EN LA LÍNEA CELULAR HEP-2**

##### **IV.2.5.1 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS**

1. Se sembró una asada de cada cultivo en tubos con 3 mL de caldo triptona con manosa al 1%, se incubó a 37 °C/ 18 horas/ 100 rpm. Se centrifugaron a 2500 rpm/ 20 min/ 4 °C.
2. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de PBS estéril. Esta es la suspensión bacteriana que se utilizó para el ensayo.

##### **IV.2.5.2 PREPARACIÓN DE LA MICROPLACA**

1. Las microplacas de 24 pozos con el 100% de confluencia de la monocapa de células Hep-2 (células cáncer laríngeo humano), crecidas sobre un cubreobjetos estéril. Fueron lavados 3 veces con PBS estéril y se eliminó el último lavado.
2. Se colocó en cada pozo 975 µL de medio MEM + 25 µL de la suspensión bacteriana.
3. Se incubó la microplaca a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>/ 3 horas.
4. Se eliminó el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.
5. Se fijaron las células con metanol durante 1 minuto.
6. Se lavó 3 veces con PBS estéril.
7. Se tiñó con Giemsa durante 20 minutos y se lavaron los pozos con agua destilada hasta que el agua saliera sin colorante.
8. Se deshidrataron las preparaciones colocándolas 1 min en acetona, 1 min en acetona-xilol (1:1) y 1 min en xilol. Se montaron las preparaciones en portaobjetos con una gota de resina de Permount.
9. Se observó al microscopio con en el objetivo de inmersión (100x).

## **IV.2.6 ANÁLISIS DE INVASIVIDAD EN LA LÍNEA CELULAR HEP-2**

### **IV.2.6.1 PREPARACIÓN DE LOS CULTIVOS**

1. Se sembró una asada de cada cultivo en tubos con 3 mL de caldo triptona con manosa al 1%, se incubaron a 37 °C/ 18 horas/ 100 rpm. Luego se centrifugaron a 2500 rpm/ 20 min / 4 °C.
2. Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de PBS estéril.

### **IV.2.6.2 PREPARACIÓN DE LA MICROPLACA**

1. Las microplacas de 24 pozos con el 100% de confluencia de la monocapa de células Hep-2 (células cáncer laringeo humano), crecidas sobre un cubreobjetos estéril. Fueron lavados 3 veces con PBS estéril y se eliminó el último lavado.
2. Se colocó en cada pozo 975 µL de medio MEM + 25 µL de la suspensión bacteriana.
3. Se incubó la microplaca a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>/ 3 horas.
4. Posteriormente se eliminó el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.
5. Se colocó en cada pozo 1000 µL de medio MEM + Gentamicina (90 µg/mL) + Lizosima (300 µg/mL).
6. Se incubó la microplaca a 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>/ 3 horas.
7. Se eliminó el medio con una pipeta Pasteur, se lavó 3 veces con PBS estéril.
8. Se fijaron las células con metanol durante 1 minuto.
9. Se lavó 3 veces con PBS estéril.
10. Se tiñó con Giemsa durante 20 minutos y se lavaron los pozos con agua destilada hasta que el agua saliera sin colorante.

11. Se deshidrataron las preparaciones colocándolas 1 min en acetona, 1 min en acetona-xilol (1:1) y 1 min en xilol. Se montaron las preparaciones en portaobjetos con una gota de resina de Permout.
12. Se observó al microscopio con en el objetivo de inmersión (100x).

#### **IV.2.7 ANÁLISIS DE HEMOLISINA**

1. Se sembró cada una de las cepas en caldo BHI y se incubó a 37°C durante 24 horas.
2. Se tomó una asada de cada cepa y se sembró en placas de agar sangre con eritrocitos de carnero al 5 %, se incubó a 37°C durante 24 horas. Se observó la producción de un halo de hemólisis.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 357 muestras analizadas el 5.88 % fueron positivas para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7, de estas un 33% correspondieron a productos de la pesca y el 67 % a hortalizas.

De las hortalizas, en cilantro y espinaca se tuvo el 21.42 % de positividad en ambos casos; el 7.14% en lechuga, en perejil de 14.28% y para las muestras de verdolagas el 35.74%; en apio, brócoli y pápalo quelite no fue posible aislar a *Escherichia coli* O157:H7 (cuadro 3).

Cuadro 4. Muestra positivas de hortalizas para *Escherichia coli* O157:H7

HORTALIZA	Muestras analizadas	Muestras positivas
<i>Apio</i>	10	0
<i>Brócoli</i>	10	0
<i>Cilantro</i>	30	3
<i>Espinaca</i>	20	3
<i>Lechuga</i>	30	1
<i>Pápalo quelite</i>	10	0
<i>Perejil</i>	20	2
<i>Verdolaga</i>	20	5
<b>TOTAL</b>	<b>150</b>	<b>14</b>

Nuestros resultado concuerdan con los encontrados por Papavassiliou, *et al.*, 1967 y Garcia-Villanova, *et al.*, 1987, quienes determinaron la presencia de patógenos y coliformes fecales en estos tipos de productos alimenticios. Lo que indica una importante contaminación,

ya sea, desde el cultivo, manejo, almacenamiento y comercialización (Rosa, *et al.*, 1984.) de estos vegetales.

La contaminación de los productos hortícola por microorganismos patógenos puede ser durante su cultivo, durante cosecha y en cualquier punto de su comercialización. Diversas son las fuentes de contaminación que pueden aumentar el número de microorganismos que de origen contengan estos alimentos, entre ellas está el agua de riego sobre todo si se utilizan aguas residuales, el suelo, fertilización con abono orgánico, el aire y las personas que cuidan de las tierras de cultivo. En la poscosecha destaca la maquinaria, el equipo, los recipientes, los animales domésticos y silvestres, los trabajadores, el polvo de la atmósfera y los vehículos (Frazier y Westhoff, 1993).

Algunos autores han demostrado que la sobrevivencia de los organismos coliformes y patógenos entéricos en diversos vegetales crudos, depende en parte de la humedad y la temperatura del medio donde se encuentre el producto. En algunos casos, el tiempo de sobrevivencia de estos organismos se extiende más allá de la vida media útil del producto y puede inclusive haber incrementado de la población bacteriana (Gelreich y Bordner, 1971; Nichols et al, 1971; Konowalchuk y Speirs, 1975).

Una práctica común durante la comercialización de hortalizas es proporcionar un aspecto de frescura al rociarles agua, esta acción les añade microorganismos tanto del manipulador como del agua que en ocasiones es de dudosa procedencia y que por supuesto si es potable después de un tiempo deja de serlo.

De las hortalizas analizadas en la verdolaga se obtuvo el 47.37 % de cepas de *Escherichia coli* O157:H7, en espinaca el 21 %, en cilantro el 15.79 %, en perejil el 10.53 % y en lechuga el 5.31 % (cuadro 4).

La mayoría de las hortalizas que se comercializan, albergan un número alto de bacterias gramnegativas fermentadoras de la lactosa del tipo coliforme, su recuento carece de importancia sanitaria, ya que *Enterobacter*, habitualmente esta asociado con la vegetación; pero cuando los cultivos se riegan con aguas residuales y fertilizan con abonos orgánicos, de

origen animal, el número de *E. coli* es alto, teniendo por lo tanto su presencia una importancia real desde el punto de vista de salud pública, considerando que el hábitat natural de *E. coli* es el tracto intestinal de los animales de sangre caliente. (Splittstoesser, 1983).

Cuadro 5. Unidades Formadoras de Colonias identificadas como *Escherichia coli* O157:H7

<b>Hortaliza</b>	<b>Número de Unidades Formadoras de Colonias</b>		
	<b>Analizadas</b>	<b>Presuntivas <i>Escherichia coli</i></b>	<b>Confirmadas <i>Escherichia coli</i> O157:H7</b>
<i>Apio</i>	50	4	0
<i>Brócoli</i>	50	3	0
<i>Cilantro</i>	150	15	3
<i>Espinaca</i>	100	9	4
<i>Lechuga</i>	150	13	1
<i>Pápalo quelite</i>	50	8	0
<i>Perejil</i>	100	8	2
<i>Verdolaga</i>	100	12	9
<b>TOTAL</b>	<b>750</b>	<b>72</b>	<b>19</b>

El agua de uso agrícola puede contaminarse directa o indirectamente si no se evacúan de forma adecuada las heces procedentes de los seres humanos y/o animales, la contaminación por materia fecal puede ocurrir debido a las descargas procedentes de plantas de tratamiento de agua. Entre las fuentes de contaminación que pueden existir sobre el terreno por materia fecal procedente de animales se encuentra el pastoreo en áreas de cultivo, el almacenamiento

de estiércol al lado de las tierras de labranza, fugas o reboses en los estanques de estiércol, el acceso no restringido del ganado a las aguas superficiales, pozos o zonas de bombeo, y la existencia de altas concentraciones de fauna silvestre (FDA; USDA y CDC, 1998).

Existen reportes en los que *Escherichia coli* O157:H7 sobrevive por más de un año en pilas de heces de vaca expuestas a las condiciones ambientales (Wang *et. al.*, 1996), corroborando de esta manera que el estiércol procedente de animales portadores de este microorganismo es la fuente primaria de contaminación de las hortalizas y productos alimenticios en los países donde no se procesa adecuadamente (Kudva *et. al.*,1998), o se utiliza como abono.

Las verdolagas y espinacas se consumen cocidas pero pueden ser una fuente de *Escherichia coli* O157:H7 mediante una contaminación cruzada cuando los utensilios que estén en contacto con estas hortalizas crudas se utilizan con otros alimentos si no se tiene una buena higiene después de cada uso, así como, de evitar el contacto de las hortalizas crudas con otros alimentos u hortalizas ya desinfectadas o cocinadas

Por otra parte el que *Escherichia coli* O157:H7 esté presente en productos que se consumen crudos como cilantro, perejil y lechuga, muchas veces sin un proceso de desinfección previo o solo enjuagándolas con agua antes de ser consumidas, son un riesgo potencial. Además de que por contaminación cruzada pueden llegar a otros alimentos o utensilios aumentando así el riesgo de los comensales.

También puede haber variación de la carga microbiana dependiendo de la tierra que permanezca adherida al vegetal en el momento de la comercialización y el consumo (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos, 1985), aunado a las los deficientes y hasta nulos procedimientos de desinfección, hacen por lo tanto a estos productos hortícolas probablemente uno de los vehículos más importantes de enfermedades (Organización Panamericana de la Salud 1993)

Existen reportes que indican que *Escherichia coli* O157:H7 es capaz de penetrar en la raíz de plantas maduras de lechuga y ser transportada a sitios dentro de las porciones comestibles de la planta. Las plantas de lechuga que crecen en suelos que han sido fertilizados con estiércol contaminado o irrigadas con agua contaminada con esta bacteria pueden producir contaminación de las partes comestibles de las plantas de lechuga (Solomon *et al.*,2002).

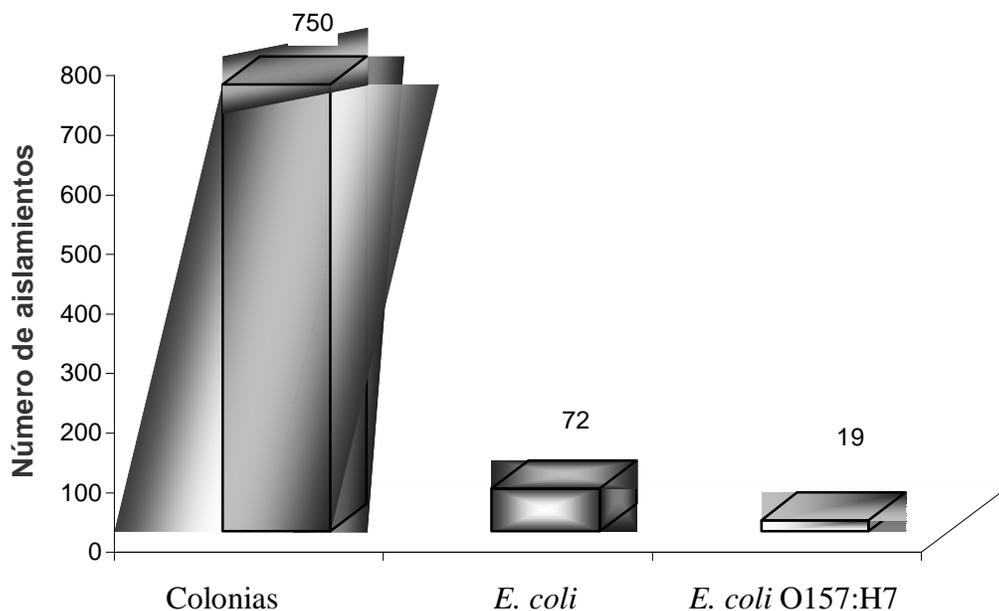


Figura 1. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en hortalizas.

Del total de colonias analizadas para hortalizas el 9.6 % fueron identificadas como *Escherichia coli* y el 2.5 % se confirmaron como *Escherichia coli* O157:H7 (Figura 1). Esto nos indica que esta bacteria se encuentra presente en las hortalizas aunque en bajo porcentaje.

Se ha demostrado que la mayoría de los brotes producidos por cepas EHEC, han sido el resultado de la transmisión del microorganismo a través de alimentos (Cimolai, *et al.*, 1990). En un estudio realizado en el período de 1987 a 1991 en Canadá, se observó que la fuente probable de la infección fue identificada solamente en el 35% de los casos (carne de res, 23.1%; leche, 0.5%; otros alimentos, 9.0% y la transmisión de persona a persona, 2.4%), por lo que se deduce que en un porcentaje elevado de casos, no se conoció la fuente de infección (Waters *et al.* 1994). De igual forma también se ha demostrado la posibilidad de que *E. coli* O157:H7 pueda crecer en vegetales crudos almacenados en refrigeración y a las

condiciones en las que comúnmente se comercializan y almacenan estos productos (Abdul-Raouf, *et al.*, 1993).

Actualmente no existen estudios epidemiológicos en México que evalúen el papel de estos alimentos en las enfermedades transmitidas por alimentos; siendo la cosecha en el campo, la comercialización, forma de preparar y consumir, las que constituyen un alto nivel de riesgo de contaminación por microorganismos patógenos. Debido a que la mayoría de las hortalizas siempre están en contacto con la tierra y los fertilizantes utilizados se debe tener el mayor control sobre ambos para evitar su contaminación.

El crecimiento de numerosas especies bacterianas, también es dependiente de la composición general de la hortaliza como es el contenido de vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, almidón, diversos tipos de azúcares, lípidos y pequeñas cantidades de proteínas (CIEMA, 1985). Esta composición es favorable para la permanencia de los organismos como *E. coli* O157:H7

Dentro de productos de la pesca el 28.57 % de muestras positivas correspondieron a ostiones y el 71.43 % a pescados (cuadro 5).

Cuadro 6. Productos de la pesca analizados para el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

<b>Producto de la pesca</b>	<b>Muestras analizadas</b>	<b>Muestras positivas</b>
<i>Ostión</i>	102	2
<i>Pescado</i>	105	5
<b>TOTAL</b>	<b>207</b>	<b>7</b>

Las aguas naturales contaminadas o las residuales tratadas inadecuadamente, pueden dar lugar a la presencia de microorganismos patógenos en el pescado (capaces de causar perjuicios

a la salud del hombre). Los microorganismos patógenos, pueden contaminar los productos de la pesca durante su manipulación en cualquier fase de su procesamiento, debido a la falta de limpieza, higiene y condiciones sanitarias (Connell, 1988).

Cuadro 7. Confirmación de Unidades Formadoras de Colonias de *Escherichia coli* O157:H7

Producto de la pesca	Número de Unidades Formadoras de Colonias		
	Analizadas	Presuntivas	Confirmadas
<i>Ostión</i>	510	47	2
<i>Pescado</i>	525	50	5
<b>TOTAL</b>	<b>1035</b>	<b>97</b>	<b>7</b>

De los productos de la pesca analizados en pescado se obtuvo el 71.43 % de las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 aisladas y en ostiones el 28.57 % (cuadro 6).

La principal fuente de contaminación de los sistemas estuarinos la constituyen los desechos domésticos, agrícolas e industriales. Ecológicamente puede considerarse desde diversos puntos de vista, ya que puede estar representada por materia en suspensión, modificando por ende las propiedades del agua como concentración de oxígeno, salinidad, dureza, pH, conductividad, entre otras (Solo-Gabriele *et. al.*, 2000).

Las especies capturadas en aguas costeras, pueden estar contaminadas por desechos industriales, agrícolas y de animales. Al respecto Nelson en 1938 señala que las aguas negras presentan una alta concentración de bacterias coliformes, en tales condiciones normalmente las ostras no alteran su ritmo de filtrado, razón por la cual la concentración de *E. coli* suele alcanzar cifras muy elevadas, de hasta 20 000-500 000 bacterias por cada 100 cc de tejido de ostión (Sevilla, 1993).

Del total de colonias analizadas para productos de la pesca el 9.37 % fue identificadas como *Escherichia coli* y el 0.68 % se confirmaron como *Escherichia coli* O157:H7 (Figura 2).

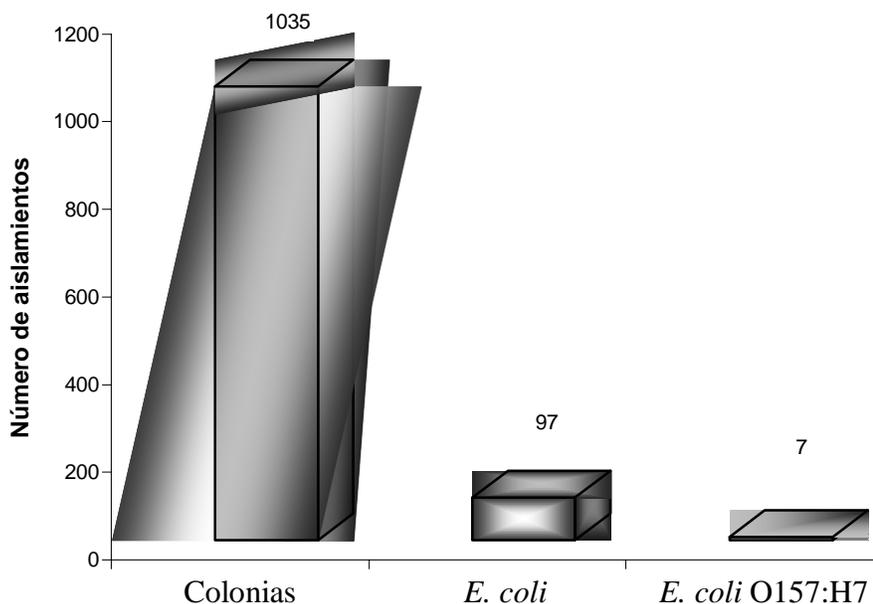


Figura 2. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en productos de la pesca

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 está relacionada con los asentamientos humanos localizados en la rivera de la laguna de los cuales algunos poseen letrinas que desembocan hacia la misma. Por lo anterior, resulta lógico el que esta bacteria se encuentre en los alimentos recolectados en la laguna, ya que el hombre es parte de la transmisión de dicho microorganismo, como lo demuestran los estudios realizados por diversos investigadores sobre la transmisión de *E. coli* O157:H7 de persona a persona por vía fecal-oral (Riley *et. al.*,1983; Spika *et. al.*,1986; Pai *et. al.*,1988; Bryant *et. al.*,1989; Pavia *et. al.*,1990; Belongia *et. al.*,1993; Rowe *et. al.*,1993; Bell *et. al.*,1994)

La dosis infectiva ingerida de EHEC en el humano es muy baja (Granum *et al.* 1995, Tarr, 1995). En un estudio de un brote presentado en Adelaide, Australia; (Paton *et al.* 1996) demostraron que una bacteria en 10 g de alimento fue suficiente para producir la enfermedad,

por lo que su presencia en un producto alimenticio, independientemente del número, es importante

La pesca en la laguna, no solo se realiza con ayuda de redes, pinzas y lanchas sino que las personas se sumergen y desplazan caminando dentro por ser poco profunda (1-1.5m) (Terán, 1989). El sumergirse y caminar hace suponer que, en algún momento se puede ingerir el agua contaminada completando así el ciclo de transmisión.

La presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en este tipo de productos esta condicionada a la composición nutricional (alto contenido proteico, lípidos, vitaminas y agua) y a la biota presente (CIEMA, 1985). Esta bacteria también puede estar presente en ostiones y pescados, por la fauna en la laguna y su entorno como cerdos: perros, vacas, gatos y diversas aves (pelícanos, gaviotas y aves de corral) que juegan un importante papel epidemiológico en la transmisión de este microorganismo, ya que estos animales son reservorios naturales de *Escherichia coli* O157:H7. Así mismo, los desechos humanos y animales son vertidos en la laguna tanto por descarga como por arrastre cuando sube la marea, por el viento y durante la época de lluvias.

Todo esto nos lleva a pensar que las enfermedades no notificadas dentro de la población, como la gastroenteritis y alguna colitis no diagnosticada pueden ser causadas por *Escherichia coli* O157:H7.

Con respecto a los experimentos de citotoxicidad, se observó que el porcentaje de destrucción de la monocapa de células VERO es variable en las cepas aisladas, así una cepa de las que proceden de pescado producen entre el 50-60 %, una un 70-80 % y las tres restantes un 90-100 %. En el caso de las cepas procedentes de ostión una produce un 70-80 % y una de 90-100 %. Para las hortalizas tres producen un 50-60 %, cuatro cepas el 70-80 % y las doce restantes un 90-100 % de destrucción celular (cuadro 7).

Cuadro 8. Efecto citotóxico en la línea celular VERO

% de destrucción	Origen de las cepas		
	<i>Pescado</i>	<i>Ostión</i>	<i>Hortalizas</i>
<i>0 - 20</i>	-	-	-
<i>30 - 40</i>	-	-	-
<i>50 - 60</i>	1	-	3
<i>70 - 80</i>	1	1	4
<i>90 - 100</i>	3	1	12
<b>Total</b>	5	2	19

Se pudo observar que el porcentaje de destrucción de la monocapa de células MA-104 es variable en las cepas aisladas, así en el caso de las cepas provenientes de pescado dos producen un 70-80 % y las tres restantes un 90-100 %. En el caso de los aislados de ostión una produce un 70-80 % y una de 90-100 %. Para las hortalizas una produce un 50-60 %, seis cepas el 70-80 % y las doce restantes da un 90-100 % de destrucción celular (cuadro 8). En este trabajo se anexó la línea celular MA-104 lo cual ayuda a ampliar el panorama sobre la acción de las toxinas shiga-like en diferentes células.

Cuadro 9. Efecto citotóxico en la línea celular MA-104

% de destrucción	Origen de las cepas		
	<i>Pescado</i>	<i>Ostión</i>	<i>Hortalizas</i>
0 - 20	-	-	-
30 - 40	-	-	-
50 - 60	-	-	1
70 - 80	2	1	6
90 - 100	3	1	12
<b>Total</b>	5	2	19

Al analizar la producción de shiga-like toxinas en las cepas identificadas como *Escherichia coli* O157:H7 se observó una gama de porcentajes de destrucción celular, que va del 50 % al 100% lo que nos señala la producción de diferentes tipos de toxina Stx 1 y/o Stx 2. Esto nos indica que pueden ser un riesgo potencial , ya que estas cepas poseen la capacidad de producir toxinas que dañan sus células blanco, lo que puede traducirse en una infección gastrointestinal y posteriormente tener secuelas de dicha infección son SUH o CH

Altos niveles de Gb<sub>3</sub> se pueden encontrar en células endoteliales presentes en el colon, el sistema nervioso central, el páncreas, la microvasculatura del glomérulo renal y células del tejido renal (Schmidt *et. al.*, 1995).

Las toxinas shiga-like son citotóxicas para las líneas celulares VERO y células HeLa, letales para ratones adultos inyectados intraperitonealmente y poseen una ligera actividad enterotóxica en asa ligada de intestino de conejo (Karmali, 1989).

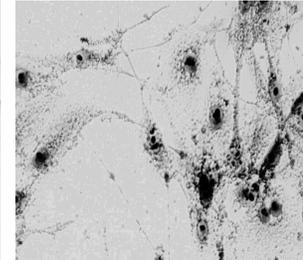
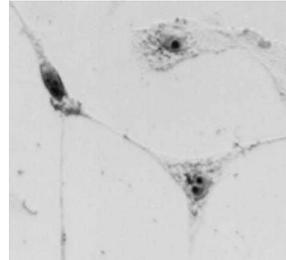
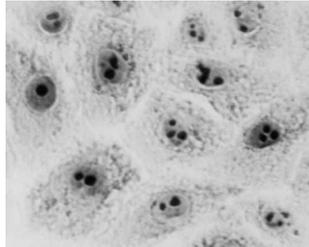
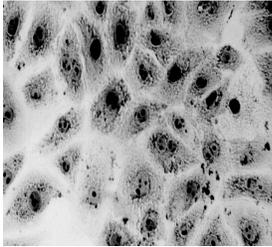
Línea celular MA-104

Sin inocular

*Escherichia coli*  
ATCC 25922

*Escherichia coli*  
O157:H7  
ATCC 35150

*Escherichia coli*  
O157:H7  
problema



Línea celular VERO

Sin inocular

*Escherichia coli*  
ATCC 25922

*Escherichia coli*  
O157:H7  
ATCC 35150

*Escherichia coli*  
O157:H7  
problema

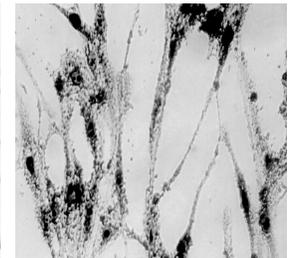
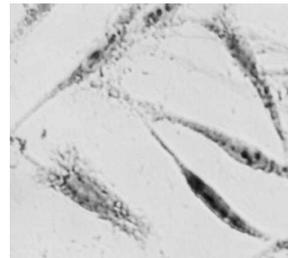
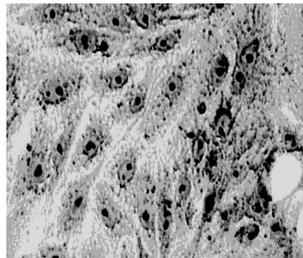
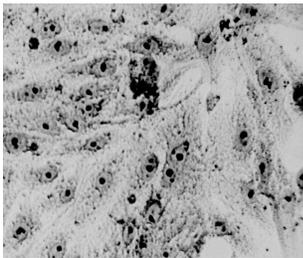


Figura 3. Efecto citotóxico producido por las toxinas de *Escherichia coli* O157:H7 en las líneas celulares VERO y MA-104.

En este trabajo se demostró la presencia del principal factor de patogenicidad informado para *Escherichia coli* O157:H7. Este microorganismo puede producir solo la toxina Stx 1, la toxina Stx 2 o ambas, pero dentro de la toxina Stx 2 existen variantes como Stx 2c, Stx 2v, Stx 2vhb, Stx 2e, etc. Por esta razón los daños y secuelas en el paciente dependerán de la o los tipos de toxina que cada cepa produzca (Nataro y Kaper, 1998; Cornick *et. al.*,2000).

Existe un subgrupo en particular llamado Stx 2c, que posee diferencias en la secuencia de aminoácidos en la subunidad B en comparación con la subunidad clásica de Stx 2 (Asp16→Asn y Asp24→Ala). Este subgrupo muestra baja capacidad de unión a su receptor Gb<sub>3</sub>, disminuyendo así la citotoxicidad en los ensayos *in vitro*. Estudios epidemiológicos informan que las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas shiga-like tipo Stx 2 son comúnmente asociadas a enfermedades graves como el SUH, que aquellas cepas que solo producen Stx 1 o ambas Stx 1 y Stx 2. Una posible explicación de esto es que, el nivel de transcripción del gene *stx*<sub>2</sub> *in vivo* es mayor que el de *stx*<sub>1</sub>, se ha observado *in vitro* que los genes relacionados con la transcripción de *stx*<sub>2</sub> son constitutivos (Paton y Paton, 1998).

Además debido a que la información para la producción de las toxinas Stx 1 y Stx 2, está codificada en plásmidos que posteriormente se integran al cromosoma, la cantidad de copias de dichos plásmidos determinará la cantidad de toxina que excretará dicha bacteria. Las toxinas shiga-like Stx 1 y Stx 2 están codificadas en el genoma de bacteriófagos temperados (Muniesa *et. al.*, 2000).

Con respecto a la evaluación de la adherencia en células Hep-2 se observó que solo el 73.08 % presentó una adherencia difusa, de las cuales el 36.8% se aislaron de verdolaga, el 21 % de espinaca, el 15.8 % de pescado, el 10.5 % de cilantro, el 5.3 % tanto para perejil, lechuga y ostión (figura 4).

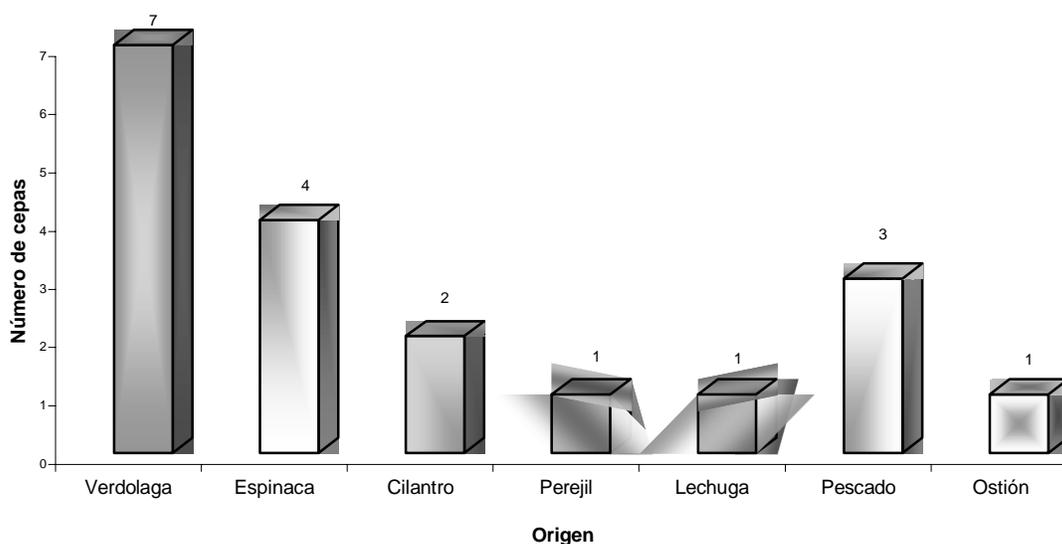


Figura 4. Adherencia de *Escherichia coli* O157:H7 en células Hep-2.

Aquellas bacterias que sobreviven a las condiciones ácidas del estomago pueden colonizar el intestino gracias a su capacidad para adherirse a la células del epitelio intestinal. *E. coli* O157:H7 presenta diferentes patrones de adherencia, tal vez, como un reflejo de los diversos mecanismos de adherencia que posee. Así, algunas cepas presentan un patrón de adherencia difusa, es decir, la bacteria se distribuye sobre toda la superficie de las células epiteliales (Sherman *et. al.*, 1987); otras cepas exhiben un patrón de adherencia localizada formando microcolonias en un número limitado de sitios en la superficie epitelial (McKee y O'Brien, 1995). Se ha demostrado que cepas de origen humano de *Escherichia coli* O157:H7 pueden adherirse a células Hep-2 y a la línea celular de Intestino 407 (Dorn y Angrick, 1991).

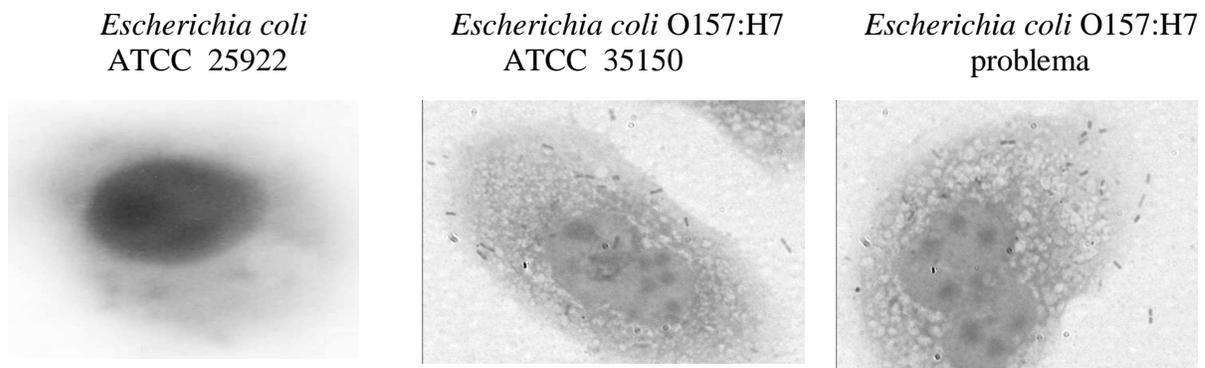


Figura 5. Adherencia difusa de *Escherichia coli* O157:H7 en células Hep-2.

De esta manera se puso de manifiesto otro factor de virulencia importante de *Escherichia coli* O157:H7, indicándonos que la mayoría de estas cepas son capaces de llegar al intestino y adherirse a las células epiteliales, destruyendo las microvellocidades causando las lesiones de adherencia y esfacelamiento (A/E) características.

Dado que hubo cepas incapaces de adherirse a las células Hep-2, se puede suponer que tienen alguna deficiencia en la producción de factores requeridos para la adherencia bacteriana, como pueden ser la intimina o su receptor. Estos daños pueden presentarse a nivel genético, por ausencia del gen que codifique para una o ambas proteínas, o que dicho gen esté presente pero tenga alguna mutación que impide la producción de una proteína funcional.

La capacidad para producir la lesión A/E está codificada en 41 genes, localizados en una isla de patogenicidad llamada Locus para Esfacelamiento de Enterocitos (LEE). LEE codifica para la adhesina intimina (gene *eaeA*) y varias proteínas (EspA, B y D) secretadas por el sistema de secreción tipo III (codificado por los genes *sep/esc*). En LEE también se codifica un receptor (EspE) para la intimina que es translocado a la membrana de la célula eucariótica. La interrupción de alguno de estos genes impide la interacción bacteriana con la célula eucariótica durante el proceso de infección (Kresse *et. al.*, 1998; Beltrametti *et. al.*, 1999).

En el caso de la invasividad las cepas aisladas de *Escherichia coli* O157:H7 fueron incapaces de invadir las células Hep-2, lo que concuerda con lo reportado en la bibliografía donde se menciona que esta bacteria no invade las líneas celulares Hep-2 (carcinoma de laringe humana), intestino 407 (células de intestino fetal humano) (Sherman *et. al.*, 1987) y HCT-8 (células ileocecales humanas) (McKee y O'Brien, 1995). El que este microorganismo no sea capaz de invadir estas líneas celulares no descarta la posibilidad de que pueda invadir alguna otra línea celular pues se desconoce si posee o no el mecanismo para llevar a cabo el proceso de invasividad.

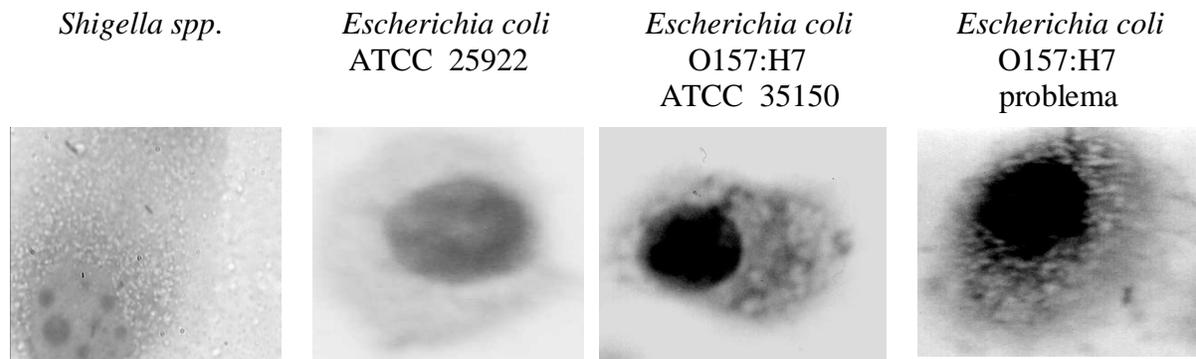


Figura 6. Invasividad producida por *Escherichia coli* O157:H7 en células Hep-2.

En el caso de la hemolisina todas las cepas fueron positivas para esta prueba produciendo un halo de hemólisis alfa, lo que muestra que hay una destrucción parcial de los eritrocitos liberándose grupos hemo y hemoglobina que sirven como fuente de hierro para *Escherichia coli* O157:H7.

Esto nos indica que posee los genes para la producción, activación o maduración y excreción de la hemolisina

La lisis de los eritrocitos *in vivo* libera grupos hemo y hemoglobina, con un incremento del crecimiento de *E. coli* O157:H7 ya que pueden servirle como una fuente de hierro (Nataro y Kaper, 1998).

La importancia de *Escherichia coli* O157:H7 se pone de manifiesto en el hecho de que su genoma y el plásmido de mayor tamaño que posee han sido secuenciados totalmente, lo cual ayudara a combatir su patogenicidad ( Burland *et. al.*, 1998: Perna *et. al.*, 2001).

Cuadro 10. Citotoxicidad, hemolisina, adherencia e invasividad de las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 aisladas.

Número de cepa	Origen	Porcentaje de destrucción celular		Adherencia	Invasividad	Producción de Hemolisina
		Células VERO	Células MA-104			
1	Verdolaga	90	90	-	-	+
2	Espinaca	100	100	+	-	+
3	Verdolaga	100	100	+	-	+
4	Lechuga	70	100	+	-	+
5	Espinaca	90	100	+	-	+
6	Verdolaga	100	100	+	-	+
7	Perejil	90	100	-	-	+
8	Verdolaga	100	90	+	-	+
9	Verdolaga	100	100	+	-	+
10	Ostión	70	90	+	-	+
11	Espinaca	80	70	+	-	+
12	Verdolaga	60	80	+	-	+
13	Verdolaga	100	80	-	-	+
14	Perejil	50	70	+	-	+

Número de cepa	Origen	Porcentaje de destrucción celular		Adherencia	Invasividad	Producción de Hemolisina
		Células VERO	Células MA-104			
15	Cilantro	90	90	+	-	+
16	Verdolaga	80	80	+	-	+
17	Espinaca	80	60	+	-	+
18	Pescado	70	80	+	-	+
19	Ostión	100	70	-	-	+
20	Pescado	100	100	+	-	+
21	Pescado	100	100	-	-	+
22	Pescado	60	80	+	-	+
23	Pescado	100	90	-	-	+
24	Verdolaga	100	100	+	-	+
25	Cilantro	100	100	+	-	+
26	Cilantro	60	80	-	-	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		CERO	CERO	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150		100	100	+	-	+

En el cuadro 9 podemos observar la procedencia de cada una de las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 aislada así como la expresión de cada uno de los factores de virulencia que se determinaron, como podemos ver la mayoría de las cepas provienen de hortalizas reflejando la situación de la agricultura en nuestro país donde se utiliza como fertilizante el estiércol del ganado y en la mayoría de los casos agua contaminada con el mismo o aguas negras. Así como las cepas obtenidas de pescado y ostión provenientes de un cuerpo acuícola con problemas serios de contaminación debida a las descargas de los hogares localizados en sus riveras, al igual que la presencia de fauna nociva para las practicas de acuicultura.

Por lo anterior podemos decir que se deben tomar las medidas higiénicas necesarias en todos los alimentos que consumimos pues no se conocen las condiciones en que hayan sido producidos.

## VI. CONCLUSIÓN

Este trabajo demuestra la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en productos de la pesca y hortalizas en México, presentando estas cepas factores de patogenicidad como las toxinas shiga-like, la producción de hemolisina y la capacidad de adherencia. La presencia de este microorganismo en diversos alimentos representan un riesgo potencial para los consumidores, por la posibilidad de padecer una gastroenteritis con secuelas como el síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica o púrpura trombocitopénica; enfermedades reportadas en nuestro país como etiología viral o desconocida.

Estos resultados sugieren que debe buscarse a *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos para su control de calidad y en pacientes que sufran de procesos diarreicos.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

ABDUL-RAOUF U. M.; L. R. BEUCHAT and M. S. AMMAR (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** (8): 2364-2368.

ABDUL-RAOUF, U.M., L.R. BEUCHAT.,AND M.S. AMMAR (1993). Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**(7):1999-2006.

ARMSTRONG G. L.; J. HOLLINGSWORTH and J. G. MORRIS Jr. (1996). Emergin foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol. Rev.* **18** (1): 29-51.

ARNOLD K. W. And C. W. KASPAR (1995). starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (5): 2037-2039.

BAGI L. K. ad R. L. BUCHANAN (1993). Preservation of *Listeria monocytogenes* and others pathogenic foodborne bacteria on silica gel. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**: 37-39

BEHRMAN R. E. (1992). Síndrome hemolítico-urémico, p. 1620-1621. **IN**: R. M. Kliegman; W. E. Nelson y V. C. Vaughan III eds. *Nelson Tratado de pediatría*. 14ª edn. Interamericana-McGraw-Hill, México

BELL B. P.; M. GOLDOFT; P. M. GRIFFIN; M. A. DAVIS; D.C. GORDON; P. I. TARR; C. A. BARTLESON; J. H. LEWIS; T. J. BARRETT; J. G. WELLS; R. BARON and J. KOBAYASHI (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers; the Washington experience. *J. AM. MED. ASSOC.* **272** (17): 1349-1353.

BELONGIA E. A.; M. T. OSTERHOLM; J. T. SOLER; D. A. AMMEND; J. E. BRAUN and K. L. MAcDONALD (1993). Trasmision of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilites. *J. AM. MED. ASSOC.* **269** (17): 883-889.

BENJAMIN M. M. and A. R. DATTA (1995). Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **61** (4): 16669-1672.

BEERY J. T.; M. P. DOYLE and J. L. SCHOENI (1985). Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. Appl. Environ. Microbiol. **49** (2): 310-315.

BELTRAMETTI F.; A. U. KRESSE and C. A. GUZMÁN (1999). Transcriptional regulation of the *esp* genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **181**(11):3409-3418.

BESSER R. E.; S. M. LETT; J. T. WEBER; M. P. DOYLE; T. J. BARRETT; J. E. WELLS and P. M. GRIFFIN (1993). An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. J. Am. Med. Assoc. **269** (17): 2217-2220.

BEUTIN L.; S. ALEKSIC; S. ZIMMERMANN and K. GLEIER (1994). Virulence factors and phenotypical traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. Med. Microbiol. Immunol. **183** : 113-121.

BITZAN M.; K. LIDWIG; M. KLEMT; H. KONIG; J. BUREN and D. E. MULLER-WIEFEL (1993). The role of *Escherichia coli* O 157 infections in the classical (enteropathic) haemolytic uraemic syndrome: results of a Central European, multicenter study. Epidemiol. Infect. **110** : 183-196.

BLANCO J. E.; M. BLANCO y J. BLANCO (1995). *Escherichia coli* enterotoxigénicas, verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. Microbiología SEM II: 97-110.

BOYCE T. G.; D. L. SWERDLOW and P. M. GRIFFIN (1995). *Escherichia coli* o157:h7 and the hemolytic-uremic syndrome. N. Engl. J. Med. **333**(6):364-368.

BRYANT H. E.; M. A. ATHAR and C. H. PAI (1989). Risk factors for *Escherichia coli* O157:H7 infection in an urban community. J. Infect. Dis. **160** (5): 858-864.

BUCHANAN R. L. and M. P. DOYLE (1997). Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and others enterohemorrhagic *E. coli*. Food Technol. **51** (10): 69-76.

BUCHANAN R. L. and S. G. EDELSON (1996). Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. Appl. Environ. Microbiol. **62** (11): 4009-4013.

BURLAND V.; Y. SHAO; N. T. PERNA; G. PLUNKETT; H. J. SOFIA and F. R. BALTTNER (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. Nucleic Acids Res. **26**(18): 4196-4204.

CARTER A. O.; A. A. BORCZYK; J. A. K. CARLSON; B. HARVEY; J. C. HOCKIS; M. A. KARMALI; C. KRISHNAN; D. A. KORN and H. LIOR (1987). a severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. N. Engl. J. Med. **317**(24):1496-1500.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (1996). Preventing food illness: *Escherichia coli* O157:H7. Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Center for Diseases Control and Prevention.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (1993). Morbidity and mortality weekly report. **42** (14): 1-104.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2001). Morbidity and mortality weekly report. **48** (53): 1-104.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2002). Morbidity and mortality weekly report. **49** (53): 1-102.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2003). Morbidity and mortality weekly report. **50** (53): 1-108.

CIMOLAI; N., J. E. CARTER, B. J. MORRISON, AND J. D. ANDERSON (1990). Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to hemolytic uremic syndrome. J. Pediatr. **116**:589-592.

CLEARY T. G. (1992). *Escherichia coli* diarrogeno, p. 880-883. IN: R. A. Kliegman; W. E. Nelson y V. C. Vaughan III eds. NELSON Tratado de pediatría, 14<sup>a</sup> e. Interamericana.

COMISIÓN INTERNACIONAL DE ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS PARA ALIMENTOS (CIEMA).© (1980). Pescados, mariscos y sus productos, p. 573-612. IN: (CIEMA). ECOLOGÍA MICROBIANA DE LOS ALIMENTOS; Vol. 2. Productos alimenticios. Acribia, Zaragoza España.

COMISIÓN INTERNACIONAL DE ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS PARA ALIMENTOS (CIEMA) (1985). Ecología Microbiana de los Alimentos. Volumen II. Productos Alimenticios. Acribia, España. pp. 613-651.

CONNELL J. J. © (1988). Calidad intrínseca, p. 43-47. IN: J. J. Conell. Control de la calidad del pescado. Acribia, Zaragoza España.

CONNELL J. J. © (1988). Otros aspectos de la calidad, p.136-143. IN: J. J. Conell. Control de la calidad del pescado. Acribia, Zaragoza España.

CONNER D. E. Ad J. S. KOTROLA (1995). Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. Appl. Environ. Microbiol. **61**(1): 382-385.

CORNICK N. A.; I. MATISE; J. E. SAMUEL; B. T. BOSWORTJ and H.W . MOON (2000). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin producing, and systemic disease. J. Infect. Dis. **181**: 242-251.

CUTTER C. N. and G. R. SIRAGUSA (1994). Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. Food Prot. **57** (2): 97-103.

CHEVILLE A. M.; K. W. ARNOLD; C. BUCHRIESER; C. M. CHENG and C. W. KASPAR (1996). *rpoS* regulation of acid, heat and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. **62** (5); 1822-1824.

CHINEN I.; J. D. TANARO; E. MILIWEBSKY; L. H. LOUND; G. CHILLEMI; S. LEDRI; A. BASCHKIER; M. SCARPIN; E. MANFREDI and M. RIVAS (2001). Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. Food Protect. **64**(9): 1346-1351.

DOYLE M. P. and J. L. SCHOENI (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry, Appl. Environ. Microbiol. **53** (10): 2394-2396.

DORN C. R. and E. J. ANGRICK (1991). Serotype O157:H7 *Escherichia coli* from bovine and meat sources. J. Clin. Microbiol. **29** (6): 1225-1231.

EDBERG S. C.; M. J. ALEN; D. B. SMITH and THE NATIONAL COLLABORATIVE STUDY (1989). National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with preserve-absence techniques. Appl. Environ. Microbiol. **55** (4): 1003-1008.

FAGAN P. K.; H. A. MICHAEL; K. A. BETTELHEIM AND S. P. DJORDJEVIC (1999). Detection of shiga-like (*stx1* and *stx2*), intimin (*eae*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. **65** (2): 868-872.

FAITH N. G.; J. A. SHERE; R. BROSCHE; K. W. ARNOLD; S. E. ANSAY; M. S. LEE; J. B. LUCHANSKY and C. W. KASPAR (1996). Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (5): 1519-1525.

FAPOHUNDA A. O.; K. W. MCMILLIN; D. L. MARSHALL and W. M. WAITES (1994). Growth of selected cross-contaminating bacterial pathogens on beef and fish at 15 and 35°C. *J. Food Prot.* **57** (4): 337-340.

FARMER III J. J. and B. R. DAVIS (1985). H7 antiserum-sorbitol fermentation medium a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* **22** (4): 620-625.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA); U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) and CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (1998). Guía para reducir al mínimo el riesgo microbiano en los alimentos, en el caso de frutas y vegetales. <http://www.fda.gov>

FRAZIER W. C. y D. C. WESTHOFF (1993). *Microbiología de los alimentos*. 4ª edición. Acribia. Zaragoza, España.

GANSHEROFF L. J.; M. R. WACHTEL and A. D. O'BRIEN (1999). Decreased adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to Hep-2 cells in the presence of antibodies that recognize the c-terminal region of intimin. *Infect. Immun.* **67** (12): 6409-6417.

GARCIA-VILLANOVA, R. B., R. V. GALVEZ (1987). Contamination on fresh vegetables during cultivation and marketing. *Int. J. Food. Microbiol.* 285-291

GELDREICH, E.E., AND R.H. BORDNER (1971). Fecal Contamination of Fruits and Vegetables. A Review. *J. Milk and Food Technol.* **34**: 184-195.

GERICHTER, C.B., I. SECHTER, A. GAVISH, AND D. CAHAN (1975). Viability of *Vibrio cholerae* biotype El Tor and of cholera phage on vegetables. Israel J. Med. Sci. **11**(9): 889-895.

GLASS K. A.; J. M. LOEFFELHOLZ; J. P. FORD and M. P. DOYLE (1992). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. Appl. Environ. Microbiol. **58** (8): 2315-2316.

GOLDWATER P. N. and K. A. BETTELHEIM (1995). The role of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes other than O157:H7 as causes of disease in Australia. Commun. Dis. Intell. **19**: 2-4.

GRANSDEN W. R.; M. A. S. DAMM; J. D. ANDERSON; J. E. CARTER and H. LIOR (1986). Further evidence associating hemolytic uremic syndrome with infection by verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. J. Infect. Dis. **154**(3):522-524.

GRANUM, P.E., J.M. TOMAS, AND J.E. ALOUF (1995). A Survey of Bacterial Toxins Involved in Food Poisoning: a Suggestion for Bacterial Food Poisoning Toxin Nomenclature. Inter. J. Food Microbiol. **28**:129-144.

GRIFFIN P. M. and R. V. TAUXE (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Rev. **13** : 60-98.

GRIFFIN P. M.; S. M. OSTROFF; R. V. TAUXE; K. D. GREENE; J. G. WELLS; J. H. LEWIS and P. A. BLAKE (1988). Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections; a broad clinical spectrum. Ann. Intern. Med. **109** : 705-712.

GYLES C.; R. JOHNSON; A. GAO; K. ZIEBELL; D. PIERARD; S. ALEKSIC AND P. BOERLIN (1998). Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. Appl. Environ. Microbiol. **64** (11): 4134-4141.

HAMANO S.; Y. NAKANISHI; T. NARA; T. SEKI; T. OHTANI; T. OISHI; K. JOH; T. OIKAWA; Y. MURAMATSU; Y. OGAWA and S. AKASHI (1993). Neurological manifestations of hemorrhagic colitis in the outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Acta paediatr.* **82**: 454-458.

HENGGE-ARONIS R.; R. LANGE; N. HENNEBERG and D. FISCHER (1993). Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175** (1): 259-265.

HITCHINS A. D.; P FENG; W. D. WATKINS; S. R. RIPPEY y L. A. CHANDER (1992). *Escherichia coli* y bacterias coliformes, p. 27-54. IN: U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition (U.S.D.A.) Manual de bacteriología analítica, 7ª edn. FDA.

HURLEY B. P.; M. JACEWICZ; C. M. THORPE; L. L. LINCICOME; A. J. KING; G. T. KEUSCH and D. W. K. ACHESON (1999). Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **67** (12): 6670-6677.

ITOH Y.; Y. SUGITA-KONISHI; F. KASUGA; M. IWAKI; Y. HARA-KKUDO; N. SAITO; Y. NOGUCHI; H. KONUMA and S. KUMAGAI (1998). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 present in radish sprouts. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (4): 1532-1535.

JORDAN K. N.; L. OXFORD and C. P. O'BYRNE (1999). Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (7): 3048-3055.

JOHNSON J. L.; B. E. ROSE; A. K. SHARAR; G. M. RANSOM; C. P. LATTUADA and A. M. MNAMARA (1995). Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak. *Food Protec.* **58** (6): 597-603.

KARMALI M. A. (1989). Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2** (1): 15-38.

KEENE W.E.; J. M. McANULTY; F. C. HOESLY; P. WILLIAMS, Jr.; K. HEDBERG; G. L. OXMAN; T. J. BARRETT; M. A. PFALLER and D. W. FLEMING (1994). A Swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. N. Engl. J. Med. **331** (9): 579-584.

KEENE W. E.; E. SAZIE; J. KOK; D. H. RICE; D. D. HANCOCK; V. K. BALAN; T. ZHAO and M. P. DOYLE (1997). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. J. Am. Med. Assoc. **277** (15):1229-1231.

KNIGHT P. (1993). Hemorrhagic *Escherichia coli*: The danger increases. ASM News **59** (5): 247-250

KONOWALCHUK, J. J., AND J.I. SPEIRS (1975). Survival of Enteric Virus of Fresh Vegetables. J. Milk and Food Technol. **38**. 469-472.

KRESSE A. U.; K. SCHULZE; C. DEIBEL; F. EBEL; M. ROHDE; T. CHAKRABORTY and C. A. GUZMÁN (1998). Pas, a novel protein required for protein secretion and attaching and effacing activities of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **180** (17): 4370-4379.

KUDVA I. T.; P. G. HATFIELD and C. J. HOVDE (1996). *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. J. Clin. Microbiol. **34**(2): 431-433.

KUDVA I. T.; K. BLANCH and C. J. HOVDE (1998). Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 survival in ovine or bovine manure and manure slurry. Appl. Environ. Microbiol. **64** (9): 3166-3174.

LEA N.; J. M. LORD and L. M. ROBERTS (1999). Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. Microbiology **145**: 999-1004.

LE SAUX N.; J. S. SPIKA; B. FRIESEN; I. JONSON; D. MELNYCHUCK; C. ANDERSON; R. DION; M. RAHMAN and W. TOSTOWARYK (1993). Ground beef consumption in noncommercial setting is a risk factor for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection in Canada. *J. Infect. Dis.* **167** (2): 500-502.

LEVINE M. N. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155** (3): 377-389.

LEYER G.J.; L-L WANG and E.A. JOHNSON (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (10): 3752-3755.

LIN J.; IN S. LEE; J. FREY; J. L. SLONCZEWSKI and J. W. FOSTER (1995). Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177** (14): 4097-4104

LIN J.; M. P. SMITH; K. C. CHAPIN; H. S. BAIK; G. N. BENNETT and J. W. FOSTER (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (9): 3094-3100.

McKEE M. L. and A. D. O'BRIEN (1995). Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. *Infect. Immun.* **63** (5): 2070-2074.

MARCH S. B. and S. RATMAN (1986). Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* **23** (5): 869-872.

MARTIN D. L.; K. L. MacDONALD; K. E. WHITE; J. T. SOLER and M. T. OSTERHOLM (1990). The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in Minnesota. *N. Engl. J. Med.* **323** (17): 1161-1167.

MARTIN M. L.; L. D. SHIPMAN; J. G. WELLS; M. E. POTTER; K. HEDBERG; I. K. WACHSMUTH; R. V. TAUXE; J. P. DAVIS; J. ARNOLDI and J. TILLELI (1986). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **2** (8514): 1043.

MEAD P. S. and P. M. GRIFFIN (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* **352** (10): 1207-1212.

MENESTRINA G.; C. MOSER; S. PELLET and R. WELCH (1994). Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology* **87**: 249-267.

MORGAN D.; C. P. NEWMAN; D. N. HUTCHINSON; A. M. WALKER; B. ROWE and F. MAJID (1993). Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yogurth. *Epidemiol. Infect.* **111**: 181-187.

MUNIESA M.; J. RECKTENWALD; M. BIELASZEWSKA; H. KARCH and H. SCHMIDT (2000). Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* **68** (9): 7850-4855.

NATARO J. P. And J. B. KAPER. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbial. Rev.* **11** (1): 142-201.

NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES AND INFECTIOUS DISEASES CONTROL DIVISION, MINISTRY OF HEALTH and WELFARE OF JAPAN (NIIDIDCD)(1997). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*(enterohemorrhagic *E. coli* ) infection, Japan, 1996-june 1997. *Infect. Agents Surveillance Rep.* **18**: 153'-154'.

NEILL M. A.; P. I. TARR; C. R. CLAUSEN; D. L. CHRISTIE and R. O. HICKMAN (1987). *Escherichia coli* O157:H7 as the predominant pathogen associated with the hemolytic uremic syndrome: a prospective study in the Pacific Northwest. *Pediatrics* **80**(1):37-40.

NETTLES C. C. and G. R. SIRAGUSA (1994). Efficacy of organic against *Escherichia coli* O157:H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. Food Protect. **57**(2): 97-103.

NICHOLS, A. A., P. A. DAVIES, K. P. KING, E.J. WINTER, and F.L.C. BLACKWALL (1971). Contamination of Lettuce Irrigated with Sewage Effluent. J. Horti. Sci. **46**:425-433.

O'BRIEN A. D.; A. R. MELTON; C. K. SCHMITT; M. L. MCKEE; M. L. BATTS and D. E. GRIFFIN (1993). Profile of *Escherichia coli* O157:H7 pathogen responsible for hamburger-borne outbreak of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in Washington. J. Clin. Microbiol. **31** (10): 2799-2801.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS) (1993). Evaluación Microbiológica de los alimentos vendidos en la vía pública en algunas ciudades de América Latina y el Caribe y, mediante su consumo, del riesgo epidemiológico de contraer toxii infecciones.. Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C.

PADHYE N. V. And M. P. DOYLE (1992). *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. Food Prot. **55** (7): 555-565.

PAI CH. H.; N. AHMED; H. LIOR; W. M. JOHNSON; H. V. SIMS and D. E. WOODS (1988). Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: A two-year prospective study. J. Infect. Dis. **157**(5):1054-1057.

PAPAVASSILIOU, J., S. TZANNETIS, H. LEKA AND G. MICHPOULOS (1967). Coliaerogenes Bacteria on Plants. J. Appl. Bacteriol. **30**: 219-223.

PARRY S. M.; R. L. SALMON; G.A. WILLSHAW and T. CHEASTY (1998). Risk factors for and prevention of sporadic infections with vero cytotoxin (shiga toxin) producing *Escherichia coli* O157. Lancet **351**: 1019-1022.

PATON J. C. and A. W. PATON. (1998). Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin. Microbial. Rev. **11** (3): 450-479.

PATON, A.W., R.M. RATCLIFF, R. L. OYLE, J.S. MURRAY, D. DAVOS, J.A. LANSER, AND J. C. PATON (1996) Molecular Microbiological Investigation of an Outbreak of Hemolytic Uremic Syndrome Caused by Dry Fermented Sausage Contaminated With Shiga-Like Toxin Producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. **34**: 1622-1627

PAVIA A. T.; C. R. NICHOLS; D. P. GREEN; R. V. TAUXE; S. MOTTICE; K. D. GREENE; J. G. WELLS; R. L. SIEGLER; E. D. BREWER; D. HANNON and P. A. BLAKE (1990). Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: Clinical and epidemiologic observations. J. Pediatrics **116** (4): 544-551.

PERNA . T.; G. PLUNKETT III; V. BURLAND; B. MAU; J. D. GLASNER; D. J. ROSE; G. F. MAYHEW; P. S. EVANS; J. GREGOR; H. A. KIRKPATRICK; G. PÓSFASIS; J. HACKETT; S. KLINK; A. BOUTIN; Y. SHAO; L. MILLER; E. J. GROTEBECK; N. W. DAVIS; A. LIM; E. T. DIMALANTA; K. D. POTAMOUSIS; J. APODACA; T. S. ANANTHARAMAN; J. LIN; G. YEN; D. C. SCHWARTZ; R. A. WELCH and F. R. BLATTNER (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature **409**: 529-533.

PRUIMBOOM-BREES I. M.; T. W. MORGAN; M. R. ACKERMANN; E. D. NYSTROM; J. E. SAMUEL; N. A. CORNICK and H. W. MOON (2000). Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. **97** (19): 10325-10329.

RAJKOWSKI K. T. And B. S. MARMER (1995). Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. Food Protect. **58** (12): 1307-1313.

RILEY L. W.; R. S. REMIS; S. D. HELGERSON; H. B. MCGEE; J. G. WELLS; B. R. DAVIS; R. J. HEBERT; E. S. OLCOTT; L. M. JOHNSON; N. T. HARGRETT; P. A. BLAKE and M. L. COHEN (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. **308** (12): 681-685.

RIOS M.;V. PRADO; M. TRUCKSIS; C. ARELLANO; C. BORIE; M. ALEXANDRE; A. FICA and M. M. LEVINE (1999). Clonal diversity of chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. J. Clin. Microbiol. **37**(3):778-781.

ROSA, I., A. BAÉZ, AND M. COUTIÑO (1984). Bacteriological quality of crops irrigated with waste water in the Xochimilco plots, Mexico City, Mexico. Appl. Environm. Microbiol. **47**(5):1074-1079

ROWBURY R. J. (1995). An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and other enterobacteria. Lett. Appl. Microbiol. **20** 333-337.

ROWE P. C.; E. ORRBINE; H. LIOR; G. A. WELLS; P. N. McLAINE and THE CPKRDRC (1993). Diarrhoea in close contacts as a risk factor for childhood haemolytic uraemic syndrome. Epidemiol. Infect. **110**: 9-16.

ROWE P. C.; E. ORRBINE; M. OGBORN; G. A. WELLS; W. WINTHER; H. LIOR; D. MANUEL and P. N. McLAINE (1994). Epidemic *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and hemolytic-uremic syndrome in a Canada Inuit community: Intestinal illness in family members as a risk factor. J. Pediatrics **124** (1): 21-26.

RYAN C. A.; R. V. TAUXE; G. W. HOSEK; J. G. WELLS; P. A. STOESZ; H. W. MCFADDEN,Jr.; P. W. SMITH; G. F. WRIGHT and P. A. BLAKE (1986). *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological and pathological findings. J. Infect. Dis. **154**(4):631-638.

SCHMIDT H.; L. BEUTIN and H. KARCH (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. **63** (3): 1055-1061.

SCHMIDT H.; J.SCHEEF; H. I. HUPPERTZ; M. FROSCH and H. KARCH (1999). *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H strain that do not produce shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. **37** (11): 3491-3496.

SEVILLA H. M. L. (1993). Factores limitantes, p. 114-116. IN: Las ostras de México. Aspectos básicos para su cultivo. Limusa. México.

SHERMAN P.; R. SONI; M. PETRIC and M. KARMALI (1987). Surface properties of the vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. **55** (8): 1824-1829.

SIEGLER R. L.; P. M. GRIFFIN; T. J. BARRETT and N. A. STROCKBINE (1993). Recurrent hemolytic uremic syndrome secondary to *Escherichia coli* O157:H7 infection. Pediatrics **91**:666-668.

SMALL P.; D. BLANKEHORN; D. WELTY; E. ZINSER and J. L. LONCZEWSKI (1994). Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. J. Bacteriol. **176** (6): 1729-1737.

SMITH H. R. and S. M. SCOTLAND (1988). Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. **26**:77-85.

SOLO-GABRIELE H. M.; M. A. WOLFERT; T. R. DESMARAIS and C. J. PALMER (2000). Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. Appl. Environ. Microbiol. **66** (1): 230-237.

SOLOMON E. B.; S. YARON and K.R. MATTHEWS (2002). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. Appl. Environ. Microbiol. **68** (1): 397-400.

SPIKA J. S.; J. E. PARSONS; D. NORDENBERG; J. G. WELLS ; R. A. GUNN and P. A. BLAKE (1986). Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center. J Pediatr. **109** (2): 287-291.

SPLITTSTOESSER, D.F.(1983). Indicator organisms on frozen vegetables. Food Technol. **37**(6):105-106

STANLEY P.; L. C. PACKMAN; V. KORONAKIS and C. HUGHES (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. Science **266**: 1992-1995.

STANLEY P.; V.KORONAKIS and C. HUGHES (1998). Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. Microbiol. and Molec. Biol. **62** (2): 309-333.

STEELE B. T.; N. MURPHY; G. S. ARBUS and C. P. RANCE (1982). An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of apple juice. J. Pediatrics **101** (6): 963-965

STEIN P. E.; A. BOODHOO; G. J. TYRRELL; J. L. BRUNTON and R. J. READ (1992). Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. Nature **355** (20): 748-750.

SWERDLOW D. L.; B. A. WOODRUFF; R. C. BRADY; P. M. GRIFFIN; S. TIPPEN; H. D. DONNELL, Jr; E. GELDREICH; B. J. PAYNE; A. MEYER, Jr; J. G. WELLS; K. D. GREENE; M. BRIGHT; N. A. BEAN and P. A. BLAKE (1992). a waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. Ann. Intern. Med. **117** (10): 812-819.

TAUXE R.V. (1997). Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Emer. Infect. Dis. **3** (4): 425-434.

TAORMINA P. J.; L. R. BEUCHAT and L. SLUTSKER (2001). Infections associated with eating seed sprouts:an international concern.

<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no5/taormina.htm>

TARR, P. I. (1995). *Escherichia coli* O157:H7: Clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. Clin. Infect. Dis. **20**:1-10.

TERÁN ALVARADO H. (1989). Estudio de la calidad bacteriológica del agua y ostión (*Crassostrea virginica*) de la Laguna de Pueblo Viejo, Ver., Méx. Tesis Profesional. UNE. Tomado de: ESCOBEDO SOLIS M. G. Y B. A. QUIROZ ZAMORA (1993). Determinación de fierro, cromo y níquel en el ostión (*Crassostrea virginica*, *Gmelin*) de la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz, México. TESIS (QFB.) México. D. F., Universidad del Norte, Esc. C. Químicas.

TILDEN J. Jr.; W. YOUNG; A. M. McNAMARA; C. CUSTER; B. BOESEL; M. A. LAMBERT-FAIR; J. MAJKOWSKI; D. VUGIA; S. B. WERNER; J. HOLLINGSWORTH and J. G. MORRIS Jr. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. Am. J. Public Health **86** (8): 1142-1145.

TOTH I.; M. L. COHEN; H. S. RUMSCHLAG; L. W. RYLEY; E. H. WHITE; J. H. CARR; W. W. BOND and I. K. WACHSMUTH (1990). Influence of the 60-Megadalton plasmid on adherence of *Escherichia coli* O157:H7 and genetic derivatives. Infec. Immun. **58** (5): 1223-1231.

UHITIL S.; S. JAKSIC; T. PETRAK and K. BOTKA-PETRAK (2001). Presence of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and ground baby beef meat. J. Food Protect. **64** (6): 862-864.

VELAUDAPILLAE, T.G., R. NILES, AND W. NAGARATNUM (1969). *Salmonellae, Shigellae* and *Enteropathogenic Escherichia coli* in Uncooked Food. J. Hyg. **67**:187-191

YOSHIMURA K.; J. FUJII; A. TANIMOTO; T. YUTSUDO; M. KASHIMURA and S-I. YOSHIDA (2000). effects of shiga toxins 2 on lethality, fetuses, delivery; and puerperal behavior in pregnant mice. *Infect. Immun.* **68** (4): 2254-2258.

WANDERSMAN C. and P. DELEPELAIRE (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. Genetics* **87**: 4776-4780.

WANG G.; T. ZHAO and M. P. DOYLE (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(7): 2567-2570.

WATANABE Y.; K. OZASA; J. H. MERMIN; P. M. GRIFFIN; K. MASUDA; S. IMASHUKU and T. SAWADA (1999). Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. . <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no3/watanabe.htm>

WATERS, J. R., J. C. M..SHARP, AND U. J. DEU (1994). Infection caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Alberta, Canada: and in Scotland: A five-year review, 1987-1991. *Clin. Infect. Dis.* **19**:834-843.

WELLS J. G.; B. R. DAVIS; I. K. WACHSMUTH; L. W. RILEY; R. S. REMIS; R. SOKOLOW and G. K. MORRIS (1983). Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreak associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.* **18**(3):512-520.

WILSON J. B.; R. C. CLARKE; S. A. REMWICK; K. RAHN; R. P. JOHNSON; M. A. KARMALI; H. LIOR; D. ALVES; C. L. GYLES; K. S. SANDHU; S. A. MCEWEN and J. S. SPIKA (1996). Vero cytotoxigenic *Escherichia coli* infection in dairy farm families. *J. Infect. Dis.* **174**(11): 1021-1027.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1997). Foodborne disease-possibly 350 times more frequent than reported.<http://www.who.int/archives/inf-pr-1997/en/pr97-58.html>

ZHAO T. And M. P. DOYLE (1994). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *Food Protect.* **57** (9): 780-783.

# APENDICE

## MEDIOS DE CULTIVO

### 1. Agua peptonada amortiguada

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona	1.0
Agua destilada	1000 mL

#### PREPARACIÓN

Disolver la peptona en el agua destilada y ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.1$ , esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

### 2. Caldo Lauril Sulfato

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Lauril Sulfato de sodio	0.1
Peptona de caseína	20.0
Lactosa	5.0
Fosfato dipotásico	2.75
Fosfato monopotásico	2.75
Cloruro de sodio	5.0
pH final	$6.8 \pm 0.2$

#### PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos de ensaye con campanas de Durham en porciones de 10 mL. Esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

### 3. Caldo *Escherichia coli*

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Digerido pancreático de caseína, triptona o caseína	20.0
Lactosa	5.0
Sales biliares No. 3	1.5
Fosfato dipotásico	4.0
Fosfato monopotásico	1.5
Cloruro de sodio	5.0

pH final  $6.9 \pm 0.2$  después de esterilizar

#### PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. De ser necesario ajustar el pH de manera que después de la esterilización el valor sea  $6.9 \pm 0.2$ .

Distribuir en tubos con campana de Durham en porciones de 5 mL. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

### 4. Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI)

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón de res	250.0
Proteasa peptona o polipeptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
Dextrosa	2.0

pH final  $7.4 \pm 0.2$

## PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, distribuir en volúmenes adecuados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

### 5. Agar Mac Conkey Sorbitol

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de gelatina	17.0
Mezcla de peptonas	3.0
Sorbitol	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.001
pH final $7.1 \pm 0.2$	

## PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. mezclar totalmente, después calentar y agitar frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50 °C y distribuir en cajas de Petri estériles.

## 6. Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI)

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón de res	250.0
Proteasa peptona o polipeptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
Dextrosa	2.0
Agar	15.0
pH final $7.4 \pm 0.2$	

### PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Mezclar totalmente, calentar y agitar frecuentemente. Hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Dejar enfriar  $45 - 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  y distribuir en cajas de Petri estériles.

## 7. Agar Base Sangre

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Infusión de corazón de ternera	500
Triptosa	10
Cloruro de sodio	5
Agar	15
pH final $6.8 \pm 0.1$	

### PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes aforando a un litro de agua, calentar si es necesario para disolver totalmente. Esterilizar a 121 °C/15 minutos, dejar enfriar 45 –50 °C y distribuir en cajas de Petri estériles.

#### 8. Base de caldo rojo de fenol

##### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	0.18
pH final	7.4 ± 0.2

### PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, agregar 10 gramos del carbohidrato que se desea utilizar y distribuir en tubos. Esterilizar de 116 a 118 °C (no más de 12 libras de presión) durante 15 minutos.

#### 9. Caldo Rojo de Metilo – Voges Proskauer (RM-VP)

##### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Mezcla de peptonas	7
Dextrosa	5
Fosfato de potasio	5
pH final	6.9 ± 0.2

## PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, mezclarlos perfectamente. Si es necesario calentar un poco hasta disolverlos, distribuir en tubos y esterilizar entre 118 a 121 °C (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos.

### 10. Medio de Movilidad Indol Ornitina (MIO)

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Extracto de levadura	3.0
Peptona de gelatina	10.0
Peptona de caseína	10.0
L-Ornitina	5.0
Dextrosa	1.0
Púrpura de Bromocresol	0.02
pH final	6.8 ± 0.1

## PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar hasta disolver completamente. Se distribuye en tubos en proporciones de 5 mL y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

## 11. Agra Hierro y Triple Azúcar (TSI)

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Mezcla de peptonas	20.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Dextrosa	1.0
Sulfato de amonio férrico	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo de fenol	0.025
Agar	13.0
pH final	$7.4 \pm 0.1$

### PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Se distribuye en tubos y se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm.

## 12. Caldo Urea

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Fosfato monopotásico	0.091
Fosfato disódico	0.095
Extracto de levadura	0.1
Urea	20.0
Rojo de fenol	0.01
pH final $6.8 \pm 0.2$	

### PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada sin calentar y se pasa a través de un filtro bacteriológico estéril. Se distribuye en tubos estériles. También se puede esterilizar el medio en autoclave de 5 a 8 libras de presión durante 15 minutos.

## 13. Agar Citrato de Simmons

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Fosfato deshidrogenado de amonio	1.0
Fosfato dipotásico	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Agar	15.0
Azul de Bromotimol	0.08
pH final $6.9 \pm 0.2$	

## PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar, agitar frecuentemente hasta ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

### 14. Agar Hierro Lisina (LIA)

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de gelatina	5.0
Extracto de levadura	3.0
Dextrosa	1.0
L-Lisina	10.0
Citrato de hierro y amonio	0.5
Tiosulfato de sodio	0.04
Púrpura de Bromocresol	0.02
Agar	13.5
pH final	6.7 ± 0.2

## PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar, agitar frecuentemente hasta ebullición durante un minuto. Distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada.

## 15. Agar Movilidad Nitrato

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de carne	5.0	
Nitrato de potasio		1.5
Extracto de carne	3.0	
Agar	3.0	
pH final $7.2 \pm 0.2$		

### PREPARACIÓN

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar hasta que se disuelvan perfectamente, distribuir en tubos. Esterilizar a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

## 16. Medio Mínimo Esencial

### FORMULACIÓN

Medio Mínimo Esencial 10X	50 mL
Regulador de pH HEPES 1M pH $7.3 \pm 0.01$ estéril	5 mL
Glutamina estéril 200mM (X100) [29.2 mg/mL de glutamina en NaCl 0.85 %]	5 mL
Bicarbonato de sodio al 7.5 % estéril	5 mL
Agua desionizada estéril	450 mL

### PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se colocan todos los ingredientes en un frasco de tapón de rosca estéril y se almacenan en refrigeración hasta su uso. Al usarse se suplementa con la cantidad de suero fetal bovino deseada.

## 17. Medio F-12

### FORMULACIÓN

Medio F-12 10X	50 mL
Regulador de pH HEPES 1M pH 7.3 ± 0.01 estéril	5 mL
Glutamina estéril 200mM (X100)	
[29.2 mg/mL de glutamina en NaCl 0.85 %]	5 mL
Bicarbonato de sodio al 7.5 % estéril	5 mL
Agua desionizada estéril	450 mL

### PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se colocan todos los ingredientes en un frasco de tapón de rosca estéril y se almacenan en refrigeración hasta su uso. Al usarse se suplementa con la cantidad de suero fetal bovino deseada.

## 18. Caldo triptona al 1 %

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Triptona-peptona	10.0
------------------	------

### PREPARACIÓN

Se disuelve la triptona-peptona en el agua, se distribuye en tubos y se esteriliza 15 minutos/ 121 °C/ 15 libras de presión. Posteriormente en condiciones de esterilidad se le adiciona la manosa antes de inocular los tubos.

## REACTIVOS

### 1. Reactivo de Kovac's

#### COMPOSICIÓN

p-dimetil-aminobenzaldehido	5 g
Alcohol amílico	75 mL
Ácido clorhídrico concentrado	25 mL

#### PREPARACIÓN

Disolver el p-dimetil-aminobenzaldehido en el alcohol amílico y después agregar el ácido clorhídrico lentamente. Conservar en un frasco ámbar.

### 2. Solución de alfa naftol

#### COMPOSICIÓN

Alfa naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

#### PREPARACIÓN

Disolver el alfa naftol en el alcohol etílico absoluto. Almacenar en frascos ámbar.

### 3. Solución de hidróxido de potasio al 40%

#### COMPOSICIÓN

Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada	100 mL

### PREPARACIÓN

Colocar en un matraz aforado de 100 mL, el hidróxido de potasio y aproximadamente la mitad del agua destilada, disolver y agregar agua destilada hasta aforar a 100 mL. Almacenar en frascos ámbar.

#### 4. Solución de rojo de metilo

##### COMPOSICIÓN

Rojo de metilo	0.10 g
Alcohol etílico	300 mL
Agua destilada	500 mL

##### PREPARACIÓN

Disolver el rojo de metilo en el agua destilada y agregar el alcohol etílico. Almacenar en frascos ámbar.

#### 5. BACTO® E. COLI O Antisuero O157 (Difco)

#### 6. BACTO® E. COLI H Antisuero H7 (Difco)

#### 7. Solución de Pucks

##### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESIONIZADA

Cloruro de sodio	8.0
Cloruro de potasio	0.40
Bicarbonato de sodio	0.35
EDTA	0.336
Agua desionizada estéril	1000 mL

### PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se disuelven una por una cada una de las sales en el orden en que se listaron, la solución se filtra en filtro de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  colectándose en un frasco de tapón de rosca estéril. Se conserva en refrigeración.

#### 8. Manosa al 10 %

##### FORMULACIÓN

Manosa	10 g
Agua desionizada estéril	100 mL

##### PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se disuelve la manosa en el agua, la solución se filtra en filtro de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  colectándose en un frasco de tapón de rosca estéril. Se conserva en refrigeración.

#### 9. Solución de gentamicina

##### FORMULACIÓN

Gentamicina	90 mg
Agua desionizada estéril	10 mL

##### PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se disuelve la gentamicina en el agua y se conserva en un frasco de tapón de rosca en refrigeración.

## 10. Solución de lisozima

### FORMULACIÓN

Lisozima	300 mg
Agua desionizada estéril	10 mL

### PREPARACIÓN

En condiciones de esterilidad se disuelve la lisozima en el agua y se conserva en un frasco de tapón de rosca a -20 °C.

## 11. Solución reguladora de fosfatos (PBS)

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESIONIZADA

Cloruro de sodio	8.0
Cloruro de potasio	0.2
Fosfato de sodio dibásico	1.15
Fosfato de potasio monobásico	0.2

### PREPARACIÓN

Se disuelven cada uno de los ingredientes y antes de aforar con el agua se ajusta el pH a  $7.2 \pm 0.2$ . Posteriormente se esteriliza 15 minutos/ 121 °C/ 15 libras de presión.