



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO

00562

13  
2ej.

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y SOBREVIVENCIA  
DE ENTEROBACTERIAS PATOGENAS EN  
EL POZOL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A:

TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO. D. F

263236

1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

ALBERTO RIVERA...  
CALLE...  
CARRERA...

BOGOTÁ...

UNIVERSIDAD...

COLOMBIA...

LIBRERIA...

PAGINACION

DISCONTINUA

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** DR. ALEJANDRO CRAVIOTO QUINTANA  
**VOCAL:** DR. CARLOS ESLAVA CAMPOS  
**SECRETARIO:** DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA  
**SUPLENTE:** DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ  
**SUPLENTE:** M. en C. JOSÉ MARIANO GARCÍA GARIBAY

## **DIRECTORA DE TESIS**

DRA. MA. DEL CARMEN WACHER RODARTE

## **SUSTENTANTE**

Q.F.B. TERESITA DEL ROSARIO SAINZ ESPUÑES

## **LUGARES DE REALIZACIÓN DEL TRABAJO**

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, LABORATORIO 324,  
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM.  
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

*No te rindas, lucha, hasta alcanzar tus metas y tu felicidad.*

*No te importen los fracasos. La templanza de tu espíritu  
te ayudará a superarlos.*

*Alébrate de tus logros, pero solo por un momento.  
Piensa siempre en algo más.*

T. S. E.

## **DEDICATORIAS**

A MI AMADÍSIMO ESPOSO, JAVIER

A MIS HIJOS SANTIAGO Y JOSÉ IGNACIO, LA RAZÓN DE MI VIDA.

A LA MEMORIA DE MI PADRE

A MI QUERIDA MADRE

A MIS HERMANOS

A MIS AMIGOS

A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Wachter, por otorgarme su confianza, apoyo y especialmente su amistad.

Al Dr. Alejandro Cravioto, Director de la Facultad de Medicina, por el apoyo recibido para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Carlos Eslava, por su dedicación, apoyo y gentileza.

A M. en C. Ruth Espinoza y M. en C. Dora Centurión, por la selección y envío de las muestras, y la recopilación de la información en las encuestas realizadas.

A la Dra. Yolanda López, por su interés y sus observaciones oportunas.

A la Dra. Amelia Farrés, por brindarme la oportunidad de alcanzar esta meta.

A Rocío Santillana, por su apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A mis compañeras del laboratorio 324, Rina, Gloria, Martha, Esmeralda e Imarmene, por su apoyo.

A mis compañeros del laboratorio de Salud Pública, Armando, Luis, Juan, Maritofía, Pepe, Delia, Gabriel, José, Ulises y Francisca, por su apoyo.

A M. en C. Enrique Menéndez por sus indicaciones en la toma de las fotografías.

A la UAM-X y a la UNAM, especialmente a la Facultad de Química.

Se agradece el apoyo de la DGAPA, UNAM (Proyecto IN2101194) y al CONACYT (Proyecto 4688N) para la realización de este trabajo.



## CONTENIDO

Resumen .....	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	3
CAPÍTULO II. GENERALIDADES .....	4
2.1 El Pozol .....	4
2.1.1 Descripción .....	4
2.1.2 Elaboración .....	4
2.1.3 Microbiología .....	5
2.2 Familia Enterobacteriaceae .....	6
2.2.1 <i>Salmonella</i> .....	7
2.2.2 <i>Shigella</i> .....	8
2.2.3 <i>Escherichia coli</i> .....	10
2.2.3.1 <i>Escherichia coli</i> (UPEC) en infecciones del tracto urinario .....	10
2.2.3.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) .....	11
2.2.3.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC) .....	13
2.2.3.4 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC) .....	13
2.2.3.5 <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica (EPEC) .....	14
2.2.3.6 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAggEC) .....	16
2.2.3.7 <i>Escherichia coli</i> con adherencia difusa (DAEC) .....	17
2.2.3.8 Toxina citolética distensionante (CDT) .....	18
2.3 Seguridad microbiológica de alimentos fermentados .....	19
2.4 Respuesta a estrés por ácido en <i>Enterobacterias</i> .....	20
CAPÍTULO III. OBJETIVOS .....	25
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
4.1 Muestreo y encuestas .....	26
4.2 Peso de la muestra .....	26
4.3 Mediciones de pH y Cuenta total de <i>Enterobacterias</i> .....	26
4.4 Aislamiento microbiano .....	26
4.4.1 Aislamiento de <i>Salmonella spp</i> .....	27
4.4.2 Aislamiento de <i>Shigella spp</i> .....	27
4.4.3 Aislamiento de <i>E. coli</i> .....	28
4.4.4 Medios de cultivo preparados en el laboratorio .....	28
4.4.5 Sistema API 20E .....	29
4.5 Caracterización Bioquímica .....	29
4.6 Caracterización Serológica .....	30
4.6.1 Preparación de antígeno somático (O) .....	30
4.6.2 Preparación de antígeno flagelar (H) .....	30
4.6.3 Identificación del serotipo .....	30
4.6.4 Reacciones de aglutinación para antígeno somático .....	30
4.6.5 Reacciones de aglutinación del antígeno flagelar .....	31
4.7 Ensayo de adherencia en células HeLa .....	31
4.7.1 Efecto citotóxico .....	32
4.8 Técnicas de hibridación de DNA en colonias .....	32
4.9 Esquema de inmunización .....	34
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....	41

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES.....	42
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS.....	43

## ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y SOBREVIVENCIA DE ENTEROBACTERIAS PATÓGENAS EN EL POZOL

### RESUMEN

Este trabajo profundiza en relación a la presencia de enterobacterias patógenas en el pozol, que es una bebida ácida que se obtiene de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado, y que es de consumo generalizado en el sureste de México. Existen reportes de la presencia de enterobacterias totales en este producto; en este trabajo, se investigó si algunas de éstas pertenecían a los géneros patógenos más comunes en nuestro medio, que son causa de enfermedades diarreicas, principalmente en niños. Otro objetivo importante fue el conocer si estas bacterias patógenas podían sobrevivir en condiciones de extrema acidez, dicha situación se presentó después de las 48 h de haber iniciado la fermentación de las masas. Lo anterior permitiría plantear que dichos microorganismos han adquirido la capacidad de resistencia al ácido, lo cual sugiere que éstos podrían sobrevivir y colonizar el tracto intestinal.

Se analizaron muestras de pozol provenientes de la ciudad de Villahermosa en el estado de Tabasco. Se determinaron los valores de pH al inicio, a las 48 h, y a los 8 días de la fermentación, observándose que habían disminuido de dos a tres unidades. Las cuentas totales de enterobacterias fueron del orden de 4.1 a 7.8 ( $\log_{10}$  u.f.c./g de peso húmedo) al inicio, y disminuyeron hasta valores de 1.0 a las 48 h. La procedencia de las muestras fue muy heterogénea, sin embargo, las muestras que se elaboraron en un pueblo (Nacajuca) cercano a la ciudad, fueron las más contaminadas.

Se emplearon diversos medios de cultivo y diferentes condiciones para el aislamiento selectivo de *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* y el único de éstos que se aisló fue *E. coli*. Se aislaron 73 cepas, tanto de muestras recién preparadas, como de las que tenían 48 h de fermentación. Se les realizaron estudios de serotipificación, ensayos de adherencia *in vitro* y por medio del uso de sondas radioactivas, se determinó la presencia de genes que codifican para factores de virulencia.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia en el pozol de cepas de *E. coli* de serotipos patógenos, tanto al inicio como 48 h después de haberse iniciado la fermentación.

Los serotipos de las cepas patógenas identificadas fueron: O1:H6 *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC), O20:H- *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y O88:H25 recientemente descrita como *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC). Es importante señalar que la tipificación serológica permitió establecer la prevalencia de serotipos específicos en las diferentes muestras analizadas.

También se identificaron cepas cuyo antígeno somático no se pudo caracterizar con ninguno de los 73 sueros correspondientes a los tipos somáticos aceptados hasta el momento, estos serotipos se describieron como O?. Al preparar un suero de conejo con una de estas cepas, se encontró que todas las

descritas como O? pertenían a una misma clona. Esta observación sugiere que podría tratarse de un serotipo nuevo no descrito hasta ahora.

Las cepas O88:H25, mostraron un patrón de adherencia localizada, y la cepa O108:H34 no reportada anteriormente, mostró un patrón característico de adherencia agregativa. Esta última cepa además, expresa una proteína de 60 kDa que fue reconocida por anticuerpos específicos preparados contra una toxina de 108 kDa presente en cepas EAaggEC asociadas con cuadros de diarrea. La caracterización de las cepas para determinar la presencia de genes de virulencia mediante ensayos de hibridación de DNA, mostró que algunas de ellas poseen genes para producción de toxina termolábil (LT) y genes *eae* relacionados con la adherencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Estos resultados sugieren que este alimento representa un problema de salud pública, al contener cepas diarreogénicas de *E.coli*, algunas de las cuales fueron capaces de sobrevivir en condiciones de estrés ácido.

Tomando en cuenta el amplio consumo de esta bebida, deberán proponerse tanto métodos higiénicos de producción como métodos para controlar su acidificación.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida ácida que se prepara diluyendo en agua masa fermentada de maíz nixtamalizado. Es de origen maya y se ha consumido en el sureste de México desde épocas prehispánicas hasta la fecha por grupos indígenas y mestizos. (Ulloa y col. 1996). El proceso de fermentación es efectuado por una microbiota muy compleja, que incluye bacterias, levaduras y hongos y ocurre de manera natural, sin inoculación, como en la mayoría de los alimentos de origen antiguo. Al fermentarse de forma semisólida, presenta heterogeneidad en cuanto al grado de aireación y a la composición química, lo cual posiblemente da lugar a la formación de diversos microambientes.

En 1955, Cravioto y col. determinaron que el pozol tiene mayor contenido de niacina, riboflavina, lisina y triptófano que el maíz, y que la concentración de proteína del pozol es mayor y de mejor calidad que la del maíz sin tratar. Esta observación nos indica que los mexicanos descubrieron hace siglos la forma de mejorar la proteína del maíz por diversos métodos (Viniestra, 1982).

El pozol fermentado tiene un pH inferior a 5 después de 20 horas de incubación, que es lo suficientemente bajo como para evitar la proliferación de algunas bacterias patógenas, incluso mantenido a temperatura ambiente. Sin embargo, y a pesar del bajo valor de pH, diversas bacterias entéricas han sido aisladas de este alimento y los números de las mismas no disminuyeron aún después de 30 horas de incubación (Wacher y col., 1993). La existencia de enterobacterias en el pozol indica la posible presencia de patógenos tales como *Salmonella*, *Shigella* y variedades de *E. coli*, entre otros. La ingestión de estas bacterias patógenas puede ser causa de cuadros clínicos de gastroenteritis de distinta gravedad, dependiendo de la especie, la cepa, de la dosis ingerida y de la predisposición del individuo. Además, enterobacterias patógenas pueden sobrevivir a valores de pH bajos, por el hecho de que poseen mecanismos de defensa en contra de estos ambientes ácidos, como son: la presencia de procesos homeostáticos por la inducción de descarboxilasas de aminoácidos, mecanismos de reparación de DNA, chaperoninas y otros que aún no están bien definidos (Bearson y col., 1997).

Aunque no se ha estudiado la relación entre el consumo de pozol y la incidencia de diarreas en las comunidades que lo ingieren (presencia de enterobacterias patógenas), la sola presencia de bacterias coliformes fecales supone un riesgo para la salud del grupo consumidor, de ahí la importancia de la búsqueda de dichos patógenos, principal objetivo de este trabajo.

## CAPÍTULO II. GENERALIDADES.

### 2.1 EL POZOL.

#### 2.1.1 Descripción.

La palabra pozol viene de la palabra nahuatl *pozolli*, que significa espumoso. El pozol es una masa de nixtamal fermentada moldeada en forma de bolas de diferentes formas y tamaños que van de 10 a 12 cm de longitud y de 5 a 8 cm de amplitud, con un peso entre 70 y 170 g, aunque puede pesar 1 kg o más. Este producto es elaborado en los Estados de Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, y en menor escala Veracruz y Oaxaca (Cañas Urbina y col, 1993). Es consumido por diferentes grupos étnicos como los chontales, choles, mayas, lacandones, tzeltales, zoques, tzotziles, tojolabales, chamulas, mames, zoques y zapotecos del sur y sureste de México, con fines alimenticios, ceremoniales y medicinales (Ulloa y col. 1996). El pozol constituye la principal fuente de energía para sus consumidores, así como un importante aporte de proteínas y vitaminas (Wacher y Santillana, 1990).

Para su consumo, las bolas de pozol son diluidas con agua, obteniéndose una bebida no homogénea de sabor ácido, refrescante, a la cual se le puede adicionar sal, azúcar, miel o chiles secos, y se toma como refresco a cualquier hora del día, durante las jornadas de trabajo. Los chamulas y lacandones consumen el pozol cuando realizan viajes largos a la selva, debido a su alto grado de conservación (Ulloa y col. 1996).

#### 2.1.2 Elaboración.

De acuerdo con Ulloa y col. (1983), la técnica de preparación del pozol se ha transferido de una generación a otra para el consumo familiar, o para una escala comercial pequeña. El pozol se elabora a partir de granos de maíz (0.5-1 kg), de preferencia blanco, que se hierven en agua con cal (aproximadamente 10% de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), durante 1 hora, o hasta que los granos se hinchan y los pericarpios se separan fácilmente, posteriormente se enfrían y se enjuagan con agua; a los granos resultantes se les llama nixtamal. El nixtamal se transfiere a un molino metálico del cual se obtiene una masa martajada a la que se le da forma de bola manualmente. Estas bolas se envuelven en hojas de plátano para evitar la desecación y se dejan fermentar a temperatura ambiente de 1 a 14 días, dependiendo de las preferencias del consumidor y de las circunstancias prevaletentes.

En función de los factores sociales y culturales del productor, existen dos tipos básicos de pozol: el mestizo y el indígena. La diferencia entre éstos consiste en que el pozol mestizo recibe una segunda

cocción o "reventado" de los granos de maíz después de la nixtamalización (Ulloa y col., 1996; Cañas Urbina y col. 1993).

### 2.1.3 Microbiología.

El proceso de fermentación del pozol es llevado a cabo por una microbiota mixta que incluye bacterias lácticas, enterobacterias y levaduras, así como varios hongos filamentosos (mohos).

Ulloa (1974) estudió la sucesión de hongos y levaduras en muestras de pozol del Estado de Tabasco. En dicho estudio estableció que la mayoría de los microorganismos presentes en los granos de maíz utilizados para preparar el pozol, son destruidos durante el tratamiento alcalino-térmico, y que es durante el tratamiento del nixtamal cuando ocurre la inoculación. Este trabajo reportó que en las primeras horas de la fermentación se detectaron *Geotrichum candidum*, *Trichosporum cutaneum* y varias especies de *Candida*.

Ulloa y col. (1987) reportaron la presencia de bacterias como: *Achromobacter pozolis*, *Aerobacter aerogenes*, *Agrobacterium azotophilum*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Paracolobactrum aerogenes*, y *Pseudomonas mexicana*; las levaduras *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Hansenula fabiani*, *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichosporum cutaneum*; así como los mohos *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *Aerobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geotrichum candidum*, *Monilia sitophila*, *Mucor racemosus*, *Mucor rouxianus*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium lanoso-viride*, *Phialophora richardsiae*, *Rhizopus nigricans* y *Trichoderma viride*. También se ha reportado la presencia de *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Mozqueda-González y Escamilla-Hurtado, 1988; Silva-Villareal, 1984; Escamilla-Hurtado y Mozaqueda-González, 1992; Nuraida y col., 1995).

Otras bacterias identificadas en el pozol son: *Bacillus cereus*, *Paracolobactrum aerogenoides* (Salinas, 1958), *Agrobacterium azotophilum*, *Achromobacter (Alcaligenes) pozolis* (Ulloa y Herrera, 1972), *Escherichia coli* var. *neapolitana*, *Pseudomonas mexicana* (Fuentes y col., 1974), y *Aerobacter aerogenes (Klebsiella pneumoniae)* (Salinas y Herrera, 1974). Por otro lado Taboada y col. (1975), encontraron que las bacterias *Agrobacterium azotophilum* y *Aerobacter aerogenes (Klebsiella pneumoniae)* son fijadoras de nitrógeno.

Wacher (1995) más recientemente, al profundizar en el estudio microbiológico del pozol, determinó que las bacterias lácticas, enterobacterias, bacterias mesófilas no lácticas (*Bacillus*), mohos y levaduras, son los grupos de microorganismos que sistemáticamente se encuentran en la masa de pozol recién elaborado, que la microbiota del pozol es muy estable, y que las diferencias del proceso ladino o mestizo y el indígena no influyen en la composición bacteriana del pozol. También observó que durante la molienda ocurre la mayor inoculación tanto de bacterias lácticas como de otro tipo de bacterias indeseables.

Es común la presencia de enterobacterias al inicio de fermentaciones en las que interviene una microbiota mixta, así como la transmisión de estos microorganismos por contaminación fecal directa o a través del agua utilizada. El pozol es un alimento muy manipulado, sobre todo durante la molienda, el amasado y el modelado, procedimientos que se realizan en condiciones poco higiénicas, hecho que muestra por qué es probable que se aislen en la masa enterobacterias con propiedades patógenas (Wacher 1995).

Con respecto a dichos microorganismos, la misma autora reportó que no se observó inhibición de las mismas como resultado de la acidificación de las masas a valores de pH menores de 4.5, se consideró la posibilidad de que al ser una fermentación sólida, la difusión de los ácidos producidos no es homogénea y que las enterobacterias tendrían la posibilidad de desarrollarse en microambientes donde no se han difundido estos ácidos, o que algunos miembros de la microbiota, como ciertas levaduras y mohos, consumieran parte de los ácidos producidos, creando microambientes libres de ácidos o con una concentración menor de éstos.

## 2.2 Familia Enterobacteriaceae.

La familia Enterobacteriaceae constituye el conjunto mayor y más heterogéneo de bacilos gramnegativos de importancia médica. Hasta 1972 se habían determinado 11 géneros con 26 especies, ahora se han descrito al menos 27 géneros con más de 110 especies. Estos géneros se han clasificado en función de las tecnologías como la homología del DNA, las pruebas bioquímicas, reacciones serológicas, la susceptibilidad a bacteriófagos específicos y a patrones de sensibilidad a antibióticos. A pesar de la complejidad de esta familia, 14 son los géneros de importancia médica: *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia* y *Erwinia* (Koneman y col., 1988).

Las enterobacterias son organismos procariontes de distribución mundial, ya que se encuentran en el suelo, agua, aire, vegetación y formando parte de la biota bacteriana normal de casi todos los animales de sangre caliente, incluido el hombre. Géneros como *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia* siempre se asocian a enfermedades, mientras que *Escherichia*, *Klebsiella* y *Proteus* son miembros de la microbiota habitual, pero pueden ser patógenos potenciales.

Estos microorganismos son: bacilos gramnegativos, móviles por flagelos peritricos o no móviles, no esporulados, anaerobios facultativos, producen ácido a partir de glucosa, son oxidasa negativos, catalasa positivos, usualmente reducen los nitros a nitritos, según la secuencia de su rRNA16S pertenecen a la sección gamma del grupo de bacterias púrpura (proteobacterias) (Brock y Madigan, 1993).

Sus requerimientos nutricionales son simples, y una de las características taxonómicas clave para identificar los diversos géneros es por los productos finales que se obtienen de la fermentación anaeróbica de glucosa. Se reconocen dos patrones: la fermentación de ácido mixto y la fermentación 2,3-butanediol. Los distintos géneros y especies de esta familia pueden ser identificados a partir de su capacidad para



fermentar carbohidratos específicos, para utilizar ciertos sustratos (citrato) como única fuente de carbono, y para dar productos finales característicos como son el indol a partir de triptofano, amoníaco a partir de urea y sulfuro de hidrógeno (Davis y col., 1990).

El evento inicial para la colonización de los tejidos epiteliales del huésped por estos microorganismos es la adherencia a células, y dicho proceso conduce a la formación de verdaderos hábitats ecológicos distintivos que juegan un papel importante en la fisiología y defensa de las mucosas por parte del huésped ante el agente extraño. Este fenómeno de adherencia no es dañino en sí, pero favorece en el caso de cepas patógenas, la integración de factores de patogenicidad con sitios blanco en el huésped; las toxinas que producen las bacterias patógenas del tracto intestinal pueden interactuar más fácilmente con su receptores cuando previamente existe una interacción entre la bacteria y la superficie de las células del intestino. Así, los microorganismos capaces de invadir y multiplicarse dentro de los tejidos, deben de adherirse inicialmente a un sitio específico de la célula y posteriormente penetrar mediante diversos mecanismos (Salysers y Whitt, 1994).

### 2.2.1 *Salmonella*.

El género *Salmonella* comprende una gran variedad de especies patógenas para el hombre o animales, y habitualmente para ambos. No fermentan la lactosa, ni la sacarosa y, con pocas excepciones, producen abundante  $H_2S$ ; no hidrolizan la urea y pueden utilizar al citrato de Simmons como única fuente de carbono. En general son móviles y descarboxilan la lisina y la ornitina. (*S. typhi* no produce gas a partir de hidratos de carbono ni descarboxila la ornitina, tampoco produce  $H_2S$  en medio TSI). *Salmonella* y *E. coli* se relacionan en forma bastante estrecha; los dos géneros presentan una homología DNA-DNA de cerca del 90%. Existen algunos problemas en cuanto a su nomenclatura, con más de 2000 serotipos descritos en el esquema de Kauffman-White, la tribu Salmonellae se agrupa en base a sus antígenos somáticos O y se subdivide en serotipos por sus antígenos flagelares H (Koneman y col., 1988). Le Minor en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* en 1984 propuso la siguiente clasificación: Género: III *Salmonella*, Subgénero I: *S. choleraesuis*, *S. hirschfeldii*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A, *S. schottmuelleri*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*. Subgénero II: *S. salamae*. Subgénero III: *S. arizonae*. Subgénero IV: *S. houtenae* y Subgénero V: *S. bongor*. Los 3 tres síndromes principales causados por *Salmonella* son: *Salmonella typhi* (causante de la fiebre tifoidea), *Salmonella choleraesuis* (patógena del cerdo, pero que puede causar infecciones sistémicas en el hombre como septicemias) y *Salmonella enteritidis* (causante común de infecciones diarreicas en humanos y animales). *Salmonella enteritidis* es comunmente causante de infecciones por ingesta de alimentos contaminados, especialmente los avícolas y la leche (Salysers y Whitt, 1994).

Las salmonelas se caracterizan inmunológicamente con base en tres antígenos de superficie celular, el O, o de pared celular (somático); el antígeno H o flagelar; y el antígeno Vi (capa de polisacárido externa), que se encuentra en principio en las cepas de *Salmonella* que causan fiebre tifoidea. Los

antígenos O son lipopolisacáridos complejos y son parte de la estructura de la endotoxina (Brock y Madigan, 1993). Los lipopolisacáridos inducen una respuesta inflamatoria en el huésped durante la invasión de la mucosa, y este daño en las células hace que absorban menos y retengan agua, lo que podría ser responsable de la diarrea. La invasividad está dada por genes *inv H,F,G,E,A,B,C,I,J*, su localización es cromosómica, y se ha sugerido que muchos genes del cluster *inv* codifican para proteínas auxiliares que regulan el proceso de invasividad. Se ha propuesto que el gene *invB* sea el que codifica para la invasina. Mutaciones en el locus *inv* reducen la capacidad de las salmonelas para invadir cultivos celulares epiteliales, pero no afecta la adherencia bacteriana a las células del huésped. Se conocen plásmidos que llevan genes de virulencia en *S. typhimurium*, ya que si se pierden, se afecta la habilidad de la bacteria para producir infecciones sistémicas en ratones; 5 genes *spv* se encuentran en un operón y parece que sus productos son proteínas reguladoras, ya que si se insertan en cepas avirulentas, se restablece la virulencia.

Es poco en realidad lo que se sabe acerca de cómo *Salmonella* invade la mucosa intestinal y establece la infección. La acción de *S. typhimurium* se ha estudiado en modelos animales como el cerdo, observándose que invaden el intestino delgado y el colon, y que se localizan tanto dentro de células de la mucosa absorptiva, como dentro de macrófagos asociados a la mucosa, pero no en células M ni en las placas de Peyer, esto no quiere decir que no pasen por las células M sino que no crecen dentro de ellas. *Salmonella choleraesuis* tiene una distribución diferente en este modelo y se observa dentro de las células M, pero no en las absorptivas. Una vez dentro de las células, estos microorganismos aparecen como parásitos intracelulares facultativos que crecen en los macrófagos del hígado y del bazo, pero todavía es controversial si crecen dentro o fuera de las células. En modelos *in vitro* usando fagocitos se observó que crecían dentro de ellos. Otro modelo importante para estudiar esto es el que utiliza líneas celulares Caco-2 (epitelio intestinal humano). En este modelo *S. typhimurium* interacciona con células polarizadas Caco-2, y se puso de manifiesto que las bacterias se adherían a las microvellosidades de la superficie apical (mediado por fimbrias y adhesinas) 30 min después de la infección. Posteriormente se observó que se englobaron y se internaron dentro de la célula del intestino, y una hora después de la infección se observaron dentro de grandes vacuolas fagocíticas donde se multiplicaron a las 12 h. Después de 24 horas, las células epiteliales estaban llenas de bacterias y éstas salían de ellas, pero a diferencia de *Shigella spp.* las bacterias no se internaron dentro del citoplasma de la célula. Se propone que *Salmonella spp.* causa rearrreglos en los filamentos de actina para su internamiento, mediante procesos de transducción de señales, donde un aumento en el calcio intracelular polimeriza las fibras de actina. Se conoce una enterotoxina y una citotoxina, pero su función no está bien determinada (Salyers y Whitt, 1994; D'Aoust, 1997).

### 2.2.2 *Shigella*.

Son bacilos gramnegativos, no esporulados, anaerobios facultativos, que fermentan la glucosa sin producción de gas, no poseen lisina descarboxilasa y son inmóviles, esto podría ser la razón por la cual no colonizan el intestino delgado sino el colon. Es ahí donde las bacterias entran a las células mucosas, se

dividen rápidamente y se mueven lateralmente para infectar células adyacentes. Entonces se presenta una respuesta inflamatoria que involucra tanto a la lámina propia como a la capa mucosa. El daño causado por la respuesta inflamatoria es lo que hace que se presenten evacuaciones con sangre y moco. Es el agente etiológico de la enfermedad conocida como disentería bacilar, (para distinguirla de la disentería amebiana), que se caracteriza por la presencia de moco y sangre en las heces. La shigellosis es el clásico ejemplo de enfermedad donde la bacteria invade las células del huésped, se duplica dentro de ellas en el citoplasma y se disemina de célula a célula. Aunque la disentería bacilar es una infección localizada y autolimitante, pueden existir complicaciones serias. En el 3% al 50% de los casos, la infección inicial puede estar seguida de complicaciones neurológicas (letargia, dolores de cabeza y convulsiones) o puede dar lugar a insuficiencia renal (síndrome urémico hemolítico). Esto se presenta como resultado del daño que sufren los vasos sanguíneos por la circulación de productos elaborados por *Shigella* (posiblemente la toxina Shiga y los lipopolisacáridos), y no por la acción directa de la bacteria.

Cuatro especies de *Shigella* pueden causar disentería: *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri* y *S. dysenteriae*. La infección se presenta generalmente al consumir agua contaminada con heces o consumiendo alimentos contaminados, especialmente en donde existen letrinas al aire libre, (en donde las moscas actúan como vectores mecánicos) y de persona a persona. Es una enfermedad común en países en desarrollo donde las condiciones de higiene son escasas, puede ser mortal en lactantes y niños pequeños (Salysers y Whitt, 1994).

*Shigella* posee antígeno O específico pero carece de antígeno H por ser no móviles; ciertas cepas lisas poseen antígeno K termolábil (Davis y col., 1990).

En general *Shigella* está muy relacionada con *Escherichia coli*, son tan semejantes que pueden experimentar recombinación genética unas con otras, ambas son susceptibles a algunos de los mismos bacteriófagos, y presentan homología del DNA de casi un 100%. Los factores de virulencia identificados en estas bacterias son *IpaD*, posiblemente para adherencia, *IpaB,C* para invasión y escape de la vesícula fagocítica, *IcsA,B* para diseminación intracelular, LPS y Antígeno O para respuesta inflamatoria, Toxina Shiga (*StxA*, *StxB*) para la producción de la toxina, y otros que tiene que ver con la regulación de la expresión de estos factores como *Fur* que regula tanto a *stxA/stxB*, así como genes para el secuestro de iones hierro. La mayoría de los genes necesarios para la virulencia se encuentran codificados en plásmidos grandes, el mejor estudiado es un plásmido de 220 kb de *S. flexneri*, y el hallazgo de plásmidos similares en *E. coli* sugiere que éstos se transfieren entre las bacterias libremente en la naturaleza. Algunos loci cromosomales que contribuyen a la invasión parecen ser reguladores más que estructurales. Los genes que codifican para la toxina son cromosomales y se encuentran en un operón (Salysers y Whitt, 1994; Maurelli y Lampel, 1997).

La toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* es del tipo de toxina A-B, y no es secretada por la bacteria sino que se libera cuando la célula se lisa. La cristalización de esta toxina demostró que existe gran similitud estructural con la toxina colérica, aunque la secuencia de aminoácidos entre ambas sea muy distinta. Es reconocida por receptores glicolipídicos (globotriaosilceramida) de la superficie celular

(Gb3). La toxina primero se une a la superficie celular y se interna por endocitosis, el corte para la activación y la translocación de la subunidad A se hace dentro de la célula del huésped, su función no es de ADP-ribosilación sino que inactiva la subunidad 60S del ribosoma eucarionte mediante la ruptura de un enlace N-glucosídico en un residuo específico de adenosina dentro de la subunidad 28S rRNA ribosómica, efecto que impide que se una el aminoacil-tRNA al ribosoma en la elongación, dando lugar a que se termine la síntesis de proteínas (Salyers y Whitt, 1994; Maurelli y Lampel, 1997).

### 2.2.3 *Escherichia coli*

Bacterias de forma bacilar, gramnegativas, anaerobios facultativos, no esporulados, oxidasa negativos, móviles o inmóviles, fermentan la glucosa con producción de ácido y gas (algunas cepas no producen gas), producen indol a partir de triptofano, no producen acetoina, y no pueden utilizar citratos como única fuente de carbono. Forman parte de la microbiota intestinal y tienen un papel nutricional importante ya que producen vitaminas, en especial la vitamina K (Brock y Madigan, 1993).

*Escherichia coli* es de los microorganismos anaerobios facultativos más importantes del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente. Coloniza al recién nacido horas después de su nacimiento y juega un papel importante en el mantenimiento de la fisiología intestinal.

Esta bacteria permanece confinada dentro del lumen intestinal como un saprófito inocuo, pero en huéspedes debilitados o inmunosuprimidos, causa infecciones oportunistas. También existe un conjunto de cepas de *E. coli* que poseen un arreglo específico de propiedades de virulencia que les permite contrarrestar los mecanismos de defensa del huésped y causar enfermedad. Estas cepas pueden ser agentes etiológicos de diferentes enfermedades entre las que incluyen: diarrea, disentería, síndrome urémico hemolítico, infecciones del riñón y vejiga, septicemia y meningitis neonatal. Por tal motivo se han agrupado en tres categorías de acuerdo al tipo de infecciones que producen: infecciones del tracto urinario, enfermedades diarreicas y meningitis/sepsis neonatal (Nataro y Levine, 1994).

*E. coli* fue originalmente descrito como patógeno intestinal por Bray en 1945, tras demostrar que una cepa era la responsable de producir diarrea en hospitales durante el verano, causando brotes de diarrea infantil (Levine, 1987). En México, en 1946 se reportó el aislamiento de *E. coli* en un caso mortal de diarrea infantil, esta cepa presentaba un antígeno común con *Salmonella adelaide* y fue denominada *E. coli* Gómez (Varela y col., 1946).

La clasificación serológica de *E. coli* se basa en tres diferentes antígenos constituidos por: 174 somáticos (O), 80 capsulares (K) y 56 flagelares (H) (Doyle y col. 1997).

#### 2.2.3.1 *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario (UPEC).

Estas infecciones se presentan en todas las edades y en ambos sexos, siendo el femenino el más afectado posiblemente por su propia anatomía. Las infecciones varían en cuanto a su severidad y van desde

una bacteriuria asintomática, a una cistitis y pielonefritis. Cuando la infección se confina sólo a la vejiga (cistitis) el paciente se muestra generalmente afebril, con algunas molestias como micción frecuente y urgente y malestar abdominal bajo. En la pielonefritis se presenta fiebre alta, dolor costal, y existe un defecto en la habilidad de concentración del riñón.

En este grupo de *E. coli* se han descrito varias adhesinas entre las que se encuentran los pili tipo 1 que contribuyen a la persistencia de la bacteria e incrementan la respuesta inflamatoria, lo que conduce a un aumento en la virulencia de *E. coli* (Connell y col., 1996). El pili P es la adhesina más importante especialmente en cepas que causan infecciones en el riñón. Existen diferentes tipos de pili P pero todos reconocen al mismo receptor (globobiosido,  $\alpha$ -D-Gal-(1,4)- $\beta$ -D-Gal), los genes que están involucrados con su síntesis se denominan *pap*. Otras adhesinas afimbriadas son, AFAI, AFaIII y la adhesina Dr. El receptor que reconoce a éstas es el antígeno de grupo sanguíneo Dr. La unión a las células del tracto urinario favorece el ascenso del patógeno de la uretra al riñón. Parece ser, que la respuesta inflamatoria se debe a la acción de los LPS y principalmente a la presencia del pili P. Esta respuesta se caracteriza por la movilización de polimorfonucleares a través de la mucosa y la liberación de citocinas al lumen de la vejiga.

Algunas cepas uropatógenicas de *E. coli* secretan una toxina que se denomina hemolisina, porque lisa los eritrocitos *in vitro*. Tiene un peso molecular de 110 kDa, y se inserta a sí misma dentro de la membrana lipídica formando un poro citoletal. También produce un sideróforo llamado aerobactina que se presenta en el 73% de las cepas que causan pielonefritis (Salyers y Whitt, 1994, Nataro y Levine, 1994).

Dentro de los serotipos de UPEC reportados para humanos están: O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:H-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:H-, O18ac:H7, O18ac:H-, O22:H1, O25:H1, O75:H5 y O75:H- (Lior, 1994). (Tabla 1)

### 2.2.3.2 *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC).

Estas bacterias son los agentes causales de la mayoría de las diarreas en niños de países en desarrollo y de los viajeros que visitan estos países. Las diarreas se presentan comúnmente durante los tres primeros años de vida, y la complicación más importante es la muerte por deshidratación. La infección es adquirida por la ingestión de agua y alimentos contaminados (Levine, 1987).

Las cepas ETEC no invaden las células epiteliales pero se adhieren a la mucosa intestinal. Poseen factores de colonización denominados CFAs. Se han descrito cuando menos 15 de estos factores adhesivos y los más importantes parecen ser cuatro en cepas ETEC de animales: K88, K99, 987P y F41 y cuatro en cepas de humanos: CFA/I, CFA/II, CFA/III y CFA/IV. CFA/I es un pili largo constituido en su mayoría por pilina y con adhesinas (proteínas) especiales en la punta. CFA/II es un conjunto de adhesinas relacionadas que no poseen la misma estructura. Cravioto y col., en 1982, demostraron que las cepas de ETEC que eran identificadas como CFA/II con base en patrones de hemaglutinación, eran en realidad combinaciones de tres antígenos distintos que elaboraban, denominados CS1, CS2 y CS3. Dependiendo

del serotipo y del biotipo, se han encontrado cepas que expresan los antígenos CS1 y CS3, CS2 y CS3 o sólo CS3; sin embargo, no se han observado cepas que expresen simultáneamente CS1 y CS2.

CFA/I, CS1 y CS2 son adhesinas que corresponden a fimbrias rígidas de 6-7 nm de diámetro, mientras que CS3, virtualmente el antígeno común a todas las cepas CFA/II, posee una estructura muy delgada y flexible de 2-3 nm de diámetro. En la cepa E8775 se describió otra familia de factores de adherencia y se denominaron como CS4, CS5 y CS6, dentro del grupo CFA/IV (Levine, 1987.).

El papel de CFA/III en la patogénesis todavía es especulativo. La más nueva de las adhesinas de las ETEC es la que se denomina *longus*, es de un tipo que se conoce como pilis en forma de atado ("bundle-forming pilus"), y es inusualmente larga ya que se extiende 40µm de la superficie celular. La formación de estos factores adhesivos está codificada por plásmidos (Salysers y Whitt, 1994), está restringida a ciertos serotipo de *E. coli*, debido a la presencia de genes estructurales y reguladores que controlan la producción de fimbrias y fibrilas. (Eslava y col., 1994).

Las cepas de ETEC elaboran dos tipos diferentes de toxinas, la toxina termolábil (LT) denominada así por su labilidad al calor (se inactiva a 100°C durante 10 min), y la denominada termoestable (ST) ya que retiene su actividad tóxica después de incubarla a 100°C durante 30 min. El control genético de la producción de estas toxinas reside en plásmidos de entre 30-75 MDa que pueden llevar también los genes para los factores de adherencia.

Existen dos tipos de toxina LT: LT-I y LT-II. La primera es una proteína dimérica de alto peso molecular (86,500 Da), que comparte un 80% de identidad con la toxina producida por *V. cholerae* O1 y es similar en cuanto a su función y antigenicidad. Está compuesta por una subunidad A y cinco subunidades B. La subunidad A tiene la actividad enzimática y está constituida por las fracciones A1 y A2; la primera penetra a la célula e induce una ADP-ribosilación en una proteína de membrana denominada G<sub>α</sub>, la cual activa a la enzima adenilato-ciclasa que incrementa los niveles de AMPc intracelular, lo que da lugar a que se altere la actividad de los transportadores de sodio y cloro, y esto produce un desbalance iónico que ocasiona que se acumule gran cantidad de agua en el lumen intestinal, produciéndose la diarrea. A2 participa en la unión a B, así como en el proceso de internalización de A1. La subunidad B forma un pentámero alrededor de A y se une a sus receptores GM<sub>1</sub> (gangliósidos). La segunda comparte las mismas características que LT-I, solamente que se aísla principalmente de animales y no se asocia con enfermedad ni en animales ni en el hombre.

ST no es una sola toxina sino una familia de toxinas y son péptidos de bajo peso molecular. Se dividen en dos subgrupos STa soluble en metanol y STb insoluble en metanol. Se secretan al medio mediante una serie de pasos, en donde se reduce su tamaño. En el caso de STa, el polipéptido precursor de 72 aminoácidos se secreta primero al periplasma y en ese paso pierde 18 aminoácidos dejando un péptido de 54 aminoácidos. Este péptido se secreta entonces al exterior donde se corta y deja al final un péptido de 17-19 aminoácidos rico en cisteína. El mismo mecanismo se sigue para STb. STa actúa uniéndose a un receptor de membrana protéico en el epitelio intestinal localizado en el borde de cepillo de la membrana del enterocito. Este receptor se encuentra con mayor frecuencia en el intestino delgado y en el colon, y se

describe como un receptor guanilato ciclasa tipo C. Es una proteína de 140-160 kDa de la familia de receptores de ciclasas. STa causa un incremento en los niveles de GMP cíclico al estimular a la enzima guanilato ciclasa, desencadenando los mismos efectos que el AMPc. No se conoce el mecanismo por el cual STb estimula la secreción intestinal pero no involucra a nucleótidos cíclicos, y solamente se ha encontrado en cepas ETEC porcinas (Sears y Kaper, 1996).

Los serogrupos "O" más comunes en las ETEC son: 6, 8, 11, 15, 20, 27, 63, 78, 115, 126, 128, 148, 149, 159, 173 (Lior, 1994). (Tabla 1).

### 2.2.3.3 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC).

Dupont en 1971 fue el primero en describirlas. Las cepas de EIEC se parecen mucho a *Shigella* spp. Metabólicamente tiene características intermedias con dicho género y se destaca su deficiente capacidad para utilizar la lactosa y en la mayoría de las cepas no existen flagelos. Una característica importante es que no producen toxina Shiga. Su mecanismo de patogenicidad es la invasividad a enterocitos, reproduciéndose en ellos e invadiendo otras células, y esto es debido a genes de virulencia presentes en un plásmido de 140 MDa (*p/mv*); esta invasión probablemente contribuya a la disentería que se produce, por los mismos mecanismos inflamatorios descritos para *Shigella*. La mayoría de la actividad enterotóxica presente en el sobrenadante de cultivos de EIEC se remite a una enterotoxina codificada en un gene plasmídico (*sen*). Esta enterotoxina también la produce *Shigella flexneri*, y se ha visto que mutantes *sen*, todavía retienen un poco de actividad tóxica, por lo que deben existir otras enterotoxinas no identificadas. Cepas EIEC también secretan una citotoxina pequeña (menor de 30 kDa), que presenta una citotoxicidad muy baja en células Vero. Las EIEC son altamente virulentas y, al igual que *Shigella*, su dosis infectiva es muy baja (Sears y Kaper, 1996; Eslava y col., 1994; Levine, 1987.) Estas cepas afectan a adultos principalmente y se aíslan muy poco en niños, identificándose preferentemente después del sexto mes de vida (Cravioto y col., 1988,1990). (Tabla 1).

Los serogrupos más comunes son: 28ac, 29, 112ac, 124,136,143,144,152,164,167 (Lior, 1994).

### 2.2.3.4 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).

En 1982 se presentó un brote de colitis hemorrágica en varios lugares de los Estados Unidos, y se identificó el serotipo O157:H7 (considerado el prototipo) como el causante de estos brotes. Este grupo propuesto por Levine, incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características epidemiológicas y patogénicas. Una característica general que las distingue es su incapacidad para fermentar el sorbitol, su incapacidad para producir  $\beta$ -glucuronidasa y su gran tolerancia a valores de pH bajos, no obstante, la cepa O157:H- que sí fermenta el sorbitol se asoció con diarrea hemorrágica. Estudios epidemiológicos realizados con la cepa O157H7 indican que las infecciones ocurren con mayor frecuencia en países desarrollados de Europa (principalmente Gran Bretaña), Norteamérica (Estados

Unidos y Canadá) y Japón entre otros. También se le asocia como uno de los agentes etiológicos del síndrome urémico hemolítico (HUS).

Las citotoxinas que producen reciben dos nombres de acuerdo con sus características antigénicas y por su actividad sobre cultivos celulares, uno es citotoxina semejante a la de Shiga (SLT), por la propiedad que tiene una de las variedades de cruzar antigénicamente con la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y el segundo verotoxina (VT), por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero (riñón de mono verde).

Son en realidad una familia de citotoxinas que se divide en tres grupos antigénicos: SLT-I o verotoxina 1, SLT-2 o verotoxina 2 que afectan específicamente a humanos y SLTIIv que es una variedad antigénica de VT2 y afecta a animales, dichas citotoxinas están codificadas por bacteriófagos lisogénicos. Su acción es semejante a la de la toxina Shiga, es decir, terminan con la síntesis de proteínas, dando lugar a la muerte de la célula intoxicada.

Otros factores de virulencia están relacionados con la alteración histológica del colon denominada adherencia y esfacelamiento (AE). Un locus cromosomal de 35 kb denominado LEE (locus of enterocyte effacement) contiene el gene *eaeA* cuya expresión está regulada por un plásmido de 60 MDa, el cual además codifica para una estructura fimbrial. El gene *eaeA*, cuya homología con respecto al gene *eaeA* de las cepas EPEC es del 86% (Yu y Kaper, 1992), codifica para una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, la cual confiere a la bacteria la capacidad para adherirse e inducir el efecto de destrucción de las microvellosidades (esfacelamiento). Otros genes como *espA* y *espB* (antiguamente *eaeB*), codifican para otros polipéptidos que se requieren para la transducción de señales, necesaria para la formación de la lesión -AE. También existe dentro del locus LEE un sistema de transporte codificado por genes *sep* para secretar factores de virulencia.

Los brotes más recientes se relacionan frecuentemente con la ingesta de alimentos contaminados, como hamburguesas de carnes de res, leche, agua, etc., y también por contacto con animales y de persona a persona.

En nuestro país, hasta este momento, no existen reportes de aislamiento del serotipo O157:H7. En México los serogrupos EHEC reportados son: O55, O26 y O111 entre otros, los cuales se relacionan con diarreas leves o moderadas (Doyle y col., 1997; Sears y Kaper, 1996; Eslava y col., 1994; Levine, 1987).

Los serogrupos O comúnmente reportados incluyen: 26, 46, 48, 55, 91, 98, 111, 113, 117, 118, 119, 125, 128, 145, 157 y 172 (Lior, 1994).(Tabla 1).

#### **2.2.3.5 *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC).**

La capacidad patogénica de las cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea se comprobó experimentalmente en la década de los años 40 del presente siglo, cuando, al inocular oralmente voluntarios con dosis elevadas ( $10^8$ -  $10^{10}$  bacterias / ml) de estos microorganismos, éstos presentaban diarrea y desarrollaban una respuesta inmunológica sistémica contra el antígeno somático. Neter propuso el término



de enteropatógena para designar a estas bacterias aisladas de niños con diarrea y confirmadas como virulentas en los estudios con voluntarios humanos adultos (Levine, 1987).

En países subdesarrollados las cepas EPEC son la causa principal de diarrea infantil, sobre todo en niños menores de 6 meses de edad. La sustitución de la alimentación materna por leche de fórmula aumenta el riesgo de contraer diarrea y agrava los problemas de malnutrición (Law, 1994).

Desde los años cuarenta estudios de necropsias de niños que habían fallecido a consecuencia de diarreas asociadas con cepas EPEC indicaban que el intestino delgado presentaba lesiones de esfacelamiento (Varela y col., 1946). El primer estudio realizado en el laboratorio sobre la capacidad de EPEC para adherirse en forma íntima a células eucariontes fue publicado por Cravioto y col., en 1979. Estos autores encontraron que aproximadamente el 80% de una colección importante de cepas EPEC formaba microcolonias sobre el citoplasma de células HEp-2 en cultivo. Esta característica no la compartían otros grupos de *E. coli* con o sin capacidad para producir diarrea. Estudios posteriores, incluyendo algunos con microscopía electrónica, han demostrado que existen cuando menos tres tipos de adherencia de *E. coli* a células HEp-2 y HeLa: la llamada *localizada* con formación de microcolonias en el citoplasma celular, la denominada *difusa* donde hay adhesividad de bacterias en todo el citoplasma celular, y la *agregativa* donde existe agregación bacteriana tanto al citoplasma celular como al vidrio de la preparación (Scaletsky y col., 1984, Vial y col., 1988). La evidencia epidemiológica publicada indica que existe asociación estadística entre colonización con cepas de adherencia localizada y la presencia de diarrea aguda y entre colonización con cepas de adherencia agregativa y la diarrea persistente (Nataro y col., 1987, Cravioto y col., 1991).

Se ha propuesto que la adherencia de tipo localizado de las cepas EPEC al enterocito tiene tres fases; en la primera la asociación entre la bacteria y la célula huésped esta mediada por adhesinas de tipo fimbriado, en la segunda, la unión de la bacteria con la célula huésped dispara un evento de transducción de señales, que está asociado con la activación de tirosín-cinasas, y un aumento en los niveles de calcio intracelular, y por último, en la tercera fase, la bacteria se asocia íntimamente con la célula huésped y ocurre un amplio rearrreglo de las fibras de actina en la vecindad de la bacteria. Histológicamente la segunda y la tercera fase se observan como esfacelamiento del epitelio (deformación y destrucción de algunas microvellosidades), así como la formación de una estructura de pedestal (formada por una capa densa de fibras de actina) en el citoplasma de la célula huésped, justo abajo de donde está la célula adherida. A este proceso se le conoce como adherencia y esfacelamiento (AE).

Los genes identificados en este proceso se denominan *eae* y están localizados en una región del cromosoma de la bacteria. Este loci está formado por los genes *eaeA* y *eaeB*, el primero es el que codifica para una proteína de membrana externa de 94 kDa denominada intimina, relacionada con la adherencia íntima a la célula del huésped. Tanto *eaeB* como otros genes *sep* están relacionados con la regulación y la secreción de ésta y otras proteínas. La adherencia en la fase inicial parece estar mediada por haces de fimbrias (Bfp) parecidos a los que elabora *V. cholerae*, y es posible que medie también la unión bacteria-bacteria que presentan estas cepas (microcolonias). La codificación genética para una subunidad de estos

haces de fimbrias esta dada por un gene *bfpA* localizado en un plásmido denominado EAF, relacionado tanto con la capacidad de cepas EPEC para adherirse en forma localizada a células HEP-2, como para causar diarrea en voluntarios. Este plásmido también codifica para ciertos genes que regulan la expresión de los genes cromosomales *eae*.

Se ha señalado que la adherencia íntima de las cepas EPEC da lugar a que se polimerice la actina del citoesqueleto, como respuesta al incremento en los niveles de calcio intracelular y a la activación de la proteína cinasa C. Estos cambios bioquímicos intracelulares son los que probablemente inducen a la célula intestinal a secretar agua y electrolitos (cloro y potasio) al espacio intraluminal. La diarrea subsecuente es consecuencia de este incremento, aunado a la falta de absorción adecuada, por la ausencia de microvellosidades en segmentos grandes del epitelio intestinal. Los cambios celulares ocasionados en la fase de adherencia íntima se han podido evidenciar *in vitro* mediante un sistema de marcaje fluorescente (sistema de faloidina actina fluorescente FAS), de la actina polimerizada en los pedestales que forman las células epiteliales, asociados con lesiones de adherencia y esfacelamiento. No se ha demostrado la existencia de exotoxinas (Law, 1994; Sears y Kaper, 1996; Eslava y col., 1994; Levine, 1987).

Los serogrupos O más comunes son: 18, 20, 26, 28, 44, 55, 86, 91, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128, 142, 158 y 159 (Lior, 1994). (Tabla 1).

#### 2.2.3.6 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC).

Cepas de EAggEC se asocian con diarrea persistente (> de 14 días) en niños, en países en vías de desarrollo. También se asocia con diarreas en adultos, transmitidas por alimentos contaminados en países desarrollados. La primera evidencia fue reportada por Bhan y col. en 1989, quien realizó un monitoreo semanal, durante un año, a niños menores de 3 años de edad, en un pueblo del norte de India y encontró que cepas EAggEC estaban asociadas con diarrea persistente.

El grupo EAggEC se definen por la presencia de un tipo característico de adherencia a células HEP-2 (Nataro y col., 1987), y no producen enterotoxinas tipo LT o ST. Poseen un plásmido de 65 MDa relacionado con la adherencia agregativa, y si el plásmido es transferido a cepas no adherentes como *E. coli* HB101, les confiere dicha adherencia. Nataro y col. (1993) identificaron dos diferentes fimbrias codificadas en dos distintas regiones de un plásmido, AAF/I y AAF/II que son capaces de mediar adherencia agregativa independientemente. AAF/I es una fimbria del tipo Bfp (bundle forming pilus) de 2-3 nm de diámetro. El tipo de adherencia agregativa varía entre las cepas, algunas se adhieren más al vidrio y otras más a la célula pero siempre conservan su típico patrón, en donde las células se adhieren al citoplasma celular formando acúmulos que parecen ladrillos encimados (Elliott y Nataro, 1995).

Se ha reportado la existencia de tres toxinas que probablemente estimulen la secreción intestinal. La primera y mejor caracterizada es una enterotoxina termoestable conocida como EAST 1, es una proteína de 4.1 kDa codificada por un gene plasmídico (*astA*), y presenta cierta homología con la toxina termoestable STa de *E. coli* enterotoxigénica. En estudios realizados con íleon de conejo se observó que

produce un aumento en los niveles de GMPc sin cambios histológicos aparentes en la mucosa intestinal, y un aumento en la diferencia de potencial  $I_{sc}$  en el modelo de cámaras de Ussing, similar a lo observado con STa. No obstante lo previamente descrito, se ha encontrado que esta enterotoxina es producida por diferentes grupos de cepas, aún de aquellas aisladas de niños sin diarrea (Savarino y col., 1996).

La segunda toxina descrita en cepas EAggEC es una proteína de 120 kDa aproximadamente que está relacionada inmunológicamente con la hemolisina alfa de *E. coli*. Esta proteína en células HEP-2 causa elevación de los niveles de calcio intracelular, aumento debido a la toma de calcio extracelular del medio probablemente por el flujo de calcio a través de un poro creado por la toxina, como lo hace la hemolisina, y no por la liberación de calcio intracelular. Su relevancia en la fisiopatología se desconoce (Sears y Kaper, 1996).

La tercera toxina fue identificada por Eslava y col., en 1993 mientras estudiaban un brote de diarrea en México producido por EaggEC. Es una proteína de 108 kDa (Pet) que produce exfoliación en enterocitos, en un modelo que utilizaba asas ligadas de fleón de rata, y que era reconocida por el suero de los mismos pacientes en estudio. En este modelo se producía una respuesta inflamatoria aguda, y las microvellosidades se veían acortadas. La secuenciación del DNA del gene que codifica para esta proteína, encontrado en el mismo plásmido que codifica para las fimbrias AAF/1 y AAF/2, mostró que esta toxina es un miembro de la familia de proteínas auto-transportadoras, llamada así, porque su secreción a través de la membrana externa es mediada por el extremo carboxilo de la molécula (Eslava y col., 1998).

Existe una considerable heterogenicidad entre las cepas de EAggEC y todavía son muy pocos los serogrupos reportados, estas cepas además, se han aislado de niños con diarrea con sangre. Se desconoce aún si existen diferentes tipos de cepas agregativas, algunas relacionadas con diarrea persistente y otras con diarrea con sangre. Actualmente se está estudiando la posible asociación entre serotipos y patrones electroforéticos de cepas agregativas (empleando el sistema de enzimas multiloci) con el tipo de cuadro clínico (Eslava y col., 1994).

Los serogrupos reportados son: O7, O44, O77, O86, O126 y O127 (Lior, 1994). (Tabla 1).

### 2.2.3.7 *Escherichia coli* con adherencia difusa (DAEC).

Estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre diarrea y DAEC, como el realizado por Girón y col., en 1991 en niños Mayas de México, donde claramente se asocian cepas DAEC aisladas con diarrea. Las características de la diarrea eran la de contener moco y ser muy líquida, con una duración de 8 días, además se presentaba fiebre y vómito, semejando una infección por ETEC. Las cepas de DAEC eran muy heterogéneas con respecto a su contenido plasmídico y serotipo, sin embargo, presentaron patrones de adherencia característicos a células Hep-2 y HeLa.

Estas cepas no producen toxinas de tipo LT o ST y tampoco invaden las células epiteliales. Se han descrito un número de adhesinas y pueden codificar tanto en plásmidos como en el cromosoma. La adhesina AIDA-I fue clonada de un plásmido grande (100 kpb) de una cepa aislada de un caso de diarrea

Tabla 1. Características de los tipos de *Escherichia coli* causantes de diarrea en humanos.

CLASES de <i>E. coli</i>	GRUPOS DE EDAD AFECTADOS	SÍNDROMES CLÍNICOS	SEROGRUPOS	ELABORACIÓN DE TOXINAS	PLÁSMIDOS RELACIONADOS	MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
Enteropatógena (EPEC)	Recién nacidos y lactantes	Diarrea aguda.	18, 20, 26, 28, 44, 55, 86, 91, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128, 142, 158, 159.	?	60 MDa. EAF codifica para <i>bfpA</i> . Regula genes <i>eae</i> cromosomales.	Adherencia a células epiteliales y esfacelamiento de microvellosidades. Genes cromosomales <i>eae</i> (Intimina)	Mundial
Enterotoxigénica (ETEC)	Niños mayores de 5 años. Viajeros turistas	Diarrea acuosa.	6, 8, 11, 15, 20, 27, 63, 78, 115, 126, 126, 148, 149, 159, 173.	Enterotoxinas LT y ST.	30-75 MDa. Adhesinas y enterotoxinas	Factores de colonización CFAs(Adhesinas fimbriadas). Toxinas LT y ST.	Países subdesarrollados
Enteroinvasiva (EIEC)	Todas las edades	Evacuaciones con moco y sangre (Disenteria).	28ac, 29, 112ac, 124, 136, 143, 144, 152, 164, 167.	Enterotoxinas y citotoxinas no bien identificadas.	140 MDa. Genes de virulencia <i>inv</i> .	Invasión y multiplicación dentro de las células. Causan infiltración de polimorfonucleares.	Mundial
Enterohemorrágica (EHEC)	Todas las edades	Colitis hemorrágica. Síndrome urémico hemolítico.	26, 46, 48, 55, 91, 98, 111, 113, 117, 118, 119, 125, 128, 145, 157, 172.	SLT I, SLT II y SLT IV.	60 MDa. Estructuras fimbriales y regula genes <i>eae</i> cromosomales. Bacteriófagos lisogénicos codifican para las SLT.	Factores de adherencia tipo A/E. Producción de citotoxinas Vero ó SLT	Países desarrollados
Enteroadregativa (EaggEC)	Niños	Diarrea persistente. (> 14 días).	7, 44, 77, 86, 126, 127.	EAST 1. Proteína 120 kDa., Proteína Pet 108 kDa.	65 MDA. Adhesinas AAF-I y AAF-II. Proteína 108 kDa. (Pet). EAST I.	Fimbrias AAF-I y AAF-II. EAST I. Pet (108 kDa).	Países subdesarrollados
Uropatógena (UPEC)	Todas las edades	Bacteriuria, cistitis, pielonefritis.	1, 2, 4, 6, 7, 18ac, 22, 25, 75.	Hemolisina		Pilis tipo I, pilis P Adhesinas fimbriadas AFA-I, AFA-III. Aerobactina.	Mundial
Adherente difusa (DAEC)	Niños	Evacuaciones líquidas con moco.			100 kpb	AIDA-1	

infantil. Se han descrito algunas toxinas pero ninguna está claramente asociada con enfermedades producidas por DAEC.

La heterogeneidad de DAEC y la dificultad de encontrar clonas patógenas impiden la comprensión de su patogenia (Elliott y Nataro, 1995). (Tabla 1).

#### 2.2.3.8 Toxina citoletal distensionante (CDT).

En 1987, Johnson y Lior, usando una cepa de *Escherichia coli* O128 aislada de niños con diarrea, describieron un nuevo tipo de actividad en células de ovario de hamster chino (CHO) y denominaron al nuevo factor como toxina citoletal distensionante (CDT). Esta actividad produce elongación de las células CHO a las 24 h, seguido de un proceso de distensión y citotoxicidad a las 96 h y la muerte a las 120 h. Esto mismo ocurre con células HeLa y HEp-2, y en menor grado en células Vero. Esta actividad se encontró también en el 6.4% de las cepas pertenecientes a EPEC. La actividad es termolábil y se parece a la que presenta la LT. Se han clonado los genes (*cdt*) que codifican para la esta actividad de la cepa *E.coli* E6468/62 y contiene tres marcos de lectura abiertos que predicen masas moleculares de 25.5, 29.8 y 20.3 kDa (Scott y Kaper, 1994).

Esta actividad también ha sido encontrada en especies de *Campylobacter* y *Shigella*. No se han reportado estudios con células intestinales para esta toxina (Sears y Kaper, 1996).

### 2.3. Seguridad microbiológica de alimentos fermentados.

Las infecciones gastrointestinales producidas por bacterias y propiamente la diarrea infantil, son endémicas en muchos países en desarrollo, incluyendo México (Cravioto y col., 1991; Girón y col., 1991; Fitzroy y col., 1992; Levine y col., 1993). Los alimentos fermentados ácidos, como el pozol de México, y otros similares como el *kenkey* y el *koko* de Ghana (Muller, 1970; Andah y Muller, 1973), pueden jugar un papel importante para contrarrestar dichas infecciones, si es que la fermentación ácida reduce la población de enterobacterias patógenas que están presentes en el alimento. Muchas veces estos alimentos se usan como sustitutos de alimentos de destete más seguros que los basados en la leche de animales domésticos, en condiciones de una higiene deficiente. Los bajos valores de pH y la presencia de ácidos producidos durante la fermentación provocan que estos alimentos sean menos susceptibles al desarrollo de bacterias patógenas que otros similares no fermentados. (Mensah y col., 1988; 1990).

En estudios realizados con pozol, se han observado efectos antagonicos adicionales a los ejercidos por las bacterias lácticas. Herrera y Ulloa en 1975, realizaron estudios de antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas para el hombre, y reportaron un efecto antagonico *in vitro* del pozol sobre 22 especies de microorganismos, entre los cuales se encontraban cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium* y *Staphylococcus aureus*, describiendo, sin embargo, que no se sabe si este efecto sea el mismo cuando los microorganismos se encuentran creciendo en la masa de pozol.

Estudios realizados por Mensah y col. (1988, 1990), con masas de maíz fermentadas, elaboradas en Ghana, mostraron que hay una disminución de la cantidad de patógenos que fueron inoculados a las papillas, después de las 24 h, sin embargo, también refieren que algunas cepas (variedades de *Shigella spp.*) sobrevivieron aún después de transcurrido este tiempo, por lo que concluyen que una fermentación ácida puede no eliminar totalmente las bacterias indeseables.

Diversos estudios señalan que los métodos de preparación casera tradicional resultan en productos con niveles altos de bacterias de origen fecal y otras (Caparelli y Mata, 1975; Mensah y col., 1988, 1990).

Nout (1992) por otro lado, estableció que con una combinación de condiciones, como valores bajos de pH en el alimento fermentado, menores de 4.5 o preferentemente menores de 4.0 y concentraciones de 1 a 1.5% de ácidos láctico y acético, era posible inhibir el crecimiento de organismos de las familias Bacillaceae, Micrococcaceae y Enterobacteriaceae en dichos alimentos.

Lorri y Svanberg (1992) encontraron que diversas cepas de enterobacterias patógenas, tales como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Campylobacter sp*, *Shigella sp* y *Salmonella sp*, se inhibían al ser inoculadas en atoles de cereales fermentados de Tanzania. Simango y Rukure (1992) estudiaron la prevalencia de bacterias patógenas al inocularlas en *mahewu*, una papilla agria de maíz, y reportaron que *Campylobacter sp* y *Aeromonas sp* no se aislaron después de 20 min de ser inoculadas, *Salmonella* no se encontró después de 4 h de incubación, y algunas cepas de las shigellas y *E.coli* enteropatógena (EPEC) aunque disminuyeron su número, se podían aislar después de las 24 h. No obstante lo anterior, concluyeron

que los alimentos fermentados tradicionales tienen propiedades bacteriostáticas y bactericidas y que no son la fuente principal en la transmisión de bacterias entéricas patógenas.

Otros estudios hechos con atoles de cereales como el *uji*, que se utilizan durante el destete en Africa, mostraron que al inocular simultáneamente un cultivo láctico y cepas de enterobacterias patógenas como *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* y *E. coli* enteropatógena, en suspensiones del cereal, durante las primeras 5 horas de fermentación a 25°C los patógenos crecieron ligeramente o sus números se mantuvieron constantes y después de este tiempo se redujeron drásticamente a las 30 horas de fermentación de  $10^8$  hasta  $10^5 - 10^3$  ufc/ g. Los valores de pH habían disminuído de 5 a 3.5 a las 5 horas y a 3 en 20 h. (Mbugua y Njenga, 1992).

Las bacterias lácticas ejercen actividad antimicrobiana, especialmente mediante la producción de ácidos orgánicos como el láctico y el acético, de bacteriocinas, de diacetilo y de peróxido de hidrógeno (Daeschel, 1989; Bruno y Montville., 1993). Los ácidos orgánicos actúan como inhibidores de microorganismos dependiendo de su concentración, de su capacidad para entrar a la célula y de la capacidad de la célula para metabolizarlos. La forma no disociada de los ácidos es la que mayor efecto inhibitorio ejerce sobre enterobacterias, siendo el ácido acético el que tiene mayor poder (Wacher, 1995). Este es el caso del pozol (Wacher y col., 1993), en el que además hay indicios de la sobrevivencia de enterobacterias, a pesar de su acidificación

Aunque algunos estudios sugieren que los alimentos fermentados al suprimir el crecimiento de bacterias patógenas son seguros desde el punto de vista microbiológico, algunas de las cepas utilizadas en dichos estudios, pueden haber adquirido una resistencia a las condiciones ácidas del medio donde fueron inoculadas. Estudios recientes demuestran que existe resistencia a entornos ácidos de enterobacterias como *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* (Bearson y col., 1997; Guilfoyle y col., 1996; Lin y col., 1995). Leyer y col., 1995, por su parte adaptaron una cepa de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 haciéndola crecer a un pH de 5, observando que ésta aumentó su resistencia al ácido láctico, lo que resulta muy importante para alimentos fermentados ácidos como el salami y la sidra de manzana de los cuales se ha asilado esta bacteria.

#### 2.4. Respuesta a estrés por ácido en Enterobacterias.

Enterobacterias como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, enfrentan muchas situaciones de estrés ambiental físico y químico, siendo la acidez uno de ellos.

En el cuerpo humano la acidez del estómago reduce el número de organismos viables, tanto inocuos, como patógenos, que pasan a través de él, donde son comunes valores de pH entre 2 y 3. La presencia de ácidos grasos volátiles de cadena corta presentes en el intestino y heces, tienen el mismo efecto.

Sin embargo, patógenos intracelulares facultativos como *Salmonella*, toleran valores bajos de pH dentro de los fagosomas de los macrófagos, y el pH ácido de la orina y de la vagina debe ser resistido por patógenos urinarios.

Los microorganismos entéricos se enfrentan también a diversas condiciones de estrés ácido, por ejemplo, el que existe en los desechos industriales, el drenaje ácido de las minas que se descarga a ríos y lagos y por la propia degradación de material orgánico. Por lo tanto, la capacidad para monitorear y responder a cambios de pH potencialmente letales, es crucial para la sobrevivencia de estos microorganismos (Goodson y Rowbury, 1989, Bearson y col., 1997, Baik y col., 1996).

El estrés ácido se define como el efecto biológico combinado de pH bajo y de ácidos orgánicos débiles presentes en el ambiente. Estos ácidos débiles incluyen ácidos grasos volátiles como el butírico, propiónico y acético. Los efectos letales de estos ácidos no sólo son dependientes de su concentración, sino del pH ambiental y de sus constantes de disociación. Estos ácidos en su forma protonada (sin carga) pueden difundir a través de la membrana y disociarse dentro de la célula, reduciendo el pH interno (pHi) en el proceso. Mientras más bajo sea el pH externo (pHo) más ácidos débiles no disociados atravesarán la membrana y afectarán el pH interno de la célula (Baik y col., 1996, Bearson y col., 1997).

Términos como "resistencia a la acidez", "tolerancia a la acidez" y "habitación a la acidez", se usan para describir la sobrevivencia a valores bajos de pH, en diferentes condiciones de crecimiento de los diferentes microorganismos. En medios de cultivo complejos *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* sobreviven a valores de pH entre 2 y 2.5 (resistencia a la acidez), mientras que *Salmonella typhimurium* lo hace en medio mínimo a valores de pH de 3 (tolerancia a la acidez) (Lin y col., 1995).

Cuando se exponen *E. coli* y *S. typhimurium* a valores moderadamente bajos de pHo (5.5-6.0) se induce un proceso que protege a la célula de un cambio subsecuente a pHo más bajos (3.4-4.0), esta respuesta se denomina "respuesta a tolerancia de ácido" (ATR) en *S. typhimurium*, y "habitación a la acidez" en *Escherichia coli* (células en fase exponencial) (Foster y Hall, 1990., Hickey y Hirshfield, 1990).

*Salmonella typhimurium* posee diferentes sistemas de sobrevivencia inducibles por ácido, dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentren las células (exponencial o estacionaria). La mayoría de los estudios que se han desarrollado se han hecho con células en fase exponencial, creciendo en medio mínimo con glucosa. La respuesta inducible por ácido (ATR) es un proceso de dos etapas que involucra sistemas de protección activados a diferentes niveles de acidez. En la primera etapa, cuando el microorganismo está creciendo a pH de 7.7 y rápidamente se cambia a condiciones ácidas por debajo de 4, las células mueren, pero si se adapta creciéndolo primero en condiciones ligeramente ácidas (pH 5.5), se induce una respuesta mediante la síntesis de un sistema de homeóstasis que alcaliniza el citoplasma durante períodos de extrema acidez. La segunda etapa induce otros sistemas y se inicia cuando el pHo cae por debajo de 4.5. Se inducen aproximadamente 50 proteínas de choque ácido (acid shock proteins, ASPs) en esta etapa y se cree que previenen y reparan el daño macromolecular (Foster, 1991).

Durante la primera etapa se inducen descarboxilasas de aminoácidos que contribuyen a mantener la homeostasis. Uno de estos sistemas se ha identificado como lisina descarboxilasa (CadA) trabajando en



colaboración con el antiporte lisina-cadaverina (CadB). CadA descarboxila a la lisina intracelular convirtiéndola en cadaverina, la cual es exportada al exterior y cambiada por nueva lisina vía antiporte CadB, consumiendo un protón en el proceso. Induciendo este operón *cadAB* mediante un pH ligeramente ácido y lisina, se demostró que había una clara sobrevivencia de la cepa silvestre sobre las mutantes *cad*, cuando se cambiaban las condiciones de pH a valores muy bajos (3.5) (Foster, 1991, Bearson y col., 1997).

Otros sistemas que se inducen en la segunda etapa, son absolutamente necesarios para que *Salmonella* en fase exponencial sobreviva a cambios de acidez. Tres proteínas reguladoras RpoS, PhoP y Fur, controlan la expresión de un conjunto distinto de ASPs. Un factor sigma alternativo  $\sigma^s$  codificado por *rpoS*, que es a su vez una ASP, es controlado por la proteína codificada por el gene de virulencia de ratón *mvIA*. MivA permite la acumulación de  $\sigma^s$  en presencia de estrés. Mutaciones en *rpoS* o *mvIA* dan lugar a cepas de *Salmonella* avirulentas, por lo que existe una conexión entre la tolerancia a la acidez y la virulencia (Bearson, 1997).

Se desconoce el papel que juega la proteína PhoP, pero es usada para conferir protección contra valores bajos de pH, una mutante avirulenta de *phoP* fue mil veces más sensible a la acidez que la virulenta *phoP+*, esto sugirió, otra vez, que podía existir una correlación entre la tolerancia a la acidez y la virulencia en *Salmonella typhimurium* (Foster y Hall, 1990.)

Fur es otra proteína reguladora que gobierna la expresión de varias ASPs como un activador de una manera independiente de hierro, pero no se conoce muy bien que acción tiene, sin embargo, mutantes *fur* son sensibles a la acidez.

La habilidad de que una condición de estrés confiera protección contra otros estreses se denomina protección cruzada. Leyer y Johnson (1993), encontraron que si adaptaban *Salmonella typhimurium* a la acidez haciéndola crecer en condiciones ligeramente ácidas (pH 5.8) por dos o tres doblajes, ésta también había aumentado su tolerancia a otros tipos de estreses como el calor, salinidad, agentes superficiales activos como el cristal violeta y a la polimixina B. Este resultado sugiere que el paso de enterobacterias por el estómago, las prepara para soportar otros estreses ambientales que pudieran existir en el intestino. Otro hallazgo importante de los autores mencionados es que no encontraron diferencias entre la composición de los lipopolisacáridos de las cepas adaptadas a la acidez y las no adaptadas, después de digerirlos con proteinasa K y visualizarlos por tinción de plata al ser sometidos a electroforesis SDS-PAGE.

En *E. coli* y *Shigella spp.* se habla de resistencia a la acidez, porque las mediciones se llevan a cabo durante la fase estacionaria de las células crecidas en medio completo (Luria) (Bearson y col., 1997).

Estudios realizados por Gordon y Small en 1993, demostraron que el 75% de sus aislados de *Shigella* y el 80% de *E. coli* eran resistentes a condiciones ácidas, mientras que todas las especies de *Salmonella* que probaron eran sensibles. Sin embargo, en un estudio subsecuente realizado por Lin y col., (1995), usando medio mínimo, ninguna de estas especies sobrevivieron al ser expuestas a un pH de 2.5, aún a valores de pH de 3, *Shigella* fue la más sensible. *E. coli* y *Salmonella* presentaron tolerancia a la acidez. Las conclusiones que se obtuvieron de este trabajo demostraron que la composición del medio Luria

Bertani y células en fase estacionaria son importantes para el fenómeno de resistencia a la acidez (AR) a valores de pHo de 2.5.

Una explicación para estas observaciones es que tres sistemas AR dependientes de medio completo, se presentan en *E. coli* pero no en *Salmonella*. Dos de estos sistemas también están presentes en *Shigella*. (Lin y col., 1995). La actividad de estos sistemas depende, en parte, de que el metabolismo de las células sea oxidativo o fermentativo. Dos sistemas AR fermentativos involucran a las descarboxilasas inducibles, arginina descarboxilasa y glutamato descarboxilasa. Se presume que su acción sea muy parecida a la de lisina descarboxilasa presente en *Salmonella typhimurium*, donde la descarboxilación del aminoácido consume un protón a valores bajos de pH<sub>i</sub>, y un antiporte de membrana cambia este producto (cadaverina), por más aminoácido (lisina) presente en el medio. Se requiere del operón *adiA* que codifica para la arginina descarboxilasa de *E. coli*, para el sistema AR dependiente de arginina, que se induce por pH ácido, anaerobiosis y medios ricos (Stim-Herndon y col., 1996) y se ha descrito un gene regulador *adiY* que se encuentra después del inicio de la transcripción (downstream) del *adiA*, y presenta gran homología con la familia de reguladores transcripcionales, la cual incluye al EnvY y otros. En este sistema también se requiere *gadC*, que es un gene que putativamente codifica para un antiporte glutamato/g-amino butirato para el sistema AR dependiente de glutamato en *E. coli* (Hersh y col., 1996), y en *Shigella flexneri*, donde está positivamente regulado por  $\sigma^s$  (Waterman y Small, 1996).

El tercer sistema, llamado oxidativo, es inducido por el crecimiento a fase estacionaria en medio LB, reprimido por glucosa, y una vez inducido, no requiere de la presencia de aminoácidos en el medio durante un cambio subsecuente a un pHo de 2.5 (Bearson y col., 1997).

La habituación al ácido (AH) ocurre en *E. coli* cuando crece en fase exponencial en medio nutritivo a un pH de 5. Esta habituación permite su sobrevivencia al ser transferida a un medio con valores de pH entre 3 y 3.5. La habituación al ácido aparentemente involucra síntesis de proteínas que, como un evento clave, reparan daños en el DNA. El ión fosfato y la porina dependiente de fosfato PhoE, parecen estar implicados, ya que los iones fosfato inhiben la habituación al ácido, y las mutantes *phoE* son resistentes al ácido (Rowbury y col., 1992). Se propone que PhoE proporciona un canal para la salida de H<sup>+</sup> al espacio periplásmico estimulando a una proteína de membrana que monitorea la acidez e induce la AH, mientras que el ión fosfato bloquea el acceso de los H<sup>+</sup> a la PhoE e interfiere con la transducción de señales.

Usando células de *E. coli* en fase exponencial, Guilfoyle y Hirshfield en 1996 demostraron que los ácidos orgánicos (ampliamente utilizados como conservadores de alimentos, como el acético, propiónico y butírico) podían inducir resistencia al ácido en medio completo. *E. coli* adaptada con 0.1% de butirato o propionato a pHo de 6.5, sobrevivió treinta minutos, y entre 50-200 veces mejor que las células no adaptadas, al ser cambiada a un pHo de 3.5. Se sugiere entonces, que la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta puede disparar respuestas de sobrevivencia adaptativa que pueden ser de gran importancia para la sobrevivencia de patógenos de origen alimentario.

Estudios realizados con cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) del serotipo O157:H7, mostraron la capacidad que tiene esta bacteria para sobrevivir en ambientes con valores ácidos de pH a 37°C. Benjamin y Datta en 1995, demostraron lo anterior al observar que bacterias de dicho serotipo se mantenían viables en medios de cultivo con valores de pH de 3.0 y 2.5 hasta 5 h, refiriendo además, que la mayoría de las cepas aisladas de este serotipo, presentan un nivel de tolerancia al ácido muy alto, similar al que previamente determinaron en cepas de *Shigella flexneri*. Así mismo, mostraron que la tolerancia al ácido era dependiente de la fase de crecimiento (estacionaria, o de hambruna en la fase log) y del medio de cultivo empleado. Arnold y Kaspar en 1995, obtuvieron resultados similares utilizando fluido gástrico sintético. Todos estos autores relacionan la baja dosis infectiva de estos microorganismos con las propiedades de sobrevivencia al ácido que presentan.

El pozol es un alimento fermentado acidificado en el cual se ha podido establecer la microbiota que lo conforma y en la que se ha detectado la existencia de diversos miembros de la familia Enterobacteriaceae, incluidas bacterias del género *Escherichia*, sin embargo, no se ha determinado el tiempo de sobrevivencia de las mismas ni su identidad relacionada con su posible potencialidad patogénica como agentes causantes de diarrea.

El pozol ha adquirido en los últimos años un importante desarrollo, de tal manera que ya no sólo es un alimento utilizado por algunos grupos étnicos; en la actualidad este producto ha empezado a industrializarse a través de múltiples pozolerías que lo comercializan sin que esto haya conducido a que se establezca un control sanitario para su elaboración.

Lo anterior hace necesario conocer más profundamente sobre la viabilidad de los microorganismos, tanto en el tiempo como en los niveles de pH, y de la capacidad patogénica de los mismos, para finalmente poder asegurar si el producto carece de riesgos para su ingesta, o requiere de ciertas normas para su elaboración y comercialización.

## **CAPÍTULO III. OBJETIVOS**

### **Objetivo general :**

Determinar la presencia de enterobacterias patógenas en el pozol y su sobrevivencia durante la fermentación.

### **Objetivos particulares:**

1.- Aislar e identificar bacterias patógenas de la familia Enterobacteriaceae (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.* y *Escherichia coli*), en varias muestras de pozol de Villahermosa, Tabasco. México.

2.- Estudio de la sobrevivencia, durante el proceso de la fermentación, de las enterobacterias patógenas encontradas.

## **CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **4.1 Muestreo y encuestas.**

Se analizaron 10 muestras de pozol las cuales se adquirieron en diferentes expendios situados en la Ciudad de Villahermosa, e inmediatamente se enviaron las muestras por avión. A su llegada a la ciudad de México, se recogieron tan pronto como llegaron al aeropuerto, se colocaron en hielo y se trasladaron al laboratorio de Alimentos de la Facultad de Química, donde se procesaron inmediatamente. Se estima que el tiempo promedio transcurrido entre la toma de muestra y el análisis fue de 4 h.

Se recopiló información sobre aspectos relacionados con las condiciones sanitarias del local, del agua empleada en la elaboración del pozol y del aspecto del productor mediante un cuestionario.

### **4.2 Peso de la muestras.**

Se determinó el peso total de cada muestra, empleando una balanza LABTOP-ACE-3000B, Yamato.

### **4.3 Mediciones de pH y Cuenta total de enterobacterias.**

Se tomaron 2g de la masa del centro de la bola del pozol y se le adicionaron 2ml de agua destilada ajustada a un pH de 7. Los valores de pH se determinaron por duplicado con un potenciómetro (3020pHmeter JENWAY), y se anotó el promedio de ambas determinaciones. Se repitió este mismo procedimiento a las 48 h de iniciada la fermentación y a los 8 días posteriores al inicio de la misma.

Se determinó en todas las muestras la cuenta total de enterobacterias inmediatamente después de su llegada al laboratorio y a las 48 h de fermentación. Para esto se realizaron las diluciones pertinentes ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) y se empleó la técnica de placa servida utilizando el medio VRBGA (Oxoid CM485). Las placas se incubaron a  $35^{\circ}$ - $37^{\circ}$ C por 24 h y posteriormente se determinó el número de ufc/g de peso húmedo, utilizando las cajas en las que se observaron entre 10 y 50 colonias. Cada dilución de la muestra se procesó por duplicado y se sacó un promedio de los resultados obtenidos ("Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual", 1995).

### **4.4. Aislamiento Microbiano.**

El aislamiento de microorganismos se realizó siguiendo los procedimientos establecidos en el "Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual" (1995).

#### 4.4.1 Aislamiento de *Salmonella* spp.

Se pesaron asepticamente 25g de la muestra de pozol y se les añadió 225 ml de caldo lactosado (Oxoid CM137). Se homogenizaron utilizando un homogenizador Stomacher, durante 2 min y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 60 min. Posteriormente se determinó el pH del caldo de cultivo y se ajustó a  $6.8 \pm 0.2$ , con soluciones estériles de NaOH 1N y de HCl 1 N. Se incubó a 37°C por 18-24 h.

Después de este tiempo, se transfirió 1 ml de este medio de preenriquecimiento a 10 ml de caldo selenito cistina (Oxoid CM399) recién preparado y 1 ml a 10 ml de caldo tetrionato base (Oxoid CM29), al cual se le añadieron previamente una solución de verde brillante (conc. final 1%) y 20 ml de solución de yoduro de potasio (I-KI) por litro de medio basal. Ambos se emplearon como medios de enriquecimiento para el aislamiento de *Salmonella* spp. Se incubaron por 24 h a 37°C y al finalizar este tiempo los tubos conteniendo el inóculo se agitaron y se tomó una asada de cada uno (el asa de 3mm de diámetro) y se sembraron por agotamiento en medios selectivos de Xilosa- Lisina -Desoxicolato (XLD, Oxoid CM469), Agar Entérico de Hektoen (HE, Oxoid CM419), y Agar Sulfito Bismuto (ABS, Oxoid CM201). Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. De las colonias sospechosas encontradas en estos medios, se sembraron tubos de Agar hierro triple azúcar (TSI, Oxoid CM277), y Agar hierro lisina (LIA, Oxoid CM381), y se incubaron a 37°C 24 h. Cuando se obtuvo crecimiento en estos medios se procedió a realizar pruebas bioquímicas diferenciales, empleando el sistema API20E, para la caracterización de los microorganismos aislados.

#### 4.4.2 Aislamiento de *Shigella* spp.

Para realizar el enriquecimiento se pesaron asepticamente 25 g de la muestra, a los que se les añadieron 225 ml de Caldo Shigella al cual se le adicionó previamente una solución estéril de novobiocina (0.5 µg/ml para aislamiento de *Shigella sonnei* y 3 µg/ml para las otras especies de *Shigella*). Se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente con agitación periódica. Se ajustó el pH a  $7.0 \pm 0.2$ , con soluciones estériles de NaOH 1N y HCl 1N, y se incubó en jarras de anaerobiosis a 44°C si se trata de la muestra para seleccionar *Shigella sonnei*, o a 42°C para las otras especies, por 20 h. Una vez transcurrido ese tiempo, se agitó la suspensión y se inocularon por estrías cajas que contenían Agar MacConkey (Oxoid CM7b), se incubaron a 37°C por 20 h. Posteriormente se examinaron las cajas para identificar colonias sospechosas (translúcidas o ligeramente rosadas), las cuales sirvieron para inocular los siguientes medios: Caldo glucosa, Agar triple azúcar hierro (TSI Oxoid CM277), Caldo lisina descarboxilasa (Oxoid CM191) y agar movilidad, los cuales se incubaron nuevamente a 35°C por 48 h, revisando a las 20 h.

Se descartaron todos los cultivos que mostraron movilidad, descarboxilación de la lisina, producción de H<sub>2</sub>S, fermentación de glucosa con producción de gas, y fermentación de sacarosa o lactosa (2 días). Para la caracterización bioquímica de los cultivos positivos se empleó el sistema API20E.

#### 4.4.3 Aislamiento de *E.coli*.

Se pesaron asepticamente 25 g de la muestra y se les añadió 225 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, Oxoid CM225). Se dejó el cultivo a temperatura ambiente por 10 min con agitación ocasional y posteriormente se incubó por 3 h a 35°C. Transcurrido este tiempo, se transfirieron los 225 ml a otro matraz que contenía 225 ml de Caldo triptona sulfato y se incubó nuevamente por 20 h a 44°C. Posteriormente, empleando una asa calibrada, se inocularon estriando hasta agotamiento cajas de petri que contenían Agar de Levine con eosina y azul de metileno (EMB Oxoid CM69) y Agar MacConkey (Oxoid CM7b) las cuales se incubaron a 35-37°C por 24 h. Se seleccionaron entre 5 y 10 colonias típicas o atípicas y se les realizaron las pruebas bioquímicas necesarias mediante el sistema API20E, para su identificación. Posteriormente a las colonias identificadas como *E. coli* se les realizó la caracterización serológica y mecanismos de virulencia, por ensayos de hibridación de DNA y cultivo celular con el objeto de establecer los serogrupos y serotipos de *E. coli* enterovirulenta.

#### 4.4.4. Medios de cultivo preparados en el laboratorio.

##### Caldo Shigella (g/L).

Triptona	20
Dextrosa	1
NaCl	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Tween 80	1.5 ml
Esterilizar 15 min, 121°C, 15 lb.	

##### Caldo Glucosa (g/L).

Triptosa	10
Glucosa	5
NaCl	5
Lab-Lemco	3
Colocar un tubo Durham en el interior,	
Esterilizar 15 min, 121°C, 15 lb.	

##### Caldo Triptona sulfato (g/L).

Triptona	20
NaCl	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Tween 80	1.5 ml

Esterilizar 15 min, 121°C, 15 lb.

##### Agar movilidad (g/L).

Extracto de carne	3
Peptona	10
NaCl	5
Agar	4

Esterilizar 15 min, 121°C, 15 lb.

Agar semisólido.(g/L).

Peptona de Caseína	10
Extracto de Carne	3
Gelatina bacteriológica	80
NaCl	5
Agar- agar	4

Se ajustó el pH a 6.9, se hirvió por 2 min y se esterilizó 15min a 121°C. Se colocaron 9 ml en un tubo de 16x150 y se introdujo el tubo de Craigie, se tapó y se esterilizó de nuevo en las mismas condiciones.

#### 4.4.5. Sistema API 20 E.(Biomérieux)

Este sistema se utiliza para la identificación de las Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos no exigentes, mediante 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas, y una base de datos. Las reacciones están basadas en el uso de sustratos cromogénicos. La planilla de API 20 E consta de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Estos se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los medios. Durante la incubación el metabolismo de la bacteria produce cambios de color espontáneos o bien al añadir reactivos.

La lectura de las reacciones se realizó utilizando el programa APILAB PLUS (bioMérieux).

#### 4.5. Caracterización Bioquímica.

Un total de 73 cepas de *E. coli* se identificaron mediante el sistema API20E, éstas posteriormente se volvieron a caracterizar en el Laboratorio de Salud Pública, con la autorización del Dr. Cravioto Quintana y bajo la supervisión del Dr. Eslava Campos.

Se confirmó la identidad de las cepas de *E. coli* aisladas mediante las siguientes pruebas bioquímicas: producción de H<sub>2</sub>S, ureasa, oxidasa, lisina, ornitina y arginina descarboxilasa, fenilalanina deaminasa, fermentación de glucosa y lactosa, celobiosa y sorbitol, ONPG, RM-UVP, Citrato, Malonato, Gluconato, Movilidad, Reducción de nitrato. Para realizar dicha caracterización previamente las cepas de *E.coli* aisladas se sembraron en placas de agar sangre y agar MacConkey con el fin de establecer la pureza de las mismas, y se incubaron a 37°C por 24 h. De estas cepas se tomó una sola colonia y se sembró en un tubo con medio de agar casoy, incubándolo nuevamente en las mismas condiciones. Este tubo sirvió para mantener el cultivo y realizar todas las resiembras posteriores que fueron necesarias para la caracterización de las cepas.



Del cultivo de agar casoy se sembró agua peptonada 1%, pH 7.4 y se incubó a 37°C durante 24 h. Transcurrida la incubación se tomaron alícuotas para inocular cada uno de los sustratos de las pruebas bioquímicas, y se hicieron las lecturas a diferentes tiempos dependiendo del sustrato; así mismo se utilizaron los reactivos necesarios, según las especificaciones particulares de cada prueba.

#### **4.6. Caracterización Serológica.**

##### **4.6.1 Preparación de antígeno somático (O).**

Cada una de las cepas se resembró en toda la superficie de tubos con medio de Agar Casoy inclinado para la obtención del antígeno somático (O), se incubaron a 37°C por 24 h, y una vez finalizada la incubación se adicionaron 10 ml de solución salina 0.15 M a cada tubo, para desprender la biomasa. La suspensión obtenida se transfirió a otro tubo el cual se calentó con vapor fluente durante 1 h. Una vez enfriado el antígeno se conservó con formalina al 0.6% (concentración final).

##### **4.6.2 Preparación de antígeno flagelar (H).**

Para obtener el antígeno flagelar (H), se sembraron tubos de 16x150 con tapón de rosca conteniendo un medio semisólido que en su interior tenía un tubo de Craigie el cual sirve para evaluar la movilidad. Estos se incubaron a 30°C durante varios días (15 o más), hasta observar el enturbiamiento del medio de cultivo. Cuando el cultivo bacteriano es móvil se observaba que el crecimiento no sólo se presentaba en el interior del tubo Craigie, sino que éste emergía hasta la superficie del medio presentándose en el exterior de dicho tubo. De ahí se recogió con asa estéril y se sembró en caldo de peptona de biotriptasa al 2% (pH 7.2) y se incubó durante 24 h a 30°C. Terminada la incubación el antígeno se conservó con formalina 0.6% (concentración final). En caso de no obtener movilidad se consideró como negativo y a las cepas como no móviles.

##### **4.6.3. Identificación del serotipo.**

La serotipificación de las cepas de *E. coli* se realizó siguiendo el procedimiento empleado en el Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina de la UNAM de acuerdo con Orskov y Orskov, 1984, utilizando sueros específicos (SERUNAM), obtenidos en conejo (Nueva Zelanda blanco).

Las reacciones de aglutinación se efectuaron en microplacas de 96 pozos de fondo redondo. Se analizó el antígeno de cada cepa empleando una batería con los 173 antígenos somáticos monovalentes conocidos, más tres de aislados de cepas obtenidas en el propio laboratorio (090457, 074324/0 y 04976), para el caso de antígenos somáticos y con 56 sueros específicos para el caso de los antígenos flagelares, los sueros se encontraban diluidos 1:100.

#### **4.6.4 Reacciones de aglutinación para antígeno somático.**

Por cada pozo de la placa se colocaron 100 µl del suero monovalente (las microplacas se llenaron con dispensador Quick Spense Controller Mod no. QSIIE y Reservoir Model 96-200 DYNATECH LABORATORIES) y 50µl del antígeno somático preparado con anterioridad. La placa se cubrió con papel adherente para evitar la evaporación y se incubó a 50°C por 24 h, concluido el tiempo se interpretó el resultado, siendo positivo cuando se presenta una reacción de aglutinación, observada con la ayuda del aglutinoscopio. Con este procedimiento se identificaron los sueros que reconocían al antígeno bacteriano, realizando diluciones desde 1:100 hasta 1: 12800. Se asignó a cada cepa el serogrupo donde se observó aglutinación en la dilución más alta del suero. Cuando se observó reacción cruzada, el antígeno se desafió contra sueros absorbidos diluidos 1:50. El serogrupo se definió al determinar el mayor grado de aglutinación con la mayor dilución del suero.

#### **4.6.5 Reacciones de aglutinación del antígeno flagelar.**

Se determinó el antígeno flagelar siguiendo un proceso similar al descrito para el antígeno somático, pero utilizando los 56 sueros específicos y variando el tiempo de incubación, que fue de 2 h.

#### **4.7 Ensayo de adherencia a células HeLa.**

Para este ensayo se empleó la técnica descrita por Cravioto y col. (1979). La prueba se desarrolló colocando una lenteja de vidrio de 1 cm de diámetro en cada uno de los 24 pozos de una placa de polipropileno, a los cuales se les agregó una suspensión de células HeLa en medio MEM a una concentración de  $2.5 \times 10^6$  células por ml aproximadamente. Las placas así preparadas se incubaron a 37°C por 18-24 h, con 5% de CO<sub>2</sub>, para formar una monocapa con un 70-80% de confluencia al observarse directamente en un microscopio invertido, y para que al hacer un ensayo de adherencia a células sea más fácil su interpretación. Posteriormente se eliminó el medio de cultivo de los pozos y se lavaron éstos con una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, agregándose entonces 1 ml de una suspensión en medio MEM sin suero de la cepa bacteriana en estudio. Previamente las bacterias se crecieron por 18 h en agua peptonada al 2% con 1% (w/v) de D- manosa, para evitar una adherencia inespecífica por pili tipo 1 (Ofek, 1977). La concentración final de bacterias fue de  $1.5 \times 10^8$  ufc/ml. Las placas se incubaron por 3 h en las mismas condiciones. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el medio y se lavaron los pozos 3 veces con amortiguador de fosfatos; las células se fijaron con metanol y se tificaron con colorante de Giemsa durante 20 min, posteriormente se lavaron con agua desionizada para eliminar el exceso de colorante. Utilizando unas pinzas se tomó cada lenteja y se deshidrató empleando acetona, acetona- xileno y xileno y se realizó el montaje de éstas en un portaobjetos utilizando bálsamo de Canadá o resina (Depex) dejando secar por 24 h.

La observación se realizó con un microscopio óptico (Carl Zeiss) en campo claro con un aumento de 100x. En los casos pertinentes se realizó un registro fotográfico.

Para considerar una cepa positiva, ésta debía presentar como mínimo 10 bacterias adheridas al 40% o más de las células de la preparación, se tomaron como referencia los patrones de adherencia a células HeLa referidos en Girón y col. (1991), Scaletsky y col. (1984) y Nataro y col. (1987).

#### 4.7.1 Efecto Citotóxico.

En algunos casos se observaron efectos citotóxicos en las células HeLa. Cuando ocurrió esto, se repitió el ensayo empleando el sobrenadante del cultivo de bacterias, el procedimiento es básicamente el mismo que para el ensayo de adherencia, solo que, el cultivo de la cepa bacteriana se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se filtró por membrana de 0.22  $\mu$  m de poro y se hicieron diluciones 1:1 con medio mínimo esencial. Para el ensayo se tomaron alícuotas de 1 ml y se colocaron en cada uno de los pozos con monocapa de células confluentes y se incubó a 37°C por 24 h. Después de este tiempo, se desechó el contenido de cada uno de los pozos, se lavaron con agua y se siguieron los pasos ya descritos. El efecto citotóxico se consideró cuando había desprendimiento de la monocapa y las células presentaban destrucción vacuolar en su citoplasma.

#### 4.8 Técnica de hibridación de DNA en colonias.

Para este estudio se siguió la técnica reportada por Hill y Payne en 1984. Se emplearon 9 sondas (STH, eae1, AGG1, AGG2, SLT, IPA-H, BFP, LTH y cdt.) que contienen secuencias de DNA provenientes de genes que codifican para diferentes factores de virulencia reportados para distintas cepas patogénicas de *E. coli*. Todas las sondas fueron oligonucleótidos sintéticos (GIBCO BRL Custom Primers) adquiridos en la Cía. LIFE TECHNOLOGIES.

El procedimiento consistió en cuatro pasos básicos: a) crecimiento de las cepas y lisis de las células en un filtro; b) marcaje de la sonda con radioactividad; c) hibridación del DNA; y d) detección de las colonias positivas por autorradiografía.

a).- Las cepas puras de *E. coli* se sembraron en 1 ml de caldo BHI y se incubaron 18-24 h a 37°C con agitación (siempre se incluyeron cepas del laboratorio ya probadas como controles negativos y positivos para cada una de las sondas empleadas). De estos cultivos se inocularon por picadura cajas de Petri que contenían Agar MacConkey (20 colonias por caja) y se incubaron nuevamente a 37°C por 18-24 h. Después de este tiempo se colocaron filtros Whatman No. 541 (previamente esterilizados y adecuadamente marcados), sobre la superficie del medio haciendo una ligera presión con el objeto de que se transfirieran las colonias, evitando en lo posible la formación de burbujas de aire. Después de 5-10 min se retiraron los filtros de las cajas y se colocaron sobre papeles filtro (Whatman No. 1) previamente colocados en cajas de petri que contenían de 5-10 ml del buffer de lisis A (NaOH 10N, 50 ml, NaCl 5M, 300 ml agua dd, 650

ml), teniendo cuidado de que las colonias quedaran en contacto directo (filtro boca abajo) con estos últimos. Se dejaron por 10 minutos y posteriormente se colocaron estas cajas sobre un baño de agua hirviendo por 15 minutos. Los filtros con las colonias lisadas se transfirieron a otra caja de petri que contenía papeles filtro Whatman No.1 humedecidos previamente con el buffer de lisis B (Tris 2M, pH7, 50 ml, NaCl 5M, 400 ml, agua dd 550 ml), cuidando que los filtros con las colonias estuvieran horizontales para que el DNA de las colonias lisadas no se corriera. Se dejaron entre 10-15 min, se retiraron y se dejaron secar al aire para usarlos posteriormente en el proceso de hibridación.

b).- El procedimiento empleado para marcar las sondas es el que se conoce como end-labeling (United States Biochemical Corporation, Tested User Friendly T4 Polynucleotide Kinase 5' End Labeling Protocol), y consiste en rehidratar los oligonucleótidos sintéticos a 5-10 unidades  $A_{260}$  (entre 150-350  $\mu\text{g/ml}$ ) para tener una solución stock. Una unidad  $A_{260}$  equivale a 33  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de cadena sencilla. Si la sonda sintética tiene 22 bases de longitud, su peso molecular es de 7260 (22 x 330 daltones/base). Para trabajar se prepararon soluciones de 10 pmoles/  $\mu\text{l}$  (72.6  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para sondas de 22 bases). Para marcar la sonda se preparó en un tubo Eppendorf la siguiente mezcla de reacción: 5  $\mu\text{l}$  de la sonda, 5  $\mu\text{l}$  de buffer de cinasa, 50  $\mu\text{l}$  de agua, 3  $\mu\text{l}$  de  $^{32}\text{P}$  ATP y 2  $\mu\text{l}$  de cinasa polinucleótido T4. Se centrifugó por 2-3 seg e incubó a 37°C por 30 min. Para parar la reacción se incubó 5 min a 65°C y se añadió 5  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5M, pH 8. Seguidamente se agregaron 4.5 ml de acetato de amonio 4M antes de cargar la mezcla sobre columnas NACS PREPAC utilizadas para retirar el  $^{32}\text{P}$  ATP no incorporado. Para tal fin se equilibró la columna saturando la matriz con acetato de amonio 0.25 M por una hora, antes de cargar la mezcla de reacción a la columna, luego se cargó con la mezcla de reacción y se lavó con 4 ml de la solución de acetato de amonio 0.25M para que saliera todo el  $^{32}\text{P}$  no incorporado. Se eluyó el DNA unido a la columna usando 200  $\mu\text{l}$  de acetato de amonio 4M, se colectaron 3 fracciones de 200  $\mu\text{l}$  cada una y se colocaron 2  $\mu\text{l}$  del eluido sobre un papel filtro, se dejó secar, se colocó en un vial y se agregaron 5 ml de liquido de centelleo para contar la radioactividad. Se calculó la cantidad total de radiactividad recuperada. Si la actividad específica del ATP es de 3000 a 7000 Ci/mmol, generalmente la obtenida en una sonda es de  $1-2 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ . Las fracciones marcadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

c).- Para realizar la hibridación se preparó la siguiente mezcla: agua 115.6 ml, 20X SSC 60 ml, Solución Denhardt's 50X 20 ml, EDTA 0.5M, pH 8 0.4 ml y DNA hervido de esperma de salmón 4 ml. Se añadió 5-10 ml de esta mezcla a cajas de petri desechables que contenían los filtros con las colonias lisadas y se calculó el volumen requerido de la sonda para tener  $1 \times 10^6$  cpm. La mezcla con los filtros se agitaron suavemente e incubaron a 41°C toda la noche.

Después de la incubación se removió la mezcla de hibridación y se lavaron los filtros por 5-10 segundos con una solución 6X SSC (previamente incubada a 54°C) para retirar la sonda que no se unió específicamente en las colonias lisadas, se desechó el liquido y se volvió a incubar las cajas con 10 ml de la misma solución a 54°C por una hora. Nuevamente se enjuagaron con una solución 2X SSC por 5-10 seg y se dejaron secar los filtros a temperatura ambiente.

d).- La autorradiografía se llevó a cabo colocando los filtros en un chasis donde previamente se había colocado un Film x-ray Kodak XAR-2 en 8x10 in. con pantalla intensificadora Kodak regular o Dupont Cromex, e incubaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Después de este tiempo, se reveló la película con x-ray film revelador (Kodak) y se fijó utilizando un fijador (x-ray film Kodak) en cuarto oscuro.

Interpretación de los resultados. Las colonias que tuvieron el gene que la sonda reconoce específicamente aparecieron como manchas oscuras en la película.

#### 4.9 Esquema de inmunización.

Obtención de anticuerpos en conejo. Una cepa O7:H10 se utilizó como antígeno para la inmunización del conejo. La obtención del antígeno somático fue similar a la previamente descrita. Brevemente, se sembró en medio de agar de soya y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Después de este tiempo se calentó a  $100^{\circ}\text{C}$  a vapor fluyente por 2.5 h. Posteriormente se lavó 3 veces con solución salina y se ajustó su concentración igualando el tubo No.3 de MacFarlan en el nefelómetro. Todo se realizó en condiciones de esterilidad.

Dos conejos Nueva Zelanda blancos de 3 kg de peso, fueron inoculados por vía intravenosa con el antígeno previamente preparado cada 5 días, siguiendo este esquema de inmunización: 1a. dosis- 0.5 ml de antígeno, 2a. y 3a. dosis- 1 ml de antígeno, 4a. y 5a. dosis- 2 ml de antígeno. Después de transcurridos 6 días de la aplicación de la última dosis se realizó una sangría de prueba para determinar el título de anticuerpos, si éste era bajo, se aplicaba una dosis de refuerzo, si era alto, se procedía a sangrar al animal. El suero se separó del paquete celular mediante centrifugación a 3000 rpm, empleando una centrifuga refrigerada (Sorvall C 600).

El suero en pequeñas alícuotas, se almacenó hasta su uso. Para determinar la especificidad del suero se realizó aglutinación con su antígeno homólogo y con el resto de antígenos (173) del esquema. A la vez se determinó el título del mismo.

Una vez hecho ésto, el suero quedó preparado para usarse contra otras cepas con antígeno somático desconocido para evaluar si se trataba de una misma clona.

## CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### CONSUMO DE POZOL.

En Villahermosa, Tabasco, existe un gran consumo de pozol. A diferencia de otros lugares, el consumo por mestizos es muy generalizado y existen alrededor de 400 pozolerías. (Zebadua, 1997).

En el estado de Tabasco la tercera causa de mortalidad infantil es la generada por enfermedades infecciosas intestinales (Anexo 1). Debido al gran consumo de pozol por poblaciones de todas las edades, se determinó investigar la presencia de microorganismos patógenos y establecer si dicho alimento podría ser una causa para la presencia de enfermedades diarreicas.

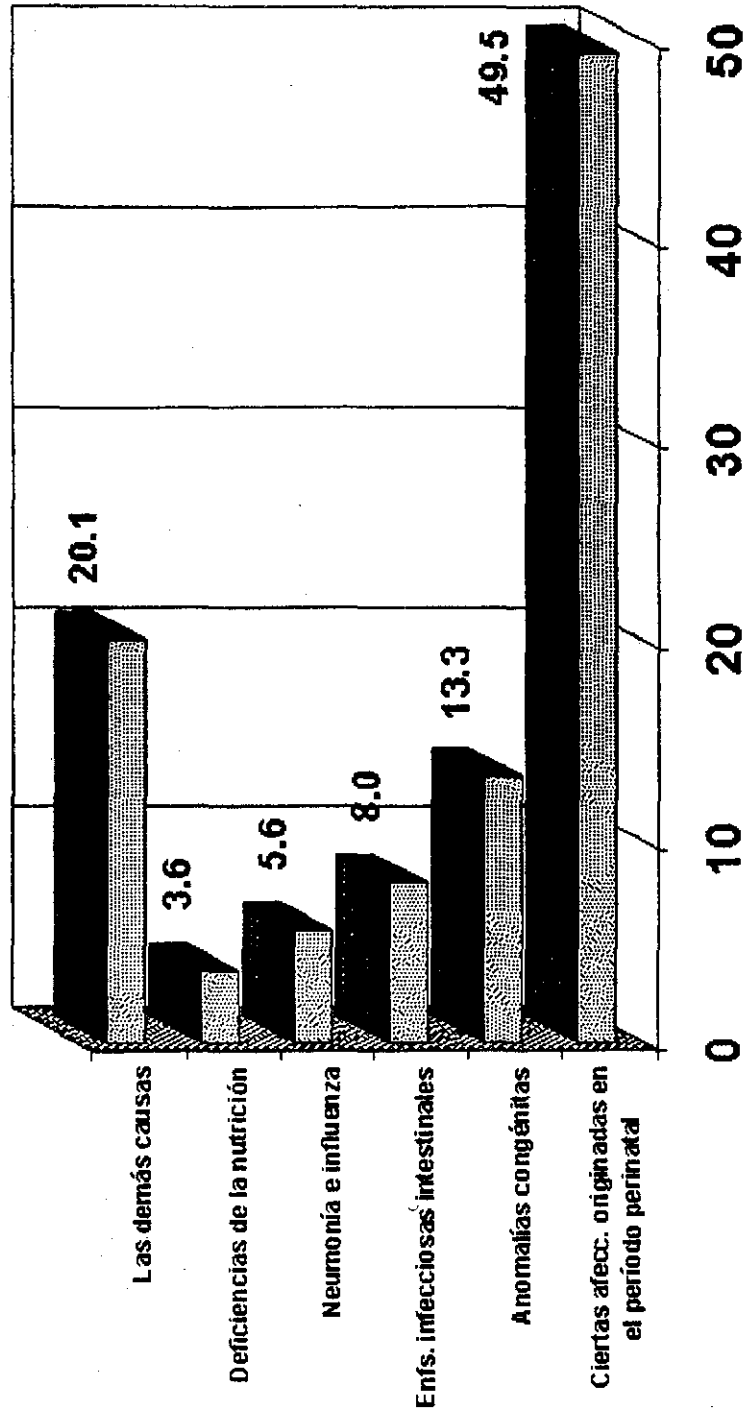
El pozol se elabora y se vende en los mercados y en pozolerías, en donde se ha modificado, añadiéndole sal, azúcar, chile o miel, según el gusto del consumidor.

Para realizar este estudio se seleccionaron muestras de pozol que se venden en los mercados, ya que es el que se produce en condiciones higiénicas no bien establecidas. La procedencia de las muestras es de diferentes productores y de diferentes expendios. Los datos obtenidos de las encuestas realizadas no proporcionaron suficiente información relacionada con las condiciones higiénicas de su elaboración y venta, sin embargo, se lograron obtener diferentes parámetros con los que se realizó un análisis comparativo (Tabla 2).

Los datos recabados sugieren que las personas que elaboran y venden el pozol, aparentemente tienen buenas condiciones higiénicas en cuanto a la limpieza de su ropa y manos, sin embargo, no se tomaron muestras de las últimas para asegurar que realmente no estuvieran contaminadas.

Con relación a las instalaciones donde se elabora y expende el pozol, se pudo observar que las características de éstas son muy diversas, tratándose desde únicamente una mesa colocada en un pasillo del mercado, hasta locales perfectamente establecidos. La limpieza de los mismos también fue variable ya que mientras algunos se asean utilizando desinfectantes, otros solo emplean agua. Es importante mencionar que el local en el que se refiere la presencia de insectos, fue el único en el que la muestra presentó cepas de *E.coli* de origen animal, tal hecho permite suponer que estos insectos actúan como vectores mecánicos diseminando dichos microorganismos. Otro punto importante que pudiera estar relacionado con la contaminación bacteriana es el empleo de agua de la llave, frecuentemente almacenada en recipientes abiertos. Los datos obtenidos mostraron que los molinos empleados para preparar la masa nixtamalizada, solo se enjuagan con agua, lo que hace pensar que las bacterias pudieran mantenerse en éstos (al formar biopelículas) y ser ésta una fuente de contaminación constante. Ya que las bacterias lácticas se inoculan en este proceso (Wacher 1995), debe prevenirse la contaminación de tal manera que no se afecte la fuente de inóculo de la fermentación.

**DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS  
PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD INFANTIL  
1995**



**ANEXO I.**

Fuente: Sistema Único de Información Epidemiológica. Información Preliminar. Procesó: DGE  
Estado de Tabasco.

Tabla 2. Datos obtenidos de las encuestas realizadas en los expendios de pozol de Villahermosa, Tabasco.

Procedencia de la muestra	Higiene del personal	Instalaciones de los locales	Abastecimiento de agua	Equipos y utensilios empleados
Mercado Pino Suárez. Sra de Nacajuca. Muestras 1, 7, 8.	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Puesto con una mesa en un pasillo del mercado.	No se tienen datos.	Leña para la cocción, molino.
Mercado Pino Suárez. Pozolería 2. Muestra 2.	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Piso de mosaico, techo de madera, paredes de cemento. No hay puertas ni ventanas. Aseo con agua y jabón.	Agua de la llave. Se almacena en recipientes de plástico.	Gas, molino que se enjuaga con agua para asearlo, se recibe la masa en una lámina anexa al molino.
Mercado Pino Suárez. Pozolería 3. Muestra 3.	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Piso de cemento. No hay puertas, techos ni ventanas. Aseo con agua.	Agua de la llave.	Gas, molino que se enjuaga con agua para asearlo, se recibe la masa en un plástico.
Pozolería "La Flor del Maíz". Muestra 4.	Limpieza aparente en ropa y manos. No hay mucho tránsito de personas.	Local apartado del mercado. Piso, techo y paredes de cemento, hay puertas y ventanas. Aseo con agua y jabón, a veces con desinfectante comercial.	Agua de la llave.	Fogón, molino. La masa se recibe en charola de lámina. El pozol se vende en una mesa dentro de una vitrina de cristal.
Mercado Pino Suárez. Pozolería 1. Muestra 5.	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Piso de mosaico. No hay techo, puertas ni ventanas. Aseo con jabón, a veces cloro.	Agua de la llave.	Gas, molino. Recibe la masa en recipientes de plástico.
Mercado Atasta. Muestra 6.	Limpieza aparente en ropa y manos. No hay mucho tránsito de personas.	Piso de cemento, no tiene techo, puertas ni ventanas. Presencia de insectos. Aseo con agua y jabón.	Agua de la llave.	Gas, molino que enjuagan con agua. Reciben la masa en recipientes de plástico.
Mercado Pino Suárez. Junto a carnicerías. Muestras 9 y 10.	Limpieza aparente en ropa y manos. Tránsito de personas.	Piso de mosaico, techo de madera, paredes de cemento. Mala ventilación. Aseo con agua y jabón.	Agua de la llave. Almacenada en cubetas.	Gas, molino que se enjuaga con agua. Reciben la masa en un recipiente de lámina.



En la Tabla 5 se presentan datos referentes al origen de las muestras, en ésta se puede observar que las procedentes del pueblo de Nacajuca mostraron mayor índice de contaminación, lo anterior podría estar relacionado con su elaboración totalmente artesanal, así como por la forma en que se expende, utilizando los pasillos del mercado, donde el riesgo de contaminación es muy alto, o por el hecho de que el productor hace un recorrido desde su lugar de origen hasta el mercado (aproximadamente 1-1.5 h de distancia).

#### AISLAMIENTO MICROBIANO.

La Tabla 3 muestra la caracterización del género de los aislamientos realizados a las diez muestras de pozol, como puede observarse se logró la identificación de cepas de *Escherichia coli*, de otros géneros de la familia Enterobacteriaceae y de bacterias de origen ambiental como *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, y *Acinetobacter*.

No se logró el aislamiento de bacterias de los géneros *Salmonella* ni *Shigella*, bien sea porque no estaban presentes, o por tener la condición de microorganismos viables no cultivables. Otra razón pudo ser que su número fuera demasiado bajo para detectarse por los métodos empleados.

Al realizar el análisis de sobrevivencia se encontró que en tres de las muestras (3, 4 y 7) *Escherichia coli* se aisló hasta las 48 h de fermentación e incluso en una (muestra 1) hasta los 8 días después de colectada la muestra. Lorri y Svanberg (1992) encontraron que cepas de enterobacterias patógenas como *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) y *Shigella spp.* se inhibían fuertemente al ser inoculadas en atoles de cereales fermentados de Tanzania, sin embargo, Simango y Rukure (1992) al estudiar la prevalencia de bacterias patógenas como *Shigella spp.* y *Escherichia coli* (EPEC) en el *mahewu* (papilla agria de maíz), observaron que, aunque disminuía el número de éstas, se podían aislar después de 24 h de fermentación. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, en donde la sobrevivencia se presentó a valores de pH por debajo de 4. Estudios previos (Guilfoyle y Hirshfield, 1996; Benjamin y Datta, 1995) han demostrado como cepas de *E. coli* adaptadas a ambientes extremos presentan mayor resistencia a la acidez. Estas propiedades hacen a los microorganismos potencialmente patógenos (Foster y Hall, 1990).

#### ACIDIFICACIÓN DE LAS MASAS.

Para determinar la acidificación de las muestras, se tomaron lecturas de los valores de pH inmediatamente que éstas llegaron al laboratorio cuando tenían entre 4 y 6 h de fermentación, a las 48 h y a los 8 días (Tabla 4. Figura 1). Los valores de pH iniciales fueron muy variables ya que van desde 6.7 a 4.7. Probablemente los valores de pH más bajos detectados en las muestras 7 a 10 se debieron a que al ser las últimas que se colectaron y que la temperatura ambiental en Villahermosa era ya muy elevada, se favoreció la fermentación y por ende la acidificación. A las 48 h los valores de pH obtenidos fueron menores a 4.5 en la mayoría de los casos, por lo que este alimento podría considerarse seguro si se consume después de 48 h de haberse iniciado la fermentación, ya que la mayoría de las bacterias patógenas se inhiben a estos valores. A los 8 días los valores de pH fueron ligeramente menores de 4 en la mayoría de los casos.

La acidificación inicial es importante para la eliminación rápida de microorganismos patógenos, por lo que además de mejorar las condiciones higiénicas del proceso de elaboración, deberá optimizarse su acidificación, sin embargo, esto es variable, ya que estudios con enterobacterias patógenas (Leyer y col., 1995) mostraron como algunas de estas bacterias resisten valores de pH bajos en alimentos ácidos fermentados.

#### CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS.

En la Tabla 4 y Fig. 1 se muestran los datos de la cuenta inicial de enterobacterias, observándose que varió desde 7.8 hasta 4.1 (log ufc/g muestra húmeda). Cuentas de 7 (log ufc/g muestra húmeda) indican una contaminación masiva o que existieron condiciones que permitieron su proliferación en masa. Las enterobacterias siempre están presentes al inicio de la fermentación de muchos de los alimentos elaborados con maíz, tal es el caso del pozol, donde Wachter (1995) señala que la cuenta inicial de enterobacterias en pozoles de Chiapas fue de 3.9 (log ufc/g de peso húmedo), y el del *mawe* en Benin (Africa) (que, si se consume como gel se denomina *ogi* y si se consume como atole se llama *koko*), donde Hounhouigan y col. (1991) reportaron que las cuentas de enterobacterias fueron de 3.6 (log cfu/g de muestra).

Las cuentas bacterianas a las 48 h en la mayoría de los casos se redujeron entre 1 y 3 ciclos logarítmicos, sin embargo, no se eliminaron, aunque los valores de pH fueron menores a 4.5. Es importante resaltar que incluso en dos de los casos la cuenta aumentó; en la muestra 4, la cuenta total de enterobacterias aumentó en dos ciclos logarítmicos a un valor de pH de 4.8, por lo tanto, es importante controlar la fermentación para favorecer la acidificación. Estudios realizados con alimentos fermentados que se consumen en África mostraron cómo disminuyen las cuentas totales de ciertos patógenos intestinales de las familias Bacillaceae, Micrococcaceae y Enterobacteriaceae, cuando los valores de pH bajan a 4.5- 4 y las concentraciones de ácidos láctico y acético son de 1 a 1.5% (Nout, 1992).

En un estudio realizado con pozoles de Chiapas, Wachter y col., (1993) observaron que la contaminación del pozol ocurrió en diferentes etapas durante su elaboración. La microbiota existente inicialmente en los granos de maíz, aunque seguramente es eliminada durante el proceso de nixtamalización, puede nuevamente aumentar durante el lavado y el remojo del nixtamal por la existencia de microorganismos presentes en el agua y en los recipientes empleados, sin embargo, el incremento sustancial de éstos ocurre durante la molienda del nixtamal ya que es ahí donde se inoculan, entre otros, los microorganismos fermentativos y por falta de higiene, bacterias patógenas. En dicho estudio, después de la molienda, los reportes de las cuentas totales de enterobacterias fueron de aproximadamente 4 (log ufc/g). La elaboración de las bolas y su envoltura en hojas de plátano es un proceso totalmente artesanal, donde el contacto de la masa con las superficies de trabajo, con las manos del productor y con las mismas hojas de plátano ofrece nuevas fuentes de contaminación, dando lugar a un alimento que probablemente no es apto para su consumo ya que el riesgo de inoculación de patógenos en este paso de la producción es alto (Wachter y col. 1993).

Tabla 3. Microorganismos identificados en las diferentes muestras de pozol analizadas.

MUESTRA

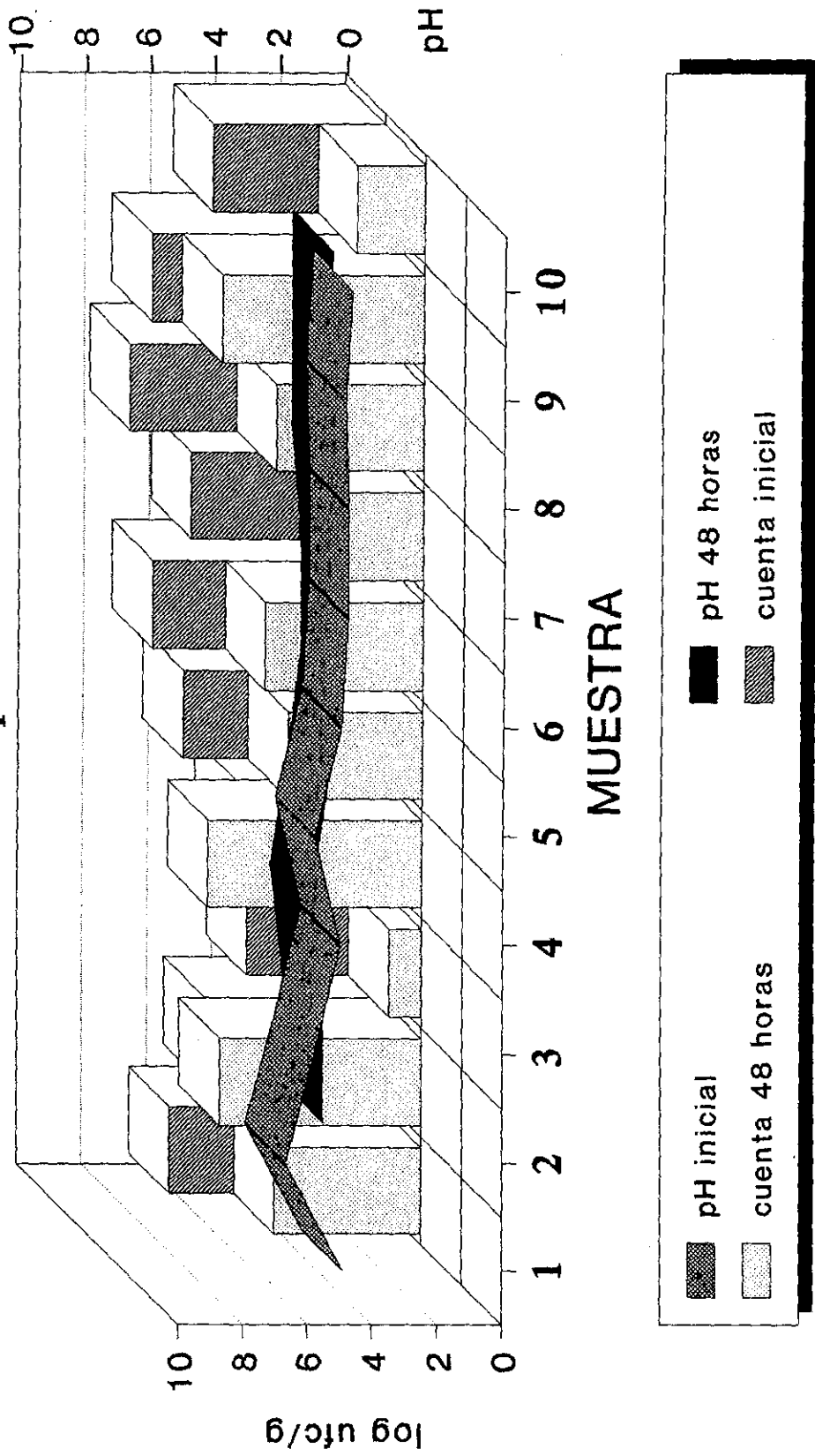
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>E. coli</i> inicial	presencia (*)	ausencia	presencia	presencia	presencia	presencia	presencia	presencia	ausencia	presencia
<i>E. coli</i> 48 h		ausencia	presencia	presencia	ausencia	ausencia	presencia	ausencia	ausencia	ausencia
<i>E. coli</i> 8 días	presencia (*)									
<i>Salmonella</i> inicial	ausencia (*)	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia
<i>Salmonella</i> 48 h		ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia
<i>Salmonella</i> 8 días.	ausencia (*)									
<i>Shigella</i> inicial	ausencia (*)	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia
<i>Shigella</i> 48 h		ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia
<i>Shigella</i> 8 días.	ausencia (*)									
Otros microorganismos	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i> <i>Xanthomonas</i> spp.	<i>E. sakazakii</i> <i>Enterobacter</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Escherichia</i> <i>fergusonii</i> <i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> <i>E. fergusonii</i> <i>E. cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>			<i>E. agglomerans</i> <i>Klebsiella</i> spp.	

(\*) Todas las presencias y ausencias de la tabla de muestras están referidas a 25 g.

Tabla 4. Valores de pH y cuentas de enterobacterias totales de muestras de pozol.

	MUESTRA									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peso de la muestra (g)	946	1050	1038	1073	1022	989	955	1049	1013	1085
pH inicial	4.90	6.72	5.73	5.00	5.81	4.99	4.88	4.84	4.95	4.73
pH 48 horas		4.38	4.38	4.77	4.20	3.85	3.85	4.14	4.18	4.19
pH 8 días	3.70		4.29	3.86	3.59	4.00	3.86	3.93	3.83	3.91
Cuenta total de enterobacterias inicial log ufc/g	6.54	5.47	4.17	4.54	6.17	7.13	5.95	7.84	7.17	5.30
Cuenta total de enterobacterias 48 h. log ufc/g	4.54	6.25	1.00	6.62	4.17	4.89	2.59	4.56	6.25	2.08

**Fig. 1. Variaciones del logaritmo ufc /g muestra húmeda con valores de pH indicados en cada una de las muestras de pozol**



## SEROTIPIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DEL POZOL.

*Escherichia coli* fué el único patógeno identificado, por lo que el estudio se centró en esta bacteria. Al respecto se estableció la identidad de diversos serogrupos de *E. coli* reportados en los grupos patógenos EPEC: O18 (muestra 10) y O88 (muestra 1); ETEC: O8 (muestras 4, 8 y 10); O11 y O20 (muestra 8); O173 (muestra 10) y UPEC: O1 (muestras 7 y 8) (Anexo 2). Otros serotipos como O8:H7 (muestra 4), O4:H16 (muestra 8) y O108:H34 (muestra 10) presentaron patrones de adherencia agregativa por lo que se pueden considerar potencialmente patógenos (Tabla 5).

La cepa O88: H25 (Tabla 5, muestra 1), presentó adherencia localizada a células HeLa y genes para factores de virulencia (*eae*), por lo que se le considera como una *E. coli* patógena del grupo de las EPEC. Estudios realizados en Brasil (Pedroso y col., 1993), reportaron resultados muy similares a los obtenidos en este trabajo, y relacionan cepas con este serotipo a cuadros de diarrea infantil, por lo que aunque no está referida dentro de los serotipos clásicos de EPEC, los autores mencionados sugieren que se incluya en dicha categoría.

En varias cepas no se identificó el antígeno somático, reportándose como un serotipo O?: H10 (muestras 3 y 7). Al realizar la búsqueda de sus propiedades de adherencia y la identificación de factores de virulencia se encontró que todas tuvieron un comportamiento diferente. Para establecer si todas las cepas pertenecían a una misma clona, se prepararon sueros de conejo de dos de ellas. Al realizar el ensayo de aglutinación, se determinó que se trataba efectivamente de una misma clona, al obtenerse aglutinación con todas las cepas que presentaron dicho serotipo.

En tres de las muestras (3,4 y 8) se identificó el serogrupo O92, lo anterior sugiere que existe una contaminación común del pozol, la cual podría presentarse dentro del propio mercado donde se vende este producto.

Las cepas del serotipo O9: H31, están reportadas como de origen animal, en el estudio se identificó este serotipo en la muestra 6. Es muy probable que también se de contaminación por heces de animales. Dicha contaminación se puede explicar de diversas maneras, una de ellas podría ser por lo anotado en los datos de las encuestas, en donde se refiere la existencia de insectos en el local donde se adquirió esta muestra. Otra explicación es el manejo de animales en los lugares de elaboración del pozol, y otra más, es la diseminación de microorganismos por corrientes de aire, tal como lo han reportado Rosas y col. (1997). Lo anterior tiene mayor importancia de la que en un momento dado se le puede otorgar; ya que está bien establecido que cepas de origen animal como *E. coli* O157:H7 que ha causado brotes de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (HUS) en países desarrollados, se aísla de heces de ganado bovino. La contaminación por heces de animales hace que el alimento no se pueda considerar seguro para su consumo (Doyle y col., 1997).

Los ensayos de adherencia realizados en células HeLa (Tabla 5, Anexo 3), mostraron que una cepa (O88:H25) presentó adherencia localizada (Fig. 2), y otras cepas de los serotipos O23:H10, O?:H10, y O92:H21 presentaron adherencia difusa (Fig. 3), siendo pobre en los serotipos O22:H2, O8:H8 y O59:H5.

TABLA 5. Serotipos de *E. coli* identificados en diferentes muestras de pozol. Capacidad de sobrevivencia durante la fermentación, presencia de factores de virulencia.

NO DE REFERENCIA FMU	FOZOZOL	SEROTIPO	TIPO DE ADHERENCIA			HIBRIDACION (*)	pH			PERMANENCIA (**)	CTA TOT. ENTEROBAC.		PROCEDENCIA	SEROTIPOS PATOGE. NOS REPORTADOS
			LOCALIZADA	DIFUSA	AGREGATIVA		INICIAL	48 HORAS	8 DIAS		INICIAL	48 HORAS		
95214	1 MI - 1	O88 H25				+++	4.9	4.9	3.7	SI	8.84	4.84	NACAJUCA	
95215	1 MI - 2	O88 H25				+++	4.9	4.9	3.7	SI				
95216	1 MI - 3	O88 H25				+++	4.9	4.9	3.7	SI				
95217	1 MI - 4	O88 H25				+++	4.9	4.9	3.7	SI				
95218	1 MI - 5	O88 H25				+++	4.9	4.9	3.7	SI				
95219	1 M48 - 1	O88 H25				+++	4.9	4.9	3.7	SI				
95220	1 M48 - 2	O88 H25				+++	4.9	4.9	3.7	SI				
95221	1 M48 - 3	O88 H25			Adherencia al cristal	+++	4.9	4.9	3.7	SI				
95222	1 M48 - 4	O88 H25	+			+++	4.9	4.9	3.7	SI				EPEC
95223	1 M48 - 5	O88 H25				+++	4.9	4.9	3.7	SI				
95224	3 MI - 1	O92 H8			Adherencia al cristal	+++	5.73	4.38	4.29	NO	4.17	1	MERCADO	
95225	3 MI - 2	O92 H11			Adherencia al cristal	+++	5.73	4.38	4.29	NO			PINO SUAREZ	
95226	3 MI - 3	O7 H10				+++	5.73	4.38	4.29	NO			POZOLERIA 3	
95227	3 MI - 4	O92 H11			Adherencia al cristal	+++	5.73	4.38	4.29	NO				
95228	3 MI - 5	O7 H11				+++	5.73	4.38	4.29	NO				
95229	3 M48 - 1	O30 H45				+++	5.73	4.38	4.29	NO				
95230	3 M48 - 2	OR H45				+++	5.73	4.38	4.29	NO				
95231	3 M48 - 3	O30 H45				+++	5.73	4.38	4.29	NO				
95232	4 MI - 1	O92 H11				+	5	4.77	3.86	NO	4.54	5.82	POZOLERIA	
95233	4 MI - 2	O22 H2				+	5	4.77	3.86	SI			"LA FLOR DEL MAIZ"	
95234	4 MI - 3	O22 H2				+	5	4.77	3.86	SI				
95235	4 MI - 4	OR H17				LT	5	4.77	3.86	NO				
95236	4 MI - 5	O147 H7				LT	5	4.77	3.86	NO				
95237	4 M48 - 1	O92 H8				LT	5	4.77	3.86	NO				
95238	4 M48 - 2	O8 H7			+	Agg 1	5	4.77	3.86	NO				
95239	4 M48 - 3	O22 H2				+	5	4.77	3.86	SI				
95241	4 M48 - 5	O8 H8				+	5	4.77	3.86	NO				EPEC
95242	5 MI - 1	O130 H23				+++	5.81	4.2	3.59	NO	5.17	4.17	MERCADO	
95243	5 MI - 2	O130 H23				+++	5.81	4.2	3.59	NO			PINO SUAREZ	
95244	5 MI - 3	O33 H11			Adherencia al cristal	+++	5.81	4.2	3.59	NO			POZOLERIA 1	
95245	5 MI - 4	O130 H23			Adherencia al cristal	+++	5.81	4.2	3.59	NO				
95246	6 MI - 1	O9 H31			Adherencia al cristal	+++	4.90	3.85	4	NO	7.13	4.89	MERCADO	Animal
95248	6 MI - 3	O9 H31				+++	4.90	3.85	4	NO			ATASTA	Animal
95251	7 MI - 1	O1 H8				+++	4.88	3.85	3.86	NO	5.98	2.59	NACAJUCA	UPEC
95252	7 MI - 2	O104 H11				+++	4.88	3.85	3.86	NO				
95253	7 MI - 3	O23 H10			+	+++	4.88	3.85	3.86	NO				
95254	7 MI - 4	O7 H				+++	4.88	3.85	3.86	NO				
95255	7 MI - 5	O7 H10				+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95256	7 MI - 6	O7 H				+++	4.88	3.85	3.86	NO				
95257	7 MI - 7	O7 H10				+++	4.88	3.85	3.86	SI				UPEC
95258	7 MI - 8	O7 H10				+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95259	7 MI - 9	OR H41			EFECTO CITOTOXICO	+++	4.88	3.85	3.86	NO				
95260	7 MI - 10	O7 H10			+	+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95261	7 M48 - 1	O7 H10				+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95262	7 M48 - 2	O7 H10			+	+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95263	7 M48 - 3	O7 H10				+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95264	7 M48 - 4	O7 H7				Agg 1	4.88	3.85	3.86	NO				
95265	7 M48 - 5	O7 H10			+	+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95266	7 M48 - 6	O7 H10				+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95267	7 M48 - 7	O7 H10			Adherencia al cristal	+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95268	7 M48 - 8	O7 H10				LT	4.88	3.85	3.86	SI				
95269	7 M48 - 9	O7 H10			+	+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95270	7 M48 - 10	O7 H10			+	+++	4.88	3.85	3.86	SI				
95271	8 MI - 1	O73 H				+++	4.84	4.14	3.93	NO	7.84	4.58	NACAJUCA	
95272	8 MI - 2	O62 H21			+	LT	4.84	4.14	3.93	NO				
95273	8 MI - 3	O4 H16			Adherencia al cristal	Agg 1	4.84	4.14	3.93	NO				
95274	8 MI - 4	O42 H			Adherencia al cristal	+++	4.84	4.14	3.93	NO				
95275	8 MI - 5	O11 H47				+++	4.84	4.14	3.93	NO				EPEC
95276	8 MI - 6	O38 H7				+++	4.84	4.14	3.93	NO				
95277	8 MI - 7	O20 H				+++	4.84	4.14	3.93	NO				EPEC
95278	8 MI - 8	O1 H7				+++	4.84	4.14	3.93	NO				UPEC
95279	8 MI - 9	O8 H49			Adherencia al cristal	+++	4.84	4.14	3.93	NO				EPEC
95280	8 MI - 10	O92 H19			Adherencia al cristal	+++	4.84	4.14	3.93	NO				
95281	10 MI - 1	O22 H2			Adherencia difusa pobre	+++	4.73	4.19	3.91	NO	5.3	2.08	MERCADO	
95282	10 MI - 2	O18 H83				+++	4.73	4.19	3.91	NO			PINO SUAREZ	
95283	10 MI - 3	O106 H34			+	+++	4.73	4.19	3.91	NO			CARNICERIA	EPEC
95284	10 MI - 4	O173 H23			EFECTO CITOTOXICO	+++	4.73	4.19	3.91	NO				Prob. EPEC
95285	10 MI - 5	O6 H8			Adherencia difusa pobre	+++ LT	4.73	4.19	3.91	NO				EPEC
95286	10 MI - 6	O6 H8			Adherencia difusa pobre	LT	4.73	4.19	3.91	NO				EPEC
95287	10 MI - 7	O59 H5			Adherencia difusa pobre	LT	4.73	4.19	3.91	NO				EPEC
95288	10 MI - 8	O7 H34			Adherencia al cristal	+++ LT	4.73	4.19	3.91	NO				
95289	10 MI - 9	O61 H14				+++ LT	4.73	4.19	3.91	NO				
95290	10 MI - 10	O147 H7				+++	4.73	4.19	3.91	NO				

(\*) Hibridación con las sondas que se mencionaron, sin resultado significa no hibridación.

(\*\*) Detección de esa cepa a las 48 h de incubación de la muestra de pozol.

ANEXO 2.

Serogrupos de *E. coli* patógenos encontrados en las muestras de pozol.

EPEC	ETEC	UPEC
O18	O8	O1
O88	O11	
	O20	
	O173	



### ANEXO 3

#### Serotipos de *E. coli* y patrón de adherencia a células HeLa

Número de cepas	Serotipo	Patrón de adherencia
1	O1:H10	Agregativa
1	O4:H16	Al cristal
1	O8:H7	Agregativa
2	O8:H8	Difusa
1	O8:H49	Al cristal
1	O22:H2	Difusa
1	O23:H10	Difusa
1	O42:H-	Al cristal
1	O59:H5	Difusa
1	O88:H25	Localizada
1	O88:H25	Al cristal
1	O92:H6	Al cristal
2	O92:H11	Al cristal
1	O92:H19	Al cristal
1	O92:H21	Difusa
1	O108:34	Agregativa
2	O?:H10	Agregativa
3	O?:H10	Difusa
1	O?:H34	Al cristal

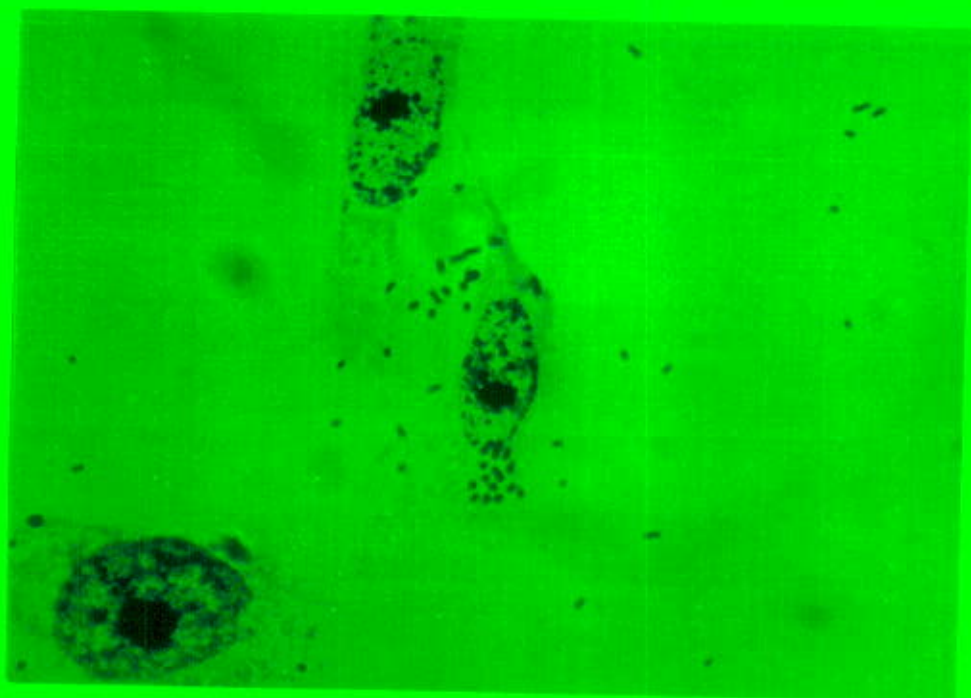


Fig. 2. Adherencia tipo localizada a células HeLa por la cepa O88:H25 de *Escherichia coli*.

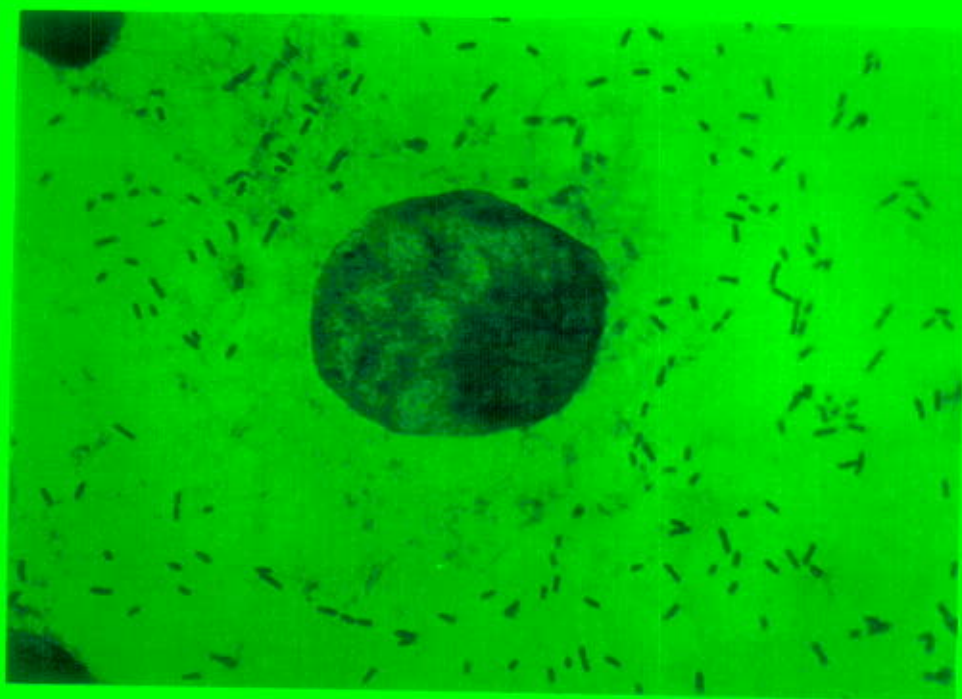


Fig. 3. Adherencia difusa a células HeLa por serotipos O23:H10, O92:H21 y O7:H10 de *Escherichia coli*.

El patrón de adherencia agregativa se observó en 5 cepas de los serotipos O 8:H7, O1:H10, O?:H10 y O108:H34, finalmente, en 13 cepas de diversos serotipos se estableció únicamente adherencia al cristal (Fig. 5). El serotipo O108:H34 en particular, mostró un patrón de adherencia agregativa a células HeLa característico (Fig. 4).

Durante este ensayo de adherencia se observó que, dos cepas (OR:H41 y O173:H23) causaban un efecto citotóxico sobre los cultivos de células HeLa (Fig. 6).

#### IDENTIFICACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA.

En el estudio de hibridación en colonia (Anexo 4) se encontró que cepas de los serotipos O88:H25, O8:H49, O108:H34, O173:H23, O8:H8, O?:H34, y O81:H14, poseen genes *eae* (Fig. 7), otras de los serotipos OR:H17, O147:H7, O92:H6, O?:H10, O92:H21, O8:H8, O59:H5, O?:H34, O81:H14 y O?:H- hibridaron con la sonda para LT (Fig. 8), y cepas O8:H7, O?:H7 y O4:H16 con la sonda Aggl de adherencia agregativa (Fig. 9). Al respecto es importante mencionar que la primera de estas últimas cepas además, dió positiva la prueba de adherencia agregativa al realizar el ensayo en células HeLa. Las cepas del serogrupo O8 están incluidas en el grupo enterotoxigénico (ETEC), los resultados obtenidos empleando la técnica de hibridación con sonda para LT fueron positivos para cepas de este serotipo aisladas, demostrándose así la presencia de los genes para la toxina termolábil. La presencia de genes de virulencia en estas cepas aisladas de un alimento de alto consumo convierte a estos productos en posibles fuentes de transmisión de patógenos causantes de enfermedades diarreicas.

Debido a que la cepa O108:H34 presentó un patrón de adherencia agregativa muy característico se propuso la búsqueda de toxinas que previamente han sido reportadas en EAggEC. Empleando el sobrenadante del cultivo de esta cepa se realizó SDS-PAGE y un ensayo de Western blot, los resultados obtenidos mostraron una fracción proteica de aproximadamente 60 kDa (Fig. 10), que fue reconocida por anticuerpos obtenidos contra una proteína de 108 kDa, reportada por Eslava y col., (1993), la cual ha sido caracterizada y relacionada con el daño intestinal inducido por EAggEC. Consideramos por el tamaño de la proteína identificada en nuestra cepa (60 kDa), que ésta pueda tener homología antigénica con la proteína de 108 kDa, por lo que es muy importante continuar con su caracterización para determinar las propiedades y la importancia clínica y epidemiológica que este producto pueda tener en la patogenia de *E. coli* diarreogénica.

#### SOBREVIVENCIA DE *E. coli* DURANTE LA FERMENTACIÓN.

En cuanto a la sobrevivencia de las cepas aisladas de *Escherichia coli*, observamos en los resultados de la Tabla 5, que las cepas de los serotipos O88:H25 (muestra 1), O8:H7(muestra 4), O8:H8 (muestra 4) y O?:H10 (muestra 7) que poseen factores de virulencia o que por serogrupo están reportados como patógenos, sobrevivieron a valores de pH bajos (entre 3.7 y 4.3) después de las 48 h de fermentación, y las cepas de los serotipos O30:H45 (muestra 3), OR:H45 (muestra 3), O22:H2 (muestra 4) y O92:H6 (muestra 4), que no han sido reportados como patógenos, también sobrevivieron (Anexos 5 y 6). Esta

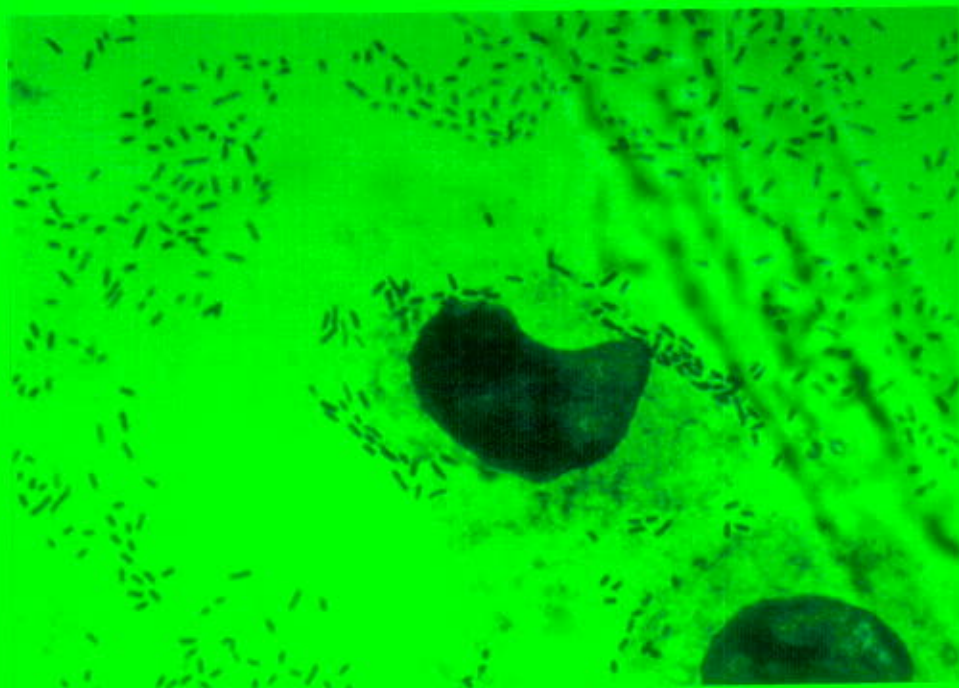


Fig. 4. Adherencia agregativa a células HeLa por cepas de *Escherichia coli* de los serotipos O1:H10, O8:H7, O108:H34 y O7:H10

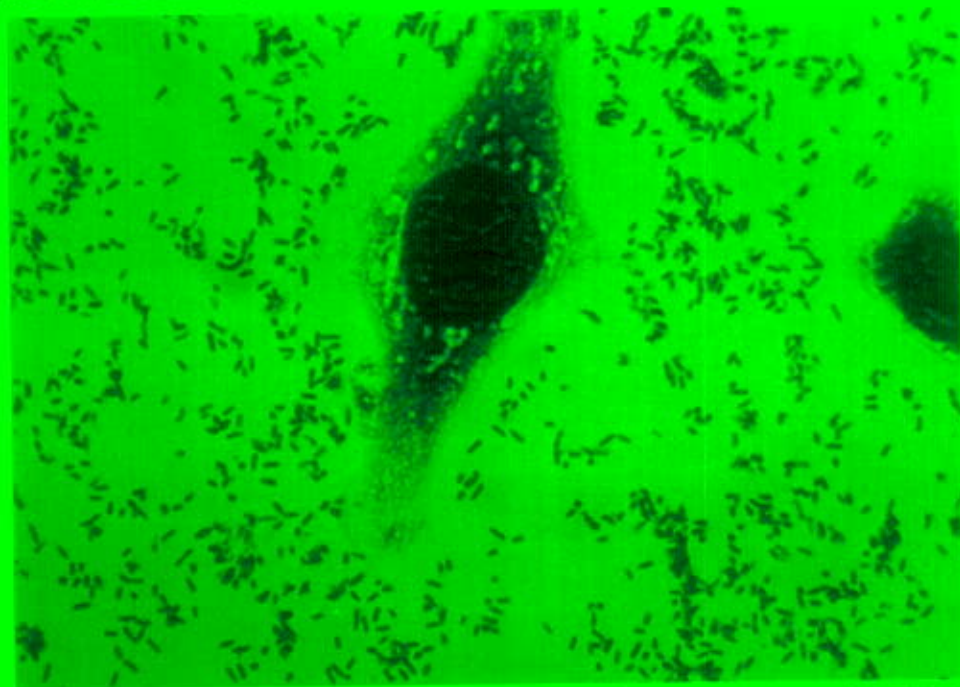


Fig. 5. Adherencia al cristal por cepas de *Escherichia coli* pertenecientes a los serogrupos O4:H16, O8:H49, O42:H-, O88:H25, O92:H6, O92:H11, O92:H19 y O7:H34

## ANEXO 4

Serotipos que hibridizaron con diferentes sondas para genes de virulencia.

SONDAS	<i>eae</i>	LT	Agg 1
Serotipos	O8:H8	O8:H8	O4:H16
	O8:H49	O59:H5	O8:H7
	O81:H14	O81:H14	O?:H10
	O88:H25	O92:H6	
	O108:H34	O92:H21	
	O173:H23	O147:H7	
	O?:H34	OR:H17	
		O?:H10	
		O?:H34	

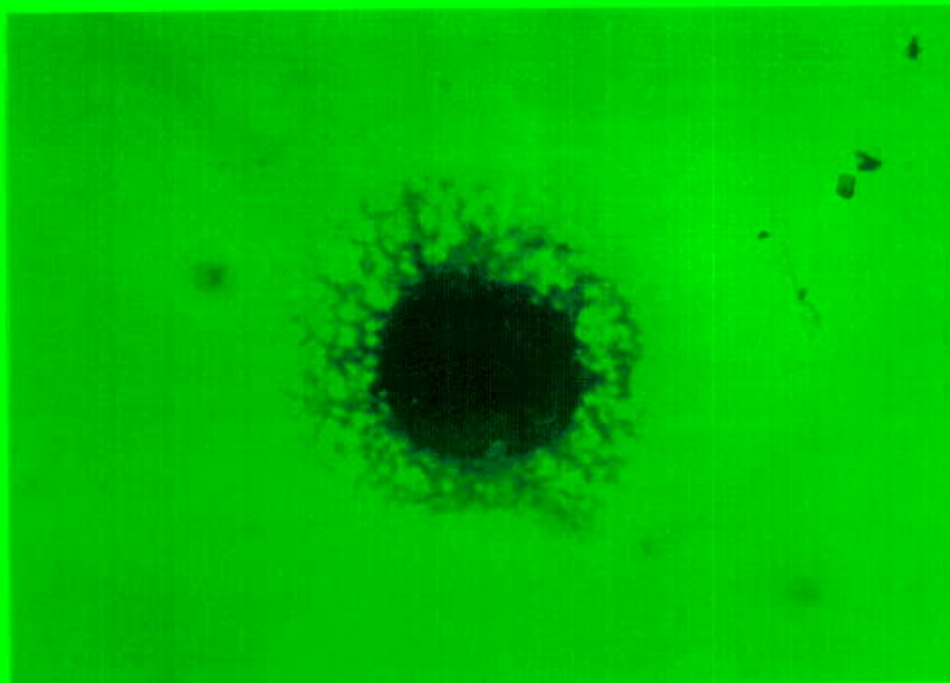


Fig. 6. Efecto citotóxico sobre cultivos de células HeLa por *Escherichia coli* O173 H23

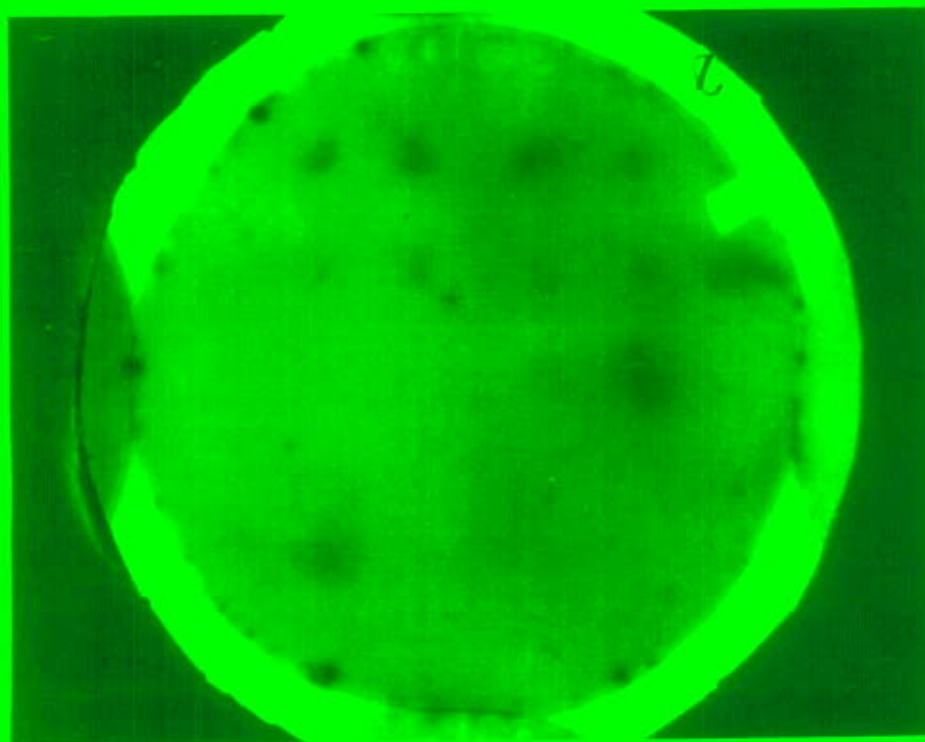


Fig. 7. Autoradiografía con colonias positivas para genes *cae*, que hibridaron con la sonda empleada

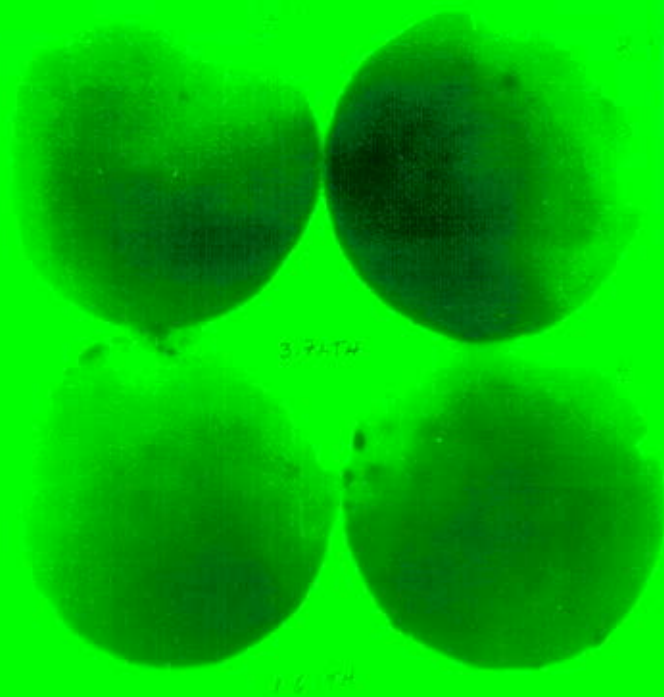


Fig 8 Autorradiografía con colonias positivas que contienen genes para LT

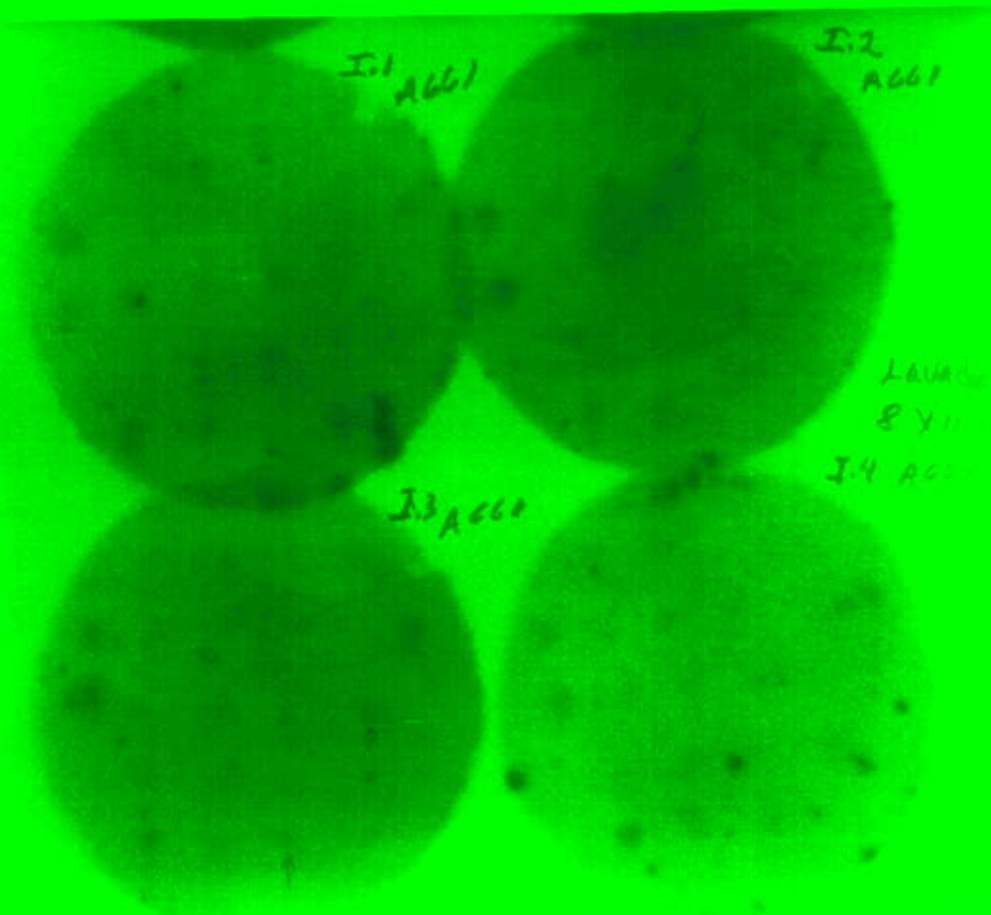


Fig 9 Autorradiografías de colonias positivas que contiene genes para factores de virulencia AGG1

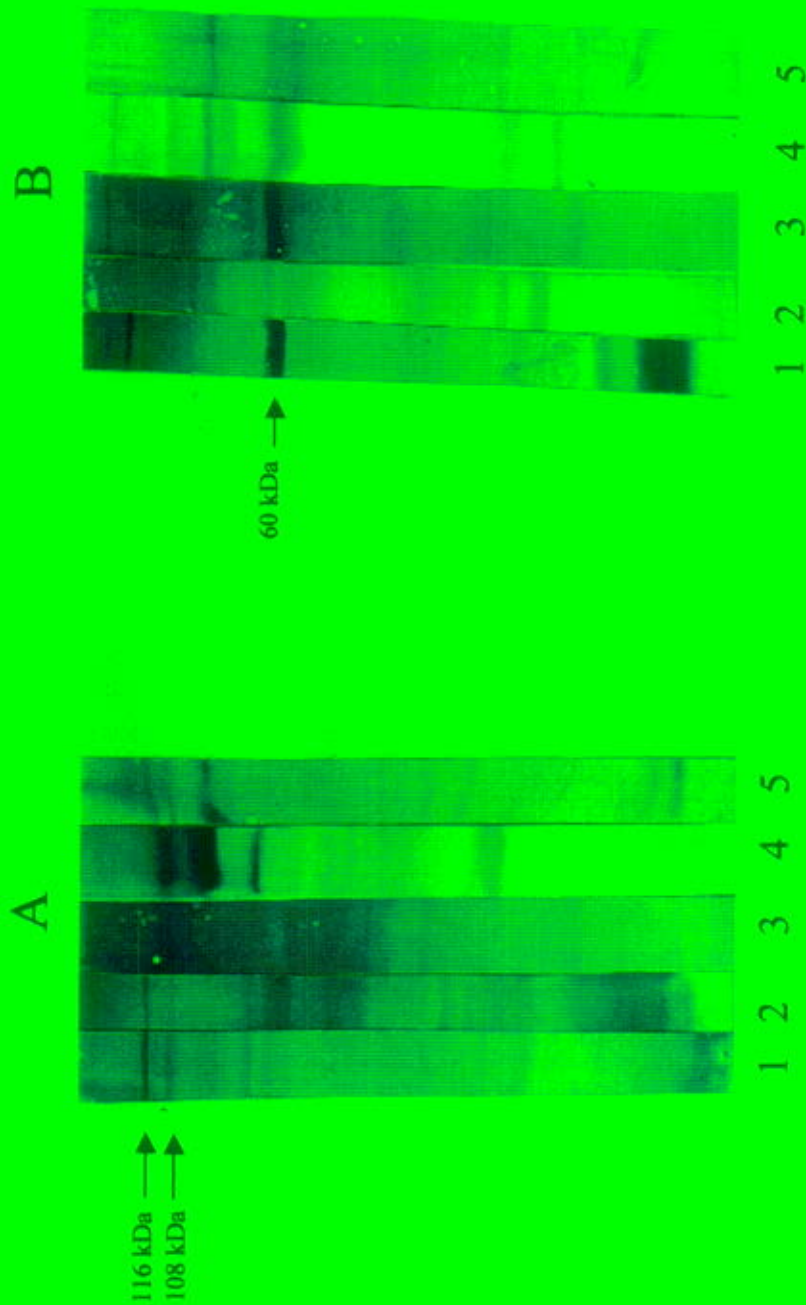


Fig. 10.

Immunotransferencia de precipitados bacterianos obtenidos del sobrenadante del cultivo de la cepa EaggEC (O2:H10) 49766 (A), y de la cepa de *E. coli* O108:H34 (B).

Carril 1.- Anticuerpos contra las proteínas de 116 y 108 kDa de EAggEC 49766.

Carril 2.- Anticuerpos contra la proteína de 116 kDa de EAggEC 49766.

Carril 3.- Anticuerpos contra la proteína de 108 kDa de EAggEC 49766.

Carril 4.- Anticuerpos contra Toxina Colérica (CT).

Carril 5.- Anticuerpos contra la Toxina Termolábil de *E. coli* (LT).



## ANEXO 5

Serotipos identificados en muestras de pozol. Valores de pH en el aislamiento. Procedencia.

Muestra	Serotipo	pH inicial	pH 48 h	Procedencia
1	O88:H25	4.9	3.7	Nacajuca
3	O92:H6	5.7		Mercado Pino Suárez Pozolería 3
	O92:H11	5.7		
	O7:H10	5.7		
	O30:H45		4.2	
	OR:H45		4.2	
4	O22:H2	5.0	4.7	Pozolería "La Flor del Maíz"
	O92:H11	5.0		
	O147:H7	5.0		
	OR:H17	5.0		
	O8:H7		4.7	
	O8:H8		4.7	
	O92:H6		4.7	
5	O33:H11	5.8		Mercado Pino Suárez Pozolería 1
	O139:H23	5.8		
6	O9:H31	4.9		Mercado Atasta
7	O1:H6	4.8		Nacajuca
	O1:H10	4.8		
	O23:H10	4.8		
	O104:H11	4.8		
	O7:H-	4.8		
	OR:H41	4.8		
	O7:H10	4.8	3.8	
	O7:H?		3.8	
8	O1:H?	4.8		Nacajuca
	O4:H16	4.8		
	O8:H49	4.8		
	O20:H-	4.8		
	O33:H7	4.8		
	O42:H-	4.8		
	O73:H-	4.8		
	O92:H19	4.8		
	O92:H21	4.8		
10	O8:H8	4.7		Mercado Pino Suárez Carnicería
	O18:H53	4.7		
	O22:H2	4.7		
	O59:H5	4.7		
	O81:H14	4.7		
	O108:H34	4.7		
	O147:H7	4.7		
	O173:H23	4.7		

ANEXO 6.

Serotipos aislados a las 48 h de fermentación, algunos presentaron factores de virulencia.

Número de cepas	Serotipos	pH	Adherencia	Hibridización
1	O8:H7	4.7	Agregativa	Agg 1
1	O8:H8	4.7		
1	O22:H2	4.7		
2	O30:H45	4.3		
1	OR:H45	4.3		
5	O88:H25	3.7	Localizada	eae
1	O92:H6	4.7		LT
10	O?:H10	3.8	Difusa, agregativa	LT, Agg 1

observación da lugar a proponer posibles causas de la sobrevivencia de estas cepas en condiciones de estrés. Una posibilidad sería la existencia de microambientes de diferente pH dentro de las masas, las que al contener residuos de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ocasionan que los valores de pH se puedan modificar por la neutralización de los ácidos formados, o por otro lado, que microorganismos como *Geotrichum candidum* se encarguen de consumir estos ácidos y por lo tanto se favorezca la sobrevivencia de bacterias patógenas. Otro aspecto a discutir es la posible resistencia que de forma natural o inducida puedan presentar estas cepas a ambientes extremos. Bearson y col. (1997) y Foster y Hall (1990) correlacionan la tolerancia a la acidez y la virulencia en *Salmonella typhimurium*, posiblemente porque algunos genes sólo se expresan en situaciones de estrés. Una situación similar podría presentarse en las cepas de *E. coli* aisladas en este estudio.

En este trabajo se identificaron diferentes cepas no incluidas en los grupos patógenos que presentan genes o propiedades de virulencia como la cepa O81:H14. Recientemente se describió un serotipo O39: HNM (Craig y col., 1997), que no está reportado dentro de ningún esquema de clasificación de patógenos existentes, y que sin embargo, fue el agente causal de un brote de diarrea en Estados Unidos causado por alimentos contaminados servidos en un restaurante. Esto nos hace pensar que cepas no clasificadas como patógenos, en algún momento, pueden representar problemas de salud, por lo que es importante realizar la caracterización completa de microorganismos aislados de alimentos.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis (similar a la ANOVA pero no paramétrica), y se determinó que hay diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) entre los tres grupos de valores de pH de las muestras de pozol que se compararon.

El coeficiente de correlación de Pearson señala que no hay una correlación significativa ( $r=0.34$ ,  $p=0.14$ ) entre las cuentas de bacterias y los valores de pH. Este valor bajo se debe probablemente al tamaño de la muestra.

No fue posible observar diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las cuentas bacterianas inicial y de 48 h, probablemente por el tamaño de la muestra que es pequeño.

## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Este trabajo se realizó con el propósito de investigar la presencia y sobrevivencia de bacterias patógenas en el pozol durante el proceso de la fermentación. Se escogió el que se elabora y se expende en diversos mercados y pozolerías de la ciudad de Villahermosa, Tabasco, porque el consumo y la venta de este producto ha proliferado notablemente en esta región y además por presentar facilidades para la obtención de las muestras.

De los resultados obtenidos podemos concluir que las enterobacterias están presentes y las cuentas totales iniciales son muy altas, aunque se reducen con la fermentación, no se eliminan totalmente (Fig. 1).

De los grupos de Enterobacterias cuya presencia se suponía, sólo se aislaron cepas de *E. coli*, hallándose diversos serogrupos patógenos como: O1, O8, O11, O18, O20, O88 y O173.

Se aislaron cepas no reportadas como patógenas, pero que presentan factores de virulencia como: O4:H16, O42:H-, O59:H5, O81:H14, O92:H6, O92:H21, O108:H34, O147:H7, O?:H10, O?:H34, O?:H?, OR:H17 y OR:H41.

Aunque se encontró que hay sobrevivencia a la fermentación tanto de cepas patógenas como no patógenas, la acidificación en conjunto con el tiempo confiere seguridad en la eliminación de microorganismos como *Escherichia coli*.

Una cepa del serotipo O108:H34 que no ha sido reportada como patógena, secreta una fracción protéica de 60 kDa que fue reconocida por anticuerpos elaborados contra la proteína Pet de 108 kDa (Eslava y col., 1993, 1998) la cual ha sido relacionada con la inducción de daño intestinal.

En este estudio se detectan diversas cepas como O23:H10 y O?:H10 cuyas características son desconocidas, por lo que se propone continuar con estudios que las definan.

El haber encontrado un nuevo serotipo (O?) es de mucho interés, y se propone que otras cepas O? se reten contra sus anticuerpos para poder determinarlo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, este alimento puede ser transmisor de *E. coli* con mecanismos de virulencia relacionados con la patogénesis de la diarrea.

## **CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES**

Se recomienda hacer un estudio epidemiológico amplio que incluya la caracterización de cepas de *E. coli* involucradas en casos de diarrea y determinar si se asocian a las presentes en el pozol.

Estudiar las cepas nuevas para obtener más datos en lo que se refiere a su probable patogenia ya que se trata de cepas aisladas en México.

Proponer métodos de control tanto higiénicos como de acidificación de las masas nixtamalizadas para mejorar la calidad sanitaria del pozol.

## CAPÍTULO VIII REFERENCIAS

- Arnold K.W. y Kaspar C. 1995. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2037-2039.
- Andah A. y Muller H.G. 1973. Studies on koko, a Ghanaian fermented maize porridge. *Ghana Journal of Agricultural Science*. 6: 103-108.
- Baik H. S., Bearson S., Dunbar S. y Foster J.W. 1996. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. *Microbiology*. 142: 3195-3200.
- Bhan M.K., Bhandari N., Sazawal S., Clemens J., Ray P., Levine M.M. y Kaper J.B. 1989. Descriptive epidemiology of persistent diarrhoea among young children in rural northern India. *Bulletin of the World Health Organization*. 67: 281-288.
- Bearson S., Bearson B., y Foster J.W. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 147: 173-180.
- Benjamin M.M. y Datta A.R. 1995. Acid tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1669-1672.
- Brock T.D. y Madigan M.T. 1993. *Microbiología*. Sexta Edición. Editorial Prentice Hall Hispanoamericana S. A. México.
- Brno M.E.C. y Montville T.J. 1993. Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 3003-3010.
- Cañas Urbina, A.O., Bárzana García, J.D. Owens y Wachter Rodarte M.C.. 1993. La elaboración del pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia*. 44: 219-229.
- Capparelli E. y Mata L. 1975. Microflora of maize prepared as tortillas. *Applied Microbiology*. 29: 802-806.

Connell I., Agace W., Klemm P., Schembri M., Marild S. y Svanborg C. 1996. Type I fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for urinary tract. *Proceeding of the National Academy of Sciences (USA)*. 93: 9827-9832.

Cravioto A., Gross R.J., Scotland S.M. y Rowe B. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*. 3:95-99.

Cravioto A., Scotland S.M. y Rowe B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infection and Immunity*. 36:189-197.

Cravioto A., Reyes R.E. Ortega R., Fernández G., Hernández R. y López R. 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of live. *Epidemiology and Infection*. 101:123-134.

Cravioto A., Reyes R.E. y Trujillo F. 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *American Journal of Epidemiology*. 131:886-904.

Cravioto A., Tello A., Navarro A., Ruiz J., Villafán H. y Eslava C. 1991. Association of *Escherichia coli* Hep-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoeae. *The Lancet*. 337: 262-64.

Cravioto R.O., Cravioto O.Y., Massieu H.G. y Guzmán G.J. 1955. El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Ciencia*. 15: 27-30.

Craig W. H., Savarino S.J., Besser J.M., Paulus C.J., Thelen V.M., Myers J.L., Cameron D.N., Barret T.J., Kaper J.B., Osterholm M.T. and Investigation Team. 1997. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *The Journal of Infectious Diseases*. 176: 1625-1628.

Daeschel M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. 43(1), 164-167.

D'Aoust J-Y. 1997. *Salmonella species*. En *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. Doyle M. P., Beuchat L. R. y Montville T. J. Editores. ASM Press. Washington, D.C. U.S.A.

- Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H.N. y Ginsberg H.S. 1990. Tratado de Microbiología. 3a. Edición. Salvat Mexicana de Editores. S. A. de C. V. México.
- Doyle M.P., Zhao T., Meng J. y Zhao S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. En Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle M. P., Beuchat L. R. y Montville T. J. Editores. ASM Press. Washington, D.C. U.S.A.
- Elliott S.J. y Nataro J.P. 1995. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. Reviews in Medical Microbiology. 6: 196-206.
- Escamilla-Hurtado, M.L. y Mozqueda- González, E. 1992. Fermentación láctica del pozol, una bebida fermentada de maíz. Tecnología de Alimentos (México) 27:37-41.
- Eslava C., Villaseca J., Morales R., Navarro A. y Cravioto A. 1993. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. Abstract B105. En Abstracts 93<sup>rd</sup> General Meeting American Society for Microbiology.
- Eslava C., Villaseca J.M. y Cravioto A. 1994. Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Cerezo S.G., Escobar G. A. y Valdespino G.J.L. Editores. Secretaría de Salud. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Baez". México. Capítulo III-6. pp.251-265.
- Eslava C., Navarro-García F., Czeczulin R.J., Henderson LR., Cravioto A. y Nataro J.P. July 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 7, vol. 66.
- Fitzroy J.H., Udoy A., Wanke C., y Aziz KMA. 1992. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. Acta Paediatric Supplement. 381: 27-31.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 8th. Ed. 1995. AOAC International. Gaithersbury, M.D. USA.
- Foster J.W. y Hall H. K. 1990. Adaptative acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology. 172: 771-778.
- Foster J.W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptative acid tolerance response. Journal of Bacteriology. 173: 6896-6902.



Fuentes I., Herrera T. y Ulloa M. 1974. Descripción de una especie nueva de *Pseudomonas*, *P. mexicana*, y determinación de *Escherichia coli* var. *neapolitana* aisladas del pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 16: 99-103.

Girón A., Jones T., Millán-Velasco F., Castro-Muñoz, Zárate L., Fry J., Frankel G., Moseley L., Baundry B., Kaper J.B., Schoolnik K. y Riley L. W. 1990. Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan Children in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*. 163: 507-513.

Goodson M., y Rowbury R.J. 1989. Habituation to normally lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at sub-lethal acid pH value. *Letters in Applied Microbiology*. 8: 77-79.

Gorden J. y Small P.L.C. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and Immunity*. 61: 364—367.

Guilfoyle D.E. y Hirshfield I.N. 1996. The survival benefit of short-chain organic acids and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. 22: 393-396.

Herrera T y Ulloa M. 1975. Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 17: 143-147.

Hersh B.M., Farooq F.T., Barstad B.N., Blankenshorn D.L. y Slonczewski J.L. 1996. A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 178: 3978-3981.

Hickey E.W., y Hirshfield I.N. 1990. Low pH induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 1038-1045.

Hill W.E. y Payne W.L. 1984. Genetic Methods for the detection of microbial pathogens. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hybridization: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 67: 801-807.

Hounhouigan D. J., Jansen J. M. M., Nout M.J.R., Nago M.C. y Rombouts F.M. 1991. Production and quality of maize-based fermented dough in Benin urban area. En: IFS (International Foundation for Science) Proceedings of a Regional Workshop on Traditional African Foods – Quality and Nutrition, 25-29 nov. 1991. Westby A., Reilly P.J.A. (Eds.) Echanis Press, Manila, pp 9-18.

Johnson W. M. y Lior H. 1987. Response of chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiology Letters*. 48: 235-238.

Koneman E. W., Allen S. D., Dowell V. R. Jr., Janda W. M., Sommers H. M. y Winn W. C. Jr. 1988. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Third Edition. J. B. Lippincott Company. Philadelphia. U.S.A.

Law D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 7: 152-173.

Le Minor L. 1984. Genus III. *Salmonella*. En Krieg NR, Holt JG (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1, pp 427-458. Baltimore, Williams & Wilkins.

Levine M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *The Journal of Infectious Diseases*. 155:377-389.

Levine M., Ferreccio C., Prado V., Cayazzo M., Abrego P., Martínez J., Maggi L., Baldini M., Martin W., Maneval D., Kay B., Guerss L., Lior H., Wasserman S., y Nataro J.P. 1993. Epidemiologic Studies of *Escherichia coli* diarrhoeal infections in a low socioeconomic level peri-urban community in Santiago, Chile. *American Journal of Epidemiology*. 138: 849-869.

Leyer G. J., y Johnson E. A. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 1842-1847.

Leyer G.J., Wang L., y Johnson E. A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 3752-3755.

Lin J., Lee I.S. Frey J., Slonczewski J.L. y Foster J.W. 1995. Comparative Analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 177: 4097-4104.

Lior H. 1994. Classification of *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Gyles C.L. Editor. CAB INTERNATIONAL. Ontario, Canada. pp 31-72.

Lorri W. y Svanberg U. 1992. The potential role of fermented cereal gruels in reduction of diarrhoea among young children. En: IFS (International Foundation for Science) Proceedings of a Regional

- Workshop on Traditional African Foods – Quality and Nutrition, 25-29 nov. 1991. Westby A., Reilly P.J.A. (Eds.) Echanis Press, Manila, pp 33-38.
- Maurelli A. T. y Lampel K.A. 1997. *Shigella* species. En Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Doyle M. P., Beuchat L. R. y Montville T. J. Editores. ASM Press. Washington, D.C. U.S.A.
- Mbugua S.K. y Njenga J. 1992. Antimicrobial properties of fermented *uji* as a weaning food. En: IFS (International Foundation for Science) Proceedings of a Regional Workshop on Traditional African Foods – Quality and Nutrition, 25-29 nov. 1991. Westby A., Reilly P.J.A. (Eds.) Echanis Press, Manila, pp 63-67.
- Mensah P.P.A., Tomkins A.M., Drasar B.S., y Harrison T.J. 1988. Effect of fermentation on Ghanaian Maize dough on the survival and proliferation of 4 strains of *Shigella flexneri*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene. 82: 635-636.
- Mensah P.P.A., Tomkins A.M., Drasar B.S., y Harrison T.J. 1990. Fermentation of cereals for reduction of bacterial contamination of weaning foods in Ghana. Lancet. 336: 140-143.
- Mozqueda-González, E. y M.L. Escamilla Hurtado. 1988. Mexican traditional solid state fermentation: Chemical and microbiological study of lactic acid fermentation in pozol (a Mexican corn-based beverage). Proceedings of the seminar solid state fermentations in bioconversion of agroindustrial raw materials. Editor Raimbault M. Orston-Montpellier, France.
- Muller H.G. 1970. Traditional cereal processing in Nigeria and Ghana. Ghana Journal of Agricultural Science. 3: 187-195.
- Nataro J.P., Kaper J.B., Robins-Browne R., Prado V., Vial P. y Levine M.M. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatric Infectious Diseases Journal. 6: 829-831.
- Nataro J.P., Yikang D., Giron J. A., Savarino S.J., Kothary M.A. y Hall R. 1993. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. Infection and Immunity. 61:1126-1131.
- Nataro J.P. y M.M. Levine. 1994. *Escherichia coli*. Diseases in Humans. En: *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Gyles C.L. Editor. CAB INTERNATIONAL. Ontario, Canada. pp.285-334.

- Nout M.J.R. 1992. Weaning foods for tropical climates. En: IFS (International Foundation for Science) Proceedings of a Regional Workshop on Traditional African Foods – Quality and Nutrition, 25-29 nov. 1991. Westby A., Reilly P.J.A. (Eds.) Echanis Press, Manila, pp. 23-31.
- Nuraida, L., M.C. Wachter y J.D. Owens. 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11:567-571.
- Ofek I., Mirelman D. y Sharon N. 1977. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*. 265: 623-625.
- Orskov, F y Orskov I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. En: *Methods in microbiology*. Vol.14. Edited by T.Bergan. Academic Press, London. pp. 43-112.
- Pedroso M.Z., Freymüller E., Trabulsi L.R. y Gomes T.A.T. 1993. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. *Infection and Immunity*. 61: 1152-1156.
- Rosas I., Salinas E., Yela A., Calva E., Eslava C. y Cravioto A. 1997. *Escherichia coli* in settled-dust and air samples collected in residential environments in Mexico City. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4093-4095.
- Rowbury R.J., Goodson M. y Wallace D.A. 1992. The PhoE porin and transmission of the chemical stimulus for induction of acid resistance (acid habituation) in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*. 72: 233-243.
- Salinas Ch. C. 1958. Etnobiología e introducción a la bacteriología del pozol. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 63 pp.
- Salinas Ch. C. y Herrera T. 1974. Aislamiento de *Aerobacter aerogenes* del pozol del Estado de Campeche. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 16: 95-98.
- Salyers A.A. y Whitt D.D. 1994. *Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach*. ASM Press. Washington, D.C. U.S.A.
- Savarino S. J., McVeigh A., Watson J., Cravioto A., Molina J., Echeverria P., Bhan M.K., Levine M.M. y Fasano A. 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases*. 173: 1019-1022.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Scaletsky I.C.A., Silva M.L.M. y Trabulsi L.R. 1984. Distinctive Patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection and Immunity*. 45: 534-536.
- Scott D. A. y Kaper J. B. 1994. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infection and Immunity*. 62: 244-251.
- Sears C.L. y Kaper J.B. 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Reviews*. 60: 167-215.
- Silva Villareal, E.C. 1984. Estudios preliminares sobre la fermentación del pozol de Tapachula, Chiapas. Tesis de Licenciatura. Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Autónoma de Chiapas.
- Simango C. y Rukure G. 1992. Survival of enteric pathogens in traditional fermented foods. *Journal of Applied Bacteriology*. 73: 37-40.
- Stim-Herndon K., Flores T. M., y Bennett G.N. 1996. Molecular characterization of *adiY*, a regulatory gene which affects expression of biodegradative acid-induced arginine decarboxylase gene (*adiA*) of *Escherichia coli*. *Microbiology*. 142: 1311-1320.
- Taboada J., Salinas C., Ulloa M. y Herrera T. 1975. Fijación de nitrógeno en cultivos mono-específicos y mixtos de *Aerobacter aerogenes* y *Agrobacterium azotophilum* usando distintas fuentes de carbono. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 17: 157-159.
- Ulloa M. y Herrera T. 1972. Descripción de dos especies nuevas de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 14: 15-24.
- Ulloa M. 1974. Mycofloral succession in pozol from Tabasco, Mexico. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*. 8: 17-48.
- Ulloa M., Herrera T. y Taboada J. 1983. Mexican pozol. En *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. pp.226-237. Editor K.H. Steinkraus, Vol 9. Microbiology Series. Marcel Dekker, Inc. New York y Basilea.
- Ulloa M., Herrera T., Lappe P. 1987. Fermentaciones Tradicionales Indígenas de México. Número 16, Serie de Investigaciones Sociales. Instituto Nacional Indigenista. México.

Varela G., Aguirre A. y Carrillo J. 1946. *Escherichia coli* "Gomez" nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 3: 623-627.

Vial P.A., Robins-Browne R., Lior H., Prado V., Kaper J.B., Nataro J.P. Maneval D., Elsayed A. y Levine M.M. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. The Journal of Infectious Diseases. 158: 70-79.

Vinegra G. 4 junio 1982. Ciencia. En periódico uno más uno.

Wacher R. M.C., y Santillana H.R. 1990. Cuadernos de Posgrado No. 32. Alimentos y Biotecnología. Carmen Durán de Basúa Ed. Facultad de Química. Div. de Estudios de Posgrado. UNAM. 101-110.

Wacher M. C., Cañas A., Cook P.E., Bárzana E. y Owens J.D. 1993. Sources of microorganisms in pozol, a traditional mexican fermented maize dough. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 9: 226-274.

Wacher Rodarte, M.C. 1995. Estudios sobre la Microbiología del Pozol. Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Químicas (Alimentos). UNAM.

Waterman S. R. y Small P.L.C. 1996. Identification of  $\sigma^d$ -dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance of *Shigella flexneri*. Molecular Microbiology. 21: 925-940.

Yu J. y Kaper J.B. 1992. Cloning and characterization of the *eae* gene for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Molecular Microbiology. 6: 411-417.

Zebadua G. R. 1997 Marzo 12. Pujante la industria del pozol. Periódico "Tabasco Hoy". pp. 12A