



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO EN CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS

ÀREA ACADÈMICA DE QUÌMICA

Frecuencia de coliformes totales, coliformes termotolerantes, Escherichia coli genérica y grupos patógenos de E. coli en queso, jitomate y hongos zetas

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

Gladys Marina Viveros Valdez

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER CASTRO ROSAS



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Javier castro Rosas, Director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de los Profesores: Dr. Alberto José Gordillo Martínez, Dra. Alma Delia Román Gutierrez, Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa, Dr. José Roberto Villagómez Ibarra, Q.A. Israel Oswaldo Ocampo Salinas y Q.A. Andrés García Guerrero, me encuentro en deuda por el ánimo infundido y la confianza en mí depositada.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia.

A Dios por permitirme llegar hasta donde he llegado.

.
A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	II
INDICE DE TABLAS	V
INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE ANEXOS	VIII
ABREVIATURAS	IX
	1
I. INTRODUCCIÓN	
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Microbiología de las frutas y verduras	3
2.2 Enfermedades asociados al consumo de verduras	4
2.3 Fuentes y mecanismos de contaminación de frutas y verduras	7
2.4 Organismos coliformes	9
2.4.1 Características generales	9
2.4.2 Significado en los alimentos	9
2.5 Coliformes termotolerantes	10
2.5.1 Características generales	10
2.6 <i>Escherichia coli</i>	10
2.6.1 Características generales	10
2.6.2 <i>Escherichia coli</i> patógena	11

2.6.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (ECEP)	13
2.6.2.2 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (ECEH)	14
2.6.2.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (ECEI)	15
2.6.2.4 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (ECAG)	16
2.6.2.5 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET)	17
2.6.2.6 <i>Escherichia coli</i> enteroadherente (ECEA)	19
2.7 Comportamiento y sobrevivencia de <i>E. coli</i> patógena en verduras	20
2.8 Técnicas para identificación de grupos patógenos de <i>E. coli</i>	21
2.9 Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	22
2.9.1 Generalidades	22
2.9.2 Ventajas de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa	28
III. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos específicos	29
IV. METODOLOGÍA	30
4.1 Equipo	30
4.2 Material de laboratorio	30
4.3 Medios de cultivo	31
4.4 Reactivos	32
4.5 Procedimientos	32
4.5.1 Recolección de la muestra	32
4.5.2 Análisis microbiológico	33

4.5.2.1 Preparación de la muestra	33
4.5.2.2 Cuantificación de organismos coliformes	
Termotolerantes.	33
4.5.2.3 Identificación y cuantificación de <i>Escherichia coli</i>	33
4.6 Identificación de <i>Escherichia coli</i> patógena	34
4.6.1 Extracción de Acido Desoxirribonucleico	34
4.6.1.1 Mezcla para la Reacción en Cadena de la Polimerasa	36
4.6.1.2 Obtención de mezcla de iniciadores	36
4.6.1.3 Preparación de desoxiribonucleótidos trifosfato	37
4.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa y electroforesis	37
V RESULTADOS Y DISCUSION	41
6.1 Estudios de frecuencia de microorganismos Coliformes totales, <i>Escherichia coli</i> y <i>Escherichia coli</i> patógena	41
VI CONCLUSIONES	53
VII BIBLIOGRAFÍA	54
VIII ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Página
1 Agente etiológico identificado en brotes de enfermedades asociadas al consumo de frutas y verduras en los E.UA. de 1988-1997.	5
2 Brotes reportados de enfermedades por consumo de frutas y verduras en E.U.A. de 1983-1997.	6
3 Incidencia y casos de brotes causados por <i>Escherichia coli</i> en Japón.	12
4 Incidencia y casos de brotes causados por <i>Escherichia coli</i> en Cuba	12
5 Incidencia y casos de brotes causados por <i>Escherichia coli</i> en Estados Unidos.	13
6 Iniciadores para <i>Escherichia coli</i> diarrogénicas	32
7 Genes de pares de iniciadores	37
8 Orden de la reacción para la Reacción en Cadena de la Polimerasa	38
9 Programa del Termoreciclador utilizado para la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	39
10 Frecuencia de Coliformes totales, <i>Escherichia coli</i> y <i>Escherichia coli</i> patógena en quesos frescos	42
11 Valores mínimos, medianas y máximos de Coliformes Totales, <i>Escherichia coli</i> y <i>Escherichia coli</i> patógena en quesos frescos.	43
12 Frecuencia de Coliformes totales, <i>Escherichia coli</i> y <i>Escherichia coli</i> patógena en hongos zetas	44

13 Valores mínimos, medianas, medias y máximos de Ct,, E. coli y E. coli patógenas encontrados en hongos zetas	44
14 Resumen de microorganismos encontrados en los alimentos analizados	45
15 Concentración y tipo de E.coli patógenas identificada en los alimentos analizados	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página
1 Reacción en cadena de la polimerasa	24
2 Esquema de la identificación de grupos patógenos de Escherichia coli	36
3 Gel de agarosa después de una electroforesis	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos No.	Pàgina
1. Càlculos para resuspender iniciadores	61
2. Preparaciòn de dNTP`s	63

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BMA	Bacterias mesófilas aerobias
°C	Grado centígrado
Ct	Coliformes totales
ETAs	Enfermedades transmitidas por los alimentos
ECEA	<i>Escherichia coli enteroadherente</i>
ECEG	<i>Escherichia coli enteroagregativa</i>
ECEH	<i>Escherichia coli enterohemorrágica</i>
ECEI	<i>Escherichia coli enteroinvasiva</i>
ECEP	<i>Escherichia coli enteropatógena</i>
ECET	<i>Escherichia coli enterotoxigénica</i>
EMB	Agar eosina de azul de metileno
DMI	Dosis mínima infectante
g	Gramo
h	Hora
IMVIC	Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato
Kb	Kilobites
min	Minutos
μL	Microlitro
ml	Mililitro
MPM	Marcador de peso molecular
NMP	Número más probable
±	Más/menos

%	Por ciento
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
pH	Concentración de hidrogeniones
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonia

Nucleótidos

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timin

I. INTRODUCCIÓN

Se reconoce que las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son un problema de salud pública en todos los países aún en los desarrollados. La mayoría de estos padecimientos son producidos por microorganismos patógenos y toxigénicos. Se presentan como resultado del efecto tóxico producido por los metabolitos microbianos generados durante el crecimiento de los microorganismos en los alimentos antes de su ingestión (intoxicación estafilocócica y botulismo), otros mediante la ingestión de algunas células de los microorganismos patógenos (*Salmonella*, por ejemplo); otros por el contrario, necesitan la ingestión de un número elevado de gérmenes que esporulan en el tracto digestivo y liberan la toxina (intoxicación por *Clostridium perfringens*). Aunque los alimentos que con mayor frecuencia se involucran en los brotes de ETAs son de origen animal, se ha observado que los alimentos como las frutas y verduras también están participando como vehículos en brotes de ETAs. De hecho en la actualidad se ha incrementado el consumo de frutas y verduras debido a que son consideradas como saludables y por su aporte nutricional al humano, sin embargo, correlativamente se ha presentado un incremento en los brotes asociados al consumo de frutas y verduras (Fernández E. 2000).

Los vegetales frecuentemente son consumidos crudos; desafortunadamente con una alta frecuencia estos productos no son sometidos a un tratamiento de desinfección eficiente que asegure la eliminación de los patógenos potencialmente presentes, en consecuencia existe riesgo de infección con microorganismos patógenos a los consumidores. Esto puede dar como

resultado un incremento de brotes por consumo de frutas o verduras crudas.

Una forma de contribuir a la solución del problema de la inocuidad en las frutas y verduras es conocer el tipo y frecuencia de microorganismos patógenos potencialmente presente en ellas. Con esta información será posible entonces detectar o identificar las potenciales fuentes de contaminación de las frutas y verduras con microorganismos patógenos para eliminarlas. Para investigar la frecuencia de microorganismos patógenos en los alimentos comúnmente se emplean técnicas que en la parte final del estudio, involucran la identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas. Sin embargo, estas pruebas por lo general son numerosas y se requiere en ocasiones hasta 10 días para finalizar la investigación. La utilización de novedosas técnicas en la identificación de microorganismos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado con éxito en la identificación rápida y precisa de bacterias, hongos y virus (Fernández E. 1981, 2000).

En México, se ha reportado que los grupos patógenos de *E. coli* se encuentran dentro de los principales agente patógenos que se aíslan de pacientes con cuadros de gastroenteritis en la mayoría de hospitales. Esto es un indicativo de la importancia que se les debe tener a estos agentes como causa de enfermedad. Por desgracia, existe limitada información sobre la frecuencia de estos agentes patógenos en los alimentos que consumimos en México o en aquellos que se exportan. A consecuencia el objetivo de este trabajo es investigar la frecuencia de algunos microorganismos patógenos e indicadores de higiene en alimentos producidos en el municipio de Acaxochitlán.

II. ANTECEDENTES

2.1 Microbiología de las frutas y verduras

Las frutas suelen tener una cubierta externa que les protege del ingreso de microorganismos, sus características físicas, estructurales, composición química y origen, son determinantes para su contenido cualitativo y cuantitativo de microorganismos. Así mismo el contenido de microorganismos patógenos en las verduras depende también de las prácticas que se sigan en la fertilización de la tierra y las condiciones sanitarias durante la cosecha de los productos. Pueden identificarse diversos microorganismos intestinales, su origen puede ser el uso de aguas negras para riego sin tratar, fecalismo al aire libre, acceso de animales o uso de materia fecal sin tratar como fertilizante. La población microbiana se localiza fundamentalmente sobre las partes externas de frutas y verduras, en gran medida, la flora microbiana de estas hortalizas refleja el ambiente en el cuál se cultivaron. Así, las verduras pueden contener diversos microorganismos intestinales: bacterias, virus, quistes y huevecillos de parásitos (Díaz y Vernon, 1999, Fernández, 2000).

Es importante destacar que el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos en hortalizas no se limita únicamente a su presencia en el alimento, está además en función de la capacidad de los microorganismos para sobrevivir y proliferar en la tierra y sobre las verduras (Moreno, 1994).

Una diversidad de microorganismos pueden encontrarse en las verduras ya sea como flora nativa o bien como contaminantes, y dentro de éstos, son comunes los de origen fecal. (Monge y Chinchilla 1996) reportan niveles elevados de *E. coli* en verduras crudas procedentes de mercados: para Col 2-3

Log₁₀ NMP/g, 3 Log₁₀ NMP/g para zanahoria, 3-6 Log₁₀ NMP/g para hojas de cilantro y 1-2 Log₁₀ NMP/g para jitomates.

En estudios realizados sobre brócoli, zanahoria, pepino, lechuga, jitomate, papas y chícharo, se han encontrado una diversidad de géneros y especies bacterianas tanto bacterias gram negativas como positivas y hongos; dentro de las gram negativas se ha aislado: *Enterobacter* (*E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans*), *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. amalonticus*), *Hafnia alves*, *Erwina carotovora*, *Pseudomonas spp*, *Flavobacterium sp*, *Proteus sp*, *Klebsiella sp*, *Xanthomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Serratia sp* *A. hydrophila* ., entre los gram positivos destacan: *Lactobacillus sp*, *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*), *Bacillus* (*B. cereus*, *B. licheniformis*) y *Micrococacea* (Gaeson, 1979; Senter y col., 1984; Senter y Col, 1987; Brackett, 1988; Hayward, 1974). Los hongos aislados han sido: *Alternaria spp*, *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sp* y *Penicillium sp*, *Alternaria tenuis*, *A. pullulans*. (Fernández, 2000).

2.2 Enfermedades asociados al consumo de verduras

Debido a la forma de cultivo de los vegetales, teóricamente cualquier fruto o verdura puede ser vehículo de bacteria, virus o parásitos patógenos al hombre. De hecho, se han registrado brotes de enfermedad provocados por diferentes microorganismos. Los principales microorganismos de interés en la inocuidad de las verduras crudas y mínimamente procesadas son: *E. coli* O157:H7, *Campylobacter*, *L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Shigella*, *Salmonella*, parásitos y virus, *A. hydrophila*, *B. cereus*, *P. shigelloides* y *Y.*

enterocolítica (Fernández, 2000).

Es importante resaltar el hecho de que en los últimos años *E. coli* muestra un sensible incremento en la producción de brotes de enfermedad (Tabla 1). En general de 1993-97 (Tabla 2) se muestra un incremento en brotes causados por el consumo de frutas y verduras pero de todos los agentes aquí mencionados, los brotes causados por *E. coli* han sido los que más incremento presentaron.

Tabla 1. Agentes etiológico identificado en brotes de enfermedades asociados al consumo de frutas y verduras. Estados Unidos 1988-1997

Agente	1988-92	1993-97
<i>Campylobacter</i>	1	4
<i>C. botulinum</i>	23	6
<i>Salmonella</i>	9	13
<i>V. cholerae</i>	2	0
<i>E. coli</i>	0	7
<i>Shigella</i>	0	2
<i>S. aureus</i>	0	1
<i>G. lamblia</i>	2	0
Otros parásitos	0	4
Virus hepatitis	4	2
Otros virus	0	2
Desconocido	23	25
Total	64	66

(Fernández, 2000).

También es interesante mencionar que el número de víctimas asociadas al consumo de frutas y verduras se incrementò para el último periodo. Es común observar un incrementò en el número de ETAs en la época de verano, el hecho se asocia a un elevado consumo de verduras y frutas frescas en las poblaciones.,

Tabla 2. Brotes reportados de enfermedades por consumo de frutas y verduras. Estados Unidos 1983-1997

Año	Brotes	% del total de todos los alimentos
1983	13	5.5
1984	8	3.4
1985	18	8.1
1986	16	7.9
1987	4	2.6
1988	14	3.1
1989	21	4.2
1990	15	2.8
1991	12	2.3
1992	2	0.5
1993	12	2.5
1994	17	2.6
1995	9	1.4
1996	13	2.7
1997	15	3

(Fernández 2000).

La forma en que se obtienen las frutas y verduras del campo, comercializan, preparan y consumen, pone de manifiesto un alto nivel de riesgo de contaminación por microorganismos patógenos; bacterias enteropatógenas como *E. coli* O157:H7, *C. jejuni*, *L. monocytogenes* y *V. cholerae*, virus, protozoarios y helmintos, son transmisibles a través del consumo de frutas y verduras que se comen crudas (Díaz y Vernon, 1999).

Aún en países desarrollados que suelen proteger los cultivos contra la contaminación fecal, se han reportado brotes en la población. Por ejemplo 47 personas que consumieron ensaladas de verduras crudas a bordo de un aerotransporte de EUA, sufrieron una infección por *E. coli* enterotoxigénica

(Beuchat, 1996). En este país también se tienen registros de infección por *E. coli* O157:H7 asociada al consumo de frutas y verduras crudas o insuficientemente cocidas (Beuchat, 1996).

Desde 1990 se han reportado varios brotes de enfermedades en EUA asociados a jugos no pasteurizados que incluyen: jugo de manzana, jugo de naranja, jugo de sandía y jugo de zanahoria (FDA, 2000). La FDA (Food and Drug Administration) calcula que aproximadamente cada año hay entre 16,000 y 48,000 casos de enfermedades transmitidas por alimentos involucradas por el consumo de jugos no pasteurizados contaminados por microorganismos patógenos (FDA, 2000). En 1991 se reportó un brote por el virus *Norwalk* asociado al consumo de jugo de naranja (Buckle, 1995). En otros incidentes, *E. coli* O157:H7 fue transmitida por jugo de manzana no pasteurizado, provocando enfermedad a más de 70 personas en EUA y Canadá (FDA, 2000). Y también por ese tipo de jugos ocurrió un brote de criptosporidiosis con 20 casos en EUA (Fernández, 2000).

2.3 Fuentes y mecanismos de contaminación de frutas y verduras

La mayoría de las frutas, así como las verduras, son consideradas cada vez más como alimentos propios de una alimentación saludable. No obstante, su consumo puede provocar enfermedades de etiología microbiana. Uno de los principales problemas se relaciona con la elevada contaminación derivada de su producción (Haward, 1999).

Las superficies de las frutas se contaminan con frecuencia con heces de insectos, aves o con tierra del suelo. La mayoría de las frutas poseen

contaminación superficial procedente de las zonas de cultivo, de las manos y de los utensilios empleados durante la recolección y del ambiente en general. El principal problema que plantean no es, entonces, la simple contaminación, sino que en algún momento han de pasar al interior del producto, para posteriormente multiplicarse o vehicularse directamente hacia los consumidores. En este sentido, la manipulación que se realiza antes de su consumo parece que puede ser una de las etapas a tener más en cuenta. Recientes investigaciones relacionan el consumo de frutas o verduras con el origen de múltiples infecciones de origen alimentario, especialmente de etiología vírica y bacteriana por microorganismos patógenos habituales del intestino de animales y/o humanos. Se trata de un problema especialmente significativo en las zonas turísticas puesto que se ha visto que una de las vías más frecuentes es el paso de esta contaminación, a través de las manos de los manipuladores que están en etapas iniciales de la infección o que son portadores asintomáticos, hacia la fruta en el momento de su preparación o troceado. El origen de los procesos de infección alimentaria por virus se debe a que éstos poseen una tasa de ataque muy baja, es decir, unas pocas partículas son suficientes para desencadenar un brote, mientras que las bacterias suelen encontrar un sustrato rico que les permite proliferar hasta alcanzar elevados niveles en función de la temperatura de conservación y del tiempo transcurrido desde la preparación hasta el consumo.

Como solución a estos padecimientos alimentarios se ha planteado la higienización obligatoria de las verduras que incluye el uso de diversas sustancias limpiadoras y desinfectantes que permitan eliminar tanto los virus

como las bacterias (Fernández, 2000).

2.4 Organismos coliformes

2.4.1 Características generales

Los organismos coliformes son bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que producen gas y ácido a partir de lactosa dentro de 24-48 horas de incubación a 35°C. Se trata de una definición totalmente convencional que pretende involucrar bacterias de hábitat típicamente intestinal, no obstante existen microorganismos que satisfacen la definición pero que tienen hábitat extraintestinal (Acevedo y col., 2001).

2.4.2 Significado en los alimentos

Los organismos coliformes son el grupo indicador de mayor tradición en la microbiología sanitaria. Es importante destacar que los organismos coliformes únicamente se relacionan con contaminación fecal reciente cuando se encuentran en agua limpia. Esto, se fundamenta en el hecho de encontrarse en el intestino de los animales de sangre caliente en mayor número que las bacterias patógenas, siendo incapaces de multiplicarse en aguas limpias. Su presencia en el agua no indica obligatoriamente la existencia de un patógeno. La presencia de coliformes en muchos alimentos, especialmente en aquellos que han recibido tratamiento térmico, sugiere contacto con materiales sucios y no necesariamente implica un riesgo a la salud (Fernández, 1981).

2.5 Coliformes termotolerantes

2.5.1 Características

Desde el surgimiento de éste grupo microbiano se ha empleado el término “coliformes fecales” para designarlos, sin embargo, recientemente diversas instituciones e investigadores han sugerido que tal término sea cambiado ya que se crea confusión debido a que el solo término da idea de contenido intestinal en los alimentos, lo cual no es verdad. El nombre actual sugerido es el de coliformes termotolerantes (BAM, 2001; Fernández, 2000). Los coliformes termotolerantes forman un grupo microbiano reducido. Son gram negativos no esporulados capaces de utilizar la lactosa con formación de gas. Este grupo está formado por aquellos microorganismos con semejantes características que los organismos coliformes la única diferencia que los termotolerantes fermentan lactosa con producción de gas a 44-45°C dentro de las 24-48 horas de incubación. Dentro de los coliformes termotolerantes se encuentra *E. coli* (Fernández, 1981).

Los coliformes termotolerantes se aíslan con frecuencia de la materia fecal pero no son exclusivos de ella; un porcentaje considerable de coliformes termotolerantes tienen como hábitat el agua, el suelo y las plantas (Marier y col., 1973).

2.6 *E. coli* (Características generales)

Escherichia coli fue descrita por primera vez en 1885 como bacteria indicadora de contaminación fecal en los alimentos. En los 40s se señaló por primera vez como causa de brotes intrahospitalarios de diarrea en niños.

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra generalmente en los

intestinos animales, incluido el humano y, por ende, en las aguas negras. Es un parásito normal en el contenido intestinal de animales superiores y del hombre. Fue descrita por primera vez en "Theodor von Escherich" Theodor von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor (Harris y Wells, 1985).

Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Además produce vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la "Tinción de Gram" anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa y su prueba de "IMVIC" es ++-.

Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular (Hussein y Sakuma, 2005).

2.6.1 *E. coli* patógena

Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas existen algunas cepas con potencial patógeno. Las cepas responsables de patología se han venido describiendo desde la década de los años 40s bajo la denominación de *Escherichia coli enteropatógena* clásica (ECEP clásica). Con posterioridad, se han ido añadiendo a este grupo otras cepas igualmente patológicas que causan enteritis por un mecanismo invasor rigurosamente idéntico al de las *shigelas*, el microorganismo responsable de la disentería bacilar.

Aparte del potencial patógeno, una de las diferencias principales desde el punto de vista fisiológico de las cepas patógenas con las no patógenas, es la

limitada capacidad de las patógenas para fermentar la lactosa. Varía desde una negatividad hasta una fermentación lenta (más de 48 h.) o positiva a 37°C pero negativa a 44.5°C. Actualmente se reconocen 6 grupos de *E. coli* patógena que dan lugar a diversos padecimientos. Entre estos existen diferencias clínicas y epidemiológicas, así como en la estructura antigénica y mecanismos de patogenicidad de los diferentes grupos (Haward 1900).

La combinación de letras y números en el nombre de la bacteria se refiere a los marcadores específicos que se encuentran en su superficie y la distingue de otros tipos de *E. coli*. Se distinguen seis cepas según su poder patógeno (Fernandez 1981).

De manera general, en las tablas 3 a 5 podemos observar la incidencia y casos de ETAs causados por *E. coli* en diferentes países.

Tablas 3. Incidencia y casos de brotes causados por *E. coli* en Japón

País	1987		1988		1989		1990		1991	
	Incidentes	casos	Incidentes	casos	Incidentes	casos	Incidentes	casos	Incidentes	casos
Japón	15	1,616	17	1,756	29	4,736	19	6,135	30	4,445

(Fernández, 2000)

Tablas 4. Incidencia y casos de brotes causados por *E. coli* en Cuba

País	Incidentes					Media anual
	1984	1985	1986	1987	1988	
Cuba	9	6	3	10	7	7

(Fernández, 2000)

Tablas 5. Incidencia y casos de brotes causados por *E. coli* en Estados Unidos

País	1982-1988		1993-1997	
	Incidentes	casos	Incidentes	casos
Estados Unidos	11	244	84	3260

(Fernández, 2000)

2.6.1.1 *E. coli* enteropatógena (ECEP)

Este grupo fue primeramente identificado en los años 40s. El hombre es el reservorio importante del grupo, su patogenicidad se observa en recién nacidos, especialmente en hospitales. La transmisión ocurre a través de alimentos contaminados o directamente siguiendo la ruta ano-mano-boca. La enfermedad en los niños se caracteriza por diarrea acuosa, en ocasiones vomito y fiebre baja. En menores de 6 meses la condición puede prolongarse por más de 14 días y terminar letalmente (Fernández, 2000).

Su capacidad para producir enfermedad esta determinada por factores de virulencia que le permiten infectar a sus huéspedes y sobreponerse a los mecanismos de defensa, como la producción de adhesinas, enterotoxinas, citotoxinas y otras proteínas que le permiten al microorganismo sobrevivir en condiciones ambientales adversas. La ECEP es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vía de desarrollo (Nataro y Kaper, 1998). La ECEP interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como “adherencia / destrucción” o

lesión A/E (“attaching and effacing”) (Kaper, 1998). En la producción de la lesión A/E por ECEP, se observan cambios importantes en el citoesqueleto de la célula hospedera, los cuales incluyen a la acumulación de actina polimerizada formando una estructura parecida a una copa o pedestal (Knutton y col., 1989; Donnenberg y col., 1997). La adherencia inicial está relacionada a la producción de la fimbria BFP (“B undle F orming P ilus”), el cual se requiere para la producción de diarrea por ECEP. La expresión de la fimbria BFP de ECEP, codificada en el operón bfp, responde positiva o negativamente a señales ambientales que pudieran encontrarse en el hospedero y determinar la adherencia bacteriana a la superficie de las células del epitelio intestinal. La regulación coordinada de estos genes involucrados en la patogénesis es una necesidad importante para la adaptación de las bacterias patógenas a los diferentes ambientes encontrados dentro del hospedero durante la infección. Los serogrupos más comunes incluidos entre estas cepas patógenas son: 055,086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128ab y 0142 (Benson, 1990).

El lavado escrupuloso de las manos acompañado de desinfección completa es una medida primaria de prevención de las infecciones en las personas que manejan recién nacidos, así como la protección de las fuentes de agua contra la contaminación de materia fecal directa o descargas de aguas negras, igualmente la desinfección sistemática del agua a base de cloro o un agente germicida efectivo (Fernández, 2000).

2.6.1.2 *E. coli* enterohemorrágica u O157:H7 (ECEH)

Es similar a la *E. coli* típica, fermenta la lactosa, pero no el sorbitol dentro de 48

h. (Farmer y Davis, 1985), mientras el 93% de las cepas de *E. coli* ordinarias lo hacen. Tampoco produce glucoronidasa (Thompson y col, 1990), ampliamente utilizada para identificar *E. coli*, no crece a 44 °C. Las cepas del serovar O157:H7 son muy homogéneas, como corresponde a un patógeno del que hay evidencia que surgió de una clonación.

La *E. coli* O157:H7 fue reconocida inicialmente como causa de enfermedad en 1982 durante un brote de diarrea aguda con sangre; el brote determinó que se debía a hamburguesas contaminadas. Desde entonces, la mayoría de las infecciones han provenido de comer carne de vacuno molida insuficientemente cocinada. (Fernández, 2000).

Este grupo es el más virulento de todas; incluye cepas de *E. coli* con capacidad para dar lugar a procesos infecciosos entre los que destacan como complicación, la colitis hemorrágica (diarrea sanguinolenta severa) y el síndrome uremico hemolítico. Produce verotoxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome hemolítico ureico (lo anterior más infección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocitopénica trombótica (lo de antes más infección del sistema nervioso central) (Fernández, 2000)

2.6.1.3 *E. coli* enteroinvasiva (ECEI)

Este grupo muestra semejanzas bioquímicas y posee antígenos que comparte con *Shigella*. Una porción elevada de cepas de ECEI son anaerogénicas y fermentan la lactosa dentro de 48 h. pueden invadir las células epiteliales del colon, proliferar dentro de ellas y destruirlas. El proceso conduce a una

necrosis con heces fluidas, sanguinolentas y cargadas de moco, aparte de diarrea, la persona afectada puede presentar fiebre y tenesmo, con un cuadro muy similar al de la disentería bacilar, ocasionalmente aparece vomito. El periodo de incubación en los brotes es de 2 a 48 h con mediana de 18. El reservorio natural de este germen es el hombre; no se ha demostrado su presencia entre los animales. Se conocen casos de transmisión directa de persona a persona (Marier y col., 1973). La dosis infectante es de millones de células viables.

Un brote extensivo registrado en EUA, ocurrió en noviembre-diciembre de 1971. Estuvo asociado al consumo de quesos Camembert y Brie importados de Francia. Se tuvo conocimiento de 227 personas enfermas distribuidas en 8 estados y el Distrito de Colombia. La tasa de ataque fue de 94%. Después de un periodo de incubación de 24 horas las personas afectadas mostraron vómito (35%), diarrea (90%), fiebre (73%), dolor abdominal (66%), cefalea y en algunos casos sangre en las heces. La fuente de contaminación se trazó al agua utilizada en la limpieza de la planta procesadora del queso; provenía de un río y el sistema de filtración funcionaba defectuosamente en esa época (Fernández, 2000).

2.6.1.4 *E. coli* enteroagregativa (ECAG)

Los estudios realizados sobre la capacidad adherente de la *E. coli* a células heteroaploides (HEp-2) muestran que, además de la adherencia localizada, existen otros 2 mecanismos: uno llamado difuso, que se produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular, y otro agregativo, que se forma cuando

las bacterias se acumulan en forma de empalizada tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparación. Estudios recientes han definido algunas características de estas cepas, como es el fenómeno de la autoagregación, que está determinado por un plásmido de 55 a 65 mdaltons, que codifica para una fimbria de adherencia, un lipopolisacárido uniforme y una nueva enterotoxina termoestable (TE) denominada toxina enteroagregativa estable (TEAE). Se han detectado algunas cepas que elaboran una segunda toxina termolábil antigénicamente relacionada con la hemolisina de *E. coli*, la cual puede causar necrosis de las microvellosidades, acortamiento de las vellosidades intestinales e infiltración mononuclear de la submucosa. La capacidad de las cepas de ECAG para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano y la producción de una o más de las toxinas descritas, pudiera explicar la persistencia de las diarreas por ellas producidas (Browne y Hartland, 2002).

Se han aislado cepas de ECAG en niños con diarrea con sangre, aunque en la actualidad se desconoce si existen diferentes cepas agregativas relacionadas con diarreas persistentes u otras en relación con diarrea con sangre. Estudios recientes muestran la existencia de una toxina que es capaz de producir lesiones hemorrágicas severas cuando se inoculan ratas con la toxina purificada. Esto pudiera apoyar la capacidad de cepas de ECAG para causar diarrea con sangre en humanos. Estudios realizados en México identifican el 51 % de pacientes con diarrea persistente como portadores de ECAG y sólo el 5 % en niños asintomáticos CHPG (Fernández, 2000).

2.6.1.5 *E. coli* enterotoxigénica (ECET)

Se parece mucho a *V. cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos; afecta principalmente a poblaciones de países en vías de desarrollo, aunque los desarrollados también se ven afectados. Las cepas enterotoxigenicas de *E. coli* suelen corresponder a diversos serogrupos de *E. coli*, en especial: 06, 08, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 080, 085, 0115, 0128, 0139, 0148, 0159 y 0167.

Las cepas de ECET deben su poder patógeno a la producción de enterotoxinas. Una de ellas es termolábil se inactiva a 60° en 30 min. La otra enterotoxina es termoestable, resiste la ebullición durante 30 min. Estas cepas de este grupo patógeno pueden poseer capacidad para colonizar el intestino, este proceso se conforma mediante fimbrias de la bacteria a través de las cuales se adhiere a los enterocitos del intestino delgado proximal. La naturaleza de estas fimbrias hace específico al microorganismo en la colonización de intestinos de animales o del hombre (Krogfelt, 1991).

El cuadro clínico de la infección por este grupo de ECET es similar al del cólera. El periodo de incubación oscila entre 8 y 44 h. El individuo presenta náuseas con moderado dolor abdominal y diarrea, que en casos agudos conduce a una acentuada deshidratación. No hay una respuesta inflamatoria. En niños el cuadro puede ser muy severo e interferir con la absorción de nutrientes. Se estima que en los países en desarrollo los niños suelen padecer entre dos y tres episodios de diarrea con esta etiología por año (Doyle y Cliver, 1990).

En adultos se identifica como un cuadro de gastroenteritis conocido comúnmente como diarrea del viajero, quizá este grupo patógenos sea el responsable del 60-70% de los casos de diarrea del viajero en países en vías de desarrollo como México (Guzewich y col., 1997). La ECET es la mayor causa de síndrome diarreico entre aquellos que se trasladan hacia Latinoamérica, África y Asia (Fernández, 2000). En México se originó un brote causado por ECET debido al desbordamiento del canal de aguas negras en Chalco, en mayo del 2000. De los pacientes que presentaron diarrea y vómito, se realizó el aislamiento e identificación bioquímica de enterobacterias, de las cuales el 0.45% correspondió a *Salmonella* y 76.6% a *E. coli*: 62.2% a ECET (44.6% con LT, 11.2% con ST, 44.1%), 0.84% a ECEI, 0.84% a ECEP, 0.08% a ECEH (CDC, 2000). La dosis infectante calculada en voluntarios humanos, es elevada: 10^5 - 10^6 células (Fernández, 2000, Mainil y Daube, 2005).

2.6.1.6 *E. coli* enteroadherente (ECEA)

Es el grupo de *E. coli* diarrogénico más recientemente conocido, se adhiere a las células epiteliales del colon con fimbrias de adherencia. Produce toxina termolábil y termoestable pero se desconoce el papel que desempeña en la patogenia. También se le denomina *E. coli* enteroaglutinante

No forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha

asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas. Al realizar ensayos *in vitro* en células Hep-2, las cepas ECEA tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo* (Parrilla y col., 1993).

El grupo ECEA se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Fernández, 2000).

2.7 Comportamiento y sobrevivencia de *E. coli* patógena en verduras

Diferentes Investigaciones han mostrado que en general la ECEP, ECET y la ECEH muestran un comportamiento semejante. Sobre jitomate y pepino los tres grupos patógenos se inactivaron paulatinamente, no obstante, sobrevivieron al menos 6 días. En las rebanadas almacenadas a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ en solo 24 h *E. coli* alcanzó una concentración cercana a 9 y 7 Log de UFC/rebanada de jitomate y pepino, respectivamente. Las cepas también se multiplicaron en refrigeración; hasta el quinto día alcanzaron una concentración semejante a la observada a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ en 24 h. En las rebanadas las BMA y las bacterias psicrótrofas desarrollaron entre 1 y 2 log más que *E. coli*. El pH de las rebanadas disminuyó de 2 a 3 unidades durante el almacenamiento. (Rodríguez-Ángeles, 2002).

Se ha reportado *E. coli* patógena es capaz de sobrevivir a temperaturas bajas (Schoeni y Doyle, 1984). ECEH muestra un activo desarrollo entre 30 y 41 °C, con tiempos de generación de 0.49 h. a 37 °C y 0. 64 h. a 42 °C en caldo soya tripticasa (Schoeni y Doyle, 1984). Se destaca su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en ensaladas de verduras crudas. A 5 °C el número de *E. coli* 0157:H7 tiende a disminuir en lechugas y zanahorias, pero a temperaturas mayores de 12 °C la proliferación es activa. La *E. coli* patógena es algo más sensible al calor que la *Salmonella*, no es un germen termodúrico, su concentración disminuye al menos 10⁴ UFC/ml por la pasterización. (Millar y Kaspar, 1994) observaron una tolerancia de cepas de *E. coli* 0157:H7 a valores de pH extremos (2 y 12), ese comportamiento más notable a 4°C que a 25°C , esta tolerancia es un dato de interés primario en el análisis de riesgos para controlar etapas críticas en el procesamiento de los alimentos.

2.8 Técnicas para identificación de grupos patógenos de *E. coli*

Existen diferentes procedimientos para la identificación de los grupos patógenos de *E. coli*, no obstante la gran mayoría de procedimientos se sustenta en identificación a partir de cepas puras aisladas en un medio de cultivo. La colonia del microorganismo se pueden identificar mediante diferentes procedimientos tales como:

1. Reacciones bioquímicas y/o de serotipo.
2. Reacciones inmunoenzimáticas (ELISA)
3. Reacciones en cultivos celulares
4. Fagotipificación.

5. Sondas genéticas.

6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

(BAM, 2001).

2.9 Técnica de PCR. Generalidades

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR ("polymerase chain reaction"), es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son: que existan iniciadores (oligonucleótidos) en el medio que son la materia base para fabricar la mezcla de desoxinucleotidos (dNTPs, los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer"). (Beuchat y col., 2001).

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos.

1. Desnaturalización

El primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN que se quiere amplificar, para lo cual se debe calentar el ADN a altas temperaturas que pueden ser próximas a la ebullición., (92-98°C 30 a 90

segundos). Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria.

2. Alineamiento

A continuación se baja la temperatura, (50-60 °C, 30-60 segundos) para conseguir que cada cebador se una a su región específica dentro de la cadena de ADN.

3. Extensión

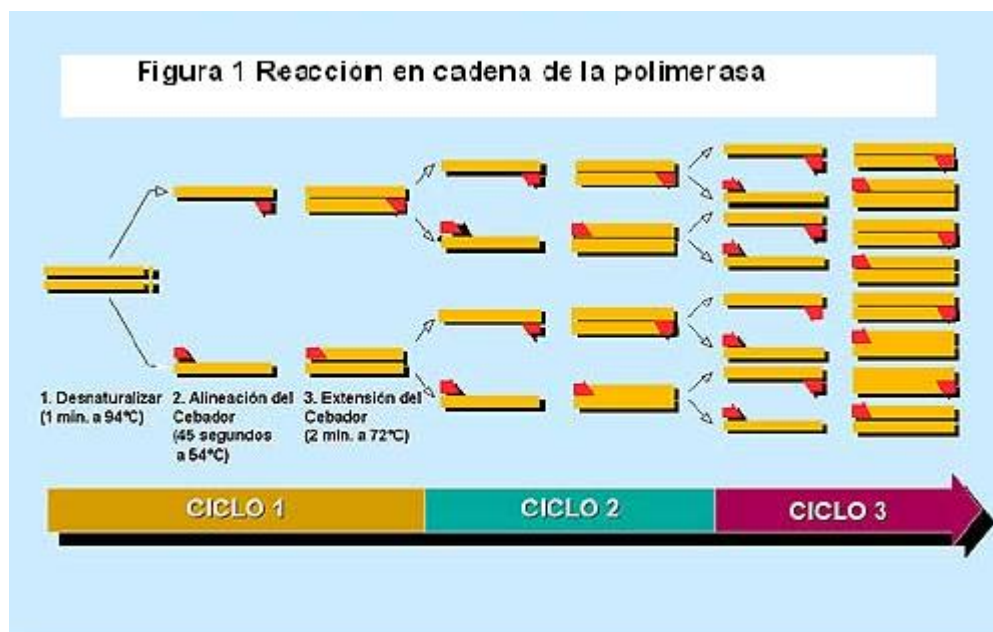
Se aumenta un poco la temperatura en el último paso para propiciar la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la ADN polimerasa, esta extiende la longitud de los iniciadores apareados al DN blanco, al ir polimerizando los desoxinúcleotidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción (Hugo y col., 1998).

El problema con el que se encontraron los científicos que idearon esta técnica es que es preciso aumentar la temperatura de la mezcla de reacción hasta valores de entre los (70-74°C, de 30-90 segundos) para que las dos cadenas de ADN se separen. A estas temperaturas tan elevadas la ADN polimerasa se inactivaba y era preciso añadirla de nuevo en cada ciclo. Esto fue así hasta que se descubrió la bacteria *Thermus aquaticus* que vive en aguas termales y cuya ADN polimerasa (Taq polimerasa) es capaz de trabajar a temperaturas superiores a los 70°C. De esta manera sólo hay que añadir la enzima al inicio del proceso de reacción y llevar a cabo tantos ciclos como sea necesario. Cada

una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias. Así tras 20 ciclos de reacción se puede obtener hasta 1 millón de copias de una molécula de ADN (Barrera-Saldaña y col., 1998).

La siguiente figura muestra simbólicamente la reacción en cadena de polimerasa, se pueden observar los tres pasos de esta reacción y como van incrementando las copias del ADN según el número de ciclos. De este modo en 30 ciclos tenemos millones de copias del segmento de ADN blanco.

Figura 1. Reacción en cadena de la polimerasa



La secuencia de los oligonúcleotidos iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Cuando la temperatura de alineamiento es muy baja existe mayor probabilidad de que los oligonúcleotidos se apareen a regiones no específicas del ADN blanco y pueden también ser

extendidos, ya que la polimerasa Taq posee actividad aun a bajas temperaturas. Utilizando temperaturas de hibridación entre 55 – 65°C se reducen gradualmente los sucesos de apareamiento inespecífico.

En la Tabla 8, (mostrada en el apartado de la metodología) se encuentran los iniciadores para *E. coli* diarrogénicas, es decir cada gen contiene estos pares de bases, ya sea un gen **F** o un gen **R**. se amplifican con ayuda del termociclador y se prepara la mezcla como ya se describió anteriormente. El gen específico identificara el género específico, así: ETEC será identificado por: *lt* y *st*, EPEC será identificado por: *bfpA* Y *egeA*, etc. Como se muestra en dicha tabla. El iniciador deberá tener C o G en el extremo 3' o 5', para darle mayor estabilidad por los puentes de hidrogeno, ya que A-T contiene 2 puentes de hidrogeno y G-C contiene 3 puentes de hidrogeno, por lo que G-C es más estable (Beuchat y col., 2001; Barrera-Saldaña y col., 1998).

Para calcular la temperatura de alineamiento para un par de oligonúcleotidos dado pueden utilizarse varias formulas empíricas, una de ellas es adicionando 2°C por cada A Y T presentes en el oligonúcleotido, y 4°C por cada G y C, sumando los resultados y finalmente restando 5°C . Este será el resultado final, será la temperatura de alineamiento. El contenido de A, T, G o C viene en las especificaciones de los iniciadores a usar.

Para detectar y analizar el producto de una PCR, al finalizar la reacción existen millones de copias del fragmento de interés, por lo que es suficiente con colocar en un gel de agarosa una décima parte del volumen total de la reacción, correr la electroforesis y teñir con bromuro de etidio, para poder

verificar el éxito de la reacción. La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta, ya que se puede hacer a partir de una sola molécula de ADN. Genes de una sola copia en el genoma pueden ser fácilmente amplificados. La concentración de ADN blanco en la reacción depende de la fuente utilizada, e idealmente se requieren aproximadamente 10^5 copias de ADN blanco, esto es, de 300 ng a 1 μ g de ADN genómico humano. En el caso de usarse genes clonados en plásmidos, de 5 a 100 ng de su ADN son suficientes (Barrera-Saldaña y col., 1998).

Magnesio y dNTPs:

La concentración de iones magnesio en la PCR es también determinante en la especificidad e la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, mientras que las concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, por lo que se recomienda optimizar la concentración de MgCl en cada reacción. Para una reacción estándar se recomienda utilizar una concentración final entre 0.5 y 2.5 mM. Si se disminuye demasiado la concentración la actividad de la enzima decae al grado de que algunas veces la amplificación es nula.

Otros inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Por otra parte para solventar el problema de la cuantificación se han generado

unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

La técnica de la PCR ha sido vital para la secuenciación del genoma humano, así como de todos los otros genomas secuenciados hasta el momento. Además, actualmente existen muchas versiones comerciales de test basados en PCR para detectar agentes infecciosos como *Chlamydia trachomatis*, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que causa el SIDA, *Mycobacterium tuberculosis*, y otros muchos. El desarrollo de esta tecnología está siendo aplicado también en la exploración de enfermedades genéticas (ej. la anemia de células falciformes o la fibrosis quística), en pruebas para el cáncer (ej. para

detectar recaídas tempranas), y para determinar si dos individuos son compatibles genéticamente de cara a un trasplante. La llegada de la PCR cuantitativa promete un gran avance en estos test clínicos y de diagnóstico (Barrera, y col.1998).

2.9.1 Ventajas de la técnica de PCR

Entre las ventajas que aporta esta técnica, destacan: rapidez, en sólo tres horas pueden detectarse la presencia de cualquier microorganismo buscado en la muestra; especificidad, ya que con unos cebadores bien elegidos hibridarán exclusivamente con la secuencia del ácido nucleico, lo amplifican y facilitan su detección, y por último sensibilidad, siendo que basta una sola molécula del ácido nucleico para obtener millones de copias de ADN en apenas dos horas de amplificación. Estas tres propiedades hacen de la PCR una técnica rápida, fiable y segura para la detección de microorganismos.

No siendo de menor importancia las siguientes ventajas: no requiere ningún tipo de respuesta por parte del huésped; los microorganismos a detectar no necesitan estar multiplicándose, no es necesario que sean viables o infecciosos. Mediante esta técnica también se puede cuantificar el número inicial de microorganismos existentes en las muestras y a medida que se vaya mejorando, se llegara a la automatización de su realización y lectura. Por estas ventajas la técnica de PCR puede sustituir las técnicas tradicionales.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia y concentración de coliformes termotolerantes, *E. coli* no patógena y grupos patógenos de *E. coli* en quesos frescos, hongos zetas y jitomate obtenidos en el municipio de Acaxochitlán.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia y concentración de coliformes termotolerantes y *E. coli* no patógena en muestras de quesos, hongos zetas y jitomate obtenidos en el municipio de Acaxochitlán.
2. Identificar y cuantificar grupos patógenos de *E. coli* en alimentos obtenidos de Acaxochitlán por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) combinada con la del Numero Mas Probable.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Equipo

- Autoclave (Yamato Sterilizer SM 200)
- Balanza analítica (PC 2000 Mettler Toledo)
- Stomacher 400 Circulator (Seward)
- Incubadora bacteriológica (Blue M)
- Baño maría con circulación de agua; (Riosa)
- Lámpara de luz UV ENF-240C (Spectroline)
- Refrigerador (Lab-line Environeers Inc)
- Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
- Centrífuga (Hérmle Labnet Z 323 K
- Parrilla (BI Thermolyne)
- Termociclador (Bioselec)
- Campana de flujo laminar (Labconco, purifier class II, biosafety labinet)
- Cámara de electroforesis (Pharmacia biotech, GNA100)
- Fuente de poder para electroforesis (Amershem Biosciences)

4.2 Material de laboratorio

Asa bacteriología, Bolsas de polietileno, Cajas Petri, Espátulas, Gradillas, Guantes sin talco, Matraces Erlenmeyer diferentes volúmenes, Pipetas, Termómetros, Mecheros, Puntas de diferentes volúmenes, Tubos de ensayo, Tubos tipo ependorff de 1 mL.

4.3 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron de marca Bioxon, México

- Caldo lactosado
- Caldo lactosado verde brillante fluorocult
- Agar eosina azul de metileno (EMB)
- Agar Base sangre

4.4 Reactivos

- Indol
- Peptona de caseína
- Reactivo Kovac
- NaCl Sigma Chemical
- Agarosa Gibco
- Bromuro de Etidio
- Marcadores de peso molecular Gibco
- Agua destilada
- Buffer
- Cloruro de Magnesio (BIOSELEC)
- dNTPs (BIOSELEC)
- Enzima Taq polimerasa (invitrogen)
- Iniciadores (BIOSELEC) (Tabla 6)

Tabla 6. Iniciadores para <i>E. coli</i> diarrogénicas				
Genero	Gen	Orientación	Secuencia	PM (bp)
ETEC	<i>Lt</i>	F	5'-GGC GAC AGA TTA TAC CGT GC-3'	450
		R	5'-CGG TCT CTA TAT TCC CTG TT-3'	
ETEC	<i>St</i>	F	5'-ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T-3'	190
		R	5'-CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT-3'	
EPEC	<i>bfpA</i>	F	5'-AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC-3'	324
		R	5'-GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA-3'	
EPEC	<i>eaeA</i>	F	5'-GAC CCG GCA CAA GCA TAA GC-3'	384
STEC		R	5'-CCA CCT GCA GCA ACA AGA GG-3'	
STEC	<i>stx1</i>	F	5'-CTGGAT TTA ATG TCG CAT AGT-3'	150
		R	5'-AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC-3'	
STEC	<i>stx2</i>	F	5'-GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-3'	255
		R	5'-TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G-3'	
EIEC	<i>lal</i>	F	5'-GGT ATG ATG ATG ATG ATG CCA-3'	650
		R	5'-GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC-3'	
F: Foward R: Reverse				

Iniciadores para *E. coli* patògena

4.5 Procedimientos

4.5.1 Recolección de la muestra

Se analizaron tres tipos de alimentos: jitomate, hongos “zetas” y quesos frescos. Los alimentos fueron comprados en diferentes establecimientos del mercado del municipio de Acaxochitlán, Hidalgo en época de verano. En total se analizaron 120 muestras de alimentos. Las muestras fueron tomadas y, transportadas en su empaque de venta y en un termo. Las muestras se analizaron dentro de las 2 primeras horas después de su compra.

4.5.2 Análisis microbiológico

4.5.2.1 Preparación de la muestra

Se analizaron 50 g de cada tipo de muestra; estas se depositaron en una bolsa estéril de polietileno, posteriormente se le adicionó 450 ml de caldo lactosado y se homogenizó mecánicamente en Stomacher a 260 rpm/1minuto.

4.5.2.2 Cuantificación de organismos coliformes termotolerantes

A partir de la muestra homogenizada se realizaron diluciones decimales en tubos que contenían 9 ml de diluyente de peptona. Se realizaron tres diluciones con tres repeticiones a cada muestra, de la muestra homogeneizada se tomaron 3 ml y se transfirió 1 ml en cada uno de tres tubos que contenían 9 ml de diluyente de peptona, posteriormente las diluciones se incubaron a 37°C durante 24 h, transcurrido el tiempo de incubación, una “asada” de aquellos tubos que mostraran turbidez fue transferida a tubos con 5 mL de Caldo Lactosado verde brillante fluorocult conteniendo campana Durham y se incubaron a 44.5°C/ 24-48 h en baño María. Los tubos que presentaron desarrollo y producción de gas se consideraron positivos para coliformes termotolerantes (*Ct*). La cuantificación se realizó empleando las tablas del Numero Mas Probable y de acuerdo al numero de tubos positivos para *Ct*. El valor obtenido se expresó como NMP de *Ct*/g de alimento.

4.5.2.3 Identificación y cuantificación de *E. coli*

Los tubos que resultaron positivos para *Ct* fueron sometidos a la reacción de indol (revelado por la adición del reactivo de Kovac) y producción de

fluorescencia al hacer incidir luz ultravioleta sobre los tubos de caldo lactosado fluorocult con desarrollo. Los tubos de coliformes termotolerantes que fueron positivos a indol y fluorescencia se consideraron positivos para *E. coli*. Adicionalmente, los tubos considerados positivos a *E. coli* se confirmaron mediante siembra en agar eosina azul de metileno por 24 h. a 37 °C, en este medio se observaron las colonias con morfología típica de *E. coli*. La cuantificación se realizó empleando las tablas del Numero Mas Probable y de acuerdo al numero de tubos positivos para *E. coli*. El valor obtenido se expresó como NMP de *E. coli* /g de alimento.

Todas las cepas de *E. coli* aisladas se resembraron en agar base sangre en tubo pico de flauta y se almacenaron en refrigeración para los estudios de patogenicidad.

La cuantificación de organismos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* se realizó de acuerdo a los manuales especializados de la Administración de medicamentos y alimentos de los Estados Unidos de América (FDA/JFSAN, por sus siglas en Ingles), 2001; y de acuerdo con los protocolos de la legislación mexicana vigente (NOM-092-SSA1-1994; NOM-110-SSA1-1994; NOM-112-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994)

4.6 Identificación de *E. coli* patógena

4.6.1 Extracción de DNA

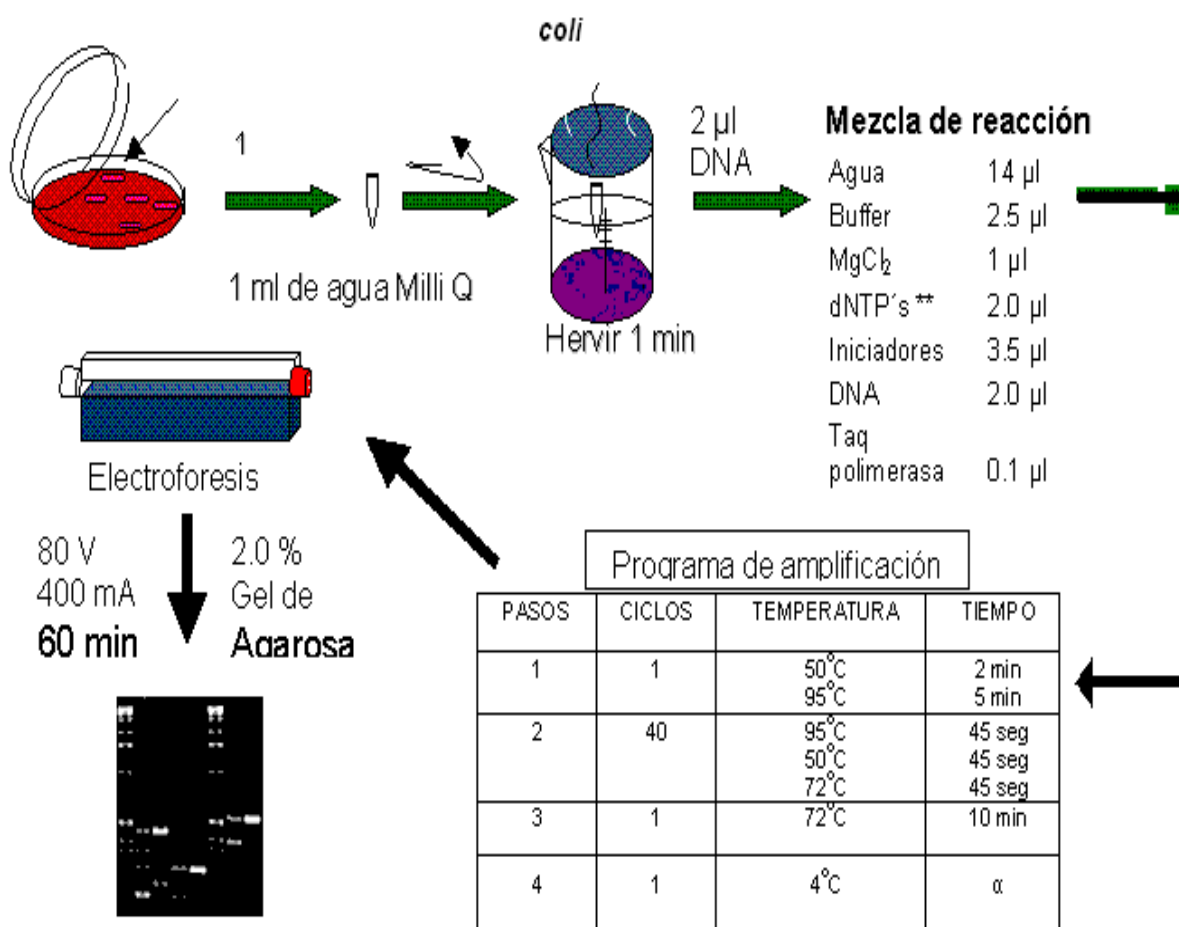
Para identificar *E. coli* patógena fue necesario extraer DNA de las cepas identificadas como *E. coli* aisladas de las 71 muestras analizadas, para amplificarlo mediante la técnica de PCR y así poder informar la existencia de

grupos patógenos de *E. coli* así mismo saber de que grupos se trataba. La extracción de DNA consistió de los siguientes pasos:

- a. Se tomó una asada de una colonia identificada como cepa de *E. coli*, esta cepa estaba congelada en agar papa dextrosa.
- b. Se colocó esta asada en agua destilada estéril contenida en un tubo de eppendorf.
- c. Se agitó el tubo con ayuda de un vortex.
- d. El tubo con su contenido se colocó en agua hirviendo por un minuto
- e. El tubo eppendorff, con el DNA se colocò en congelación para posteriormente utilizarlos.

La figura 2 muestra el procedimiento empleado en el laboratorio desde el aislamiento de DNA de las cepas identificadas como *E. coli* hasta la identificación de grupos patógenos de este.

Figura 2 Esquema de la identificación de grupos patógenos de *E. coli*



4.6.1.2 Obtención de mezcla de iniciadores

Se preparó la mezcla de iniciadores a una concentración de 100 µM.

En un tubo tipo Eppendorf se mezclaron los diferentes iniciadores (F ó R) para la identificación de las cepas patógenas (Tabla 7). Por separado se mezcló 100 µL de cada iniciador con 900 µL de agua destilada estéril para tener 1 mL de cada iniciador. Posteriormente, en otro tubo eppendorf se mezcló 100 µL de iniciador F con 100 µL de iniciador R y se adicionó 800 µL de agua destilada estéril; este pasó se realizó para todos los pares de iniciadores (Lt, st, stx1, stx2, egea, bfpA, ial). Todos los pares de iniciadores se mezclaron en un tubo

estéril a las proporciones descritas en la (tabla 9).

Tabla 7. Genes de pares de iniciadores

Gen	µl
Lt	148
St	185
stx1	74
stx2	111
eaeA	111
bfpA	74
Ial	296
Total de mezcla de iniciadores	999

Finalmente, de esta mezcla se toman 3.5 mL para realizar la mezcla de reacción.

4.6.1.3 Preparación de dNTP's

Se preparó una suspensión de dNTP's a una concentración de 100 µM. El procedimiento para el cálculo y ajuste de ésta concentración se encuentra en el Anexo 3. De esta suspensión se tomaron directamente 2.0 µl, de dNTP's para elaborar la mezcla de reacción.

4.7 PCR y electroforesis

Una vez preparados todos los reactivos se procedió a preparar la mezcla de reacción. Las proporciones de cada reactivo en esta mezcla se encuentran en la Tabla 8. Es importante señalar que los reactivos se deben adicionar en el orden estricto tal como se indica en la Tabla 10:

Tabla 8. Orden de la reacción para PCR

Agua estéril	14 μ L
Buffer	2.5 μ L
MgCl	1.0 μ L
dNTPs	2.0 μ L
Iniciadores	3.5 μ L
DNA	2.0 μ L
Enzima polimerasa Taq	0.1 μ L

Para efectuar el PCR, en cada tubo tipo eppendorf se mezclaron 2 μ L de la muestra problema DNA con 22 μ L de la mezcla de reacción. Los tubos con las diferentes muestras problemas se introdujeron al termociclador; la reacción se efectuó con el programa descrito en la Tabla 9. La duración del PCR fue de 3 horas 15 min.

Tabla 9. Programa del termoreciclador utilizado para la técnica de PCR

Paso	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	50°C	2 min.
	1	95°C	5 min.
2	40	95°C	45 seg.
	40	50°C	45 seg.
3	40	72°C	45 seg.
	1	72°C	10 min.
4	1	4°C	

Para la electroforesis, se preparó solución TAE 1x; Los cálculos se muestran en el Anexo 4. Posteriormente, se preparó gel de agarosa al 2% en solución TAE 1x. Se preparó el gel al 2% porque en las muestras se esperaban pares de base de tamaño medio y de diferente peso molecular, en caso de haber sido parecidos en tamaño se hubiera preparado gel de agarosa al 5%, o sí las muestras contienen pares de base muy pequeños el gel se prepara al 0.5%. El gel se colocó en una cámara de electroforesis y se dejó solidificar el gel; posteriormente, con ayuda de un peine de 12 dientes, se hicieron 11 pozos en el gel de agarosa. En los pozos 3-10 se colocaron 5 µL de muestra y 1µL de buffer de carga en cada uno; en el pozo 1 se colocaron 3 µL de marcador de peso molecular, en el pozo 2 se colocaron 5 µL de control negativo (solo mezcla sin DNA) y 1 µL de buffer de carga y en el pozo 11 se colocaron 5 µL de control positivo (mezcla de reacción con 1 µL de mezcla de DNA patógenos)

y 1 μL de buffer de carga.

La electroforesis se efectuó a 80 V, 400 mA/60 min. Concluido el tiempo de la electroforesis, el gel se retiró de la cámara y se colocó en solución de TAE 1x con 20 μL de bromuro de etidio a 5 ppm para revelar las bandas. El gel se dejó en dicha solución durante 10 min. Finalmente las bandas formadas en el gel se observaron bajo luz ultravioleta.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudios de frecuencia de microorganismos *Ct*, *E. coli* y *E. coli* patógena

Durante la preparación de quesos u obtención de verduras crudas, los productos suelen someterse a diferentes tratamientos tales como, pelado, rebanado, picado y/o troceado; estas maniobras pueden favorecer la contaminación con microorganismos patógenos (Fernández, 2000). Debido a que la mayoría de las veces en los restaurantes o fondas, muchas frutas y verduras son consumidas crudas, es de gran importancia que las verduras sean sometidas a un proceso efectivo de desinfección para minimizar los peligros microbianos que pudieran estar presentes. Los desinfectantes pueden ser aplicados para reducir el número de microorganismos en los alimentos siempre y cuando por si solos no representen un peligro químico en el producto terminado. Por otro lado, es común que en los restaurantes e incluso en los hogares se consuma queso fresco elaborado con leche no pasteurizada, convirtiéndose en un factor de riesgo para los consumidores, ya que los quesos pueden contener bacterias patógenas.

Como ya se mencionó, los grupos patógenos de *E. coli* causan importantes problemas en la salud pública. Para prevenir las ETAs que estos grupos provocan, es importante conocer su frecuencia en los alimentos involucrados. En este estudio se analizaron 120 muestras 40 de queso, 40 de hongos zetas y 40 de jitomates. Sólo se reportan datos generales (frecuencia, mediana, media, etc). En las muestras de quesos el 25 y 17.5% de las muestras

resultaron positivas par *Ct* y *E. coli* genérica, respectivamente (Tabla 10); y 4 muestra resultaron positivas para *E. coli* patógena (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencia de *Ct*, *E. coli* y *E. coli* patógena en quesos frescos

Microorganismo o grupo	Muestras analizadas	Positivas	Frecuencia %
<i>Ct</i> (NMP/g)	40	10	25
<i>E. coli</i> (NMP/g)	40	7	17.5
<i>E. coli</i> patógena	40	4	10

Los valores mínimos, máximos, mediana y media de cada microorganismo o grupo microbiano de los hongos zetas, se encuentran descritos en la Tabla 11. Desde el punto de vista, es interesante notar la gran diferencia que existe entre la información proporcionada por los valores de la media y la mediana de la Tabla 11. La media nos proporciona información limitada, solo expresa el promedio de los recuentos; además esta en función de los valores individuales de cada muestra, por lo que no permite deducir si al menos el 50 % de las muestras presentaron un contenido microbiano por debajo del promedio. Por el contrario, la mediana expresa el valor al cual el 50 % de las muestras contienen una concentración por abajo o por arriba de ella. Con base en esto, por ejemplo en la Tabla 11 se expresa que el contenido microbiano del 50 % de las muestras tuvieron <3.0 NMP de *Ct*/g.

Tabla 11. Valores mínimos, medianas, medias y máximos de *Ct*, *E. coli* patógena en quesos frescos

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Media	Máximo
<i>Ct</i> (NMP/g)	<3.0	<3.0	114.04	>1100
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<3.0	<3.0	69.44	1100
<i>E. coli</i> patógena	<3.0	<3.0	0.36	9.2

Para el caso de los hongos zetas la frecuencia de *Ct* y *E. coli* fue de 97.5 y 90%, respectivamente (Tabla 12). Cabe señalar que sólo una muestra no fue positiva *Ct*. Los hongos zetas también estuvieron contaminados con *E. coli* patógena en un 13 % (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencia de *Ct*, *E. coli* y *E. coli* patógena en hongos zetas

Tabla 12. Frecuencia de <i>Ct</i> , <i>E. coli</i> y <i>E. coli</i> patógena en hongos zetas			
Microorganismo o grupo	Muestras analizadas	Positivas	Frecuencia %
<i>Ct</i> (NMP/g)	40	39	97.5
<i>E. coli</i> (NMP/g)	40	36	90
<i>E. coli</i> patógena	40	8	20

Los valores mínimos, máximos, mediana y media de cada microorganismo o grupo microbiano de los hongos zetas se encuentran descritos en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores mínimos, medianas, medias y máximos de *Ct*, *E. coli* y *E. coli* patógena encontrados en hongos zetas

Microorganismo o grupo	Mínimo	Mediana	Media	Máximo
Ct (NMP/g)	<3.0	210	422.08	>1100
<i>E. coli</i> (NMP/g)	<3.0	20.5	83.89	1100
<i>E. coli</i> patógena	<3.0	<3.0	1.013	23

En la Tabla 14. Se muestra un resumen de los resultados; en ella podemos encontrar además información sobre la frecuencia y los valores máximo, mínimo, mediana y media de los microorganismos en quesos, hongos zetas, y jitomates. Es interesante notar que en los quesos que fueron positivos para *Ct* también lo fueron para *E. coli*. Estos resultados nos indican que las muestras tanto las muestras de quesos como las de hongos zetas se encontraban en pésima calidad de higiene, ya que se encontró un número elevado de *Ct* y *E. coli*.

Tabla 14. Resumen de microorganismos encontrados en los alimentos

Analizados

Alimento	No. de muestras	Microorganismo o grupo microbiano	Mediana	Media	Frecuencia %
Quesos	40	<i>Ct</i>	<3.0	114.04	25
		<i>E. coli</i>	<3.0	69.44	17.5
		<i>E. coli patógena</i>	<3.0	0.36	10
Hongos zetas	40	<i>Ct</i>	210	446.85	97.5
		<i>E. coli</i>	35	87.57	90
		<i>E. coli patógena</i>	9.2	1.31	20
Jitomates	40	<i>Ct</i>	210	548.71	100
		<i>E. coli</i>	28	79.54	100
		<i>E. coli patógena</i>	3.6	1.02	20

La identificación de los grupos patógenos se realizó mediante la técnica del PCR la cual involucra electroforesis en gel y su revelación mediante luz ultra violeta, al comparar las bandas generadas con un control o marcador de peso molecular, es posible identificar el grupo al cual pertenecen las *E. coli* bajo estudio, por ejemplo en la figura 3, observamos un gel de agarosa después de una electroforesis que muestra los productos para cada gen de virulencia de *E. coli* patógena obtenida por la amplificación de DNA mediante una prueba múltiple o PCR múltiple, en el primer carril se encuentra un control positivo, así como, también el peso molecular de cada gen, en los carriles 2-5 la amplificación de bandas típicas de *E. coli* productora de la toxina shiga, *E. coli*

enterotoxigenica, *E. coli* enteropatogena y *E. coli* enteroinvasiva respectivamente, en los carriles 6-15 se muestran productos de PCR de muestras aisladas de alimentos y la mezcla de iniciadores y en el carril 16 un marcador de peso molecular de 1kb.

En este estudio se realizaron dos ensayos de PCR separados con todas las cepas: uno para la búsqueda de las *E. coli* diarrogénicas (enterotoxigenica, enteropatogena, enteroinvasiva, enteroadherente y enterohemorrágica) y el otro para la búsqueda de la *E. coli* enteroagregativa. Para el primer caso se empleó un PCR múltiple es decir en una misma reacción de PCR se mezclaron todos los iniciadores para la búsqueda de las diarrogénicas (Barrera y col, 1998), y para el segundo, un PCR sencillo en el que únicamente se emplearon los iniciadores para las enteroagregativas.

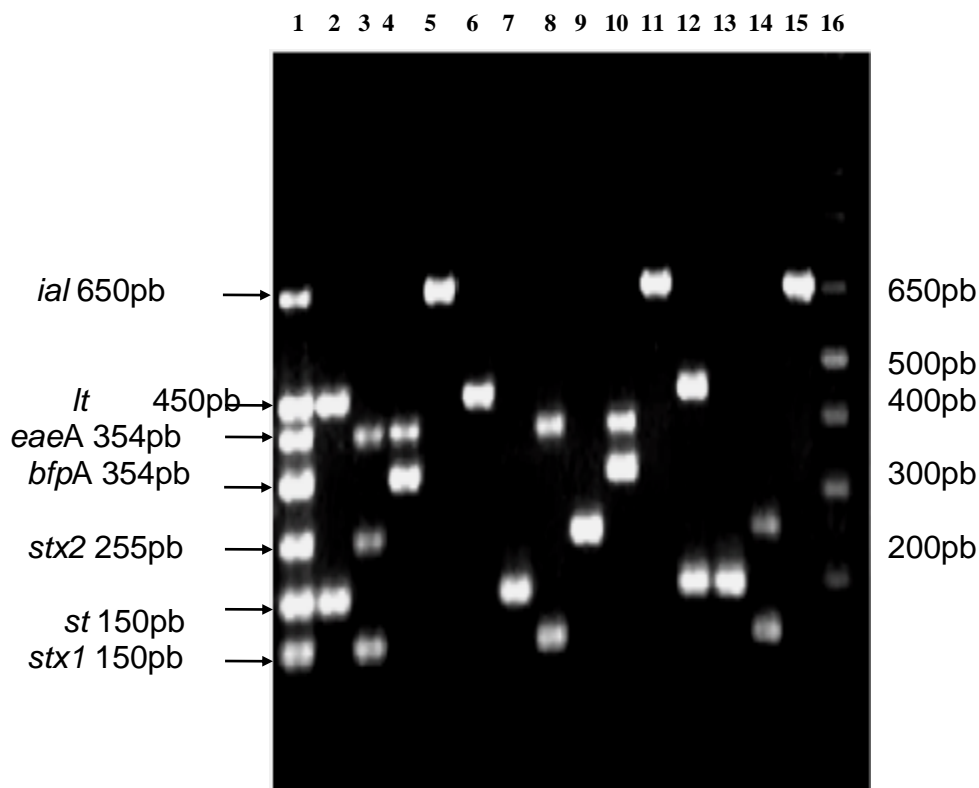


Figura 3. Gel de agarosa después de una electroforesis

Cuatro muestras de quesos fueron positiva para grupos patógenos de *E. coli*; entres se identificó solamente el grupo de las STEC y en una se encontraron simultáneamente ECET y STEC. Es importante señalar que aunque solamente cuatro muestra fueron positiva a grupos patógenos de *E. coli* el hecho de encontrar de manera simultanea dos grupos patógenos en una sola muestra nos sugiere problemas de contaminación y/o falta de desinfección. Es destacable también la presencia de STEC, ya que esta corresponde a una variante de la *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), de hecho la ECEH es una STEC. La ECEH es la más virulenta del grupo de las patógenas; este grupo se ha visto involucrado en numerosos brotes de enfermedad La diferencia que existe entre la STEC y la ECEH es el antígeno O somático: cuando la STEC es del tipo O157 comúnmente se emplea el nombre ECEH para designarla; cuando no son del tipo O157 únicamente se refiere a estas cepas como STEC ó también como STEC O157 (Hussein y Sakuma, 2005). Una vez que se ha identificado a una cepa STEC mediante PCR (u otro método molecular), debe realizarse serología para determinar si estas cepas son o no del tipo O157. En nuestro caso, la reacción serológica al antígeno O157 fue negativa en todas las cepas STEC que aislamos.

En las muestras de hongos zetas, 8 de ellas fueron positivas al grupo patógeno de *E. coli*. Los grupos identificados fueron STEC, ECET y ECEP. El grupo predominante fue STEC. En seis de las muestras se identificó exclusivamente el grupo STEC, no obstante, en una de las muestras se encontró de manera simultanea STEC y ECET, y en otra se encontraron tres grupos: STEC, ECET y ECEP; la ECEP sólo se encontró en esta ultima muestra. Finalmente, en 8

muestras de jitomate se detectó exclusivamente el grupo STEC.

Para la identificación de los grupos patógenos se emplearon las cepas de *E. coli* genéricas que se habían identificado y cuantificado mediante la metodología convencional, ésta incluye la cuantificación mediante la técnica del número más probable (NMP). Debido a esto fue posible no solo conocer cuales alimentos fueron positivos a los grupos patógenos, si no también determinar la concentración de los grupos patógenos por gr (Tabla 15).

Tabla 15. Concentración por tipo de *E. coli* patógena identificada en las muestras analizadas

Muestras alimento	de <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ECET)	Productora de toxina <i>Shiga</i> (STEC)	<i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP)
Queso 1	9.2 ⁿ	9.2	-
Queso 2	-	23	-
Queso 3	-	3.6	-
Queso 4	-	23	-
Hongos 1	-	9.2	-
Hongos 2	-	23	-
Hongos 3	-	3.6	-
Hongos 4	-	9.2	-
Hongos 5	-	3.6	-
Hongos 6	-	3.6	-
Hongos 7	9.2	23	-
Hongos 8	3.6	23	3.6
Jitomate 1	-	3.6	-
Jitomate 2	-	9.2	-
Jitomate 3	-	3.6	-
Jitomate 4	-	3.6	-
Jitomate 5	-	3.6	-
Jitomate 6	-	3.6	-
Jitomate 7	-	3.6	-
Jitomate 8	-	23	-

Los resultados indican que los alimentos analizados presentaron muy pobre calidad higiénica, el hallazgo de *E. coli* genérica es indicativo de presencia de materia fecal y en consecuencia de un riesgo potencial (OPS, 1997a). La presencia de STEC en los alimentos analizados sugiere contaminación de los productos. Es sabido que los principales reservorios de STEC son los rumiantes (Hussein y Sakuma, 2005), por lo que es probable que la contaminación haya ocurrido en el campo. A diferencia, ECET y ECEP tienen como principal reservorio al humano. En consecuencia su presencia en los alimentos sugiere contaminación por los manipuladores de alimentos o bien contaminación humana previa a su llegada a los sitios de preparación con nula desinfección. No obstante, la presencia simultánea de STEC y ECEP ó STEC, ECEP y ECET sugiere la ocurrencia de ambos tipos de contaminación (de origen y humana). Aunque en general la dosis mínima infectante (DMI) que se estima para los tres grupos patógenos encontrados es alta (10^6 - 10^8 células), pero a la concentración que se encontraron a los tres patógenos en los alimentos analizados, deben considerarse como un peligro para el consumidor. Esta elevada contaminación de patógenos puede ser a un inadecuado almacenamiento de los alimentos, lo que podría favorecer el desarrollo de estos, incrementando su número hasta niveles iguales o superiores a la DMI. En este trabajo se investigó la presencia de coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli* y grupos patógenos de *E. coli*. En general, el nivel de higiene de los alimentos analizados fue deficiente.

Los niveles tan altos de microorganismos indicadores encontrados pueden ser

el resultado de malas prácticas de higiene durante la preparación de los alimentos o bien por falta de desinfección ó inadecuada desinfección de éstas. Diferentes microorganismos pueden estar presentes en el producto de interés desde la tierra de su cultivo, por las malas prácticas de agricultura ó de recolección o bien pueden provenir de las aguas de riego utilizadas y por el humano. (Díaz y Vernon, 1999).

A diferencia de *E. coli*, a los *Ct* no se les reconoce valor indicativo de contaminación fecal en los alimentos, como ocurre con el agua (Ahuenainen, 1996). Su presencia en los alimento no implica un riesgo a la salud (Fernández, 1981). Los organismos coliformes son frecuentes en vegetales crudos. Se emplean comúnmente como indicadores de eficiencia de los procesos de desinfección de materiales y equipo (Fernández, 2000). Existen dos posibles explicaciones para los altos niveles de microorganismos encontrado en los alimentos que analizamos en este estudio una es la intensa exposición a la contaminación desde el cultivo, hasta su comercialización sin posterior desarrollo ó, una discreta contaminación y debido a los nutrientes disponibles, a la alta humedad, pH y temperatura ambiente, se favorece la multiplicación de los microorganismos sobre los alimentos y sin adecuada higiene puede llegar hasta producto que está listo para su consumo. Este desarrollo puede ser tan activo que rápidamente alcance su concentración máxima en el alimento, esto último es muy importante ya que significaría que en el caso de los microorganismos involucrados sean patógenos pueden causar daño al consumidor.

Muchos países han implementado nuevas reglas y sistemas con la finalidad de disminuir los riesgos a la salud asociados al consumo de quesos y verduras, Debido al alto número de brotes que se han presentado por su consumo, y sobre todo a la severidad de las infecciones causadas por los patógenos involucrados en tales brotes (Brayan, 1988; Caballero y col., 1998). Debido a ello, es necesario la aplicación de algún tratamiento que garantice la disminución o la eliminación de grupos patógenos. El tratamiento que ha dado mejores resultados ha sido la pasteurización en quesos, sin embargo, es necesario evaluar otros métodos alternativos que permitan reducir o eliminar los riesgos microbiológicos potencialmente presentes tanto en el producto final como en la materia prima. Además de observar prácticas sanitarias adecuadas durante la producción, transporte, comercialización y almacenamiento de estas para evitar contaminación con microorganismos patógenos. Para este efecto, se ha propuesto el uso de ácidos orgánicos tales como: ácido láctico, ácido sórbico y ácido propiónico en concentraciones de 0.1%, como una alternativa adecuada en este tipo alimentos crudos para la disminución del riesgo (FDA, 2001b)

Es importante precisar que aunque el estudio abarcó pocos establecimientos y de una sola población, los resultados dan una idea del nivel de higiene en estos tipos de comercios y podrían ser un reflejo de su calidad sanitaria. En tal caso es necesario realizar mayores estudios para confirmar esta hipótesis. Por otro lado, sería adecuado realizar mayores estudios en los establecimientos donde se obtuvieron los alimentos con la finalidad de determinar el origen de los problemas. La información derivada de estos estudios permitirá atender con

eficiencia los problemas higiénicos en los establecimientos muestreados y, en lo sucesivo, prevenirlos; disminuyendo con ello los posibles brotes de enfermedad asociados al consumo de quesos frescos, hongos zetas y jitomate crudo.

VI. CONCLUSIONES

1. Los alimentos analizados presentaron pobre calidad higiénica y microbiológica.
2. Cuatro muestras de queso (10%) de un total de 40 fueron positivas a grupos patógenos de *E. coli* y en una se aisló simultáneamente los grupos STEC y ETEC.
3. Ocho muestras de hongos zetas (20%) de un total de 40 fueron positivas a grupos patógeno de *E. coli*; los grupos identificados fueron STEC, ETEC y EPEC. En una de las muestras se encontró de manera simultánea dos grupos patógenos: STEC y ETEC, y en otra se encontraron tres grupos: STEC, ETEC y EPEC.
4. Ocho muestras de jitomates (20%) de un total de 40 fueron positivas al grupo patógeno de *E. coli*: STEC
5. Los resultados evidencian el riesgo a la salud de la población consumidora de los alimentos analizados.
6. Es conveniente implementar un sistema de higiene adecuado que establezca la inocuidad de quesos, hongos zetas y jitomate, a fin de evitar efectos nocivos en la salud humana.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo, Mendoza L, Clever y Oyon R., 2001. Coliformes totales, fecales y algunas *enterobacterias*, *Staphylococcus spp.* y hongos en ensaladas para perros calientes expandidas en la ciudad de Maracay, Venezuela. ALAN, vol.51, no.4, p.366-370. ISSN 0004-0622.
2. Ahuenainen R., 1996. New approaches in improving. The shelf life minimally processed fruit and vegetables. Trends in food Sciences and Technology. 7, 179-187.
3. Anónimo 1, 2007.
www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000296.htm - 26k
4. Anónimo 2, 2007.
http://docencia.izt.uam.mx/smk/233208/material_adicional/Microbiologia_f_rutasyhorta.ppt
5. Anónimo 3, 2005.
sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rfmh_urp/v03_n1/a12.htm - 25k -, 2006
6. Anónimo 4, 2006.
www.teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=47&id_art=4291&id_ejemplar=0 - 42k –
7. APHA, 1992. [American Public Health Association].
8. BAM (Bacteriological Analytical Manual Online). 2001. Food and Drug Administration, USA.
9. Barrera Saldaña H. A., Ortiz R, Rojas A y Resendez D., 1998. Reacción en cadena de la polimerasa, una nueva época dorada en la biología molecular. Departamento de bioquímica de la facultad de medicina.

10. Belitz H. D. y Grosch W., 1997. Química de los alimentos. 2ª ed. Editorial Acribia. Zaragoza.
11. Beuchat L. R. y Rice S. L., 1979. *Byssochlamys* ssp. And their importance in processed fruits. J. Adv. Food R. 25: 237-288.
12. Beuchat L. R., Farber J. F., Garret E. H., Harris L. J., Parish M. E., Suslow T. V., y Busta F. F., 2001b. Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. J. Food Prot. 64: 1080-1084.
13. Beuchat L. R., Harris L. R., Ward T. E. y Kajs T. M., 2001a. A Development of proposed standard method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizers. J. Food Prot. 64: 1103-1109.
14. Brayan F. L., 1988. Critical control point of street vended foods. J. Food Protect. 51: 373-84.
15. Browne Robins Roy M. and Hartland Elizabeth , 2002. Advances in Pediatric Gastroenterology and Hepatology, *Escherichia coli* as a cause of diarrhea, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*; 17, 467–475
16. Buckle K., 1995. 8 th Australian food microbiology conference. Trends Food Sci. and Technol. 6:163-166
17. Caballero T. A., Carrera V. J., Legomin F. M., 1998. Evaluación de la vigilancia microbiológica de alimentos que se venden en las calles. Instituto de nutrición e higiene de los alimentos. Rev. Cubana. 12: 7-10

18. Díaz SR. Vernon C.J., 1999. Inocuidad Microbiológica de Frutas Frescas y Mínimamente Procesadas. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*; 2:133-136.
19. Donnenberg M. S., and Nataro J. P. 2000. The molecular pathogenesis of *Escherichia coli* infections: 87-130. In: *Microbial Foodborne Diseases. Mechanisms of Pathogenesis*. Cary, J. W., Linz, J. E. and Bhatnagar, D. (Eds.). Technomic Publ. Co. Penn. EUA.
20. Donnenberg M. S., Donohue A., and Keusch G. T. 1989. Epithelial cell invasion over-looked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC Cadherent factor. *J. Infect. Dis.* 160:453-459.
21. Encarta, 2005. Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta © 1993-2004 Microsoft Corporation.
22. FDA (Food and Drug Administration), 2000. Department of Health and Human Services. Title 21 Food and Drug. Part 110 Current Good Manufacturing, Packing, or holding Humans Food. Sec. 110
23. FDA (Food and Drug Administration). 2001a. Hazard analysis and critical control point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule. *Fed Register* 66(13):6137
24. FDA (Food and Drug Administration). 2001b. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce Chapter IV *In: Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh- Cut Produce*. U. S. Food and

Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition
September 30, 2001

25. FDA/CFSAN, 2001. Bacteriological Analytical Manual Online, Equivalente a Bacteriological Analytical Manual, 1988, 8ª ed. AOAC Inter. USA.
26. Fernández E. E. 2000. Microbiología e inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
27. Fernández, E. E. 1981. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Universidad de Guadalajara, México.
28. Frías C., 1996. Estudio de los factores de patogenicidad en *Escherichia Coli* enterohemorrágica. [Tesis Doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
29. (Gaeson, 1979; Senter y col., 1984; Senter y Col, 1987; Brackett, 1988; Hayward, 1974)
30. Griffin P. M., and Tauxe R., V., 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol*; 13:60-98.
31. Harris J. R., Marieno J. y Wells J. G., 1985. Person-to-person transmission in an outbreak of enteroinvasive *Escherichia coli*. *Am. J. Epidemiol.* 122: 245-252
32. Haward R. Roberts, 1999. Sanidad Alimentaria. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza (España). 5-13 y 43-44.

33. Hussein H. S. and T. Sakuma. 2005. *Invited Review: Prevalence of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli in Dairy Cattle and Their Products*. J. Dairy Sci. 88:450–465.
34. Krogfelt K. A. 1991. Bacterial adhesión: genetics, biogénesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. Rev. Inf. Dis. 13:721-735.
35. Mainil1 J.G. and G. Daube2, 2005. A review Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and Foods: who's who?, Departments of 1Infectious and Parasitic Diseases, and 2Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lie`ge, Lie`ge; 98, 1332–1344.
36. Marier, R., Wells J. G. y Swanson R. C. 1973. An outbreak of *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. Lancet 1376-1378
37. Monge R and Chinchilla M., 1996. Presence of *Cryptosporidium oocysts* in fresh vegetables. J.F. food Prot. 59:202-203
38. Moreno G. D., 1994. Microbiología de los Alimentos. 1ª ed. Editorial Acribia.
39. Muller G., 1989. Microbiología de los alimentos vegetales. Editorial Acribia.
40. Noguera U. Y., 2005. Frecuencia de *Salmonella*, *E. coli* y organismos coliformes en ensaladas listas para su consumo. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura en Química en alimentos.

- 41.NOM -109-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios.
Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de salud. México.
- 42.NOM-093-SSA-1994 Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios.
Métodos. Práctica de Higiene y Sanidad en la Preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.
- 43.NOM-092-SSA1-1994
- 44.NOM-110-SSA1-1994
- 45.NOM-112-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios.
Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número Más Probable. Secretaría de Salud. México.
- 46.NOM-113-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios.
Método para la cuenta de organismos coliformes totales en placa.
Secretaría de salud. México.
- 47.Nuevas Tecnologías de Conservación de Frutas y Hortalizas, 1996.
Ediciones Mundi-Persa, Madrid, Barcelona, México
- 48.Olvera C. D. F, 2007. Frecuencia y comportamiento de *Salmonella* y microorganismos indicadores de higiene en jugo de zanahoria. Tesis de licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- 49.OPS, 1997a. Manual para el control de las enfermedades transmisibles.
Organización Panamericana de la Salud: 80-88.

50. OPS, 1997b. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en Ciudades de América Latina, Organización Panamericana de la Salud.
51. Palomares J.C., Rodríguez Iglesias M. J., Torres R.J., 1992. Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina, Reacción en Cadena de la Polimerasa, Medicina Clínica Vol. 99: 262-263.
52. Parrilla C. C., Vázquez C. L., Saldate C. O., Nava F. M., 1993. Brotes de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y parasitario. Salud Pública de México; 35:456-463.
53. Rodríguez Ángeles G., 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud pública Méx.; 464-475.
54. Saucedo C, Cerna N, Villegas Sepúlveda R, Thompson F, Velázquez R, Torres J, Phillip I. Tarr and Estrada García T, 2003. Single Multiplex Polymerase Chain Reaction to detect diverse loci, associated with diarrheagenic E. coli. vol 9; 127-131.
55. Schoenii J. L. and Doyle M. P. 1994. Variable colonization of vegetables inoculated with *Escherichia coli* O157:H7 and subsequent contamination of eggs. Appl. Environ. Microbiol. 60:2958-2962.
56. Thompson J. S., Hodge D. S. and Borczyk A. A., 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. J. Clin. Microbiol. 28:2165-2168.

VIII ANEXOS

ANEXO 1

Cálculos para resuspender iniciadores:

Se requiere una concentración de 100 μM

Concentración de proveedor 194.18 μM (la concentración de cada iniciador depende del fabricante y de acuerdo al tipo de iniciador)

194.18 nmol \longrightarrow 1 ml equivalente a [194.18 μM]

Entonces:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(194.18 \mu\text{M})(1 \text{ ml}) = (100 \mu\text{M})(X)$$

$$X = \frac{(194.18 \mu\text{M})(1 \text{ ml})}{100 \mu\text{M}} = V_2 = 1.9418 \text{ mL de H}_2\text{O}$$

$$100 \mu\text{M}$$

Una vez resuspendidos se utilizan en una dilución 1:10 por lo tanto se tomara un volumen de 100 μl por iniciador (Forward y reverse) y se diluirán en 800 μl de agua desionizada de acuerdo al gen de interés.

Para la realización de PCR múltiple se utilizó una mezcla de iniciadores ya resuspendidos, de acuerdo a las cantidades descritas en las siguientes tablas llegando a un volumen total de 1000 μl para la identificación de *E. coli* diarrogénica y enteroagregativa (Iopez-Sau, cedo y col). El volumen utilizado

para cada iniciador depende del peso molecular del gen a identificar.

Mezcla iniciadores *E. coli* diarrogènicas

Gen	Volumen
lt	148 µl
st	185 µl
stx1	74 µl
stx2	111 µl
eaea	111 µl
bfpa	74 µl
ial	296 µl
volume total	1000 µl

Mezcla iniciadores *E. coli* enteroegregativa

Gen	Volumen
aAt	498 µl
aggR	332 µl
aap	166 µl
volumen total	1000 µl

ANEXO 2

Preparación de dNTP`s

Para la preparación de dNTP`s se toman 25 µl de cada uno de los oligonucleótidos y se mezclan en un tubo de eppendorff para obtener 100 µl y se utilizan en una dilución 1:10 en agua desionizada, la concentración de cada dNTP`s de acuerdo a las indicaciones es 100 µM, una concentración 1x tiene 1.25 µM de cada dNTP`s, 2x sea 2.5 µM para 1 ml tenemos (la concentración dependerá del fabricante)

:

$$C1V1 = C2V2$$

$$(100 \mu\text{M}) (V1) = (25 \mu\text{M})(1000 \mu\text{M})$$

$$V1 = 25 \mu\text{M de cada iniciador}$$

$$(194.18 \mu\text{M}) (1 \text{ ml}) = (100 \mu\text{M})(X)$$

Preparación de dNTP`s	
Oligonucleotidos	Volumen
dATP	25 µl
dCTP	25 µl
dTTP	25 µl
dGTP	25 µl
volumen total	100 µl

Cabe mencionar que se utilice un kit de la taq polimerasa (in vitro gen) que

incluye el regulador o buffer y el cloruro de magnesio, el cual se mencionan para señalar su concentración.

Regulador o Buffer

2.5 μ l \longrightarrow 25 μ l

Con dilución final 1:10

Cloruro de magnesio

50 Mm 1 μ l

X= \longleftarrow 25 μ l

X = 2 mM entonces la concentración final es 2 mM