

10529
12
1



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"DETECCION DE TOXINA TERMOLABIL (LT) DE
ENTEROBACTERIAS ESTRESADAS RECUPERADAS DE
ALIMENTOS PROCESADOS"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
LAURA BEATRIZ } GOMEZ MONROY

ASESORA: M. en C. MA. GUADALUPE AMAYA LEON
COASESORA: M. en C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

2

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
 SUPERIORES CUAUTITLAN



El Presidente de
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Detección de Toxina Termolábil (LT) de Enterobacterias enterae
recuperadas de Alimentos procesados"

que presenta la pasante: Laura Beatriz Gómez Monroy
 con número de cuenta: 9256402 - 4 para obtener el título de:
Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 25 de Junio de 2002

PRESIDENTE Q. P. E. Ma. Virginia Clivia Arullaga
 VOCAL I. A. Natividad Venozza Herrera
 SECRETARIO M. en C. María Guadalupe Araya Loeb
 PRIMER SUPLENTE I. B. Q. Leticia Figueroa Villarruel
 SEGUNDO SUPLENTE I. A. María de los Angeles Corona Villana

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

- ✦ *A mis padres Sra. Ma. de Jesús Monroy Espinoza y Sr. Agustín Cutberto Gómez Alarcón por brindarme su gran ayuda en la búsqueda de información.*
- ✦ *A mi Esposo Eusebio García Vargas por su valiosísima colaboración en la elaboración de imágenes y por su apoyo financiero para la realización de este trabajo.*
- ✦ *A mi hermano Cutberto Gómez Monroy por su oportuna cooperación en la impresión.*
- ✦ *A la M. En C. Ma. Guadalupe Amaya León por su importante asesoría.*
- ✦ *A la M. En C. Clara Inés Álvarez Manrique por su orientación en el laboratorio.*
- ✦ *A las profesoras que integraron el jurado por sus acertadas correcciones:*

Q. F. B. María Virginia Oliva Arellano

I. A. Natividad Venegas Herrera

I. B. Q. Leticia Figueroa Villarreal

I. A. María de los Ángeles Cornejo Villegas

- ✦ *A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una oportunidad más de desarrollo personal.*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Resumen	1
Objetivos	2
Justificación	3
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Clasificación de las Enterobacterias	5
1.3. Descripción de las Enterobacterias como grupo	6
1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	7
1.3.2. <i>Salmonella</i>	8
1.3.3. <i>Arizona</i>	10
1.3.4. <i>Citrobacter</i>	10
1.3.5. <i>Shigella</i>	10
1.3.6. <i>Edwardsiella</i>	11
1.3.7. <i>Klebsiella</i>	11
1.3.8. <i>Enterobacter</i>	11
1.3.9. <i>Serratia</i>	11
1.3.10. <i>Proteus</i>	12
1.3.11. <i>Providencia</i>	12
1.3.12. <i>Morganella</i>	12
1.3.13. <i>Yersinia</i>	12
1.3.14. <i>Erwinia</i>	13
1.4. Factores de virulencia de las enterobacterias productoras de LT	15
1.5. Producción de Toxinas	15
1.5.1. <i>Escherichia coli</i>	17
1.5.2. <i>Salmonella</i>	19
1.5.3. <i>Shigella</i>	20
1.5.4. <i>Yersinia</i>	20
1.6. Mecanismo de acción de la Toxina LT	21
1.7. Importancia de la Toxina LT en Alimentos	28
1.8. Pruebas de detección para la Toxina LT	29
1.8.1. Homogéneos	32
1.8.2. Heterogéneos	32
1.8.3. Captura de anticuerpo	33
1.8.4. Captura de antígeno	33
1.8.5. Competitivos	34
1.8.6. No competitivos	36
1.8.7. En fase sólida	37
1.8.8. En fase fluida	39
1.8.9. Ensayos de precipitación	40
1.8.10. Ensayos de difusión en gel	41
1.8.11. Difusión doble	41
1.8.12. Electroforesis	42
1.8.13. Inmunolectroforesis	42
1.9. Microorganismos estresados	43

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Capítulo 2. ETAPA EXPERIMENTAL	43
2.1. Cuadro metodológico	45
2.2. Diagrama de Bloques. Etapa experimental	46
2.1.1. Reactivos	47
2.1.2. Medios de cultivo	47
2.1.3. Desarrollo experimental	47
2.1.4. Toma de muestra	48
2.1.5. Procesamiento de la muestra	49
2.1.6. Cultivo de la muestra	49
2.1.7. Obtención de colonias	49
2.1.8. Obtención de Toxina	50
2.1.9. Sonicación	50
2.3. Diagrama de Bloques. Técnica de ELISA	51
2.2.1. Técnica de ELISA	52
Capítulo 3. RESULTADOS	56
Capítulo 4. DISCUSIÓN	61
Capítulo 5. CONCLUSIÓN	64
Apéndice	
Bibliografía	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS

1.2.1.	<i>Escherichia coli</i>	8
1.2.2.	<i>Salmonella spp</i>	9
1.4.1.	Adhesinas	15
1.6.1.	Tracto gastrointestinal	22
1.6.2.	Estructura de la CT	24
1.6.3.	Toxina colérica y su modo de acción	25
1.6.4	Mecanismo clásico de acción de ETEC	26
1.6.5.	Esquemas patogénicos de <i>E. coli</i> diarreagénica	27
1.8.1	Inmunoglobulina	30
1.8.2	Formato de captura de anticuerpo	33
1.8.3.	Formato de captura de antígeno	34
1.8.4. a	Medición competitiva del antígeno	35
1.8.4. b	Medición competitiva del antígeno	35
1.8.5.	Ensayo directo no competitivo	36
1.8.6.	Ensayo indirecto no competitivo	37
1.8.7.	Placa de polipropileno de 96 pozos	38
1.8.8.	Ensayo en fase sólida	39
1.8.9.	Inmunoensayo de precipitación	40
1.8.10	Principio de la inmunodifusión radial simple	41
1.8.11	Principio de la doble difusión en gel	41
1.8.12.	Principio de la inmunoelectroforesis (IEP)	42
2.2.1.	Placa de microtitulación	52
2.2.2.	Representación de placa de microtitulación	52
2.2.3.	Pozo sensibilizado con antígeno (Ag)	53
2.2.4.	Pozo saturado con antígeno (Ag) y leche descremada (B)	54

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

INDICE DE TABLAS

1.2.1. Clasificación de las Enterobacteriaceae	5
1.2.2. Clasificación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa	6
1.3.1. Características generales de las Enterobacterias	14
2.3.1. Clasificación asignada a los diferentes tipos de guisados	48
3.1.1. Cepas positivas a LT	56
3.1.2. Cepas positivas a LT expresadas en porcentajes	57
3.1.3. Resultados de identificación bioquímica de las cepas positivas a LT	59
3.1.4. Tipos de cepas obtenidas de la identificación bioquímica	60

INDICE DE GRAFICAS

3.1.1. Cepas resultantes de la técnica de ELISA	58
---	----

INDICE DE DIAGRAMAS

1.8.1. Obtención de anticuerpos policlonales	31
1.8.2. Obtención de anticuerpos monoclonales	31
2.1. Cuadro metodológico	45
2.2. Diagrama de bloques etapa experimental	46
2.3. Diagrama de bloques técnica de ELISA	51

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Las enterobacterias se utilizan preferentemente para señalar la calidad sanitaria de los alimentos procesados. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también se encuentran en otros ambientes, como el suelo, aire, agua, alimentos, etc.

Muchos tratamientos y combinaciones de éstos usados en el procesamiento de los alimentos pueden causar daño subletal a las bacterias. Las temperaturas de cocción, el empleo de conservadores, la reducción de la actividad de agua, etc., son factores que influyen en el desarrollo de los microorganismos, creando condiciones estresantes en el medio, inhibiendo así su crecimiento.

La habilidad para enumerar bacterias en un producto alimenticio es muy importante, pero también es importante el aislamiento de bacterias patógenas. En un alimento procesado se pueden encontrar bacterias que han sido dañadas al ser sometidas a las condiciones estresantes del procesamiento, pero pueden ser recuperadas con la ayuda de medios enriquecidos y selectivos para su aislamiento.

Los microorganismos dañados subletalmente contienen características de crecimiento alterado, por lo que la recuperación del microorganismo depende de la naturaleza del tratamiento subletal, la especie microbiana, el medio selectivo usado, la composición química y condiciones de incubación del medio.

Algunas enterobacterias son microorganismos patógenos y se han asociado con enfermedades diarreicas severas en todo el mundo.

En este trabajo se realizó la recuperación de microorganismos alterados, específicamente enterobacterias, de alimentos procesados, como guisados, obtenidos de una estancia infantil de gobierno. Dichos alimentos fueron elaborados en la cocina de la misma estancia infantil y se tomaron muestras de cada uno, se sembraron en caldo BHI para reactivar a los microorganismos con la finalidad de obtener la toxina producida por los mismos.

Se realizaron pruebas inmunológicas como la técnica de ELISA para comprobar la presencia de toxina LT (Termolábil) liberada de las enterobacterias aisladas y las cepas que resultaron positivas a dicha técnica se identificaron bioquímicamente.

Las pruebas de identificación bioquímica dieron como resultado que las cepas positivas a ELISA fueron: *Enterobacter*, *Proteus* y *Serratia*, en guisados elaborados a base de carne y de verdura.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO GENERAL

Detectar si las Enterobacterias recuperadas de alimentos procesados son capaces de producir toxina LT (termolábil) para comprobar que pueden llegar a reparar el daño sufrido durante el procesamiento.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar las enterobacterias a partir de alimentos procesados térmicamente para obtener cepas puras.
2. Realizar la prueba de ELISA para comprobar la presencia de toxina LT en las enterobacterias aisladas.
3. Identificar bioquímicamente a las bacterias cuya prueba de ELISA resulten positivas a la toxina para determinar el género al que pertenecen.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

Algunos de los microorganismos pertenecientes a la familia de las Enterobacteriaceae son patógenas en su mayoría debido a la producción de toxina LT (termolábil), que produce diarrea en humanos parecida a la producida por la toxina de *Vibrio cholerae*.

Los métodos inmunológicos para su detección son variados y algunos son muy costosos; la técnica inmunoenzimática ELISA resulta ser una opción, no solo por su bajo costo, sino por su amplia versatilidad, su fácil manejo, el uso de pocos reactivos y no requiere personal especializado, además de una alta sensibilidad y relativa rapidez de respuesta.

Las enterobacterias presentan cierta resistencia a las condiciones hostiles de los tratamientos térmicos al que son sometidos los alimentos, por lo que permanecen en estado latente en los mismos y no causan daño a la salud, si son consumidos. Con los tratamientos ejercidos a los alimentos, las bacterias pueden sufrir lesiones que inhiben su crecimiento, pero si se presentan condiciones óptimas, pueden restaurar el daño ocasionado a nivel celular y comenzar a desarrollarse nuevamente hasta producir toxina, en el caso de tratarse de una bacteria toxigénica.

Debido al riesgo de toxicidad causado por la presencia de microorganismos lesionados en los alimentos, se desarrolló este trabajo, el cual está enfocado a la recuperación de las enterobacterias estresadas de alimentos procesados y determinar si son productores de toxina LT por medio de la técnica de ELISA, además de su identificación bioquímica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3A

INTRODUCCIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

I.1. ANTECEDENTES

Los microorganismos son organismos vivos microscópicos, los cuales han sido identificados y clasificados en familias, géneros y especies. Algunos son dañinos al hombre (patógenos) y otros no (no patógenos).

Mucho se ha aprendido acerca de los requerimientos nutricios de las bacterias y otros microorganismos y, con pocas excepciones, en la actualidad se pueden cultivar en medios artificiales, fuera de su hábitat normal, la mayoría de los gérmenes patógenos.¹

Como lo mencionan Nataro y Kaper, en su artículo al aislar e identificar a la *Escherichia coli* diarreagénica "...Las herramientas de cultivo para muchas categorías de *E. coli* diarreagénica pueden ser utilizadas en casos de diarreas bacterianas, especialmente en viajeros y niños, así como en situaciones de brotes..."¹⁰

María del Rosario Pascual (1992) indica las principales características de las Enterobacterias: "...Aptitud para desarrollarse entre 43.5 y 45.5 °C; capacidad para crecer en presencia de sales biliares y facultad para producir indol en agua de peptona..."¹⁴

Una definición práctica de un medio de cultivo conveniente es: aquél que contenga los elementos nutricios esenciales en concentración adecuada, la necesaria cantidad de sal y el adecuado volumen de agua, se encuentre exento de sustancias inhibitoras del organismo que se va a cultivar, tenga la consistencia deseada, la reacción (pH) conveniente para el metabolismo del cultivo, y sea estéril. También habrá que hacer frente a otros requisitos que surgen de las relaciones de temperatura y oxígeno del cultivo y de la incapacidad de síntesis de nutrientes de algunos gérmenes patógenos.¹

En la preparación de los medios de cultivo es fundamental el empleo de material de vidrio y equipos limpios, exentos de sustancias detergentes. Es importante el pesado exacto del cultivo y agregar el volumen adecuado de agua, preferentemente en dos partes. Se agrega primero aproximadamente la mitad del volumen necesario de agua para disolver los ingredientes y el resto se añade después. Si el medio contiene agar es necesario el calor para disolverlo, no se recomienda calentur sobre la llama, aunque a menudo se procede así. Es necesario disolver los ingredientes antes de la esterilización para obtener un producto constante y homogéneo.¹

Los medios pueden ser líquidos (caldos) o sólidos (con agar). A veces se requiere de una consistencia semisólida, en cuyo caso se emplea una baja concentración de agar. También los medios de cultivo pueden ser sintéticos en los que se conocen todos sus ingredientes, o no sintéticos, en los que se desconoce la exacta composición química.¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2. CLASIFICACION DE LAS ENTEROBACTERIAS

Tabla 1.2.1. Clasificación de las Enterobacteriaceae,

Edwards y Ewing/CDC

<p>Familia: <i>Enterobacteriaceae</i> Tribu: <i>Escherichieae</i> Género I: <i>Escherichia</i> Especies: <i>E. coli</i> Género II: <i>Shigella</i> Especies: <i>S. dysenteriae</i> <i>S. flexneri</i> <i>S. boydii</i> <i>S. sonnei</i> Tribu II: <i>Edwardsiellae</i> Género : <i>Edwardsiella</i> Especie: <i>E. tarda</i> Tribu III: <i>Salmonelleae</i> Género I: <i>Salmonella</i> Especies: <i>S. cholerae-suis</i> <i>S. typhi</i> <i>S. enteritidis</i> Género II: <i>Arizona</i> Especies: <i>A. hinshawii</i> Género III: <i>Citrobacter</i> Especies: <i>C. freundii</i> <i>C. diversus</i> <i>C. amalonaticus</i> Tribu IV: <i>Klebsielleae</i> Género I: <i>Klebsiella</i> Especies: <i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i> <i>K. ozonae</i> <i>K. rhinoscleromatis</i> Género II: <i>Enterobacter</i> Especies: <i>E. cloacae</i> <i>E. aerogenes</i> <i>E. agglomerans</i> <i>E. sakazakii</i> <i>E. gergoviae</i> Género III: <i>Hafnia</i> Especie: <i>H. Alvei</i> Género IV: <i>Serratia</i> Especies: <i>S. marcescens</i> <i>S. liquefaciens</i> <i>S. rubida</i> <i>S. plymuthica</i> <i>S. odorifera</i> <i>S. fonticola</i></p>	<p>Familia: <i>Enterobacteriaceae</i> Tribu V: <i>Proteeae</i> Género I: <i>Proteus</i> Especies: <i>P. vulgaris</i> <i>P. mirabilis</i> Género II: <i>Providencia</i> Especies: <i>P. stuartii</i> <i>P. alcalifaciens</i> <i>P. rettgeri</i> Género III: <i>Morganella</i> Especie: <i>M. morganii</i> Tribu VI: <i>Yersinieae</i> Género I: <i>Yersinia</i> Especies: <i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i> <i>Y. pestis</i> <i>Y. intermedia</i> <i>Y. frederiksenii</i> <i>Y. ruckeri</i> Tribu VII: <i>Erwinieae</i> (patógena de los vegetales) Género I: <i>Erwinia</i> Género II: <i>Pectobacterium</i></p>
--	--

FUENTE: (1)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La anterior es una clasificación de las bacterias pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae*, la cual utiliza un enfoque polifásico de la taxonomía. Se agrupan los miembros de la familia en géneros, especies y biotipos sobre la base de sus semejanzas morfológicas, bioquímicas y genéticas.1

Tabla 1.2.2. Clasificación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa

FERMENTADORAS DE LACTOSA	NO FERMENTADORAS DE LACTOSA
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Citrobacter</i> • <i>Enterobacter</i> • <i>Escherichia</i> • <i>Klebsiella</i> • <i>Serratia</i> • <i>Arizona</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Edwardsiella</i> • <i>Erwinia</i> • <i>Hafnia</i> • <i>Morganella</i> • <i>Proteus</i> • <i>Providencia</i> • <i>Salmonella</i> • <i>Shigella</i> • <i>Yersinia</i>

FUENTE (1)

1.3. DESCRIPCION DE LAS ENTEROBACTERIAS COMO GRUPO

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son gérmenes de forma bacilar, gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados, móviles e inmóviles, fermentan carbohidratos y algunas veces producen gas, reducen los nitratos a nitritos, son citocromo oxidasa negativos, y crecen en medios que contienen sales biliares, algunos fermentan la lactosa.1

Las especies móviles poseen flagelos peritricos, que los diferencian de otros que tiene flagelos polares, algunos poseen fimbrias o pilis, pero éstos no son órganos de locomoción. Muchos son parásitos, otros son saprófitos, producen infecciones entéricas y septicémicas. Crecen en agar tripticosa de soya, agar nutritivo o agar con infusión de carne, las colonias pueden variar de tamaño, según el género, pero generalmente son blanco grisáceas, traslúcidas y ligeramente convexas. Algunas colonias son grandes y mucoides. Se encuentran en los intestinos del hombre y otros animales, en el suelo y en los vegetales.1

En las infecciones intestinales, las enterobacterias pueden ser aisladas del torrente sanguíneo, contenido intestinal (bilis o heces), en ocasiones de la orina y en ciertos casos de las biopsias de médula ósea. Cuando se encuentran en el contenido intestinal, las enterobacterias son parte de una flora bacteriana mezclada, y los aislamientos se realizan a partir de medios de enriquecimiento y selectivos, de los cuales se pueden obtener cultivos puros mediante la siembra en medio no inhibitorios.1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se ha observado, la familia de las *Enterobacteriaceae* está compuesta por un número grande y diverso de microorganismos, a continuación se describe cada uno de los géneros y/o especies de bacterias pertenecientes a esta familia:

1.3.1. *Escherichia coli*:

Habita en el intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, es eliminada por heces de donde se puede producir la contaminación de los alimentos, usando como vehículo el agua y el aire.

Es un bacilo gramnegativo, fermenta rápidamente la lactosa, con producción de ácido y gas, aunque hay algunas cepas no fermentadoras de lactosa o lo hacen lentamente. Se presentan tanto formas móviles como inmóviles.¹ Es catalasa positivo, oxidasa negativo, fermentador, no esporógeno, es mesófilo típico que crece a temperaturas desde 7-10 °C, con una temperatura óptima en torno a 37 °C, aunque ha habido referencias de algunas cepas de ETEC que crecieron a temperaturas tan bajas como los 4 °C; no presenta termoresistencia elevada, con un valor D a 60 °C del orden de 0,1 de minuto y es capaz de resistir el almacenamiento en refrigeración o en congelación durante tiempos prolongados. Un pH casi neutro es óptimo para su crecimiento aunque puede crecer a pH inferior a 4,4, su a_w mínima de crecimiento es de 0.95.⁶ Para su aislamiento se recomiendan medios con menos inhibidores como el agar de McConkey y agar de Eosina y azul de metileno (EAM).⁶

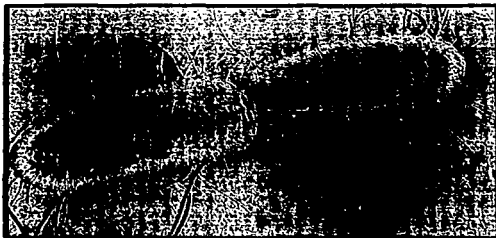
E. coli es un habitante casi universal del intestino de las personas y de los animales de sangre caliente donde es el anaerobio facultativo predominante (ver Fig. 1.2.1.) aunque sólo es un componente secundario de su microflora total. Su presencia corriente en las heces, su facilidad de cultivo, su carácter generalmente patógeno y las características de su supervivencia en el agua determinaron que *E. coli* fuese adoptado como indicador de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos, por ejemplo de *S. typhi*, en el agua.⁶ Las cepas productoras de diarrea fueron clasificadas en varios tipos basados en sus propiedades de virulencia:

1. *E. coli* Enteropatógena (EPEC)
2. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC)
3. *E. coli* Enteroagregativa (EAaggEC)
4. *E. coli* Uropatógena (UPEC)
5. *E. coli* Neonatal meningitis (NMEC)
6. *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC)
7. *E. coli* Enteroinvasor (EIEC)
8. *E. coli* Difusamente adherente (DAEC)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sin embargo, desde 1982 el serotipo O157:H7 de *E. coli* ha sido identificado como la causa de algunos brotes de colitis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico.⁶

Fig. 1.2.1.



Escherichia coli

FUENTE: (50)

1.3.2. *Salmonella*:

Son bacilos (típicamente de $0.5 \mu\text{m}$ por $1-3\mu\text{m}$)₆ gramnegativos, no esporulados, fermentan la glucosa casi siempre con formación de gas, pero no la lactosa ni la sacarosa, generalmente son móviles, aunque se encuentran algunas formas inmóviles.¹ Son anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos y tienen flagelos peritricos.⁶ Son capaces de crecer en un amplio margen de temperaturas, pH y actividad de agua, crecen bien a temperatura ambiente, pero la óptima es de unos 37°C ; pH entre 4.1 -9.0, pero se desarrollan mejor en alimentos poco ácidos; la actividad de agua mínima es aproximadamente 0.93 a 0.95.⁴ Las salmonelas son termosensibles y son destruidas fácilmente con la pasteurización (ver Fig. 1.2.2.) *S. seftenberg* 775W es el serotipo más termorresistente a valores de a_w elevados y en la leche tiene un D_{72} de 0.09 minutos (D_{72} de *S. typhimurium* de 0.003 minutos). Se ha comprobado que la termorresistencia aumenta por el choque térmico subletal a 48°C durante 30 minutos y también puede aumentar notablemente en medios de a_w baja, *S. typhimurium*, por ejemplo tiene un D_{72} de 11.3 - 17.5 horas en la salsa de chocolate.

Las células llegan a sobrevivir perfectamente en los alimentos desecados, aumentando el índice de supervivencia a medida que se reduce la a_w . El pH mínimo de crecimiento

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

varía con el acidulante desde 5.4 si se trata de ácido acético hasta 4.05 si el acidulante es el ácido clorhídrico o el ácido cítrico. El crecimiento óptimo tiene lugar a un pH cercano a 7.

Las salmonelas son huéspedes habituales del tracto intestinal de animales, como gallinas y otras aves de corral, además de cerdos, etc. Son transmitidas por una gran variedad de animales salvajes, roedores, animales de compañía, aves, reptiles e insectos, habitualmente sin presentar ninguna enfermedad manifiesta. Pueden ser diseminadas por medio de las heces al suelo, al agua, a los alimentos y piensos y desde estos medios a otros animales (incluidas las personas).⁶

La salmonelosis se define como una infección zoonótica puesto que la fuente principal de la enfermedad humana la constituyen los animales infectados. La transmisión tiene lugar por vía fecal-oral por medio de la cual el contenido intestinal de un animal infectado es ingerido con un alimento o con el agua.⁶

La carne, la leche, las aves de corral y los huevos son los vehículos principales, pueden estar insuficientemente cocidos, permitiendo que las salmonelas sobrevivan, o pueden contaminar de modo cruzado otros alimentos que son consumidos sin cocción posterior. *Salmonella* es incapaz de crecer en la leche desecada pero es capaz de sobrevivir y reanudar el crecimiento cuando se reconstituye la leche. El pescado y los productos derivados del mismo, sólo están relacionados con la salmonelosis accidentalmente, aunque la harina de pescado que se utiliza en la fabricación de piensos para los animales con frecuencia contiene *Salmonella* como consecuencia de su contaminación por roedores y aves. El marisco que se alimenta por filtración y que es capturado en aguas contaminadas y los camarones precocidos congelados, han sido identificados como los productos de mayor riesgo. Las hortalizas han sido relacionadas con brotes accidentales de fiebre tifoidea y de salmonelosis.

La diseminación de una persona a otras por medio de la vía fecal-oral también es posible pero habitualmente se halla limitada a los brotes institucionales tal como sucede en los hospitales, en las residencias para personas ancianas y en las guarderías infantiles.⁶

Fig. 1.2.2.



Salmonella spp.

FUENTE (50)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3.3. *Arizona:*

Son bastoncillos gramnegativos, cortos y móviles, que muestran una estrecha relación con las *Salmonellas*. Puede fermentar la lactosa con formación de ácido y gas en 24 horas, pero la mayoría de las cepas fermentan los hidratos de carbono después de 7 a 10 días, producen sulfuro de hidrógeno en agar HITA, fermentan la lactosa aunque muy lentamente.¹

1.3.4. *Citrobacter:*

Son bastoncillos móviles, gramnegativos que fermentan la lactosa, no son verdaderos gérmenes patógenos y se les considera oportunistas. Algunas cepas son productoras de gas al fermentar la glucosa y otras no fermentan la glucosa, otras fermentan la lactosa aunque lo hacen de forma lenta.¹ Son catalasa (+); oxidasa (-), son productoras de gas, citrato (+) y KCN (+).²

1.3.5. *Shigella:*

Todos los miembros de este género son inmóviles, no producen sulfuro de hidrógeno y, con pocas excepciones, son anaerobios, son asporógenos, gramnegativos, catalasa positivos (con excepción del bacilo de Shiga, *Sh. dysenteriae* serotipo 1), oxidasa negativos y anaerobios facultativos. Producen ácido pero habitualmente no producen gas de la glucosa y, con excepción de algunas cepas de *Sh. sonnei*, son incapaces de fermentar la lactosa, característica que comparten con la mayoría de las salmonelas. Son consideradas organismos un tanto lábiles que no sobreviven adecuadamente fuera de su hábitat natural que es el intestino de las personas y de los demás primates.³ Las colonias son generalmente más pequeñas que las de salmonelas, pero a veces pueden hallarse variantes mucoides.¹ Son organismos mesófilos típicos cuya temperatura de crecimiento varía entre 10-45 °C, su temperatura óptima es de 37 °C, su termosensibilidad es equiparable a la de los demás representantes de la familia. Crecen mejor dentro de la escala de pH de 6-8 y no sobreviven adecuadamente a valores de pH inferiores a 4.5. Resiste concentraciones salinas del 5 ó 6 % y es relativamente termosensible.⁴

Está integrada por cuatro especies: *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii* y *Sh. sonnei*, todas las cuales son consideradas patógenas para el hombre si bien se diferencian en cuanto a la gravedad de la enfermedad que causan cada una de ellas. *Sh. dysenteriae* causa disentería bacilar grave; *Sh. sonnei* es más común y causa la enfermedad más benigna; *Sh. boydii* y *Sh. flexneri* son de gravedad intermedia.

Se ha encontrado que *Shigella* tiene un parentesco con *Escherichia*, los estudios sobre el parentesco del DNA han demostrado que pertenecen al mismo género, sin embargo a las dos se les ha mantenido separadas porque a diferencia de *Escherichia*, la mayoría de las cepas de *Shigella* son patógenas. Las *Shigellas* se diseminan principalmente de una

persona a otra por la vía fecal-oral aunque se han registrado brotes transmitidos por alimentos. En los casos transmitidos por alimentos, la procedencia del organismo normalmente es de una persona portadora que interviene en la preparación de alimentos, también se puede transmitir a partir de las heces por medio de las moscas.

1.3.6. *Edwardsiella*:

Los miembros de este género son móviles y su esquema bioquímico se adapta al de la familia *Enterobacteriaceae*.¹

Estos microorganismos fueron aislados de diferentes fuentes humanas, incluyendo casos de diarrea, de las heces normales, sangre, heridas, abscesos viscerales y la orina, también de animales de sangre fría y caliente.⁴ Son bacilos gramnegativas, aerobios y anaerobios facultativos, catalasa (+), oxidasa (-), atacan a la glucosa fermentativamente; producen gas, forman H₂S en el TSI.²

1.3.7. *Klebsiella*:

Son bastoncillos gramnegativos cortos, inmóviles, encapsulados, algunas cepas fermentan la glucosa con producción de gas, generalmente fermentan la lactosa.¹ son aerobios y anaerobios facultativos catalasa (+), oxidasa (-) son KCN y VP (+), aun que hay excepciones, no descarboxila la ornitina generalmente hidroliza la urea.²

1.3.8. *Enterobacter*:

Estas especies se encuentran en el suelo, en el agua, los productos lácteos y en el intestino de los animales, inclusive en el hombre. Son consideradas oportunistas.

1.3.9. *Serratia*:

Son bastoncillos gramnegativos móviles, únicamente un pequeño porcentaje de las cepas son cromogénicas. Se encuentran sobre todo en el agua y en el suelo. Todas las *Serratias* son muy resistentes a las cefalosporinas y polimixinas.¹

Algunas cepas fermentan la glucosa con formación de gas, así como también algunas fermentan la lactosa. Muchas especies producen un pigmento rosáceo o magenta y dan lugar a coloraciones rojizas en la superficie de los alimentos.⁴

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3.10. *Proteus*:

Son bastoncillos móviles gramnegativos, que muestran cierto pleomorfismo, son activamente móviles a 25 °C, pero a menudo, débilmente móviles a 35 °C. Son lactosa negativa.₁

1.3.11. *Providencia*:

Son bastoncillos gramnegativos móviles, lactosa negativos y crecen bien en la mayoría de los medios de aislamiento entérico, son sulfuro de hidrógeno negativos y pueden o no producir gas en la glucosa.

Cuando fermentan la sacarosa, la reacción es por lo general retardada y, por eso, la fermentación de este hidrato de carbono no se apreciará en 48 horas en cultivo inclinado de HTA. Se pensó que estas especies causan diarreas, pero eso no se encuentra bien establecido.₁

1.3.12. *Morganella*:

Constituido por una única especie, *Morganella morganii*, es capaz de descarboxilar la ornitina, no utiliza el citrato, es sulfuro de hidrógeno negativa, no licúa la gelatina, es D-manosa positiva. De las cepas típicas, en cuanto a sus características bioquímicas, se han identificado otros dos biogrupos. Uno de ellos es el ornitina descarboxilasa-positivo y el otro, el lisina descarboxilasa-negativo.₁

1.3.13. *Yersinia*:

Yersinia enterocolitica es una de las tres especies del género *Yersinia* identificadas como patógenas para el hombre; *Yersinia enterocolitica* causa principalmente una gastroenteritis, mientras que *Y. pseudotuberculosis* está relacionada principalmente con la adenitis mesentérica. *Y. pestis* es responsable de la peste bubónica.₆

Es un cocobacilo asporógeno, corto (0.5–1.0 por 1–2 µm), gramnegativo, anaerobio facultativo, que a veces exhibe coloración bipolar, catalasa positivo, y oxidasa negativo.₆ Se puede encontrar en el suelo. Su temperatura óptima de crecimiento es de entre 25 y 30 °C,₁ aunque es capaz de crecer en una amplia gama de temperaturas, desde -1 °C hasta +40 °C,₆ algunas son móviles por medio de flagelos peritricos a 25 °C, generalmente fermentan la glucosa, pero no la lactosa.₁ Poseen varias características fenotípicas dependientes de la temperatura. Al igual que otros psicrótrofos, es capaz de crecer a temperaturas bajas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

aunque lo hace lentamente y se ha comprobado que a 3 °C tarda 4 días para aumentar en 2 ciclos logarítmicos en los medios de caldo.⁴

Es termosensible pero con considerable variación de unas especies a otras; los valores de D determinados en leche entera a 62.8 °C han variado desde 0.7 hasta 57.6 segundos.⁶

El crecimiento óptimo tiene lugar a un pH de 7-8 con un mínimo (en caldo a 25 °C) que varía entre 5.1 y 4.1 dependiendo del acidulante utilizado. A medida que disminuye la temperatura, en igual medida aumenta el pH mínimo de crecimiento. Su crecimiento es posible en los medios de caldo que contienen un 5% de sal, pero no en los que contiene 7%, a 3 °C o a 25 °C.⁶

Y. enterocolitica se puede aislar del suelo, el agua dulce y el tracto intestinal de muchos animales, también de leche y los productos lácteos, las carnes, especialmente la de cerdo, las canales de las aves de corral, el pescado y el marisco, las frutas y las hortalizas. Se admite que los cerdos son portadores crónicos de los serotipos de *Y. enterocolitica* más comúnmente implicados en las infecciones humanas (03, 05, 27, 08 y 09). El organismo puede ser aislado con mucha frecuencia en la lengua, en las tonsilas, en el intestino, y en el ciego de animales aparentemente sanos.⁶

Con frecuencia *Y. enterocolitica* es resistente a las penicilinas y las cefalosporinas. Los aminoglucósidos, cloranfenicol y tetraciclina son las drogas más activas contra este microorganismo.⁴

1.3.14. *Erwinia*:

Estos microorganismos eran considerados como patógenos de los vegetales, son miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, es por eso que se incluyen aquí, por el momento no hay mucho que agregar, puesto que todavía existe cierta confusión con respecto a la taxonomía de estas bacterias.¹

A continuación, a manera de resumen, en la tabla 1.3.1 se muestran las características generales de las Enterobacterias, donde se puede apreciar algunas similitudes en cuanto a sus aspectos bioquímicos para su identificación:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1.3.1. Características generales de las Enterobacterias

BACTERIA	CATALASA	OXIDASA	GLUCOSA	SIEMPRE	GAS
<i>Arizona</i>	+	-	+	+	+
<i>Citrobacter</i>	+	-	+	+	+
<i>Edwardsiella</i>	+	-	+	+	+
<i>Enterobacter</i>	+	-	+	+	+
<i>E. coli</i>	+	-	+	+	+
<i>Erwinia</i>	+	-	+	+	-
<i>Klebsiella</i>	+	-	+	-	+
<i>Morganella</i>	+	-	+	-	+/-
<i>Proteus</i>	+	-	+	+	+
<i>Providencia</i>	+	-	+	+	+/-
<i>Salmonella</i>	+	-	+	+	+
<i>Shigella</i>	+	-	+	-	-
<i>Serratia</i>	+	-	+	+	+
<i>Yersinia</i>	+	-	+	+	+

FUENTE: (PROPIA)

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* presentan un mosaico de antígenos, que pueden incluirse en tres categorías principales:

Los antígenos *K* (del alemán Kapsel), o *capsulares*, son los que envuelven a la célula. Con ciertas excepciones son termolábiles. En el género *Klebsiella* la subdivisión en tipos capsulares se basa en los antígenos K. Estos antígenos K enmascaran a los antígenos somáticos termoestables de la célula y hacen que las células vivas resulten inaglutinables con antiseros O. Algunos ejemplos son el antígeno Vi de la *S. typhi* y el antígeno B que se encuentra en ciertos tipos de *E. coli*.

Los antígenos *O* (del alemán Ohne Hauch, no diseminados) o somáticos, que son termoestables, están localizados sobre todo el cuerpo celular. Químicamente son de naturaleza polisacárida. El complejo de antígenos O determina el subgrupo somático al que pertenece el microorganismo, en los géneros *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Providencia*, *Serratia* y otros.

Los antígenos *H* (del alemán Hauch, diseminados) son los antígenos flagelares. Se hallan localizados en los flagelos, son de naturaleza proteica y termolábiles. Los serotipos dentro de los grupos somáticos de *Salmonella* y otros géneros de *Enterobacteriaceae* son determinados por los antígenos H₁.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

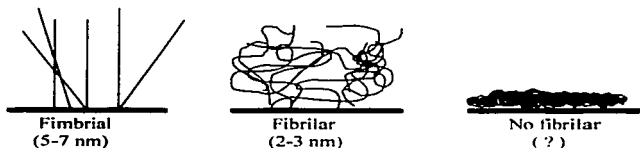
1.4. FACTORES DE VIRULENCIA DE LAS ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE LT

Un paso inicial en las infecciones bacterianas es la adhesión de la bacteria a las células del hospedero. La adhesión se lleva a cabo por medio de proteínas llamadas adhesinas localizadas en las fimbrias de las bacterias. Dicha adhesión también induce aglutinación de las células sanguíneas rojas del hospedero (RBC), las proteínas de reconocimiento se llaman también hemaglutininas. Dichas hemaglutininas son asociadas con estructuras extracelulares las cuales pueden tener diferentes apariencias, algunas son gruesas y rígidas, otras son mucho más delgadas, flexibles y curvas.

Un tercer grupo de estructuras adhesivas extracelulares solo pueden ser visualizadas después de la estabilización con anticuerpos específicos y tiene una apariencia como de cápsula. Estas estructuras, que se esquematizan mas adelante son llamadas fimbria (rígida, 5-7 nm de diámetro), fimbriales (flexible, 2-3 nm de diámetro) y no fimbrial (estructura fina no demostrable) (ver Fig. 1.4.1.).

Con solo unas pocas excepciones, las adhesinas reconocen e interactúan con carbohidratos complejos en la superficie de las células del hospedero.¹⁶

Fig. 1.4.1.



Adhesinas. Representación esquemática de la apariencia morfológica de las adhesinas de *E. coli*.

(FUENTE: 16)

1.5. PRODUCCIÓN DE TOXINAS

Las infecciones del tracto intestinal en el hombre son debidas en su mayoría por la producción de toxina termolábil o LT de las bacterias ingeridas en algún alimento contaminado, esta toxina es muy parecida a la toxina producida por el microorganismo llamado *Vibrio cholerae*, tanto en su estructura química, como en su forma de acción.

Las células bacterianas representan el 25-30% de las heces, llegando a contener 10^{10} a 10^{11} ufcg⁻¹, mientras que el resto está formado por componentes indigestibles del alimento, células epiteliales desprendidas del intestino, minerales y bilis.⁶

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* comúnmente se encuentran presentes a razón de 10^6 g⁻¹ aproximadamente. Una flora intestinal normal confiere cierta protección frente a la infección, pero mediante terapia antibiótica se puede alterar el equilibrio de la flora, ocasionando la colonización del intestino y la liberación de la toxina.⁶

DIARREA: Es la evacuación desmesurada de heces excesivamente líquidas. Cualquier proceso que perjudique gravemente la capacidad del intestino para absorber la mayor parte de los 8-10 L. líquidos que recibe cada día, producirá esta enfermedad. Con frecuencia en este proceso intervienen toxinas:

Las toxinas de origen bacteriano se clasifican en dos grupos, en endotoxinas y exotoxinas.

Exotoxinas: Término usado para definir las toxinas que son liberadas extracelularmente por el organismo vivo. Son las toxinas biológicas más potentes conocidas.⁶ Son producidas producidas fundamentalmente por bacterias grampositivas, aunque algunas gramnegativas también son capaces de elaborarlás. Estas toxinas son, en general de naturaleza proteica y termolábiles. Dado que son proteicas muchas pueden ser inactivadas o destruidas por enzimas proteolíticas.⁵² Las exotoxinas incluyen :

- * **Enterotoxinas:** Actúan sobre la mucosa intestinal generalmente causando diarrea
- * **Citotoxinas:** Destruyen las células hospedadoras
- * **Neurotoxinas:** Obstaculizan la transmisión nerviosa normal

Endotoxinas: Son lipopolisacáridos (LPS) pirógenos (productores de fiebre) liberados de la membrana externa de la envoltura celular gramnegativa por lisis bacteriana.⁶ Estas toxinas son producidas sólo por bacterias gramnegativas, el LPS es un componente estructural de la membrana externa y representa el determinante antigénico (O).⁵²

La intoxicación alimentaria bacteriana puede ser dividida en tres tipos principales, los cuales se muestran a continuación:

1. **Ingestión de toxina preformada:** Las toxinas pueden hallarse ya elaborada en el alimento y ser ingeridas con él.⁶
2. **Infección no invasora:** Las bacterias viables ingeridas con el alimento colonizan la luz intestinal. Esta colonización está relacionada principalmente con el intestino delgado en el que la competición de la microflora endógena es menos intensa. Para evitar su eliminación por la acción de arrastre de las altas velocidades del flujo existente en este tramo del intestino, el patógeno generalmente se adhiere a la superficie epitelial y la coloniza. Realiza esta adhesión produciendo adhesinas, moléculas con frecuencia asociadas a las fimbrias existentes en la superficie de la célula bacteriana, las cuales reconocen y se adhieren a sitios receptores específicos existentes en la superficie de las

microvellosidades. La pérdida de la capacidad para adherirse a la pared del intestino reducirá en mucho la virulencia de un patógeno.»

3. **Infección invasora:** Otros patógenos causantes de diarrea invaden las células del epitelio intestinal pero normalmente no se diseminan mucho mas allá de la proximidad cercana del intestino. Algunos de ellos, como *Salmonella* invaden preferentemente el ileon para producir una profusa diarrea acuosa. Las células bacterianas invaden y atraviesan las células epiteliales para multiplicarse en la *lamina propia*, una capa de tejido conjuntivo que se encuentra debajo de los enterocitos. Otros patógenos enteroinvasores, de modo igual que *Shigella* y que las cepas enteroinvasoras de *E. coli*, invaden la mucosa del colon y producen un síndrome disintérico que se caracteriza por inflamación, absesos y ulceración del colon y por la eliminación de heces sanguinolentas que contienen moco y pus. Las células bacterianas se adhieren a los enterocitos por medio de las adhesinas proteicas de la membrana externa. Son englobadas por los enterocitos en respuesta a una señal fagocítica producida por la bacteria y se multiplica en el interior del citoplasma invadiendo las células próximas y el tejido conjuntivo subyacente. La reacción inflamatoria frente a este proceso causa absesos y ulceraciones del colon.»

1.5.1. *Escherichia coli*:

Esta bacteria produce dos tipos de toxina, una llamada Termoestable (ST) , que es resistente al calor y otra llamada Termolábil (LT) que no resiste el calor, ambas del tipo cólera y son denominadas enterotoxinas.₁ La producción de ambas toxinas es regulada por plásmidos transferibles. Se ha demostrado que la LT provoca enfermedad diarreica en el ser humano y, recientemente se ha incriminado a la ST.₁

La enterotoxina del cólera y de algunas cepas no invasivas (toxigénicas) de *E. coli* provocan diarrea por un mecanismo (o varios) similar, lo que da lugar a una secreción excesiva de líquido en el intestino delgado.₁

Parece ser que la protección no es simplemente una consecuencia de la flora normal que ocupa todos los nichos disponibles, ya que *E. coli* productora de enterotoxinas se adhiere a los sitios que normalmente están vacantes. Probablemente interviene cierto antagonismo directo gracias a la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas, aunque también parece ser que intervienen la estimulación del sistema inmune del hospedador y su capacidad para contrarrestar la infección.»

***E. coli* enterotoxigénico (ETEC):** La enfermedad causada por este organismo se suele presentar entre 12 y 36 horas después de la ingestión del organismo. Los síntomas pueden variar desde una ligera diarrea afebril hasta un síndrome grave parecido al cólera, con heces acuosas sin sangre.» El organismo ingerido se opone a ser expulsado con el quimo que fluye rápidamente adhiriéndose al epitelio gracias a factores de fijación o de colonización en forma de fimbrias existentes en la superficie de la célula bacteriana. Las fimbrias pueden tener morfología diferente y ser estructuras, bien rígidas (6-7 nm de diámetro), o

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

bien flexibles (2-3 nm de diámetro) compuestas de subunidades de proteínas de 14-22 kDa. Son resistentes a la manosa, es decir, median la hemoaglutinación en presencia de manosa, por lo que determinadas fimbrias de colonización están restringidas a determinados serotipos. Son codificadas en la superficie de plásmidos donde también se codifican las toxinas causantes de diarrea. Son producidos dos tipos de toxinas:

- * **TOXINAS TERMOESTABLES (ST):** Que son capaces de resistir el calentamiento a 100 °C durante 15 minutos.
- * **TOXINAS TERMOLABILES (LT):** Que son inactivadas a 60 °C después de 30 minutos y a pH bajo.

E. coli enteroinvasiva (EIEC): La infección por EIEC origina los síntomas clásicos de una disentería bacilar invasora normalmente asociada con *Shigella*. De igual modo que *Shigella*, EIEC invade las células epiteliales del colon y se multiplica en su interior causando ulceración e inflamación. La invasividad se determina por el número de proteínas de la membrana externa que son codificadas en la superficie de un plásmido de gran tamaño, 140 Mda. Parece ser que la dosis infecciosa de EIEC es bastante más elevada que la correspondiente a *Shigella* y se cree que ésto es un reflejo de la mayor sensibilidad del organismo a la acidez gástrica.,

E. coli enteropatogénica (EPEC): Cuando se determinaron las propiedades de ETEC y de EIEC se observó que éstas cepas rara vez eran de los mismos serotipos relacionados por vez primera con la diarrea por *E. coli*. Parece ser que la patogenia está relacionada con la capacidad de las cepas de EPEC para adherirse íntimamente a la membrana del enterocito causando el desprendimiento de la célula de los extremos de las vellosidades. Se supone que ésto causa diarrea porque se rompe el equilibrio entre la absorción y la secreción en el intestino delgado.,

E. coli enterohemorrágica (EHEC): A veces también es conocido como *E. coli* productor de Verotoxina (VT/EC). Son capaces de provocar diarrea varios serotipos pero el serotipo O157:H7 es el que con mayor frecuencia se aísla en las personas. La adhesión es un factor de virulencia importante y se ha comprobado que las cepas del serotipo O157:H7 poseen un plásmido de 60 MDa que codifica los factores de colonización de las fimbrias que producen una lesión parecida, pero no idéntica, a la mancha que producen las cepas de EPEC en los extremos de las vellosidades.

Las cepas de EHEC producen la citotoxina Verotoxina [llamada así por su capacidad para destruir las células Vero (células renales del mono verde africano)]. Determinadas investigaciones han revelado la existencia de al menos dos, VT-I y VT-II, que son semejantes a la toxina Shiga.,

E. coli difusamente adherente (DAEC): El término "*E. coli* difusamente adherente" fue inicialmente usada para referirse a cualquier especie de *E. coli* Hep-2-adherente que no forma microcolonias como EPEC. Con el descubrimiento de EAEC, muchos autores ahora reconocen a DAEC como una categoría independiente de *E. coli* potencialmente diarreaagénica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Varios estudios recientes han implicado a especies de DAEC como agentes de diarrea, mientras que otros autores no han recuperado especies de DAEC mas frecuentemente de pacientes con diarrea que de controles asintomáticos. Una susceptibilidad dependiente de la edad puede explicar esta observación, porque cuando las poblaciones son estratificadas por la edad, la asociación de DAEC con la diarrea es encontrada sólo en niños mayores a los infantes, la razón por la cual este fenómeno se relaciona con la edad es desconocida aún, así como otras características epidemiológicas, tales como el modo de adquisición de la infección DAEC.

1.5.2. *Salmonella*:

Toxigenicidad: Al igual que *E. coli*, esta bacteria produce diarreas muy severas debido a la producción posible de enterotoxinas. El periodo de incubación es de 12 a 36 horas, aunque en algunos casos puede ser mas corto.

Enteritis: Las infecciones gastrointestinales están relacionadas principalmente con aquellos serotipos que existen en abundancia en los animales y en las personas. Por su gravedad, pueden variar desde la vehiculación asintomática a una diarrea grave y son el tipo de salmonelosis mas común.

El periodo de incubación de la enteritis salmonelósica tiene una duración comprendida entre 6 y 48 horas. Los síntomas principales de fiebre ligera, náusea y vomito, dolor abdominal y diarrea duran pocos dias pero, en algunos casos, pueden persistir durante una semana o mas.

Los organismos ingeridos, que sobreviven al tránsito a través del ácido del estómago, se adhieren a las células epiteliales del ileon por medio de fimbrias resistentes a la manosa. Después, son englobados por las células en un proceso conocido como endocitosis mediada por receptores. El mecanismo detallado de este proceso permanece sin esclarecer. Las salmonelas englobadas por endocitosis pasan a través de las células epiteliales al interior de una vacuola unida a una membrana donde se multiplican y después son liberadas hacia la lamina propia a través de la membrana de las células basales. Esto incita una afluencia de células inflamatorias que determina la liberación de prostaglandinas que activan la adenilato ciclasa produciendo secreción de liquido hacia el interior de la luz intestinal. Se han obtenido pruebas de que las salmonelas causantes de diarrea también producen enterotoxinas que estimulan la secreción de liquido, también se ha purificado una toxina termolábil de *S. dysenteriae* que posee cierta semejanza estructural y serológica con la LT de *E. coli* y con la toxina coherente.

Como regla general, la dosis infecciosa es elevada, del orden de 10^7 células aunque esta varía de acuerdo con una serie de factores tales como la virulencia del serotipo, la sensibilidad del individuo y el alimento vehiculador. Parece ser que el elevado contenido de grasa protectora a las bacterias cierta protección frente a la acidez del estómago.

Enfermedad sistémica: Esta característica se aplica a los bacilos tífico y paratífico, *S. typhi* y *S. paratyphi* A, B y C que causan la enfermedad septicémica conocida como fiebre entérica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La fiebre tifoidea tiene un período de incubación de una duración cualquiera de las comprendidas entre 3 y 56 días, aunque habitualmente está comprendida entre 10 y 20 días. Las salmonelas invasoras atraviesan el epitelio intestinal y después son transportadas por los linfáticos a los ganglios linfáticos mesentéricos. Después de multiplicarse en los macrófagos, son liberadas para pasar a la corriente sanguínea y después se diseminan por todo el organismo. Son eliminados de la sangre por los macrófagos pero continúan multiplicándose en su interior. Finalmente, esta multiplicación destruye a los macrófagos que liberan a la corriente sanguínea gran cantidad de bacterias causando una septicemia.

1.5.3. *Shigella*:

La patogenicidad de este microorganismo está basada en la liberación de una endotoxina de naturaleza lipopolisacárida que afecta a la mucosa intestinal.)

Las shigelas producen la disentería bacilar en las personas y en otros primates superiores. Los estudios realizados con personas han indicado que la dosis infecciosa es baja: del orden de 10 - 100 organismos. El período de incubación puede oscilar entre 7 horas y 7 días, aunque en los alimentos generalmente se caracterizan por períodos de incubación más cortos, de 36 horas como tiempo máximo. Los síntomas consisten en dolor abdominal, vómito y fiebre que acompañan a una diarrea que puede variar desde un síndrome disentérico clásico con deposiciones sanguinolentas que contienen mucosidad y pus, en los casos de *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri* y *Sh. boydii*, hasta una diarrea acuosa cuando se trata de una infección por *Sh. sonnei*.

1.5.4. *Yersinia*:

La enfermedad causada por este organismo es una enterocolitis autolimitante con un período de incubación de 1-11 días y que duran entre 5 y 14 días, aunque en algunos casos puede persistir durante un tiempo considerablemente más prolongado. Los síntomas consisten en dolor abdominal y diarrea acompañada de una fiebre ligera; el vómito es raro.

Las células ingeridas pertenecientes a la especie patógena *Y. enterocolitica* que resisten el tránsito a través del ácido del estómago y no son destruidas, se adhieren a las células, mucosas de las placas de Peyer (tejido linfóide asociado al intestino). La adhesión es mediada por proteínas de la membrana externa de la célula que son codificadas por un plásmido de 40-48 MDa que poseen todas las cepas patógenas de *Y. enterocolitica*.

Y. enterocolitica produce una toxina termoestable (9.000-9.700 Da) pero su papel en la patogenia, si es que tiene alguno, es dudoso. Guarda cierta semejanza con la LT de *E. coli* desde el punto de vista inmunológico y también en cuanto a su capacidad para inducir la acumulación de líquido en asas de ileon ligadas y para estimular la actividad de la guanilatoclasa. La producción de enterotoxina en el intestino es improbable ya que su producción suele cesar a temperaturas superiores a 30 °C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA TOXINA LT

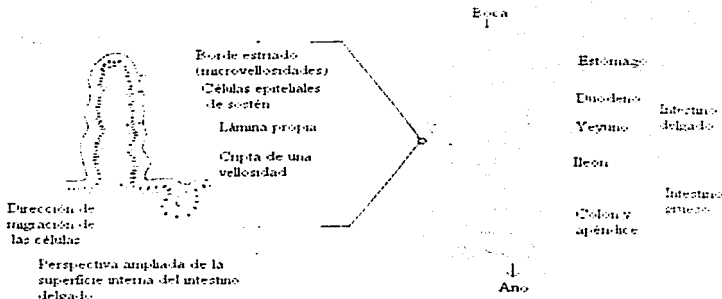
El alimento al ser deglutido desciende por el esófago hasta llegar al estómago, ahí el alimento se mezcla con el jugo gástrico, líquido de reacción ácida que contiene ácido clorhídrico. Normalmente, una vez el alimento ha entrado en el estómago, sólo sobreviven las células vegetativas acidotolerantes y las esporas, por lo que el número de microorganismos existentes en él es escaso, aunque con frecuencia se encuentran lactobacilos asociados a su pared. La acidez del estómago generalmente proporciona una protección muy eficaz para los tramos siguientes del intestino, pero no es una defensa vulnerable. Las bacterias pueden eludir la exposición prolongada al ácido por quedar protegidas en el interior de las partículas de alimento o como consecuencia de su tránsito rápido a través del estómago tal como ocurre, por ejemplo cuando el estómago está lleno. Alternativamente la acidez puede ser neutralizada por el alimento o no existir como consecuencia de un trastorno.⁶

Desde el estómago, son liberadas periódicamente al intestino delgado pequeñas cantidades de la mezcla de alimento parcialmente digerido y jugo gástrico conocida como químo. En este conducto muscular, de más de 6 metros de largo, tiene lugar la mayor parte de la digestión y de la absorción del alimento. Su revestimiento interno está muy plegado y los pliegues están recubiertos de protuberancias parecidas a dedos o vellosidades que están recubiertas por microvellosidades (Ver fig. 1.6.1.).⁶

La población microbiana aumenta a lo largo del recorrido del intestino delgado: los recuentos de 10^2 - 10^3 mL⁻¹ existentes en el duodeno aumentan hasta en torno a 10^3 - 10^4 en el yeyuno, 10^5 en el tramo superior del íleon y 10^6 en el tramo inferior del mismo. En los tramos superiores del duodeno, la velocidad del flujo es tal que su efecto de inundación es superior a la velocidad con que los microorganismos son capaces de multiplicarse de modo que sólo aquellos que tienen la capacidad de adherirse al epitelio intestinal pueden sobrevivir durante algún tiempo.⁶

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1.6.1.



Tracto gastrointestinal.

FUENTE: (6)

Una vez adherido, el patógeno produce una endotoxina de naturaleza lipopolisacárida que actúa localmente en el intestino modificando el flujo de electrolitos y de agua a través de la mucosa, que de ser un flujo de absorción pasa a ser un flujo de secreción. Varias enterotoxinas actúan estimulando los enterocitos (las células que revisten el epitelio intestinal) para producir un exceso de nucleótidos cíclicos.⁶

Más ampliamente estudiada es la toxina colérica producida por *Vibrio cholerae*. La toxina del cólera está compuesta de dos tipos de subunidades, A (peso molecular 27,215) y B (peso molecular 11,677), codificada por los genes *ctxA* y *ctxB*.¹⁵ La toxina (PM 84,000) incluye cinco subunidades B y una sola subunidad A. La toxina del cólera es conocida también como cóleragen (choleragen) y es representada como CT, y como ya se mencionó, está formada por dos protómeros distintos, como se muestran en la Fig. 1.6.2. El protómero A consiste de dos cadenas de polipéptidos, A₁ (peso molecular = 22,000) y A₂ (peso molecular ≈ 5,000) ligados por una unión simple disulfuro. El protómero B (peso molecular de 58,000) consiste de cinco cadenas polipeptídicas idénticas (peso molecular 11,600). Los protómeros A (CT-A) y B (CT-B) son mantenidos unidos por interacciones no covalentes y pueden ser separados por cromatografía de filtración en condiciones ácidas. El CT-B también ha sido encontrado en filtrados de *V. Cholerae* y ha sido nombrado coleragenoide (choleragenoide). Pero tanto CT-A como CT-B por separado son no tóxicos.¹⁵

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El segundo puede bloquear los efectos tóxicos de la holotoxina; se ha propuesto que el CT-A es el protómero activo o tóxico, pero requiere del CT-B para intoxicar a las células intactas.¹⁵

Las subunidades B se unen a los receptores del gangliósido específico (un glucolípido ácido) existentes en la superficie de los enterocitos. Esta unión crea un canal hidrófilo en la membrana celular a través del cual es capaz de pasar la unidad A. Una vez dentro de la célula, una parte de la unidad A actúa enzimáticamente para transferir un grupo ADP-ribosil derivado del NAD celular a una proteína que regula la actividad de la enzima adenilatociclasa. Como resultado de esta transferencia, la enzima es recogida en su estado activo originando una acumulación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) que inhibe la absorción de los iones Na^+ y Cl^- a la vez que estimula la secreción de los iones Cl^- , HCO_3^- y Na^+ . Para mantener un equilibrio osmótico, la transferencia de electrólitos va acompañada de una abundante efusión de agua del interior de la luz intestinal. Esta efusión sobrepasa con mucho la capacidad de absorción del intestino grueso y origina una profusa diarrea acuosa. (ver Fig. 1.6.3.).

Se ha demostrado que algunas otras enterotoxinas, entre las que se incluye la toxina termolábil (LT) producida por varios tipos de *E. coli* enterotóxico, se comportan de igual modo que la toxina colérica.

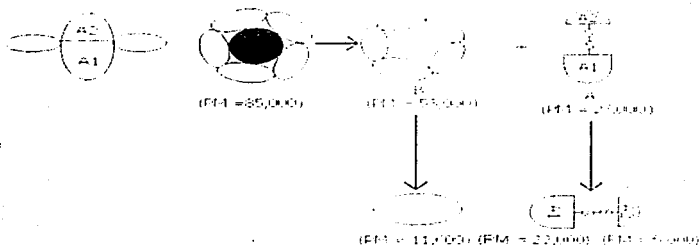
El cólera suele tener un periodo de incubación de una duración comprendida entre uno y tres días y en cuanto a su gravedad puede variar desde una diarrea benigna autolimitante hasta un trastorno grave que amenaza la vida. La dosis infecciosa en individuos normales sanos es elevada cuando el organismo es ingerido sin alimento o tampón, del orden de 10^{10} células, pero es considerablemente reducida si es ingerida con un alimento que protege a las bacterias de la acidez del estómago.

El cólera es una infección no invasora en la que el organismo coloniza la luz intestinal y produce una potente enterotoxina. En los casos graves, la hipersecreción de sodio, de potasio, de cloruro y de bicarbonato inducida por la enterotoxina origina una diarrea copiosa, descolorida y acuosa que contiene vetas de moco, descrita como heces de agua de arroz. La diarrea, que puede alcanzar un volumen de hasta 20 L. por día y contiene hasta 10^8 vibrios por mL., va acompañada de vómito, pero sin náusea o fiebre.

A menos que las pérdidas masivas de líquido y de electrólitos sean repuestas, existe una disminución del volumen de sangre y de la presión, un aumento de la viscosidad de la sangre, insuficiencia renal y colapso circulatorio.

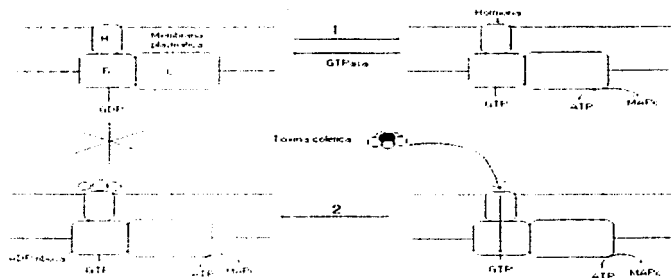
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1.6.2.



Estructura de la CT. La toxina está compuesta de un protómero A rodeado por un protómero B pentamérico, el cual puede ser separado. El protómero B puede ser disociado en sus cinco polipéptidos idénticos, cada uno siendo de 11,600 daltones. Sobre la reducción, el protómero A puede ser separado en dos polipéptidos, A₁ (PM ≈ 22,000) y A₂ (PM ≈ 5,000). FUENTE: (15)

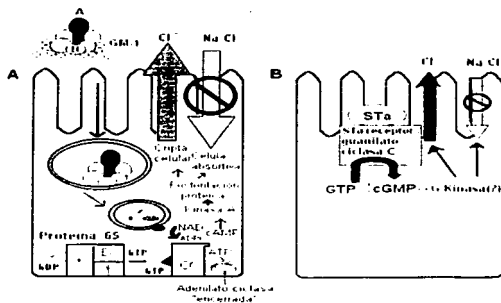
Fig. 1.6.3.



Toxina cólera y su modo de acción. (1) Activación fisiológica reversible de la adenilcilasa. (c) mediante fijación de una hormona al receptor (h) de modo que la fijación y translocación de la toxina cólera de la subunidad A origina la ribosilación del ADP de la subunidad reguladora (r) y su inactivación irreversible. FUENTE (6)

La toxina LT de *Escherichia coli* guarda una semejanza con la toxina cólera; consta de cinco subunidades B (M. 11.5 kDa), que son responsables de la unión de la toxina a las células epiteliales, y de una subunidad A (M. 25 kDa) que es desplazada al interior de la célula epitelial donde activa la adenilcilasa (Ver Fig. 1.6.4). A continuación, el subsiguiente aumento de las concentraciones de AMPc inhibe la absorción de Na^+ , de Cl^- y de agua por las células de la vellosidad y estimula su desaparición de las células de las criptas intestinales provocando así una diarrea profusa. La toxina LT-II producida por determinadas cepas de ETEC tiene una actividad biológica parecida a la de la toxina LT-I pero no tiene reacción cruzada ni con el antisuero frente a la toxina LT-I ni con el antisuero frente a la toxina cólera.

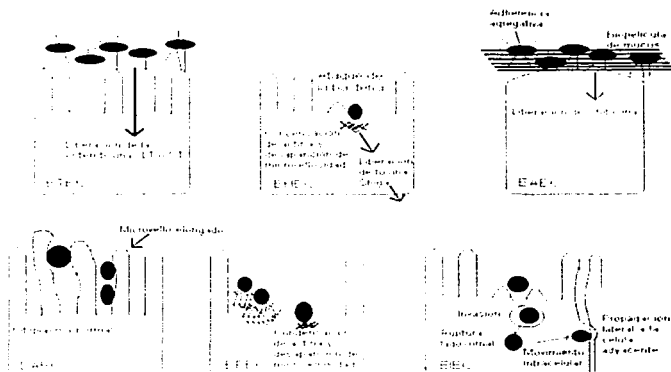
Fig. 1.6.4.



Mecanismo clásico de acción de ETEC. (A) LT-1. La holotoxina, consistiendo de una subunidad A y cinco subunidades B, es internada por las células epiteliales de la mucosa del intestino delgado vía endocitosis. La A₁, o translocación de subunidades catalíticas a través de la membrana vacuolar y pasa a través del aparato de Golgi por transporte retrogrado. En la figura, la subunidad A se muestra pasando a través del cerco de la subunidad B, pero esto puede no ser el caso in vivo. A₁ cataliza la ribosilación del ADP de la arginina 201 de la subunidad α de la proteína G; el ADP ribosilado y la proteína G activan la adenilato ciclasa la cual produce niveles supranormales de cAMP intracelular. El cAMP es un mensajero intracelular el cual regula los transportes de la membrana celular epitelial intestinal y otras enzimas celulares del hospedero, así como también posee efectos en el citoesqueleto. La activación del AMPc dependiente de la Kinasa A resulta en la fosforilación de los transportadores de membrana apicales (especialmente el regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística), resultando en la secreción de aniones (predominantemente Cl⁻ por un efecto directo, y HCO⁻ indirectamente) por las criptas celulares y un decremento en la absorción de Na⁺ y Cl⁻ por las células absorbivas. El AMPc también puede tener efectos importantes en el transporte basolateral y en los niveles de calcio intracelular, los cuales pueden incrementar la magnitud de los efectos en el transporte iónico y de fluidos. (B) STa. Es menos conocida la acción de ST que de LT. Se piensa que ST actúa por la unión del receptor de membrana de ST, GC-C. La activación de GC-C resulta en el incremento de los niveles de cGMP intracelular. El cGMP ejerce sus efectos en el incremento de la secreción de cloro y el decremento en la absorción de NaCl por la activación del cGMP dependiente de la kinasa (G-kinasa) y/o el AMPc dependiente de la kinasa (A-kinasa). Otros efectos de la STa en la inducción de la secreción de fluidos también ha sido postulada. FUENTE (8).

Una vez establecida la colonización, las estrategias patogénicas de las especies de *E. coli* diarreagénica exhiben marcadas variaciones (Fig. 1.6.5.). La interacción de los organismos con la mucosa intestinal es específica para cada categoría.¹⁸

Fig. 1.6.5.



Esquemas patogénicos de *E. coli* diarreagénica. Las seis categorías reconocidas de *E. coli* diarreagénica cada una tiene una forma única en su interacción con células eucarióticas. Aquí, la interacción de cada categoría con una célula blanco específica está representada esquemáticamente. FUENTE (18)

1.7. IMPORTANCIA DE LA TOXINA LT EN ALIMENTOS

Como se ha podido ver, es importante la adecuada sanidad en la elaboración de alimentos ya que los microorganismos se encuentran en casi cualquier tipo de ambiente, especialmente las enterobacterias que son patógenas para el hombre.

Se han reportado varios brotes de infecciones gastrointestinales en el mundo, en países subdesarrollados principalmente, pero esto no indica que los países desarrollados están exentos de dichos brotes.

Por ejemplo, en el mes de septiembre de 1999 se reportó un brote de *E. coli* 0157:H7 en el estado de Nueva York, Estados Unidos, el cual se considera como el mayor brote en la historia de este país. Posteriormente en el condado de Washington se reportó un brote en el cual 1013 personas presentaban diarrea después de asistir a una fiesta.

Se determinó en ambos casos que la más probable causa del brote fue el agua contaminada de los pozos.

Por otra parte se han reportado casos cuyos brotes son debidos a *Salmonella*, la causa principal son los alimentos poco o mal cocidos, que permiten la sobrevivencia del microorganismo, además de que esta bacteria se transmite por vía fecal-oral; cuando las manos de un manipulador de alimentos están contaminadas fecalmente y toca los alimentos que posteriormente son incorrectamente cocidos, son factores que ocasionan el crecimiento microbiano.

La contaminación por *Salmonella* también se da por vía animal cuando éstos son alimentados con subproductos de animales con *Salmonella*, como carne, harina de huesos y piensos. Los insectos como las moscas también son una vía de contaminación fecal de los alimentos.

Todo lo mencionado anteriormente indica que los cuidados que se deben tener en la preparación de los alimentos son de suma importancia, como la higiene en todos los aspectos, la adecuada cocción, la cual destruye principalmente a la toxina LT y sus organismos productores, y aislarlos lo mas posible del contacto con insectos como moscas, cucarachas, mosquitos, etc.

También se debe educar a las personas de tener un aseo personal adecuado, ya que es importante mantener en la mente que la mejor prevención es responsabilidad de la sanidad individual.

Se ha demostrado que sólo se requiere de una relativamente pequeña cantidad de células bacterianas para que una persona caiga enferma (para *E. coli* se requiere de 50 a 100 células) y un pequeño crecimiento de éstas en los alimentos también se puede originar por someter al alimento a variaciones de temperatura, es decir cuando la temperatura no se mantiene constante, por ejemplo en los alimentos que se deben mantener en refrigeración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.8. PRUEBAS DE DETECCIÓN PARA LA TOXINA LT

Se ha desarrollado una amplia gama de técnicas llamadas de inmunoensayo para la detección de toxinas bacterianas en sistemas de alimentos y otros. Las técnicas de inmunoensayo detectan las reacciones inmunológicas de un organismo vivo ante la presencia de una sustancia extraña.

Los inmunoensayos con enzimas son sistemas analíticos con los cuales pueden ser detectados pequeñas cantidades de un componente deseado con pocos o nulos requerimientos para su purificación o para la concentración de la muestra.⁷ Estos inmunoensayos tienen un carácter altamente específico, así como una alta sensibilidad y reproductibilidad.

Todos los inmunoensayos se basan en la interacción de un anticuerpo y su antígeno correspondiente y la detección de dicha interacción se logra mediante el empleo de enzimas, las cuales también son conocidas como etiquetas o marcas. Existen diferentes tipos de inmunoensayos, los cuales serán descritos más adelante, algunos son aplicables en alimentos. Para comprender mejor las técnicas de inmunoensayos es necesario conocer los términos empleados en ellos:

INMUNOGENICIDAD: Es la habilidad de un organismo para inducir la formación de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser proteínas, péptidos, carbohidratos, ácidos nucleicos lípidos y cualquier otro tipo de sustancias. Dos factores son importantes en la inmunogenicidad de un antígeno, el primero es que dicho antígeno debe ser extraño al cuerpo del animal al cual se le introducirá el antígeno y con ésto inducir la formación de un anticuerpo mediante la acción de su mecanismo de defensa; el segundo factor es que el anticuerpo debe ser de un cierto nivel de intrincación para que pueda reaccionar con los componentes del sistema de respuesta inmune.

ANTICUERPOS: Proteína producida por células inmunes del cuerpo en respuesta a la presencia de un antígeno. Todos los anticuerpos pertenecen a una categoría de proteínas llamadas inmunoglobulinas, las cuales se abrevian como Ig (ver Fig. 8.1). La función de dichas inmunoglobulinas o anticuerpos es ligar a los antígenos, los cuales son proteínas extrañas al organismo. Las inmunoglobulinas se dividen en cinco clases:

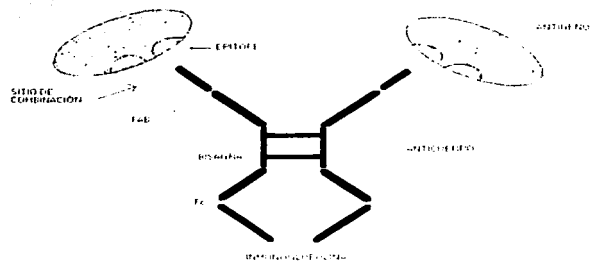
- * **IgA:** Existen dos formas, el suero y el IgA secretor. El segundo se localiza en las secreciones mucosas y esta protegido por una molécula llamada componente secretor.
- * **IgD:** Se localiza en la superficie de células B maduras con IgM. El papel para esta clase inmunoglobulinas tiene que ser determinado.¹²
- * **IgE:** Se localiza en el suero de todas las inmunoglobulinas pero a bajas concentraciones, es la responsable de todas las reacciones inmunes inmediatas, como son las alergias, fiebre del heno, asma, alergia a alimentos, drogas y picaduras de insectos.¹²
- * **IgG:** Es la mayor clase de inmunoglobulina que existe, consta de cuatro subclases diferentes, de las cuales, dos pueden unirse y activar el sistema completo, logrando formar cavidades en las células y causarles daño, incluso la muerte.¹²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- * **IgM:** Son de baja afinidad, se producen por una infección, permanecen por un período de tiempo relativamente corto.¹²

A continuación se muestra un esquema de una inmunoglobulina o anticuerpo, así como sus diferentes subclases:

Fig. 1.8.1.



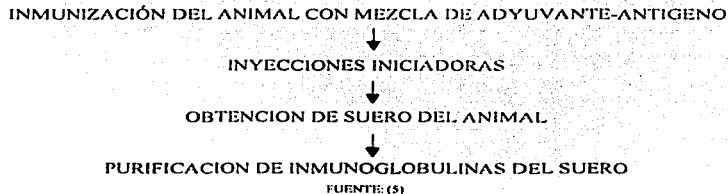
FUENTE (12)

En cuanto a los tipos de anticuerpos, pueden ser producidos dos de ellos; los llamados anticuerpos policlonales y los monoclonales. Los primeros son producidos en conejos, ovejas, cabras o caballos; los segundos se producen en ratones.

- * **Anticuerpos policlonales:** Requiere de dos inyecciones (llamadas iniciadoras) en el organismo del animal y de algunas semanas para su extracción. El suero contiene, además del IgG otras 50 proteínas, así como suero de albúmina. Una preparación de un anticuerpo policlonal puede contener más de 10.000 diferentes tipos de IgG. El anticuerpo se une al antígeno mediante fuerzas débiles, como enlaces no covalentes, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y efectos hidrofóbicos y electrostáticos. Dichas fuerzas deben tomarse en cuenta para la especificidad de la técnica inmunológica a emplear.³

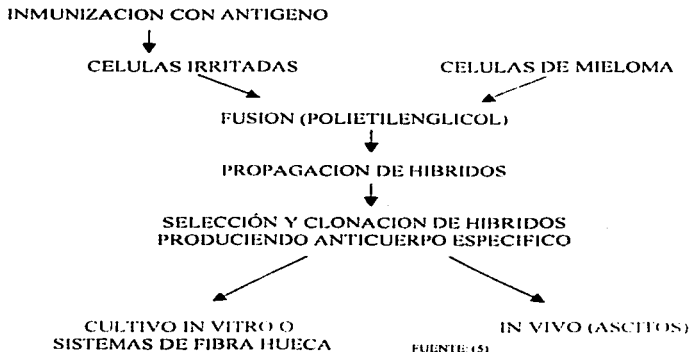
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Diagrama 1.8.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES



- Anticuerpos monoclonales:** Los ratones son inmunizados y después se logra la obtención del anticuerpo monoclonal por medio de células híbridas e irritadas producidas en el ratón empleando anticuerpos policlonales. Los anticuerpos monoclonales son químicamente idénticos y puede variar su especificidad al modificar la concentración del anticuerpo policlonal. Debido a su fácil producción, su pureza y su afinidad bien definida del epítope, estos anticuerpos son preferidos en las técnicas de inmunoensayo.⁵

Diagrama 1.8.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Adyuvantes:** Son preparaciones que intensifican la inmunogenicidad del antígeno, tienen un complejo mecanismo de acción que estimulan de manera no específica la respuesta inmune. Protegen al antígeno de un metabolismo rápido y la destrucción. Se emplean en la producción de anticuerpos poli y monoclonales.⁵
- **Epitope:** Es la región en el antígeno que reacciona con el anticuerpo.⁵
- **Hapteno:** Es una sustancia muy pequeña que sirve para inducir una sola respuesta de anticuerpos, pero puede reaccionar con anticuerpos.⁵
- **Inmunogeno:** Sustancia que induce la producción de anticuerpos.⁵

Los inmunoensayos son técnicas muy sensibles y para elegir uno de ellos debemos de considerar la concentración de la muestra, la precisión requerida, sensibilidad, naturaleza y concentración de la muestra y disponibilidad de ciertos reactivos inmunoquímicos. Existen varios formatos para los inmunoensayos: algunos incluyen una precipitación simple del complejo antígeno-anticuerpo, otros la aglutinación de células rojas cubiertas u otras partículas, precipitación electroforética en agar, radioinmunoensayos (RIA) y los inmunoensayos con enzima (EIA). Los inmunoensayos presentan varias clasificaciones, las cuales se resumirán a continuación:

1.8.1. HOMOGÉNEOS:

También llamados inmunoensayos con enzima multiplicada (EMIT), consiste en la inhibición estérica de una enzima por un anticuerpo cuando un hapteno es atacado en su sitio activo por la enzima cercana. Se emplea principalmente en ensayos con moléculas pequeñas como drogas y hormonas en el suero y la orina, no se usa mucho en alimentos y se realiza totalmente en fase líquida; por lo que no es necesario romper ligaduras para que queden reactivos libres y poder separarlos, además de que está basado en la competencia entre sus reactivos, es decir es competitivo.⁵

1.8.2. HETEROGÉNEOS:

Son abreviados como HET-EIA, se realizan en fase sólida a la cual se une un anticuerpo o un antígeno y así poder separar el material que reaccionó de lo que no reaccionó con la enzima marcada mediante la ruptura de las ligaduras. A esta técnica también se le como ELISA o Ensayo inmunosorbente con enzima ligada. La fase sólida básicamente es una placa de microtitulación a la cual se une un anticuerpo o antígeno en un sistema buffer básico (pH de 9.5-9.6) por medio de interacción no covalente.⁵

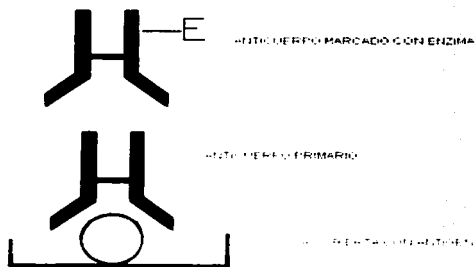
Existen muchas variantes de ensayos heterogéneos, pero los mas comunes son dos: los de "captura de anticuerpo" y "captura de antígeno", dentro de los cuales están comprendidos los del tipo competitivo y no competitivo.⁵

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1.8.3. CAPTURA DE ANTICUERPO:

Para este formato se utiliza una placa a la cual se fija un antígeno, posteriormente se añade el anticuerpo que ligará específicamente al antígeno (ver Fig. 1.8.2.). Para la cuantificación del anticuerpo ligado al antígeno, se agrega un segundo anticuerpo pero marcado con una enzima específica para el primer anticuerpo. Se puede emplear una "escalera" de anticuerpos secundarios para incrementar la sensibilidad con los puentes del anticuerpo extra. La desventaja es que las sustancias unidas a la placa pueden sufrir alteraciones estructurales en las ligaduras, provocando que los epitopes se vuelvan no utilizables para el reconocimiento por los anticuerpos.⁵

Fig. 1.8.2.



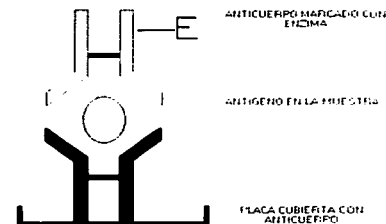
Formato de captura de anticuerpo.
FUENTE (5)

1.8.4. CAPTURA DE ANTÍGENO:

En este caso el anticuerpo es ligado a la placa, posteriormente se añade el antígeno que ligará al anticuerpo. Se agrega un segundo anticuerpo pero marcado con una enzima para cuantificar al antígeno, como se puede apreciar en la Fig. 1.8.3. A este formato se le conoce como "sándwich" o "doble anticuerpo".⁵

La ventaja de este formato es que se puede usar el mismo anticuerpo tanto para ligar como para detectar; pero también se pueden usar dos tipos diferentes de anticuerpos, un anticuerpo monoclonal para la captura y otro policlonal para la detección. De este modo se obtiene mayor especificidad en la captura y sensibilidad en la detección debido a que los anticuerpos policlonales reconocen diferentes epitopes en el antígeno. Estos ensayos también son llamados *asimétricos*.⁵

Fig. 1.8.3.



Formato captura de antígeno, también conocido como "Sándwich" o "Doble anticuerpo." FUENTE: (5)

1.8.5. COMPETITIVOS:

Miden la competición por la unión a un anticuerpo entre un antígeno marcado (antígeno unido a una enzima) de concentración conocida y un antígeno no marcado de concentración desconocida, el cual viene siendo la muestra de prueba. Existen dos versiones de estos ensayos, uno es la medida del antígeno y el otro es la medida del anticuerpo.

En la medición del antígeno, la placa es cubierta con éste para ligarlo a ella y después se añade el anticuerpo marcado o ligado a una enzima junto con la muestra de prueba. El anticuerpo marcado con la enzima se ligará mejor al antígeno correspondiente si es que está presente en la muestra, que al antígeno ligado a la placa, como se muestra en la Fig. 1.8.4.(a)

En la medición del anticuerpo, este es inmovilizado o ligado a la placa, luego se añade el antígeno ligado a una enzima junto con la muestra, entonces el antígeno marcado se une al anticuerpo, pero el antígeno no marcado presente en la muestra va inhibiendo

dicha unión; por lo tanto la concentración del antígeno no marcado es inversamente proporcional a la concentración del producto formado por acción de la enzima en la muestra.

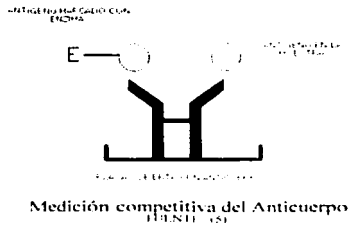
Otra variante de este método es colocar el anticuerpo cubriendo a la placa y provocar una competencia entre el antígeno marcado y el antígeno no marcado, como lo muestra la figura 8.4.(b)

Su ventaja es que es un método rápido que requiere solo de una incubación y un paso de lavado. La desventaja es que el antígeno debe ser de peso molecular relativamente bajo para prevenir precipitación, aglutinación o la hidratación estérica de reactantes solubles. Casi siempre las micotoxinas se ensayan por el método HET-EIA competitivo. A este tipo de ensayos también se les conoce como *simétricos*.⁵

Fig. 1.8.4.(a)



Fig. 1.8.4.(b)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

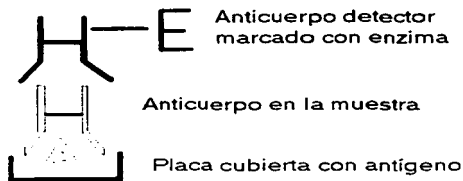
1.8.6. NO COMPETITIVOS:

Esta técnica requiere que el antígeno o el anticuerpo tengan al menos dos sitios de unión para el anticuerpo o el antígeno, según sea el caso y solo un componente (la muestra) está presente a una concentración limitada.¹² Este tipo de ensayos también presenta dos variantes:

Directo: Cuando el antígeno reacciona de manera directa con el anticuerpo marcado con enzima. En este caso se emplea el formato del sandwich y es probablemente el tipo más simple de ensayo.¹² Básicamente se liga el antígeno a la placa, luego la muestra que contiene al anticuerpo y subsecuentemente el anticuerpo marcado con enzima (ver Fig. 1.8.5).¹²

Indirecto: Cuando el anticuerpo sin marca reacciona con el antígeno seguido de una reacción con una proteína A marcada con enzima o un anticuerpo preparado contra el primer anticuerpo (ver Fig. 1.8.6).¹²

Fig. 1.8.5.

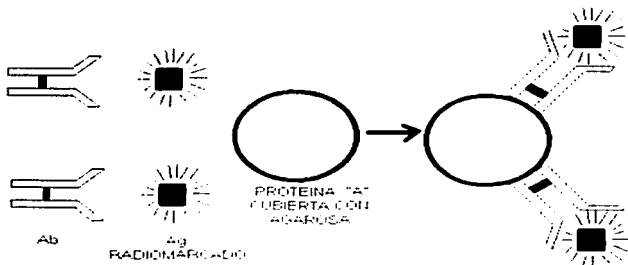


Ensayo directo no competitivo.
FUENTE: (12)

Las ventajas de este tipo de ensayos es que los materiales presentes reaccionan directamente con el conjugado enzima-anticuerpo, evitando con esto interferencias en las reacciones. La mayor desventaja es que requiere de al menos dos incubaciones y varios lavados.

Estos ensayos se emplean más comúnmente para la detección de antígenos estructurales bacterianos como enterotoxinas, por lo tanto es más aplicable en alimentos.

Fig. 1.8.6.



Ensayo indirecto no competitivo.

Ensayo de unión de Antígeno. El Ag radiomarcado es unido a la muestra de Ab y es precipitado por la proteína A cubierta con partículas de agarosa. FUENTE (12)

1.8.7. EN FASE SÓLIDA:

Son fáciles de realizar y más sensibles que los métodos en fase fluida debido a que es posible unir un número de moléculas detectoras a cada molécula de la muestra, además de que cuando el anticuerpo o el antígeno disociados de la superficie de la fase sólida tiene una mayor probabilidad de recombinación que si la reacción tuviera lugar en solución. Estos ensayos requieren del empleo de placas de microtitulación de poliestireno, poliestileno o de cualquier otro material (ver Fig. 1.8.7.).¹²

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

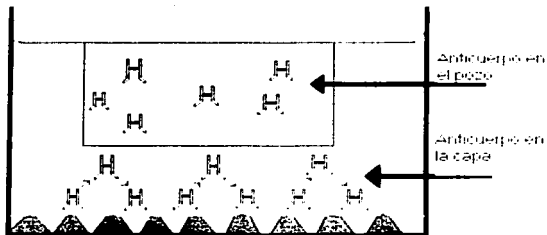
Fig. 1.8.7.

Placas de Polipropileno de 96 pozos
FUENTE (20)

En este tipo de fases se retienen los inmunoreactantes ligados y los que no se ligaron son removidos con lavado de la placa (ver Fig. 1.8.8). No obstante existen fases sólidas, como agarosa y celulosa que presentan una mayor relación área/volumen, mucho más que las placas plásticas.¹²

Los ensayos llamados "Dot-Blot" o "Dot-EIA" son aquellos que usan membranas como fase sólida, a las cuales se unen fuertemente las proteínas por medio de enlaces hidrofóbicos, como la nitrocelulosa que es la más comúnmente usada. Otras membranas como p-divinilfluoreno (PDF) y el nylon son más hidrofóbicos que la nitrocelulosa, debido a que tienen una carga negativa o mezcla de cargas negativas y positivas. También existen membranas que son derivadas químicamente para proporcionar enlaces covalentes.¹²

Fig. 1.8.8.



Ensayos en fase sólida. Son menos dependientes de la afinidad del anticuerpo debido a que hay una capa de buffer cercana a su superficie.

FUENTE: (12)

1.8.8. EN FASE FLUIDA:

Como su nombre lo indica, estos ensayos se realizan en un medio líquido, en el cual se encuentran presentes el antígeno y el anticuerpo, la reacción entre ambos obedece a la ley de acción de masas:

Asociación: Antígeno y Anticuerpo \rightarrow Complejo antígeno-anticuerpo
 r_1

Disociación: Antígeno + Anticuerpo \leftarrow Complejo antígeno-anticuerpo
 r_2

FUENTE (12)

Existen varios tipos de inmunoensayos, los cuales se dividen principalmente en aquellos donde se usan marcas con enzimas, como los EIAs y aquellos que usan radiomarcas, como los RIAs o radioinmunoensayos. Los radioinmunoensayos son los primeros en ser desarrollados y emplea radioisótopos para marcar a los anticuerpos o antígenos. La desventaja de éstos es que requieren de equipo especializado y extrema precaución, además de que es inadecuado para alimentos.¹²

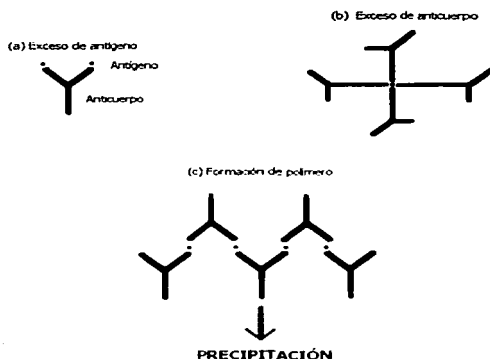
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los ensayos con enzimas se desarrollaron después, y emplean enzimas para marcar los reactantes utilizados, son más sensibles y requieren de poco equipo, además de que se pueden encontrar comercialmente, otras variantes de inmunoensayos son:

1.8.9. ENSAYOS DE PRECIPITACIÓN:

En un medio en el que se encuentra un antígeno y un anticuerpo, y alguno de los dos está en exceso, en ambos casos se une el que está en exceso a sitios ocupados del que no está en exceso, formando un complejo soluble. En el caso en el que ninguno está en exceso, entonces tanto el antígeno como el anticuerpo se unirán a moléculas adyacentes formando así un polímero antígeno-anticuerpo que precipita porque es débilmente soluble (ver Fig. 1.8.9.).¹²

Fig. 1.8.9.



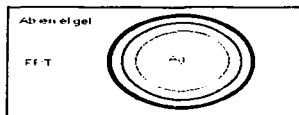
Inmunoensayo de precipitación
FUENTE (12)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.8.10. ENSAYOS DE DIFUSIÓN EN GEL:

En este ensayo se coloca un antígeno en un agar cubierto con un cristal, entonces las proteínas se difundirán en todas direcciones, si en el medio se encuentra el anticuerpo apropiado, entonces se formará un precipitado (ver Fig. 1.8.10.). El diámetro del radio del precipitado es directamente proporcional a la concentración del antígeno.¹²

Fig. 1.8.10.



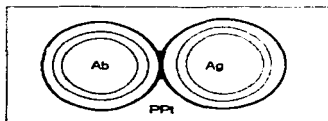
Principio de la inmunodifusión radial simple. El antígeno (Ag) es colocado en una placa cubierta con agar, el cual contiene el anticuerpo apropiado (Ab).

FUENTE: (12)

1.8.11. DIFUSIÓN DOBLE:

Se coloca una gota de antígeno en un pozo de agar y una gota de anticuerpo en un pozo adyacente, los dos se difunden hacia fuera y se unen formando un precipitado entre los dos pozos, el cual se manifiesta como una línea llamada "línea de precipitación". Su ventaja es que no requiere de un equipo especializado (ver Fig. 1.8.11.).¹²

Fig. 1.8.11.



Principio de la doble difusión en gel. Tanto el anticuerpo (Ab), como el antígeno (Ag) se difunden formando un precipitado (pp). FUENTE (12)

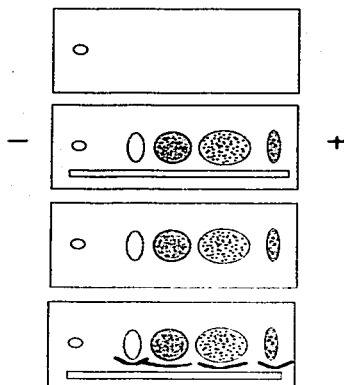
1.8.12. ELECTROFORESIS:

A un pH dado las proteínas adquieren cargas netas positivas o negativas, y pueden ser transportadas en una corriente eléctrica a un electrodo de carga opuesta. De este modo son separadas incrementando la sensibilidad en las reacciones de precipitación inmune.¹²

1.8.13. INMUNOELECTROFORESIS:

Los anticuerpos se separan electrofóricamente, después se colocan en agar junto con el antígeno, al cabo de 18 horas de incubación se observa una serie de arcos que precipitan, (ver Fig. 1.8.12.). Esto corresponde a las diferentes reacciones anticuerpo/antígeno que tienen lugar en la placa.¹²

Fig. 1.8.12.



Principio de la inmunoelectroforesis (IEP). En el primer cuadro el antígeno es colocado en el gel de agar, en el segundo es sometido a electroforesis, en el tercero se agrega el antisuero en un corte del agar y en el cuarto se forman una serie de arcos que precipitan. FUENTE (12)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.9. MICROORGANISMOS ESTRESADOS

Los microorganismos estresados son aquellos que son sometidos a condiciones poco favorables para su crecimiento, es decir, condiciones adversas. Los microorganismos que están sujetos a estrés ambiental pueden volverse estructural o metabólicamente dañados o heridos. Los organismos dañados están manifestados por su inhabilidad para replicar en medios selectivos mas que los organismos tolerantes no dañados.³⁰ Dichas condiciones estresantes o de alteración se presentan cuando las bacterias contenidas en un alimento sufren cambios en su ambiente. El daño puede resultar de muchos procesos alimenticios y métodos de manejo, incluyendo el tratamiento térmico, la refrigeración, congelación, secado e irradiación, o de exposición a preservativos, acidez o baja actividad de agua.³⁹

Al ser modificado alguno de los factores anteriores, las bacterias sufren daño a nivel de membrana y por lo tanto dejan de desarrollarse normalmente, a ese daño se le denomina daño subletal.

Muchos tratamientos usados en el procesamiento de alimentos y combinaciones de éstos pueden inducir daño subletal a células o esporas. Muchas modificaciones celulares y moleculares pueden ocurrir en las células dañadas. La extensión del daño subletal y el mecanismo del daño varía y puede ser relacionada a las condiciones de estrés. También, más de un sitio de daño puede ocurrir en la célula bacteriana por un tipo particular de tratamiento subletal.²⁵

Sin embargo también existen otras causas que pueden hacer más susceptible al estrés a una bacteria. Cuando los microorganismos entéricos que habitan en el intestino del hombre y de animales de sangre caliente al ser descargados en las heces están sujetos a condiciones de estresantes, por ejemplo, ambientes acuáticos, resultando en daño subletal o muerte.³¹ Las superficies de equipos que han sido sanitizados, así como el agua usada en el procesamiento de alimentos o limpieza de equipo, puede contener microorganismos dañados.³⁴

Las condiciones de crecimiento, antecedentes tales como edad fisiológica, velocidad de crecimiento, limitación de nutrientes y temperatura pueden influir en la susceptibilidad de los microorganismos al estrés. Por ejemplo *E. coli* cultivada bajo diferentes condiciones de oxígeno puede variar en su respuesta al estrés y resulta en la recuperación alterada.³¹

Sin embargo, hasta ahora muchos de los métodos aceptados usados para el aislamiento y enumeración de microorganismos en alimentos no permite reparar el estado de daño de algunos microorganismos y por ésto falla su detección. Los organismos dañados son potencialmente tan importantes como sus contrapartes normales. En un ambiente favorable, los microorganismos vegetativos dañados pueden resucitar y volverse funcionalmente normales.³⁴

Los medios selectivos contienen componentes que no permiten la enumeración o aislamiento de un microorganismo estresado, ya que inhiben su proceso de reparación pues resultan tóxicos y pueden llegar a causar la muerte del organismo dañado. Esto sugiere que cuando un medio deba ser usado, los microorganismos dañados en las muestras deben ser permitidos para regenerar en un ambiente apropiado previo a su exposición a un medio selectivo. Las esporas bacterianas, así como las células vegetativas dañadas, exhiben propiedades únicas como un resultado del daño celular inducido durante la exposición a las condiciones ambientales.³⁴

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las investigaciones han indicado que, para las células vegetativas dañadas, independientemente de la naturaleza del estrés impuesto en una población microbiana, (a) el daño es reparado cuando los organismos dañados son mantenidos en un ambiente apropiado, (b) la temperatura óptima y el tiempo requerido para reparar puede variar con la naturaleza del estrés, (c) las células reparadas completamente recuperan su resistencia normal a los agentes selectivos en el medio, y (d) el proceso de reparación debe preceder a la multiplicación celular. Por lo tanto es deseable permitir a las células estresadas reparar cualquier daño antes de ser aisladas o enumeradas por los procedimientos usuales en el medio selectivo.³⁰

No sólo el procesamiento, el almacenaje y las técnicas de manejo de los alimentos ejercen estrés en los microorganismos. También ciertas técnicas usadas durante el análisis puede infligir daño en los organismos presentes en una muestra. Los efectos de ciertos ingredientes, velocidad y temperatura de rehidratación de alimentos desecados, velocidad de deshielo de alimentos congelados, temperatura de un medio en placa, pueden ejercer estrés en los microorganismos presentes en una muestra y afectar su detección, especialmente para procedimientos selectivos. El grado de daño incurrido en los organismos durante el procesamiento, almacenamiento y manejo de alimentos afectan su habilidad para reparar bajo un juego dado de condiciones. Esto puede resultar en diferencias en los requerimientos nutricionales, así como en el tiempo y temperatura requeridos para reparar.³⁰

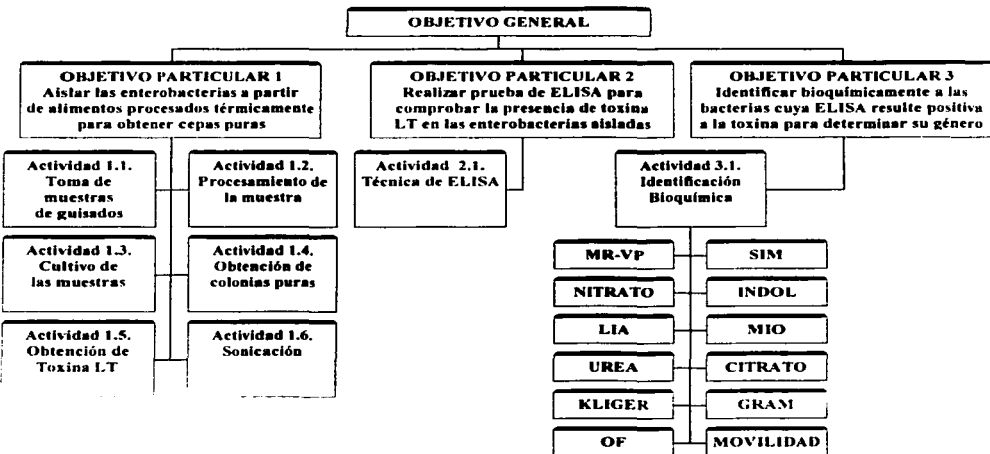
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EXPERIMENTACIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 2. ETAPA EXPERIMENTAL

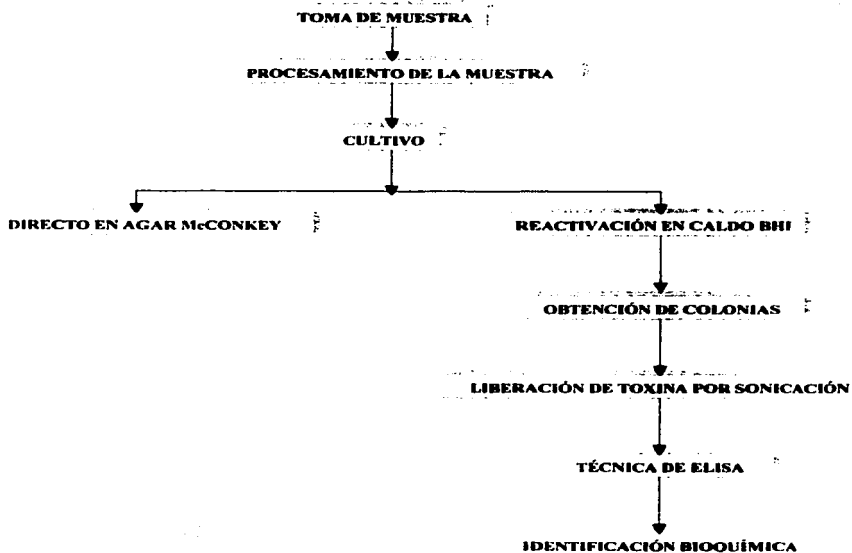
2.1. CUADRO METODOLÓGICO



FUENTE: (PROPIA)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2.2. DIAGRAMA DE BLOQUES ETAPA EXPERIMENTAL



FUENTE (PROPIA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.1. REACTIVOS:

PBS
Tween 20
Leche en polvo descremada
Antisuero
Conjugado
Sustrato
Buffer de fosfatos
Peróxido de hidrógeno
Ácido sulfúrico
Buffer de carbonatos
Reactivo de Kovac's
Solución rojo de metilo

2.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

Agar Mac Conkey
Caldo y agar BHI (Infusión Cerebro-Corazón)
Agar Hierro Lisina (LIA)
Medio Sim (Para Sulfuro, Indol y Movilidad)
Agar Citrato de Simmons
Caldo MR-VP (Rojo de Metilo-Voges Proskauer)
Caldo Malonato
Caldo Urea

2.1.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los alimentos muestreados son aquellos destinados al consumo de infantes en una guardería o estancia infantil del gobierno, cuyas edades fluctúan entre 1 y 2 años. Los alimentos fueron diferentes tipos de guisados elaborados dentro de la misma estancia, los cuales se enlistan a continuación junto con su respectiva clasificación. Esta clasificación se realizó con la finalidad de facilitar su identificación:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2.3.1. Clasificación asignada a los diferentes tipos de guisados

Tipo de Guisado	Clasificación	Tipo De Guisado	Clasificación
Jamón con verduras	CJV	Ensalada de atún	CEA
Queso tipo Chihuahua	1.QTCH	Torta de carne de res	CTR
Pescado empanizado	CPE	Carne de res con papas	CRP
Albóndigas con jitomate	CAJ	Carne de res para tacos	CRT
Pechuga con verduras	CPV	Pollo guisado con calabacitas	CPGC
Calabazas con crema	VCC	Hígado de res con cebolla	CHRC
Lengua de res guisada	CLRG	Pollo con chícharos	CPCH
Pollo con champiñones	CPCH	Pollo a la mexicana	CPM
Lengua de res con verduras	CLRV	Pollo con consomé	CPC
Sandwich de jamón con queso	CSJQ	Frijoles refritos	OFR
Pollo al perezjil	CPP	Pollo guisado con verduras	CPGV
Tortas de papa	VTP	Carne molida	CM
Jamón en caldillo de jitomate	CJCJ	Pechuga de pollo frita	CPF
Mantequilla comercial	LMCH	Carne molida con vegetales	CMV
Picadillo	CP	Crema comercial	LCCH
Bistec a la mexicana	CBM	Atún con vegetales	CAV
Calabacitas en caldillo de jitomate	VCCJ		

FUENTE (PROPIA)

2.1.4. TOMA DE MUESTRA:

Se tomaron 61 muestras de aproximadamente 50 a 100 g cada una, de cada guisado elaborado, y se vaciaron en bolsas de polietileno estériles. Cada bolsa se selló y se etiquetó con los datos de la muestra para trasladarla en refrigeración al laboratorio y proceder a su análisis, los datos de cada muestra fueron los siguientes:

CLAVE: VCCJ25599**DESCRIPCIÓN:** Calabacitas en caldillo de jitomate. La "V" es por que se trata de un guisado a base de verduras.**ELABORÓ:** Personal del comedor de la estancia infantil de gobierno**FECHA DE ELABORACIÓN:** Fecha en que se elaboró el alimento (25 de mayo de 1999)**HORA DE TOMA:** 12:00 horas**DIA DE TOMA:** 25 de mayo de 1999**TRANSPORTE:** Refrigerada**TEMPERATURA DE LLEGADA:** 10°C

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2.1.5. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA:

Las muestras se procesaron en el laboratorio de Bacteriología de Posgrado en la FES Cuautitlán Campo 1.

Cada bolsa con la muestra a analizar se desinfectó por fuera con alcohol para evitar la contaminación externa.

Una vez abierta la bolsa se procedió a registrar la temperatura con termómetro desinfectado con alcohol y agua destilada estéril.

2.1.6. CULTIVO DE LA MUESTRA:

Como se aprecia en el diagrama de bloques 2.1., el cultivo de cada muestra se realizó por duplicado, es decir cada muestra se sembró de dos formas, una llamada Directa en agar McConkey y otra denominada Reactivación en caldo BHI:

DIRECTA EN AGAR McCONKEY: Se realizó tomando una asada de la muestra y se sembró por estrias directamente sobre agar McConkey. Esto se hizo con la finalidad de asegurar que los microorganismos obtenidos en la Reactivación eran los microorganismos estresados durante la preparación del alimento.

Si el crecimiento microbiológico es alto (mas de 10 colonias por caja), entonces la muestra es descartada en la Reactivación.

REACTIVACIÓN EN CALDO BHI: Se tomaron 25 gramos de la muestra y se sembraron en 100 ml de caldo BHI estéril, homogeneizando la muestra en el caldo. Dicha reactivación es gracias al empleo del caldo BHI (Infusión de cerebro y corazón), el cual es un medio rico en nutrientes y por lo mismo puede crecer casi cualquier bacteria, incluso mohos y levaduras.

2.1.7. OBTENCIÓN DE COLONIAS:

De cada muestra se sembró una asada del caldo BHI al agar BHI por estrias para obtener colonias, las cuales son blancas y no diferenciadas entre sí.

Las bacterias que en este caso interesan son las bacterias entéricas o enterobacterias, y como se muestra en el diagrama, su obtención se logra por medio de la siembra de las colonias obtenidas en un medio selectivo diferencial, como lo es el agar McConkey. Por lo tanto se sembraron de forma estriada. En este medio se obtienen colonias de color rosa a rojo, característico de bacterias lactosa positivo. De cada una de las cajas de agar McConkey se tomaron cinco colonias y se resembraron en agar McConkey nuevo para ser analizadas posteriormente en su capacidad de producir toxina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.1.8. OBTENCIÓN DE TOXINA:

De cada caja de agar McConkey se tomaron apequeñas asadas de cada colonia y se sembraron por separado en tubos de rosca conteniendo 2 ml de caldo BHI esterilizado previamente. Posteriormente, a las 24 horas de incubación los caldos se resebraron en caldo nuevo y se volvieron a incubar a 37 ° C. Esta resiembra se repitió dos veces mas.

Al cabo de obtener cuatro siembras en caldo, éste se centrifugó a 2500 RPM durante 10 minutos a 4 ° C, con la finalidad de separar la mayor cantidad de células del caldo, las cuales quedan en el fondo del tubo. Se separó el caldo de las células por decantación.

2.1.9. SONICACIÓN:

En la sonicación se sometieron a ondas sónicas a las células por medio de la introducción de una aguja especial de acero inoxidable unida a un equipo, para lograr con ello la ruptura de las mismas y así liberar la toxina contenida en ellas.

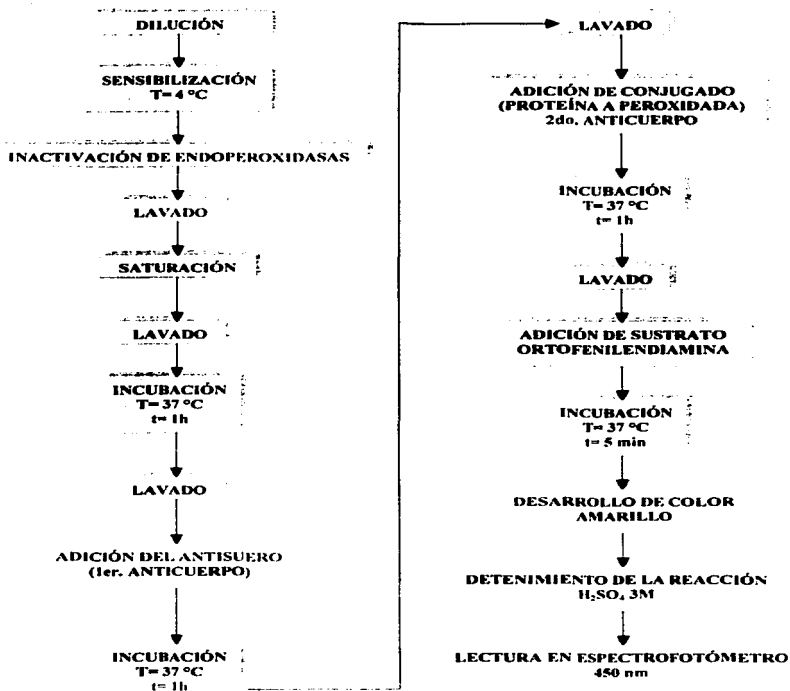
La producción del sonido se logró por medio de un equipo (Ultrasonic Homogenizer, Cole Parmer Instrument Co. Chicago Illinois 60648. Serie 4710). Al encender el equipo, la aguja produce un sonido que rompe la pared bacteriana.

La sonicación se hizo en frío para evitar el calentamiento del tubo, sumergiéndolo en hielo. También se tuvo cuidado de introducir la aguja en el centro del tubo para evitar la rotura del tubo.

La intensidad del sonido fue de 100 a 120 Hertz durante 1 minuto. Posteriormente a la sonicación, los tubos se centrifugaron en frío a 2500 RPM durante 10 minutos. Nuevamente se separó por decantación el sobrenadante de las células compactadas al fondo. En esta ocasión el sobrenadante se guardó en pequeños viales estériles, se etiquetaron y se guardaron en congelación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.3. DIAGRAMA DE BLOQUES TÉCNICA DE ELISA



FUENTE: (39)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

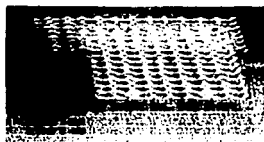
2.2.1. TÉCNICA DE ELISA (SISTEMA DE ENSAYO INMUNSORBENTE CON ENZIMA ACOPLADA):

Esta técnica consiste en determinar la presencia de la toxina LT liberada por la sonicación de los cultivos problema por medio de la reacción antígeno-anticuerpo, donde el antígeno es la toxina problema y el anticuerpo es la antitoxina de un conejo inoculado previamente con la toxina LT de *E. coli*.

A continuación se describe el procedimiento para la realización de la técnica de ELISA, así como la preparación de cada uno de sus reactivos.

Para el desarrollo de la técnica se empleó una microplaca de plástico desechable con 96 pocillos (ver Fig. 2.2.1.), y se tuvo cuidado de tomarla siempre con las manos por los lados sin tocarla por la parte de abajo, ya que la grasa de los dedos se queda adherida a la placa dando lugar a un error en la lectura espectrofotométrica. Cada muestra se analizó por duplicado, así como también los controles de la prueba (ver Fig. 2.2.2.).

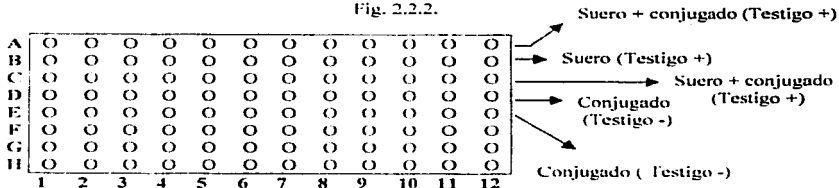
Fig. 2.2.1.



Placa de microtitulación

FUENTE (20)

Fig. 2.2.2.



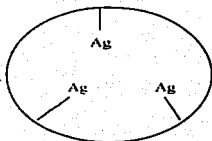
Representación de la microplaca de titulación

FUENTE (PROPIA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- DILUCION DE LA MUESTRA:** Se realizó una dilución 1:10 de la muestra en buffer de carbonatos, colocando 10 μL de muestra por cada 90 μL de buffer de carbonatos a cada pozo. Primero se vaciaron los 90 μL de buffer y luego 10 μL de muestra (Toxina).
- SENSIBILIZACIÓN:** Las muestras diluidas se incubaron toda una noche a 4 °C con la finalidad de permitir que el antígeno (Ag o Toxina) se uniera a los pocillos elegidos (ver Fig. 2.2.3.).

Fig. 2.2.3.



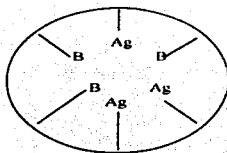
Pozo sensibilizado con antígeno (Ag)

FUENTE: (PROPIA)

- INACTIVACION DE ENDOPEROXIDASA:** Se eliminó la muestra no fijada mediante lavados con PBS-Tween y posteriormente se adicionaron 10 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a una concentración de 3%, se dejó agitar durante 5 minutos.
- LAVADO:** Se decantó el líquido y se lavó con PBS-Tween al 0.05%, adicionando 100 μL por pozo de éste. Se agitó durante 3 minutos y se eliminó el líquido. Se repitió la operación de lavado cinco veces.
- SATURACION:** Se agregaron a los pozos vacíos 100 μL por pozo de leche descremada en polvo marca Svelty diluida al 3% en PBS, esto es para saturar los espacios vacíos que quedaron en los pozos. (ver fig 2.2.4.).
- LAVADO:** Se repitió el paso 4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2.2.4



Pozo saturado con antígeno (Ag) y leche descremada (B)

FUENTE: (PROPIA)

6. **INCUBACIÓN:** Se incubó la placa a 37 °C durante una hora.
7. **LAVADO:** Se repitió el paso 4.
8. **ADICION DEL ANTISUERO (PRIMER ANTICUERPO):** A los pozos ya lavados y vacíos se adicionaron 100 µL a cada uno de antisuero diluido a 1:1800 en solución de PBS
9. **INCUBACIÓN:** Se incubó la placa a 37 °C durante una hora
10. **LAVADO:** Se repitió el paso 4
11. **ADICION DEL CONJUGADO (SEGUNDO ANTICUERPO CON PROTEÍNA A PEROXIDADA):** A cada uno de los pozos lavados y vacíos se les adicionaron 100 µL del conjugado diluido a 1:256 en solución de PBS
12. **INCUBACIÓN:** Se incubó la placa a 37 °C durante una hora
13. **LAVADO:** Se repitió el paso 4
14. **ADICION DEL SUSTRATO (ORTOFENILENDIAMINA):** El sustrato se preparó al momento de ser utilizado; y se diluyó una tableta de 1 mg en buffer de fosfatos. A la solución de buffer se le agregaron 40 µL de H₂O₂ al 30 % por cada 100 µL de solución después de diluir la tableta. Una vez disuelta la tableta, a cada pozo se le agregaron 100 µL de la solución y la placa se incubó por unos minutos hasta que se desarrolló color entre amarillo y café en el control positivo.
15. **INCUBACIÓN:** Se incubó la placa a 37 °C por 5 minutos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-
- 16. DETENIMIENTO DE LA REACCIÓN:** Una vez desarrollado el color, la reacción se detuvo con 50 ó 100 μ L. por pozo de H_2SO_4 3M.
- 17. LECTURA:** Se leyó la placa en un espectrofotómetro (Microplate Reader, Biorad, Model 450) a 450 nm, calibrando primero el equipo con una placa vacía y limpia. (Ver Fig. 2.10.1.)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SSA

RESULTADOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 3. RESULTADOS

Se tomaron un total de 61 muestras alimenticias, de las cuales se obtuvieron 5 cepas por cada muestra, dando un total de 305 cepas analizadas.

Las muestras alimenticias se clasificaron en 4 diferentes tipos de guisados, de acuerdo a su base principal como son: guisados a base de carne, guisados elaborados a base de verduras, lácteos y oleaginosas.

En la tabla 3.1.1. se muestra la clasificación de las cepas, de las cuales 217 resultaron negativas en los guisados elaborados a base de carne, 27 cepas resultaron sospechosas y sólo 3 fueron positivas en la técnica de ELISA. Para los guisados elaborados a base de verduras, 10 cepas resultaron negativas, 1 sospechosa y 2 positivas. En cuanto a los lácteos, únicamente se obtuvieron 9 cepas negativas en la técnica de ELISA y no hubo cepas sospechosas o positivas. Por otro lado, en los guisados elaborados a base de oleaginosas se obtuvieron 3 cepas negativas y sólo 2 sospechosas, sin obtener ninguna cepa positiva a ELISA.

Como lo indica la tabla 3.1.1., el total de las cepas negativas es de 239, le siguen las cepas sospechosas con 30 y por último están las cepas positivas con sólo 5.

Del total de las cepas representadas (ver Gráfica 3.1.1.), sólo 274 son las resultantes en el análisis, quedando 30 cepas como descartadas, de las cuales 25 fueron obtenidas de guisados a base de carne y las 5 restantes, se obtuvieron de guisados elaborados a base de verduras; una cepa se reporta como perdida durante el análisis. Sumando todo se obtiene el resultado final de 305 cepas obtenidas de 61 alimentos muestreados.

Tabla 3.1.1 CEPAS POSITIVAS A LT

NEGATIVAS	217	10	9	3	239
SOSPECHOSAS	27	1	0	2	30
POSITIVAS	3	2	0	0	5
DESCARTADAS	25	5	0	0	30

FUENTE: (PROPIA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 3.1.2. se presentan resultados expresados en porcentajes de cada uno de los diferentes tipos de guisados.

Como se puede apreciar, las cepas negativas ocupan el mayor porcentaje con 71.14% para los guisados elaborados a base de carne, le siguen en orden descendente las cepas sospechosas con 8.85% y sin contar las cepas descartadas, le siguen las cepas positivas: ocupando el 0.98% del total de las cepas obtenidas.

En cuanto a los guisados a base de verduras, las cepas negativas ocupan también el mayor porcentaje, con 3.27%, le siguen, sin contar a las descartadas, las cepas positivas con 0.65%, quedando en último lugar las cepas sospechosas con 0.32%.

Para los lácteos, sólo resultaron negativas a ELISA el 2.95% del total de las cepas, sin resultar ninguna cepa positiva o sospechosa.

En lo relativo a los guisados elaborados a base de oleaginosas, el 0.98% es el mayor porcentaje ocupado por las cepas negativas y el menor es 0.65% para las sospechosas, sin resultar ninguna cepa positiva.

Por lo que respecta a las cepas descartadas del análisis; se reportaron 31. de las cuales, 25 pertenecen a guisados elaborados a base de carne, ocupando el 8.19%, 5 se obtuvieron de un guisado elaborado a base de verduras, con el 1.63% y una se reportó como perdida durante el análisis, específicamente en el paso de la sonicación; la cual representa el 0.32%. Cabe mencionar que dichas cepas descartadas son resultantes de 6 muestras de guisados, de los cuales 5 fueron elaborados a base de carne y uno a base de verduras.

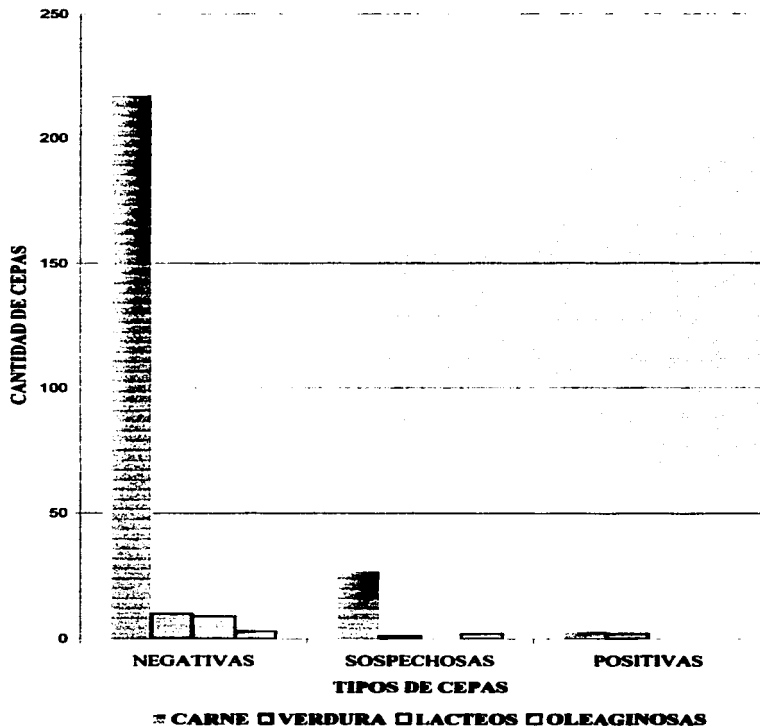
Del total de las cepas visualizado en la tabla 3.1.2. se puede mencionar que, como ya se puntualizó anteriormente, el mayor porcentaje lo ocupan las cepas negativas y el menor corresponde a las cepas positivas, por lo que, sumando los totales de cada porcentaje obtenemos un gran total de 99.61%, a lo cual se le suma el porcentaje correspondiente a la cepa perdida, dando el total final de 99.93%.

Tabla 3.1.2. CEPAS POSITIVAS A LT EXPRESADA EN PORCENTAJES

NEGATIVAS	71.14	3.27	2.95	0.98	78.34
SOSPECHOSAS	8.85	0.32	0	0.65	9.82
POSITIVAS	0.98	0.65	0	0	1.63
DESCARTADAS	8.19	1.63	0	0	9.82

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3.1.1. CEPAS RESULTANTES DE LA TECNICA DE ELISA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se realizó la identificación bioquímica solamente a aquellas cepas que resultaron positivas a la técnica de ELISA, es decir, a las que según el Sistema de Ensayo Inmunsorbente con Enzima Acoplada son microorganismo productores de Toxina Termolábil L^T.

Los resultados se encuentran expresados en la tabla 3.1.3., donde se los tipos de pruebas bioquímicas realizadas y los resultados obtenidos de cada una.

Tabla 3.1.3. RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS POSITIVAS A LT

CEPA	MIR	VE	SIM	STRATO	INDOL	LEA	MIO
28-5	-	-	-	-	-	+	+
15-1	-	-	-	-	-	+	+
25-3	-	+	-	-	-	+	+
25-1	-	+	+	+	-	+	+
15-2	-	+	+	+	-	+	+

CEPA	UREA	KELC	ONIDASA	MOBILIDAD
28-5	-	+/-	-	-
15-1	-	-	-	-
25-3	-	-	-	-
25-1	-	-	-	+
15-2	-	-	-	-

CEPA	ADONITOL	CATALASA	CITRATO
28-5	+	+	-
15-1	+	+	-
25-3	+	+	-
25-1	+	+	+
15-2	+	+	+

ESTA TESIS NO SALI

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se leyeron los resultados bioquímicos obtenidos y mediante tablas establecidas, se obtuvieron los tipos de bacterias, tanto género como especie de cada una, al que pertenecen las cepas.

Los resultados se desglosan en la tabla 3.1.4., donde se puede ver que de la cepa número 5 de la muestra 28 de pechuga con verduras se obtuvo *Enterobacter cloacae*, así como de la cepa número 1 de la muestra 15 de jamón con verduras.

De la cepa 3 de la muestra 25 de calabacitas con crema se logró identificar a la bacteria *Proteus spp.*

Por último de la cepa 1 de la muestra 25 de las mismas calabacitas con crema, así como de la cepa 2 de la muestra 15 de jamón con verduras, se aisló la bacteria *Serratia rubidea*.

Tabla 3.1.4. TIPOS DE CEPAS OBTENIDAS DE LA IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

28-5	<i>Enterobacter cloacae</i>	Carne
15-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	Carne
25-3	<i>Proteus spp</i>	Verdura
25-1	<i>Serratia rubidea</i>	Verdura
15-2	<i>Serratia rubidea</i>	Carne

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 4. DISCUSIÓN

Considerando que los alimentos son consumidos por niños muy pequeños, se debe tener en cuenta la higiene con que se preparan, los tratamientos, sobre todo los térmicos a los que son sometidos, vigilar que sean los adecuados y que las condiciones de almacenamiento cumplan con lo necesario para evitar un posible desarrollo microbiano, ya que se han reportado muchos casos de enfermedades diarreicas que afectan mayoritariamente a niños. Por ejemplo Restaino (1980), quien fue el primero en reportar un brote de *Yersinia enterocolitica*, dice que "Solo un brote causado por *Yersinia enterocolitica* ha sido documentado, aunque las fuentes alimenticias estuvieron implicadas con otros brotes, ocurrió una enfermedad en una escuela de niños en el condado de Oneida, Nueva York. La leche de chocolate estuvo determinada como el vector de transmisión. El serotipo 0:8 fue aislado de un cartón de leche sin abrir y de niños hospitalizados."²³ La Doctora Prado y colaboradores señalan que "... los *E. coli* ocupan un lugar destacado entre los agentes causales del síndrome diarreico agudo en niños. Además se ha podido comprobar que son los responsables de la llamada diarrea del turista..."²⁴

La recuperación de bacterias inhibidas de alimentos procesados es muy importante, se recuperaron bacterias dañadas o comúnmente reportadas en la literatura como bacterias alteradas, en alimentos procesados. Los tratamientos a los que son sometidos los alimentos, tales como calor, frío, cambio de pH, acidez, presión, condiciones de oxígeno, actividad de agua, etc., pueden crear condiciones de alteración para las bacterias, que pueden causarles daño subletal, como lo afirma Restaino (1980), "Muchos tratamientos usados en el procesamiento de alimentos y combinaciones de tratamientos pueden inducir daño subletal a células o esporas..."²⁵ También se puede llegar a ocasionar la muerte del microorganismo, como lo explica Kounev (1989) "Es bien sabido que las temperaturas pueden afectar a los microorganismos de diferentes formas, pero en algunas instancias puede destruir completamente a la bacteria". El daño sufrido por el microorganismo puede ocasionar cambios o alteraciones en el metabolismo celular, o producir ruptura en la membrana celular.

Por lo tanto, para recuperar a los microorganismos se requirió del empleo de un medio de cultivo en el cual se pudieran reparar del daño sufrido, dicho medio empleado fue el caldo BHI (Infusión Cerebro y Corazón), ya que con base al estudio de Restaino (1980), es un medio simple y no selectivo "Las condiciones o tratamientos especiales son, requeridos para regresar a las células a su estado normal. Las células dañadas son capaces de reparar y multiplicarse en un medio no selectivo."²⁶ El hecho de recuperar a un microorganismo que ha sido inhibido de alguna forma, implica que tiene que ser reparado primeramente antes de ser sometido a un ambiente selectivo. Nuevamente Restaino (1980) señala la importancia de esto "Muchos investigadores han enfatizado lo indispensable de la reparación o resucitación de células bacterianas dañadas antes de que las células sean expuestas a componentes selectivos. Los microorganismos dañados subletalmente poseen características de crecimiento alteradas."²⁷

También Allen y colaboradores (1991) mencionan que "Los métodos de cultivo estándar para la detección de *Salmonella* generalmente consisten de los siguientes pasos: preenriquecimiento por 24 horas; enriquecimiento selectivo por 24 horas siembra en placa selectiva por 24-48 horas; y confirmación bioquímica y serológica de colonias sospechosas."³² En comparación, se efectuaron enriquecimientos para activar a las

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GIA

DISCUSIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

bacterias alteradas antes de sembrar las muestras en agar McConkey, el cual es selectivo, y las condiciones de incubación fueron por 24 horas a 37 °C, al igual que Allen y colaboradores (1991). Doyle y Hugahl (1983) emplearon dos métodos de recuperación de *Y. enterocolitica*, uno que es enriquecimiento en frío (4 °C por 14 o 21 días) en solución de fosfato boferada (PBS) y otro más rápido, el enriquecimiento selectivo en Caldo Rappaport modificado (MRB) (a temperatura del cuarto por 2 días) "...encontraron que el enriquecimiento en PBS seguido por el tratamiento con álcali diluido recuperó el mayor número de organismos..."³⁶. En contraste, se optó por utilizar el caldo BHI como un medio de enriquecimiento, la temperatura empleada fue de 37 °C y se realizó el enriquecimiento en caldo BHI.

En cuanto a los microorganismos que no fueron alterados, pero que se encontraban en los alimentos muestreados, es decir, los microorganismos que crecieron en el cultivo realizado directamente en agar McConkey no fueron analizadas. Cabe mencionar que la contaminación de dichos alimentos pudo tener lugar después de la preparación, lo que se debió probablemente a una mala manipulación del alimento por parte de las personas que lo elaboraron, como por las personas que lo muestrearon.

Haciendo una comparación con la Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos: "Este procedimiento puede aplicarse a agua potable, agua purificada, hielo y alimentos procesados térmicamente, así como a muestras destinadas a evaluar la eficiencia de prácticas sanitarias en la industria alimentaria. Este procedimiento debe seleccionarse cuando la densidad esperada es como mínimo de una bacteria en 10 ml de producto líquido o una bacteria por gramo de alimento sólido." Todas las muestras, incluyendo las cepas descartadas quedaron dentro de esta norma puesto que la cantidad de alimento en la mayoría de las muestras era en promedio de 100g.

En contraste con la Norma Oficial Mexicana NOM-F-1989. Leche Pasteurizada que establece que el límite máximo de Organismos coliformes es de 10, las cepas descartadas no quedan dentro de esta norma.

Para la detección de la toxina LT producida por varias bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, primero se determinó romper a las células bacterianas sometiéndolas a sonido, para así poder liberar dicha toxina. Tomando como referencia a Gougeon y colaboradores (1997) quienes describen que "... las bacterias crecieron bajo condiciones aeróbicas por 18 horas a 37 °C en agar soya triplicasa. Los microorganismos que crecieron se sonicaron en un Sonicador Cell Disrupter por 10 minutos; la suspensión obtenida fue centrifugada por 30 minutos a 4 °C, y el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro Millipore..."¹¹; se sembró en caldo BHI, como ya se mencionó, con incubación de 24 horas a 37 °C y cada una de las cepas obtenidas se sonicaron, al igual que Gougeon y colaboradores (1997), en un sonicador Ultrasonica Homogenizer de Cole Parmer Instrument y posteriormente se centrifugaron. La separación del sobrenadante se hizo por decantación, el cual fue recuperado en viales estériles porque aquí estaba presente la toxina LT, cabe señalar que tanto la sonicación como la centrifugación se hicieron en frío, para evitar la posible pérdida de la toxina debido a que es termolábil.

La presencia de la toxina LT se determinó por medio la técnica de ELISA (Ensayo Inmunosorbente Ligado a Enzimas) por ser la mas sencilla y fácil de aplicar en el Laboratorio, además de que varios autores manifiestan que no es complicada y tiene una elevada sensibilidad. D'aoust y Sewell (1988) dicen que "Los métodos inmunológicos, incluyendo el anticuerpo fluorescente, serología de enriquecimiento, procedimientos de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ensayo de Enzima Inmunsorbente directo e indirecto (ELISA), han figurado predominantemente en la búsqueda por las herramientas de diagnóstico sensible y rápido.”²⁷

También Noah y colaboradores hablan de como “...el desarrollo de anticuerpos monoclonales ha hecho posible determinar la presencia de microorganismos en alimentos con un ensayo inmunoenzimático de enzima unida (ELISA) que puede detectar de 10^4 - 10^5 células/ml de muestra con pocos problemas de reactividad cruzada. Porque el procedimiento de ELISA puede detectar a los microorganismos de interés en cultivos mezclados, el ensayo es más rápido que otros métodos.”²⁶

Para su aplicación la técnica de ELISA requiere de hacer por duplicado o triplicado cada una de las pruebas para verificar los resultados finales, por lo que se empleó un segundo pocillo por cepa, colocando la misma cantidad de reactivos a cada uno.

Como ya se mencionó anteriormente, cinco cepas resultaron positivas a la técnica de ELISA y treinta cepas resultaron sospechosas a la misma técnica, por lo que se sugiere emplear un suero monoclonal para su estudio, pues aquí sólo se empleó un suero policlonal.

En el resultado de la identificación Bioquímica se obtuvieron las siguientes bacterias: *Enterobacter cloacae* (dos cepas) *Proteus spp.* (una cepa) y *Serratia rubideva* (dos cepas). Las cepas de *Enterobacter* y una cepa de *Serratia rubideva* fueron obtenidas de guisados elaborados a base de carne, las otras dos cepas restantes, fueron de guisados elaborados a base de verduras. Esto nos demuestra que no solo las bacterias mencionadas anteriormente pueden producir toxina LT, sino que hay otros microorganismos pertenecientes a la misma familia que también pueden producir dicha toxina. Gougeon y colaboradores (1997) dicen que “Especies de *Klebsiella oxytoca* (2), *Citrobacter freundii* (2), *Enterobacter cloacae* (1) y *Escherichia coli* (1) aisladas de agua ambiental fueron identificadas como especies productoras de enterotoxina termolábil LT por métodos inmunológicos y reacción en cadena de la polimerasa.”³¹ Es por esto que los microorganismos identificados mencionados son importantes porque pueden llegar a causar enfermedades diarreicas si se llegan a encontrar en los alimentos

Por todo lo anterior se puede enfatizar la importancia de la recuperación de microorganismos alterados de alimentos procesados, ya que dentro de éstos las bacterias pueden encontrar condiciones necesarias y suficientes para volver a activarse después de cierto tiempo, incluso algunos autores afirman que algunas bacterias son resistentes a condiciones estresantes severas “...un sobreviviente de la literatura indica que *Shigellae* no es particularmente frágil y que puede sobrevivir por varios días bajo condiciones adversas” Smith y Buchanan (1992).

También es importante la recuperación de microorganismos a nivel industrial porque podría ayudar a verificar que los tratamientos a los que son sometidos los alimentos, son efectivamente adecuados para la inhibición de las bacterias contenidas en ellos, ya que en algunos estudios se ha comprobado que las bacterias pueden volverse resistentes a ciertas condiciones de alteración, Mackey y Derrick (1986) en su estudio realizado reportaron que “Una secuencia fisiológica del choque térmico es una resistencia elevada al cambio subsecuente de calor...”¹⁷ Esto podría ser útil para verificar el transporte de los alimentos antes de ser procesados, como por ejemplo en la pasteurización de la leche. Nuevamente Mackey y Derrick (1986) dicen que “Células expuestas a temperaturas elevadas por períodos relativamente cortos pueden ser más resistentes al calor”¹⁷.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIÓN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO 5. CONCLUSIÓN

1. Se logró la recuperación de microorganismos patógenos de la familia *Enterobacteriaceae* por medio del empleo de caldo BHI y agar BHI (Infusión Cerebro-Corazón) después del tratamiento térmico normal de cocción de los alimentos. Esto indica que las bacterias pueden permanecer en un estado latente en los alimentos, y que al encontrar condiciones adecuadas, éstos pueden comenzar a desarrollarse nuevamente después de reparar el daño hecho por el tratamiento térmico principalmente.
2. Se determinó la presencia de la toxina LT de las bacterias recuperadas, la cual fue detectada por la técnica de ELISA.
3. Se identificaron bioquímicamente a las bacterias positivas en la técnica de ELISA, obteniéndose los siguientes géneros y especies: *Enterobacter cloacae*, *Proteus spp.* y *Serratia rubidea*, las cuales pueden llegar a ser importantes cuando se lleven a cabo estudios epidemiológicos.
4. Por los resultados encontrados, con respecto a la presencia de la toxina LT, además de *E. coli*, existe la posibilidad que otras Enterobacterias productoras de la toxina puedan causar también enfermedad diarreica en los niños que se encuentran en estancias infantiles por el consumo de alimentos contaminados.
5. Los alimentos deben conservarse en condiciones apropiadas después de ser preparados, y sobre todo si no van a consumirse inmediatamente.
6. El hecho de recuperar microorganismos estresados de alimentos procesados es importante porque puede indicar la efectividad del tratamiento al que es sometido el alimento, además de que puede ser útil en la verificación de las condiciones de almacenamiento del mismo.
7. Se recomienda emplear antisueros monoclonales contra estos microorganismos para establecer si las cepas encontradas como sospechosas producen toxina LT.
8. Se sugiere establecer el carácter patógeno de estas toxinas realizando pruebas biológicas o en cultivos de tejidos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

Identificación Bioquímica	I
Fundamentos de espectrofotometría	II
Composición de medio de cultivo utilizados	III
Soluciones empleadas en la técnica de ELISA	IV
Lista de abreviaturas	V
Lista de significado de palabras	VI

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

PRUEBAS DE FERMENTACIÓN DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

> PRINCIPIO

Esta prueba nos ayuda a determinar la capacidad de un organismo a fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado a un medio básico, produciendo ácido, o ácido con gas visible.

Las formas de fermentación son características de bacterias que fermentan la glucosa, como todos los miembros de las Enterobacteriaceae, así como de las que fermentan la glucosa y la lactosa, como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, grupos de *Enterobacter* y *Yersinia enterocolitica*.₃

> BASES BIOQUÍMICAS

Los hidratos de carbono se clasifican como: 1) monosacáridos, aldehídos polihidroxilicos o cetonas, 2) polisacáridos u oligosacáridos, productos de condensación de dos o más monosacáridos (polímeros de los monosacáridos), o 3) alcoholes polihidricos y ciclitoles (inositoles), productos de la reducción de los monosacáridos.₃

Un monosacárido o azúcar simple está compuesto generalmente por 1 a 6 carbonos: eritrosa, un azúcar con 4 carbonos (tetrosa), ribosa, xilosa y arabinosa, azúcares con 5 carbonos (pentosa), glucosa (dextrosa), fructosa (levulosa), galactosa y manosa, azúcares con 6 carbonos (hexosa).₃

Los disacáridos son polisacáridos (oligosacáridos) compuestos por unidades de monosacárido. Glucósido es un termino general que designa a un disacárido, sin tener en cuenta el azúcar que contenga.

El trisacárido rafinosa está compuesto por tres monosacáridos: glucosa, fructosa y galactosa.₃

Los alcoholes que colectivamente reciben el nombre de "azúcares" son el adonitol, dulcitol, manitol y sorbitol; todos son alcoholes polihidricos producto de la reducción de un monosacárido.₃

Los polisacáridos, trisacáridos y disacáridos son demasiado complejos para entrar en una célula bacteriana, por lo que primero son catabolizados en monosacáridos menos complejos por enzimas extracelulares (permeasas) de manera que pueden penetrar en la célula.₃

La fermentación es un proceso metabólico de oxidación-reducción *anaeróbico* en el cual un sustrato orgánico sirve como aceptor de hidrógeno final (aceptor de electrones) en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

lugar de oxígeno. La fermentación de los carbohidratos dan, por lo tanto, productos finales reducidos como oxidados.₃

El tipo de productos finales producidos por la fermentación de los hidratos de carbono depende de varios factores, como:

- Tipo de organismo que lleva a cabo el proceso de fermentación.
- Naturaleza del sustrato que debe ser fermentado.
- En ocasiones los factores ambientales como temperatura y acidez.

Los productos finales de la fermentación de los hidratos de carbono y los alcoholes denominados como "azúcares" son: gases hidrógeno y anhídrido carbónico; algunos pocos ácidos; algunos alcoholes y una cetona.₃

Algunas bacterias pueden fermentar anaeróbicamente la glucosa, otras la oxidan y otras la metabolizan por ambos métodos, mientras que otras no pueden utilizarla. Las bacterias que fermentan un hidrato de carbono son por lo general anaerobios facultativos.₃

Los productos finales característicos de la fermentación bacteriana son:

1. Ácido láctico
2. Ácido acético y fórmico
3. Ácido láctico y alcohol etílico (etanol)
4. Alcohol etílico (etanol)
5. Acetilmetilcarbinol (acetoina) y CO₂
6. Ácido succínico o ácido propiónico
7. CO₂ y acetona o alcohol isopropílico (isopropanol)
8. Ácido butírico o alcohol butílico (butanol)

El grupo coliforme puede dividirse en dos categorías: 1) las que producen diversos productos ácidos mixtos, y 2) las que producen butilenglicol como principal producto final.₃

Los microorganismos ácido mixtos producen los siguientes productos: ácidos fórmico, acético, láctico y succínico; etanol y CO₂ y H₂; pero no butilenglicol. El alcohol es formado por la fermentación alcohólica; el ácido láctico, el ácido acético y el CO₂ son formados por la fermentación láctica.₃

PRUEBA DE LA DECARBOXILASA (LISINA-ORNITINA-ARGININA)

➤ PRINCIPIO

Medir la capacidad enzimática de un organismo de descarboxilar un aminoácido para formar una amina, con la consiguiente alcalinidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estas pruebas se emplean fundamentalmente para determinar grupos bacterianos entre las Enterobacteriaceae. Los aminoácidos descarboxilados son la lisina, la ornitina y la arginina.3

➤ BASES BIOQUIMICAS

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo (-COOH), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico.

Las tres descarboxilasas importantes utilizadas para la identificación bacteriana son la lisina, la ornitina y la arginina. Estas descarboxilasas son formadas por un organismo solamente cultivadas en un medio ácido en presencia de un sustrato específico, y los productos de la descarboxilación provocan una desviación del pH hacia la alcalinidad. La descarboxilación está limitada a aquellos aminoácidos que poseen por lo menos un grupo químicamente activo que no sea una amina (-NH₂) o un grupo carboxil(-COOH), y la descomposición de los aminoácidos se produce anaeróbicamente.

El aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación para dar cadaverina (una diamina) y anhídrido carbónico por acción de la enzima específica lisina-descarboxilasa. El aminoácido L-ornitina es descarboxilado por la enzima ornitina-descarboxilasa para dar la diamina putrescina y anhídrido carbónico.

Se cultiva la bacteria estudiada en anaerobiosis recubriendo la superficie del medio con parafina o vaselina. Con el sellado de los tubos, todo el oxígeno no combinado es consumido por el organismo durante la fase de crecimiento inicial y durante la descarboxilación el pH del medio aumenta (hacia la alcalinidad) a medida que se produce anhídrido carbónico. Como el pH puede ser controlado, es posible incorporar un indicador, ya sea púrpura de bromocresol y/o rojo de cresol en el medio.3

PRUEBA DEL ÁCIDO SULFHÍDRICO

➤ PRINCIPIO

Determinar si se ha liberado ácido sulfhídrico (SH₂) por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre, produciendo una reacción visible de color negro.1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BASES BIOQUIMICAS

La proteólisis de las proteínas da aminoácidos individuales; algunas especies bacterianas heterotróficas son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que las contienen, produciendo el gas ácido sulfhídrico. La peptona, la cisteína, la cistina y el tiosulfato, son fuentes de azufre, pero las bacterias utilizan distintos compuestos o aminoácidos que contienen azufre para producir SH_2 . La enzima responsable es la cisteinasa. Los aminoácidos que contienen azufre son: Cistina, Metionina, Cisteína.

Un organismo que produce SH_2 cultivado en un medio orgánico como la peptona, reduce el azufre por hidrogenación, produciendo el gas SH_2 . Como la reacción se lleva a cabo en dos etapas es necesaria la presencia de dos indicadores: una sal llamada Citrato férrico de amonio, y una sustancia química: Tiosulfato de sodio; el medio recomendado es el agar Hierro de Kligler (AHK).

En la primera etapa la bacteria reacciona de manera reductiva con el tiosulfato de sodio, dando como resultado un sulfato y un sulfito. Para que la reducción del tiosulfato se lleve a cabo es necesaria la presencia de un medio ácido, el cual lo proporcionan dos hidratos de carbono; así, se lleva a cabo un proceso de respiración anaeróbica en el cual el azufre acepta electrones para la oxidación de los sustratos orgánicos. El tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) reemplaza al sulfato como aceptor de electrones y es una fuente de azufre para el organismo. El ácido sulfhídrico es un gas incoloro, por lo que es necesario emplear un segundo indicador para detectar su producción.

En la segunda etapa el SH_2 reacciona con una sal pesada, citrato férrico de amonio para producir un precipitado negro insoluble llamado sulfuro ferroso.

PRUEBA DEL INDOL

PRINCIPIO

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptófano.

BASES BIOQUIMICAS

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol (metilindol) e indolacético (IAA-indolacetato). Diversas enzimas intracelulares que intervienen en este proceso reciben el nombre colectivo de "triptofanasa", lo que indica un sistema completo de enzimas vinculadas con la producción del indol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PRUEBAS CON AGAR HIERRO DE KLIGER Y AGAR HIERRO TRIPLE AZUCAR

➤ PRINCIPIO

Determinar la capacidad de un organismo de atacar un hidrato de carbono específico incorporado en un medio de crecimiento básico, con producción o no de gases, junto con la determinación de posible producción de ácido sulfhídrico (SH_2).³

➤ BASES BIOQUIMICAS

El agar hierro de Kliger (AHK) y el agar hierro triplemente azucarado (AHTA) son medios diferenciales en tubo que sirven a un doble fin: 1) determinación de las fermentaciones de los hidratos de carbono, y 2) determinación de la producción de ácido sulfhídrico. Un organismo puede utilizar diversos sustratos incorporados en el medio; los diferentes sustratos metabolizados son utilizados para la diferenciación entre varios grupos, géneros o especies, sobre todo entre la familia *Enterobacteriaceae*.

En el medio AHK, algunos organismos tienen la facultad de fermentar ambos hidratos de carbono, otros fermentan solamente la glucosa; y otros no pueden fermentar ni glucosa ni lactosa. La fermentación del hidrato de carbono puede producirse con producción o no de gases ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$).

La fermentación se produce de forma aeróbica en el pico de flauta y anaeróbica en la capa inferior del cultivo. Las reacciones en AHK se usan básicamente para la identificación de miembros de las *Enterobacteriaceae* que son gramnegativos, catalasa positivos y que fermentan la glucosa en ácido.

- FERMENTACION ALCALINA /ACIDA

Esta se da después de las 18 a 26 h de incubación, es un pico de flauta alcalino y una capa profunda ácida. Esta reacción se observa en los organismos capaces de fermentar solo la glucosa; no son fermentadores de lactosa.

El pico de flauta es alcalino (rojo), lo que indica que se ha producido la degradación aeróbica de la glucosa. Después de la incubación, la baja concentración de glucosa ha sido consumida y el organismo comienza a utilizar las peptonas que se encuentran en el medio para obtener los nutrientes. El catabolismo de la peptona produce la liberación de amoníaco (NH_3) dando un pH alcalino que es detectado por el rojo de fenol.

En la capa profunda se observa un color amarillo debido a la degradación anaeróbica de la glucosa. Aquí la glucosa también es degradada después de 18 a 26 h

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de incubación: sin embargo, se forman productos terminales ácidos dando un pH ácido (color amarillo).

FERMENTACION ACIDA /ACIDA

Algunos organismos pueden fermentar la lactosa y la glucosa, dando una reacción en el medio de un pico de flauta alcalino y una capa profunda ácida, después de 18 a 23 h de incubación. La lactosa se encuentra en concentración del 1%, diez veces más que la glucosa. Después de la incubación, la lactosa todavía no se ha consumido y existe una condición ácida.

NO FERMENTACIÓN ALCALINA / ALCALINA; ALCALINA / SIN CAMBIO

Los bacilos no entéricos gramnegativos son incapaces de fermentar la glucosa o la lactosa. Estas bacterias se encuentran en el tracto intestinal junto con miembros de las *Enterobacteriaceae* y es necesario identificarlas como no entéricas. Dichos bacilos recurren a la peptona que contiene el medio de forma aeróbica o anaeróbicamente, dando dos posibles reacciones. Un organismo que da un pico de flauta alcalino y una capa profunda alcalina (alcalina/alcalina), degrada la peptona tanto aeróbica como anaeróbicamente. Una reacción de pico de flauta alcalino y sin cambio en la capa profunda (alcalina/sin cambio) es el resultado de un organismo que solo puede catabolizar la peptona en condiciones aeróbicas, por lo que solo el pico de flauta muestra cambio de color a rojo.

En resumen se puede interpretar una reacción en A11K de cuatro maneras:

Alcalina / ácida: Solamente es atacada la glucosa

Ácida / ácida: Son atacadas la glucosa y la lactosa

Alcalina /alcalina: No es atacada la glucosa ni la lactosa, se utilizan las peptonas

Alcalina / sin cambio: No son atacadas ni la glucosa ni la lactosa, se utilizan las peptonas

Los gases producidos son anhídrido carbónico e hidrógeno. La bacteria que produce se denomina *acrogénica*, lo que se manifiesta por el desdoblamiento del medio, una sola burbuja de gas, el desplazamiento total del medio del fondo del tubo dejando un área clara, o una ligera muesa del medio en el costado del tubo. La producción de gas se denomina *anaerogénica*.

Otra forma de diferenciación es la presencia de indicadores del ácido sulfhídrico en el medio: una sal, el citrato férrico de amonio y tío sulfato de sodio. El precipitado negro del sulfuro ferroso indica la producción de SH_2 , pero se puede ocultar la condición ácida en la capa superior del medio, por lo tanto, si se produce SH_2 es que existe una condición ácida, aunque no se observe.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PRUEBA DEL MALONATO

> PRINCIPIO

Determinar la capacidad de un organismo de utilizar malonato de sodio como única fuente de carbono, con la consiguiente alcalinidad.

> BASES BIOQUÍMICAS

El malonato es un inhibidor enzimático, inhibiendo a la enzima succinato-deshidrogenasa por inhibición competitiva. Esta enzima transfiere el hidrógeno a un compuesto aceptor adecuado en la conversión del ácido succínico en ácido fumárico. Pero esta reacción puede ser inhibida por un compuesto orgánico que estructuralmente es similar al sustrato normal, el ácido succínico. El ácido malónico es análogo al ácido succínico y compite por su lugar en la enzima.

El ácido malónico se une a la enzima, encerrando así los sitios activos de manera que la enzima no puede combinarse con su sustrato normal, el ácido succínico. Para la activación del sustrato es necesario un complejo enzima-sustrato, y si está bloqueada la activación no puede formarse un nuevo producto (ácido fumárico). El grado de inhibición esta en relación inversa con la proporción de concentración del inhibidor con el sustrato.

Una acumulación del ácido succínico debida a la inhibición del succinato-deshidrogenasa interrumpe el ciclo de Krebs, privando a algunos organismos de su fuente de energía, e interfiere en el ciclo del ácido glicólico, impidiendo la producción de nuevos intermediarios para la biosíntesis de nuevos compuestos necesarios para el metabolismo. El resultado es que un organismo es incapaz de crecer y reproducirse a menos que puede fermentar o utilizar el malonato de sodio como su única fuente de carbono. Si dicha reacción es esencial para la actividad metabólica de una bacteria, entonces el inhibidor malonato muestra una actividad antibacteriana.

< INTERPRETACIONES

- A Prueba positiva: color azul claro a azul de Prusia intenso en todo el medio.
- B Prueba negativa: no se observa cambio de color (verde) o amarillo (únicamente fermentación de la glucosa).

**TESIS CON
FALTA DE ORIGEN**

PRUEBA DEL ROJO DE METILO

➤ PRINCIPIO

Comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa, y vencer la capacidad amortiguadora del sistema. Además, es una prueba cualitativa de la producción de ácido (determinación del pH); algunos organismos producen más ácidos que otros

➤ BASES BIOQUÍMICAS

Esta prueba se basa en el empleo de un indicador del pH, rojo de metilo, para determinar la concentración de iones hidrógeno (pH) presente cuando un organismo fermenta la glucosa. Todos los miembros de las Enterobacteriaceae son, por definición, fermentadores de la glucosa. En el caldo Rojo de Metilo/Voges-Proskauer (RM/VP), después de 18 a 24 h de incubación, la fermentación resultante da productos secundarios metabólicos ácidos, por lo tanto, inicialmente todos los entéricos darán una reacción positiva con el rojo de metilo. Sin embargo, después de más tiempo de incubación (de 2 a 5 días), aquellos organismos que son rojo de metilo positivos continúan produciendo más ácidos, y dan como resultado un bajo pH terminal, venciendo al sistema amortiguador de fosfato y manteniendo un medio ácido (pH: 4.2 o menos).

Los organismos rojo de metilo negativos continúan metabolizando los productos iniciales de la fermentación por descarboxilación, produciendo acetilmetilcarbinol (acetoina) neutro, lo que da un elevado pH terminal que disminuye la acidez del medio, elevando el pH hacia la neutralidad (pH: 6 o más).

➤ INTERPRETACIONES:

- A. Prueba RM positiva: el cultivo es lo suficientemente ácido como para permitir que el reactivo rojo de metilo mantenga un definido color rojo (pH: 4.4) en la superficie del medio
- B. Prueba RM negativa: color amarillo (pH: 6) en la superficie del medio
- C. Reacción retardada: color anaranjado. Continuar la incubación hasta 4 días y repetir prueba.

<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

PRUEBA DE LA MOTILIDAD

➤ PRINCIPIO

Determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen motilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos (bacterias en forma de bastoncillos); sin embargo, algunas formas de cocos son móviles. A veces las bacterias con motilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles. Los organismos no móviles carecen de flagelos.

Directamente de los tubos con caldo BHI, se toma una gota con una asa estéril y se coloca en un cubreobjetos, se fija este a un portaobjeto con la ayuda de bolitas de plastilina, colocadas una en cada esquina del cubreobjetos. Se invierten el cubre y el portaobjetos unidos, y se observa al microscopio colocando un poco de aceite de inmersión en el cubreobjetos

➤ INTERPRETACIONES:

- A. Prueba positiva (motilidad): los organismos móviles cruzan en todo el campo visual del microscopio hasta que ya no se pueden observar.
- B. Prueba negativa (sin motilidad): los organismos no móviles no pueden atravesar todo el campo visual del microscopio, solo se mueven en un área determinada y son observables todo el tiempo.

PRUEBA DE REDUCCIÓN DEL NITRATO

➤ PRINCIPIO

Determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitrito o en nitrógeno libre.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

➤ BASES BIOQUÍMICAS

La reducción del nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-) y en gas nitrógeno (N_2) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. El oxígeno sirve como un aceptor de hidrógeno. La mayoría de las bacterias aeróbicas son anaerobios facultativos y sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno. En la reducción del nitrato, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas.

Las posibilidades del producto final de reducción del nitrato son muchas: nitrito (NO_2^-), amoníaco (NH_3), nitrógeno molecular (N_2), óxido nítrico (NO), óxido nítrico (N_2O), o hidroxilamina (R: NH:OH). El producto final de la reducción que se forme depende de la especie bacteriana. El más común es nitrógeno molecular por medio de la reducción del nitrito.

La reducción del nitrato en gas nitrógeno (N_2) u óxido nítrico (N_2O) se denomina desnitrificación. La reducción se manifiesta por la presencia de un producto final catabólico o la ausencia de nitrato en el medio.

➤ INTERPRETACIONES

1. Prueba positiva:
 - a) Color rosado a rojo intenso
 - b) Nitrato (NO_3^-) *reducido* a nitrito
 - c) Prueba completa.
2. Prueba negativa:
 - a) No se ha desarrollado color

PRUEBA DE OXIDACION-FERMENTACION

➤ PRINCIPIO

Determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

➤ BASES BIOQUÍMICAS

La utilización que una bacteria hace de los hidratos de carbono tiene lugar por alguno de dos procesos, de fermentación o de oxidación. Algunas bacterias son capaces de metabolizar un hidrato de carbono sólo aeróbicamente, mientras que otras lo hacen tanto aeróbia como anaeróbicamente. Las bacterias que pueden crecer, metabolizarse y reproducirse en condiciones aerobias como anaerobias se denominan anaerobios facultativos.

Por medio del proceso de fermentación un hidrato de carbono es fermentado y desdoblado en dos moléculas trisa de carbono que asu vez son convertidas en cierto número de compuestos con 1, 2, 3 o 4 carbonos. Los productos finales de este proceso de fermentación varían en cada especie bacteriana.

La oxidación de la glucosa es un proceso aeróbico y los oxidadores bacterianos de un hidrato de carbono no son degradados ni desdoblados en dos moléculas trisa de carbono; al contrario, el grupo aldehído es oxidado directamente en un grupo carboxilo formando ácido glucónico que es oxidado a su vez en un ácido 2- cetoglucónico.

La diferencia principal entre el metabolismo fermentativo y el metabolismo oxidativo de un hidrato de carbono depende de los requerimientos de oxígeno atmosférico y de la fosforilación inicial. La fermentación es un proceso aeróbico que requiere la fosforilación inicial de la glucosa previamente a su degradación, mientras que la oxidación, en ausencia de compuestos inorgánicos como nitrato y sulfato, es un proceso estrictamente aeróbico que comprende la oxidación directa de una molécula de glucosa no fosforilada (inicialmente). La fermentación produce una acidez más elevada que el proceso oxidativo.

➤ INTERPRETACIONES:

Además de la utilización de los hidratos de carbono, puede detectarse con un medio OF la producción de gases y la motilidad. Registrar la producción de gas y/o ácido y la reacción de motilidad de cada tubo utilizando las siguientes abreviaturas:

1. Reacciones con hidratos de carbono:

- a) Ácido: A
- b) Ácido y gas: AG
- c) Sin cambio o reacción alcalina: S(-) o -

2. Determinaciones OF:

- a) Fermentativa: F
- b) Oxidativa: O
- c) Ni oxidativa ni fermentativa. -

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

REACCION DE LA UREASA

➤ PRINCIPIO

Determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa.

➤ BASES BIOQUÍMICAS

El sustrato urea es una diamida del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamida. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución, la urea se hidroliza, dando carbonato de amonio como producto final.

La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Las enzimas bacterianas se clasifican en constitutivas o adaptivas. Una enzima adaptiva o inducida es aquella que es producida por una bacteria solamente cuando se encuentra presente su sustrato específico. La ureasa es considerada una enzima constitutiva dado que es sintetizada por ciertas bacterias sin tener en cuenta la presencia o ausencia de su sustrato, la urea.

Existen dos grandes divisiones de las enzimas: 1) hidrolasas que están vinculadas con la hidrólisis (agregado de agua) de los ésteres, hidratos de carbono, proteínas y amidas, y 2) las que están relacionadas con diversas reacciones de oxidación-reducción. La ureasa se clasifica como una amidasa, catalizando la hidrólisis de las amidas.

➤ MATERIAL Y METODOS:

Este medio requiere de dos polvos, uno que es la base de agar urea y el otro que es el caldo urea, y ambos se preparan por separado para después mezclarse.

A) Base de agar urea:

1. Disolver 15 g del polvo en 1000 ml de agua destilada. Obtener la cantidad deseada para la cantidad de agua requerida por regla de tres.
2. Ajustar pH de 6.8
3. Disolver por ebullición el polvo en el matraz
4. Tapar con torunda y esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lb) x 15 min.
5. Dejar enfriar un poco

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B) Caldo urea:

1. Disolver 3.87 g en 100 ml de agua destilada sin calentar. Obtener la relación para la cantidad requerida por regla de tres.
2. Pasar a través de un filtro bacteriológico estéril (Seitz o de Bujía) y dejarlo caer en el matraz con la base de agar urea.
3. Mezclar bien y distribuir en tubos. Taparlos bien.
4. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.
5. Someter a prueba de esterilidad.

> **INTERPRETACIONES:**

1. Reacción positiva: Color rojo Rosado intenso en todo el caldo
2. Reacción negativa: No se produce cambio de color (amarillo anaranjado)

REACCION DE VOGES-PROSKAUER> **PRINCIPIO**

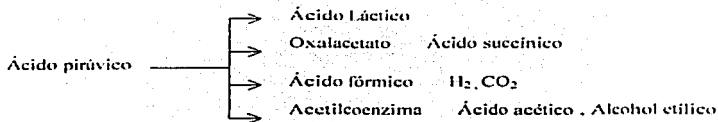
Determinar la capacidad de algunos organismos de producir un producto final neutro, el acetilmetilcarbinol (acetoina), a partir de la fermentación de la glucosa.

> **BASES BIOQUÍMICAS**

La reacción de Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección del acetilmetilcarbinol (acetoina), un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Esta es metabolizada en ácido pirúvico, intermediario clave en la glucólisis. La producción de acetoina es uno de los ciclos para la degradación de la glucosa en las bacterias.

Las Enterobacteriaceae se clasifican característicamente como fermentadoras de ácidos mixtos o del ácido fórmico, lo cual indica que sus productos terminales por la fermentación de la glucosa son ácidos: ácido fórmico, ácido acético, ácido succínico, alcohol etílico, hidrógeno y anhídrido carbónico. 11, 25

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Estos fermentadores de ácidos mixtos pueden ser divididos a su vez en dos grupos: 1) los que producen ácidos, pero no 2, 3- butanediol (o 2, 3 - butilenglicol) 2) los que producen 2, 3- butanediol como principales productos terminales. La reacción Voges-Proskauer se basa en la detección de la acetoina (acetilmetilcarbinol de 2, 3- butanediol).

Esta producción de 2, 3- butanediol provoca un aumento de la producción de anhídrido carbónico, con la acumulación de acetoina y el 2, 3- butanediol está determinado por el volumen de hidrógeno disponible, ¹⁵ o las diferencias de potencial oxidación-reducción. ^{3,4}

> INTERPRETACIONES

1. Reacción VP positiva: Color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoina)
2. Reacción VP negativa: Color amarillo en la superficie del medio (el mismo color del reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero aun así la reacción es negativa (debido a la acción de los reactivos al mezclarse).

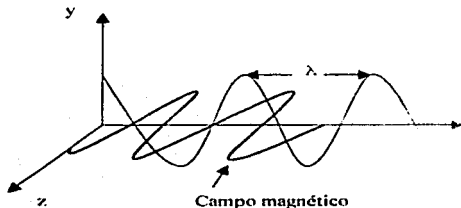
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FUNDAMENTOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría es el conjunto de procedimientos que utilizan la luz para medir concentraciones químicas por medio del empleo de un espectrofotómetro.

El espectrofotómetro es el instrumento que sirve para medir la intensidad de la luz o de radiaciones infrarrojas o ultravioletas en las diversas zonas de su espectro.

La luz se clasifica en dos términos: partículas y ondas. Las ondas de la luz constan de campos eléctricos y magnéticos que oscilan en planos perpendiculares entre sí.



Onda de luz polarizada en el plano

Como se puede apreciar en la figura anterior, el campo eléctrico se encuentra en el plano xy y el campo magnético en el plano xz . A la distancia entre las crestas de dos ondas se le conoce como **Longitud de onda** (λ) y al número de oscilaciones completas de una onda en un segundo se le denomina **Frecuencia**. La unidad de frecuencia es el inverso de los segundos y a una oscilación por segundo también se le conoce como Hertzio (Hz). Una frecuencia de 10^6 s^{-1} es, por lo tanto 10^6 HZ ó 1 **megahertzio** (MHz).

La relación entre la frecuencia y la longitud de onda es: $v = c/\lambda$, donde c es la velocidad de la luz ($2,998 \times 10^8 \text{ m/s}$ en el vacío). En un medio distinto al vacío la velocidad de la luz es cn , donde n es el **índice de refracción** de ese medio.

Cuando una muestra absorbe luz, la **potencia radiante** del haz de luz disminuye. La potencia radiante P es la energía por segundo y por unidad de área del haz de luz.

En la siguiente figura se ilustra una experiencia espectrofotométrica rudimentaria. La luz se hace pasar a través de un **monocromador** (prisma, red de difracción o incluso un filtro para seleccionar una longitud de onda. La luz de una sola longitud de onda se llama monocromática, es decir, de "un color". La luz monocromática, con una potencia P en una muestra de longitud es b . La potencia radiante del haz que emerge por el lado opuesto de la muestra es P' . Como la muestra puede haber absorbido algo de luz, entonces $P' < P$.

$$\text{Por lo tanto: } T = \frac{P'}{P_0}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

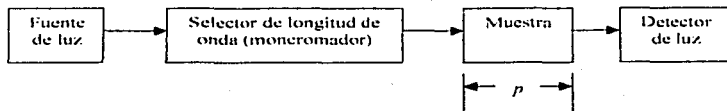


Diagrama esquemático de una medida espectrofotométrica de haz simple

Donde T es la **Transmitancia**, la cual se define como la fracción de luz incidente que pasa a través de la muestra. T puede valer de 0 a 1 y el porcentaje de transmitancia puede variar entre 0 y 100%.

Otro valor importante en espectrofotometría es la **Absorbancia**, la cual también se conoce como **densidad óptica**. La absorbancia es directamente proporcional a la concentración c de la especie que absorbe la luz en la muestra, se representa como sigue:

$$A = \log_{10} \left(\frac{P_0}{P} \right) = -\log T$$

Cuando no se absorbe luz $P = P_0$ y $A = 0$. Si se absorbe el 90% de luz, se transmite el 10% y $P = P_0/10$. Este cociente vale $A = 1$.

La **Ley de Lambert Beer** o **ley de Beer** es el fundamento de la espectrofotometría.

$$A = \epsilon bc$$

La absorbancia es adimensional, pero algunos escriben "unidades de absorbancia" después de la absorbancia. La concentración de la muestra viene dada en unidades de mol/L (M). El paso óptico b normalmente se expresa en centímetros. La cantidad ϵ se llama **absortividad molar** y tiene unidades de $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y así el producto ϵbc es adimensional. La **absortividad** es la característica de una sustancia que nos dice cuanto luz absorbe a una longitud de onda determinada.⁴⁵

EL ESPECTROFOTOMETRO

El espectrofotómetro es el instrumento usado para medir la intensidad de la luz reflejada o transmitida de un material.⁴⁶

Los requisitos mínimos para un espectrofotómetro ya se mencionaron anteriormente. La luz procedente de una fuente continua pasa a través de un monocromador que selecciona una banda estrecha de longitud de onda del haz incidente.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Esta luz "monocromática" atraviesa una muestra de paso óptico b , y mide la potencia radiante de la luz que emerge.⁴⁵

Todas las medidas espectrofotométricas se hacen de forma relativa a un estándar, así que se tiene una relación entre la luz transmitida o reflejada por la muestra con aquella que proviene de la referencia o estándar.⁴⁹

Los espectrofotómetros se pueden clasificar de acuerdo a varios criterios diferentes. Los instrumentos de **haz simple o doble** constituyen un criterio. También hay **monocromadores simples y dobles**. Esta clasificación simplemente indica si el instrumento utiliza uno o dos elementos de dispersión. Una clasificación muy común en los espectrofotómetros está basada en el tipo de sistema de detección, visual o fotoeléctrico.⁴⁹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

1. CALDO Y AGAR BHI (INFUSIÓN CEREBRO-CORAZÓN)

COMPONENTES	CANTIDAD
Infusión de Cerebro de ternera	200 mL
Infusión de corazón de res	250 mL
Peptona de gelatina	10.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato disódico dodecahidratado	2.5 g
Glucosa	2.0 g

2. AGAR HIERRO LISINA (LJA)

COMPONENTES	CANTIDAD
Peptona de gelatina	0.5 g
Extracto de levadura	0.3 g
Glucosa	0.1 g
L-lisina	1.0 g
Citrato férrico-amónico	50.0 mg
Tiosulfato de sodio anhidro	4.0 mg
Púrpura de bromocresol	2.0 mg
Agar	1.05 mg

3. MEDIO SIM (PARA SULFURO, INDOL Y MOVILIDAD)

COMPONENTES	CANTIDAD
Extracto De carne	3.0 g
Peptona	30.0 g
Hierro peptonizado	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.025 g

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. AGAR CITRATO DE SIMMONS

COMPONENTE	CANTIDAD
Fosfato de amoni	1.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Citrato de sodio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.20 g
Azul de bromotimol	0.80 g
Agar	15.0 g

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SOLUCIONES EMPLEADAS EN LA TÉCNICA DE ELISA

Para la elaboración de las soluciones a emplear en la técnica de ELISA se debe tener en cuenta las siguientes cantidades:

- ii Número de placas a usar = A
- ii Número de pozos por placa = B
- ii Total de pozos = A x B = C

➤ PBS-Tween 0.05% (Solución de lavado)

Volumen 1 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)
 Volumen total = Volumen 1 x Número de veces a lavar

➤ Leche descremada en polvo Svelty al 3%

Volumen 2 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)

Volumen total = 3 g de Leche ----- 100 mL de PBS

$$\frac{X}{\text{Volumen 2}} = \frac{3 \text{ g}}{100 \text{ mL}}$$

➤ Antisero (1:1800)

Volumen 3 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)

Volumen total = 1 mL Antisero ----- 1800 mL PBS

$$\frac{X}{\text{Volumen 3}} = \frac{1 \text{ mL}}{1800 \text{ mL}}$$

➤ Conjugado (1:1200) Proteína a preoxidada

Volumen 4 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)

Volumen total = 1 mL Conjugado ----- 1200 mL PBS

$$\frac{X}{\text{Volumen 4}} = \frac{1 \text{ mL}}{1200 \text{ mL}}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Medio de disolución e la muestra (Buffer de carbonatos)

Volumen 5 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)

▣ Bicarbonato de sodio (NaHCO_3):

$$\text{Volumen total 1} = \frac{\text{Volumen 5}}{2}$$

Pesar 2.265 g de NaHCO_3 para preparar 50 mL de solución

2.265 g ----- 50 mL H_2O

$\frac{X}{\text{Volumen total 1}} = \frac{2.265 \text{ g}}{50 \text{ mL}}$

$$X = 2.265 \text{ g} \times \text{Volumen total} / 50 \text{ mL}$$

▣ Carbonato de sodio (Na_2CO_3):

$$\text{Volumen total 2} = \frac{\text{Volumen 5}}{2}$$

Pesar 0.91 g de Na_2CO_3 para preparar 50 mL de solución

0.91 g ----- 50 mL H_2O

$\frac{X}{\text{Volumen total 2}} = \frac{0.91 \text{ g}}{50 \text{ mL}}$

$$X = 0.91 \text{ g} \times \text{Volumen total} / 50 \text{ mL}$$

Se deben mezclar ambas soluciones y ajustar el pH hasta 9.6

Peróxido de hidrógeno al 3%

Volumen 6 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)

3 mL de H_2O_2 ----- 100 mL PBS

$\frac{X}{\text{Volumen 6}} = \frac{3 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$

$$X = 3 \text{ mL} \times \text{Volumen 6} / 100 \text{ mL}$$

Acido sulfúrico (H_2SO_4) 3M

Volumen 7 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)

PM $\text{H}_2\text{SO}_4 = 98.08 \text{ g/mol}$

$\rho_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1.8 \text{ g/mL}$

Pureza $\text{H}_2\text{SO}_4 = 97.6\% \text{ (nL/mL)}$

Obtener por regla de tres la cantidad a pesar, disolver y ajustar el pH de la solución a 7.2

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Medio de disolución del sustrato (Na_2PO_4)

Volumen 8 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)

▣ Fosfato de sodio dibásico (Na_2PO_4):

Pesar 0.7296 g de Na_2PO_4 para preparar 25.7 mL de solución y obtener por regla de tres la cantidad a pesar

▣ Acido cítrico

Pesar 0.5106 g de ácido cítrico para preparar 24.3 mL de solución y obtener por regla de tres la cantidad a pesar.

Mezclar ambas soluciones y ajustar el pH a 5.0

Solvente PBS

Volumen 9 = No. de pozos x Cantidad a agregar a cada uno (μL)

Se emplean los siguientes reactivos y se disuelven en agua destilada para preparar 1 L de solución:

$\text{NaCl} = 8\text{g}$

$\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1.21\text{ g}$

$\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0.34\text{ g}$

Se obtiene por regla de tres la cantidad a pesar de cada uno de los reactivos para preparar el Volumen 9.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
AMPe	Monofosfato de adenosina cíclico
a _w	Actividad de agua
BHI	Infusión Cerebro-Corazón
°C	Grados centígrados o Celsius
Cl ⁻	Ión Cloro
CT ⁻	Toxina de cólera coleragen (Choleraegen)
CT-A	Protómero A
CT-B	Protómero B
Da	Daltones
EAEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EAggEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EIA	Inmunoensayos con enzima
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
ELISA	Ensayo Inmunosorbente con Enzima Ligada
EMIT	Inmunoensayo con enzima multiplicada
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno (al 3% es agua oxigenada y al 30% es Perhidrol)
HET-EIA	Inmunoensayo con Enzima Heterogéneo
IEP	Inmunolectroforesis
kDa	Kilodaltones
λ	Lambda. Longitud de onda
L	Litros
LIA	Agar Hierro-Lisina
MDa	Megadaltones
mL	Mililitros
m/s	Metros por segundo
mol/L	Mol o moles por Litro
μL	Microlitros
mol/L (M)	Mol por Litro o moles por Litro
MR-VP	Rojo de Metilo-Voges Proskauer
Na ⁺	Ión Sodio
nm	Nanometro
NMEC	<i>E. coli</i> neonatal meningitis
LT	Termolábil
LT-I	Toxina LT-1 Termolábil
LT-II	Toxina LT-2 Termolábil
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PDF	p-divinilfluoreno
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso molecular
RIA	Radioinmunoensayo
SIM	Sulfuro Índol Movilidad
ST	Termoestable

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE SIGNIFICADO DE PALABRAS

Aerobio	Que precisa del Oxígeno del aire para subsistir.
Adenitis	Inflamación de una glándula o ganglio, especialmente de un ganglio linfático.
Adhesión	Fenómeno de unión de las superficies de cuerpos puestos en contacto: se debe a la unión de fuerzas intermoleculares.
Agar	Sustancia mucilaginoso, también llamada agar-agar que se extrae de algunas algas frecuentes en el Atlántico, Pacífico e Índico, se emplea como medio de cultivo en bacteriología, en farmacia, etc.
Aglutinar	Reunirse y ligarse entre sí fragmentos, glóbulos o corpúsculos de igual o diversa naturaleza
Albumina	Cada una de las proteínas solubles en agua, de peso molecular de entre 30,000 y 100,000. Coagulan fácilmente y se encuentran en todos los seres vivos, el suero, la leche, etc.
Alergia	Modificación de la reactividad que experimenta un organismo por previo contacto con una sustancia extraña llamada antígeno. Esta modificación puede ser beneficiosa (Inmunidad) o nociva (anafilaxis).
Aminoglucósido	Antibiótico como Estreptomocina, Gentamicina, Tobramicina, Netilmicina, Kanamina, Amikacina
Anaerobio	Dicese del microorganismo capaz de desarrollarse sin el Oxígeno del aire.
Anafilaxis	Reacción alérgica de tipo inmediato que aparece después de una previa sensibilización.
Anión	Ion con carga eléctrica negativa.
Antagonismo	Relación de interferencia entre dos especies, en la que una o ambas resultan perjudiciales en su actividad o funciones vitales. Puede abarcar desde la creación de un ambiente desfavorable para ciertas especies, como resultado de la misma actividad vital, hasta la acción directa sobre otra especie, que puede llegar a su eliminación.
Anticuerpo	(Ac). Molécula de inmunoglobulina capaz de combinarse de forma específica con un antígeno conocido.
Antígeno	Término general para toda sustancia que, introducida en un cuerpo animal provoca la formación de anticuerpos. Molécula ligada por anticuerpos o linfocitos.
Antisuero	Suero que contiene anticuerpos frente a un determinado antígeno.
Asma	Enfermedad que se caracteriza por ataques de disnea respiratoria, tos, sibilancias, sensación de constricción y contracciones involuntarias de los bronquios.
Apical	De o del ápice. Extremo superior o punta de alguna cosa.
Bacilo	Bacteria que tiene forma de bastoncillo
Bacteria	Nombre común de los organismos o seres unicelulares procarióticos (sin núcleo diferenciado ni plastidios típicos). La bacteria representa uno de los estadios más primitivos de organización de los seres vivos, del que derivan las demás formas.
Biotipo	Grupo de organismos de origen común que tienen los mismos factores

	hereditarios.
Bubónica	Proceso patológico que se caracteriza por presentar bubones
Bubón	Tumefacción de un ganglio linfático, especialmente el de la ingle.
Cefalosporina	Antibiótico como Cefamandol, Cefuroxima, Cefonicida, Cefaclor, Cefalotina, Cefazolina, Cefradina, Cefapirina.
Cepa	Conjunto de individuos cuyo genotipo presenta uno o más caracteres fijos que los diferencian de los demás individuos de la población a la que pertenecen.
Citocromo	Proteína de estructura similar a la hemoglobina, que realiza la transferencia de electrones en la respiración celular.
Citoplasma	Parte del protoplasma de la célula que rodea al núcleo
Cloramfenicol	Antibiótico aislado de cultivos de <i>Streptomyces venezuelae</i> u obtenido por síntesis. Es eficaz contra gérmenes gramnegativos, grampositivos, rickettsias y microbacterias.
Colitis	Inflamación del colon. Se manifiesta por diarrea y dolor cólico difuso.
Colon	Porción del intestino grueso comprendido entre el ciego y el recto. Se distinguen las siguientes partes: ascendente, transversa, descendente y sigmoideo. Realiza funciones mecánicas y digestivas (absorción de agua y sales)
Colonia	Agrupación de células o de animales pequeños y aún microscópicos que viven reunidos.
Covalente	Dícese del enlace químico que tiene lugar entre átomos que comparten pares de electrones.
Cromógeno	Dícese de las bacterias que producen sustancias colorantes o pueden originar coloraciones
Crónico	Aplica a las enfermedades o dolencias largas.
Decantación	Acción y efecto de decantar. Inclinar suavemente una vasija para separar un líquido de su poso
Descarboxilar	Proceso por el que un compuesto orgánico pierde anhídrido carbónico por la acción del calor o de enzimas.
Diarrea	Transtorno de la función del aparato digestivo, consistente en la evacuación abundante y repetida de excrementos líquidos o fluidos.
Disentería	Enfermedad infecciosa caracterizada por la ulceración e inflamación del tubo digestivo, sobre todo del colon, con frecuentes diarreas, dolorosas y sangrantes. Las formas más típicas de disentería son la bacteriana o bacilar y la amebiana de los países cálidos.
Electrolito	Compuesto químico que, fundido o disuelto en ciertos disolventes, se disocia en iones, por lo que es conductor de la corriente eléctrica.
Electroforesis	Fenómeno consistente en el movimiento de partículas coloidales o macromoléculas por efecto de un campo eléctrico.
Electrostática	Parte del electromagnetismo que estudia los campos eléctricos producidos por cargas en reposo, tanto en el vacío como en la materia. Su ley fundamental es la de Coulomb.
Endemia	Enfermedad, generalmente infecciosa, característica de un país o región, donde persiste de modo permanente.
Endémico	De la endemia.
Endógena	Que se origina o nace en el interior.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Entérica	Del intestino.
Enterobacterias	Familia de bacterias del orden eubacteriales, en forma de bacilos gramnegativos, capaces de fermentar con rapidez la glucosa. Generalmente son parásitos intestinales.
Estérico	De los ésteres. Relativo al espacio, forma o geometría de átomos, iones o moléculas.
Enterocolitis	Inflamación del intestino delgado, el ciego y el colon.
Enzima	Catalizador biológico de naturaleza proteínica, que se desnaturaliza con el calor. Unos son proteínas simples, otros conjugadas. En este caso pueden contener un grupo prostético (Coenzima), o bien uno proteínico (Apoenzimas). Las reacciones químicas que tienen lugar en el ser vivo son catalizadas por enzimas en pequeña concentración.
Epitelial	Referente al epitelio. Capa celular que cubre la superficie externa e interna del cuerpo. Sus células están unidas por muy escasa cantidad de sustancia intercelular y no posee vasculación. Tiene función de revestimiento.
Especie	Unidad taxonómica fundamental en la clasificación de los organismos. Un conjunto de especies afines forma un género, a su vez, la especie se subdivide en subespecies y variedades.
Estrés	Estado general de tensión en que se halla un organismo amenazado de ser alterado o perturbado en su equilibrio psíquico y biológico por la acción de agentes o condiciones ambientales.
Eucariótica	Eucariote. Dícese de los organismos cuyas células poseen un núcleo diferenciado del protoplasma.
Exotoxinas	Producidas fundamentalmente por bacterias grampositivas aunque algunas gramnegativas también son capaces de elaborarlas. Son de naturaleza proteica y termolábiles.
Facultativo	De una facultad. Fuerza o resistencia.
Fagocito	Célula libre, ameboide, generalmente habitante de líquidos orgánicos (Sangre), cuya misión consiste en fagocitar cuerpos peligrosos para el organismo, bacterias o productos del organismo.
Flagelo	Filamento protoplasmático que se proyecta fuera de la célula a manera de un pequeño látigo. Está dotado de un movimiento ondulatorio de función locomotriz y al mismo tiempo de giro sobre sí mismo.
Fenotípico	Pertenciente o relativo al fenotipo.
Fenotipo	Aspecto físico de un organismo resultante de la interacción entre su constitución genética (Genotipo) y el medio ambiente.
Fibrosis	Formación patológica de tejido fibrosos. Supone la sustitución de elementos por tejido conjuntivo fibroso inerte. Si afecta a órganos vitales es grave.
Fiebre	Elevación de la temperatura corporal a causa de una enfermedad. Es un síndrome complejo integrado por taquicardia, sopor sudoración, etc. y puede ser producido por multitud de procesos: infecciones, trastornos metabólicos o nerviosos, neoplasias, etc.
Fiebre del heno	Estado alérgico propio de la primavera o el verano y provocado por la inhalación del polen de ciertas plantas. Se caracteriza por conjuntivitis, catarro nasal y síntomas asmáticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fiebre Tifoidea	Constituye el prototipo y la forma más grave de las fiebres entéricas.
Fimbrias	También llamadas pili, son apéndices más pequeños que se encuentran en la superficie de muchas bacterias gramnegativas. Actualmente el término fimbria se utiliza para describir cualquier apéndice no flagelar similar a un pelo.
Ganglio	Pequeño abultamiento de forma y tamaño variables, que aparece generalmente en grupo, en el trayecto de los vasos linfáticos o de las fibras nerviosas.
Gastroenteritis	Inflamación de la mucosa del estómago y del intestino. Es causada por productos tóxicos, infecciones, etc. Se caracteriza por vómitos y diarrea.
Género	Conjunto de seres que tienen caracteres comunes. Categoría taxonómica intermedia entre la familia y la especie.
Genotipo	Material cromosómico característico de un organismo
Germen	Principio rudimental de un nuevo ser orgánico. Microorganismo.
Glucolípidio	Lípido no fosforado.
Hemaglutinina	Proteínas virales capaces de aglutinar eritrocitos de ciertas especies animales. Pueden ser auto-, iso- y heteroglutinina, según aglutine las células de la sangre en que están contenidas, las de los animales de la misma especie o las de animales de especies diferentes, respectivamente.
Hematie	Cada uno de los corpúsculos o glóbulos rojos de la sangre. Tienen forma redondeada y un diámetro de 7 μ .
Hemólisis	Dstrucción de los hematíes con liberación de hemoglobina
Hemolítico	Relativo a la hemólisis.
Hertz	Hercio. Unidad de frecuencia, equivale a un ciclo, vibración u oscilación por segundo.
Híbrido	Animal o vegetal que proviene del cruzamiento entre individuos genéticamente distintos.
Hidrófilo	Que absorbe el agua con gran facilidad.
Hidrófobo	Que padece hidrofobia. Propiedad de las sustancias de repeler el agua.
Hidrólisis	Reacción química que tiene por efecto el desdoblamiento de una molécula por acción del agua. Reacción de algún compuesto con el agua, aunque no se produzca doble descomposición.
Hidrolizar	Someter a hidrólisis.
Huésped	Organismo animal o vegetal a cuyas expensas vive un parásito.
Ileon	Última porción del intestino delgado que desemboca en el ciego.
Índol	(C ₈ H ₇ N) Benzopirril. Sustancia orgánica aromática formada por un núcleo de benceno y uno pirrólico. Se usa en perfumería y como reactivo químico.
Immune	No atacable por ciertas enfermedades
Immunización	Acción y efecto de inmunizar. Hacer inmune.
Imunoglobulinas	Son Anticuerpos, existen varios: IgG, IgA, IgM, IgE, IgD
Intrínseca	Acción y efecto de intrínsecar. Enmarañar una cosa.
In vitro	Aplica a los procesos biológicos cuando se producen experimentalmente, aislados del conjunto del organismo.
Lábil	Dícese del compuesto fácil de transformar en otro más estable.
Lactosa	(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁) Azúcar de la leche constituida por una molécula de

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

	galactosa unida a una de glucosa. Se presenta como un polvo duro, blanco, inodoro y de sabor muy dulce.
Licuar	Passar del estado gaseoso al líquido. Convertir algo en líquido.
Linfático	Dícese del conjunto de vasos, capilares y ganglios que intervienen en la circulación de la linfa.
Lipopolisacárido	Son glucolípidos complejos compuestos por una porción lipídica llamada Lípido A, la región del centro o core polisacárido y cadenas laterales O-específicas, que son regiones de estructura bioquímica variable que confieren una entidad serológica única a las especies de bacterias gramnegativas.
Lisis	Destrucción de las membranas celulares.
Macrófago	Célula del sistema reticuloendotelial que fagocita partículas grandes.
Manosa	Isómero de la glucosa $C_6H_{12}O_6$.
Mesentérica	Pertenciente o relativo al mesenterio.
Mesenterio	Conjunto de repliegues del peritoneo que une la cavidad abdominal, junto con sus vasos y nervios, al intestino delgado.
Mieloma	Neoplasia maligna de células plasmáticas de la médula ósea. Sus manifestaciones son numerosas: anemia, insuficiencia renal, plasmocitos anormales en la sangre y médula, etc.
Nitrocelulosa	Nitrato de celulosa. Se obtiene por acción del ácido nítrico, madera o paja.
Nucleótido	Sustancia formada por ácido fosfórico, d-ribose y una base (pirimidina o purina).
Nutricio	Del lat. <i>Nutritius</i> , adjetivo nutritivo
Nylon	Fibra textil sintética constituida por una amida polimerizada de cadena larga obtenida a partir de grupos amidos. Es muy tenaz, elástica y resistente a la abrasión.
Oportunista	Pertenciente o relativo al oportunismo. Actitud que consiste en aprovechar al máximo las circunstancias momentáneas.
Osmosis	Paso de un líquido a través de una membrana semipermeable que separa dos disoluciones de distinta concentración; el flujo global tiende a igualar ambas concentraciones.
Osmótico	Relativo a la ósmosis.
Paratífico	Pertenciente o relativo a la paratifoidea.
Paratifoidea	Infección intestinal con sintomatología de la fiebre tifoidea, pero menos grave.
Pasteurización	Acción y efecto de pasteurizar. Eliminar las bacterias patógenas de la leche, vino, etc., mediante calor, sin alterar su estructura y componentes.
Patógeno	Productor o causante de una enfermedad o estado morboso.
Penicilina	Antibiótico obtenido de varias cepas del hongo <i>Penicillium</i> . Descubierta por Fleming en 1929.
Peptona	Mezcla de polipéptidos resultante de la hidrólisis peptídica de la albúmina, de la caseína y de la fibrina por acción de la pepsina.
Peste	Enfermedad infecciosa epidemicoendémica muy grave que afecta al hombre y a diversos animales. Se transmite por la picadura de pulgas que han sido huéspedes de ratas infectadas o por transmisión aérea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Pienso	Cualquier enfermedad que causa gran mortandad.
Pili	Ración de alimento seco que se distribuye al ganado. Aquellas fimbrias de las bacterias gramnegativas cuya función específica es la de transferir DNA de una célula a otra durante el proceso de conjugación (por ejemplo, pili sexuales). Que produce fiebre.
Pirógeno	Plástico obtenido por polimerización del estireno.
Poliestireno	Termoplástico obtenido por polimerización del etileno
Polietileno	Polímero del propileno.
Polipropileno	Cada una de las sustancias aisladas de diversas estructuras orgánicas, cuyo esqueleto químico lo constituye un anillo de ciclopentano. Son estimulantes musculares, anticonceptivos, etc.
Prostaglandina	Masa líquida, espesa, de color grisáceo, resultante de la digestión gástrica de los alimentos.
Químo	Tumoración formada por una cavidad o vejiga rellena de sustancias diversas, generalmente líquidas o semisólidas.
Quística	Isótopo radiactivo de un elemento químico.
Radioisótopo	La degradación de la unión de un anticuerpo a una molécula no marcada.
Reactividad cruzada	(C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁) Glúcido. Es el oligosacárido conocido como azúcar de caña o de remolacha. Se encuentra en frutos, semillas, flores y raíces de plantas. Químicamente está formado por glucosa y fructosa.
Sacarosa	Enfermedad infecciosa causada por bacterias del genero <i>Salmonella</i> . Dícese de los organismos que obtienen materia orgánica en dilución a partir de los tejidos muertos o en descomposición de plantas y animales. Se aplica a cualquier microbio que se desarrolla como comensal sobre un ser vivo sin interferir sus funciones.
Salmonelosis	Infeción general grave producida por la penetración de gérmenes patógenos en la sangre.
Saprófito	Ciencia que trata del estudio de las reacciones inmunológicas del suero.
Septicemia	Conjunto de síntomas y signos que coexisten simultáneamente y que definen un proceso patológico.
Serología	Dícese de cualquier afección de base orgánica.
Síndrome	Disolución tampón o amortiguadora. Dícese de la disolución cuyo pH no varía sensiblemente por adición de un ácido o una base.
Somático	Reordenamiento inter cromosómico consistente en el cambio de posición de un cromosoma
Tampón	Ciencia que estudia la clasificación de los seres vivos.
Translocación	Dícese de las sustancias activas que se descomponen por acción del calor.
Taxonomía	Antibiótico de amplio espectro, obtenido de ciertas especies de <i>Streptomyces</i> .
Termolábil	Dícese del síndrome de diversas enfermedades, constituido por trastornos nerviosos y fiebre.
Tetraciclina	Del tifus.
Tífico	Denominación dada a un grupo de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos del genero <i>Rickettsia</i> y transmitida por
Tifoidea	
Tifus	

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tracto	artrópodos. Cursan con fiebre, cefaleas y obnubilación Denominación que se aplica a diversas estructuras anatómicas de carácter cordonal o alargado.
Uremia	Exceso de urea en la sangre, especialmente por insuficiencia renal.
Vacuola	Cavidad celular separada del resto del citoplasma por una membrana.
Valor D	Tiempo de reducción decimal. Es el tiempo que se necesita para reducir a una temperatura dada el 90% de los microorganismos.
Zoonosis	Cualquiera de las enfermedades de los animales, que pueden ser transmitidas al hombre (rabia, brucelosis, etc.).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey, Scott. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. Sexta Ed. p 1-254. Octubre 1983.
2. Cowan, S. T. y Steel K. J. Manual para la identificación de Bacterias de importancia médica. Ed. Continental. p 149-166. Feb. 1985.
3. Mac Faddin, Jean F. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Ed. Médica Panamericana. p 27-197. Mayo 1984.
4. ICMSF. Ecología microbiana de los alimentos I. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Ed. Acribia, p 8-106. 1980.
5. Hefle, Susan L. Immunoassay Fundamentals. Overview outstanding symposia in food Science and Technology. Food Technology. Vol. 49, No. 2. p 102-107, 1995.
6. Adams , M. R. y Moss M. O. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia. p 186-275. 1995.
7. M. Smith, Denise. Immunoassay in process control and Speciation of Meats. Food Technology. Vol. 49, No 2. p 116-119. February 1995.
8. Lácteos y Cárnicos mexicanos. Revista Industrial Especializada. Se Reportan Brotes Epidémicos de E. coli O157:H7 en los E. U. Vol 14, No. 5. p 22. Octubre- Noviembre 1999.
9. Frobisher-Summermeyer. Microbiología y patología para enfermeras. Ed. Interamericana, 5^{TA} Edición. p 186-187.
10. El Manual Merck de Diagnóstico y terapéutica. 1980.
11. Pérez Miravete, A y Peláez, Dionisio. Enteropathogenic Escherichia coli with particular regard to enterotoxigenicity. Recent Advances in Microbiology. Congreso Internacional de Microbiología. Asociación Mexicana de Microbiología. p 399- 406. 1971.
12. Kemeny, D. M. A practical guide to ELISA. Ed. Pergamon Press. 1991. p. 1-43.
13. Wyatt, G. M. whit contributions from Lee, H. A. and Morgan, M. R. A. Food Safety Series I. Immunoassays from food poisoning bacteria and bacterials toxins. Ed. Chapman and May. p 1-94. London 1992.
14. Guhric, Rufus K. Salmonella. Ed. CRC Press. Boca Raton Ann Arbor. p 23-61. London 1992.

<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

15. Moss, Joel and Vaughan, Martha. ADP-Ribosilating toxins and G proteins isighs into signal transduction. American Society for Microbiology. Washington, D. C., 1990.
16. Ron, Eliora Z. and Rottem, Sholomo. Microbial Surface components and Toxins of relation to pathogénesis. Plenum press. New York and London.
17. Hardegree, M. Caroly and Tu., T. Anthony. Handbook of natural Toxins. Vol. 4. Marcel Decker Inc., 1983.
18. James, Nataro P. and James, Kaper B. Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology. Vol. 11, No. 1. p 142-201. Jan 1998.
19. Anderson, Pascual y Del Rosario, María. Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ed. Diaz de Santos, 1992.
20. NUNCTMPRODUCTS. Laboratory products for cell culture, Molecular biology, Cryopreservation and Immunology. 1998-1999. Catalog.
21. Meng, Jianghong; Doyle, Michael P.; Zhao, Tong and Zhao, Shaohua. Detection and control of *Escherichia coli* 0157:H7 in foods. Trends in Food Science and Technology. Vol. 5, June 1994.
22. Stephenson, Patricia; Satchell, Felicia B.; Allen, Geraldine and Andrews, Wallace H. Recovery of *Salmonella* from Shell Eggs. Foods and Drug Administration, División of Microbiology. Journal of Analytical Chem. Washington. D. C. 20204. Vol. 74, No. 5. p 179-189. 1991.
23. Fernández Escartin E.; Castillo Ayala A. and Saldaña Lozano J. Survival and Growth of *Salmonella* and *Shigella* on Sliced Fresh Fruit. Journal of Food Protection. Vol. 52, No. 7. p.471-472. July 1989.
24. Wilson, Clyde R.; Wallace, H. Andrews; Poelma, Paul L and Verneal, R. Bruce. Recovery of *Salmonella* from Fluid Milk. Journal of Food Protection. Vol. 51, No. 5. p 409-411. May 1988.
25. Restaino, L.; Jeter, Wayburn S. and Hill, W. M. Thermal Injury of *Yersinia enterocolitica*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 40, No. 5. p 939-649. Nov. 1980.
26. Noah, Charles W.; Pérez, John C.; Ramos, Nora C, Mckee, Charles R. and Gibson, Virginia. Detection of *Listeria spp.* in Naturally Contaminated Seafood Using Four Enrichment Procedures. Journal of Food Protection. Vol. 54, No. 3. p 174-177. March 1991.

<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

27. D'aoust, J. Y. and Sewell, A. M. Reliability of the Immunodiffusion 1-2 TestTM System for Detection of *Salmonella* in Foods. Journal of Food Protection. Vol. 51, No. 11, p. 853-856.
28. Parrilla Cerrillo, Ma. Cristina; Vázquez Castellano, J. Luis; Saldade Castañeda, E. Ofelia y Nava Fernández, Luz Ma. Brotos de Toxiinfecciones Alimentarias de Origen Microbiano y Parasitario. Salud Pública de México. Vol. 35, No. 5. Octubre de 1993.
29. López Brea, Manuel; Sanz, Juan Carlos; Usera, Miguel Angel; Reina, Jordi; Cardeñoso, Laura y Vasallo, Francisco. Infecciones Gastrointestinales Bacterianas y Toxiinfecciones Bacterianas. Procedimientos en Microbiología Clínica.
30. O'Neill, Caroline E. and Bissonnette, Gary K. Antecedent Oxygen Growth Conditions and Recovery of Heat-Stressed *Escherichia coli*. Journal of Food Protection. Vol. 54, No. 2. p 90-93. Feb. 1991.
31. Gougeon-Jovilet A.; Tamanai, Shacoori T.; Sauvager, F. and Cormier M. Production of *Escherichia coli* group I-like heat-labile enterotoxin by Enterobacteriaceae isolated from environmental water. Microbios 1997. p 209-218.
32. Allen, Geraldine; Vermeal, R. Bruce; Wallace, H. Andrews; Satchell, Felicia B. and Stephenson, Patricia. Recovery of *Salmonella* from Frozen Shrimp: Evaluation of Short-Term Selective Enrichment, Selective Media, Postenrichment, and a Rapid Immunodiffusion Method. Journal of Food Protection, Vol. 54, No. 1. p 22-27. January 1991.
33. Kounev, Zheko. Effects of Enrichment Medium and Incubation Temperature on Recovery of *Yersinia enterocolitica* from Coked Sausage. Journal of Food Protection, Vol. 52, No. 11. p 818-820. November 1989.
34. Barnes, Ana Isabel; Ortiz Cristina; Paraje, María Gabriela; Balanzino, Luis Eduardo and Albasa, Inés. Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. Can. J. Microbiol. Vol. 43. p 729-733. May 1997.
35. Prado, Valeria; Siri, María Teresa; Aranda, Marcela; Marambio, Eliana y Cohen Jacob. Incidencia de *E. coli* enterotoxigénico en lactantes con diarrea aguda, utilidad de células LLC para la detección de Toxina Termolábil (LT). Revista Médica de Chile. Vol. 111. p 1221-1226. Septiembre 1983.
36. Doyle, Michael P. and Huddahl, Mary B. Improved Procedure for Recovery of *Yersinia enterocolitica* from Meats. Applied and Environmental Microbiology. Vol 45, No. 1. p. 127-135. Jan 1983.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

37. Mackey, B. M. and Derrick, Christine M. Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. Journal of Applied Bacteriology. Vol. 61. p 389-393, July 1986.
38. Bailey, J. Stan; Cox, Nelson A. and Blankenship, L. C. A Comparison of an Enzyme Immunoassay, DNA Hybridization Antibody Immobilization and Conventional Methods for Recovery of Naturally Occurring Salmonellae from Processed Broiler Carcasses. Journal of Food Protection, Vol. 54, No. 5. p 354-356. May 1991.
39. Vanderzant, Carl and Splitstoeser, F. Don. Compendium of methods for the Microbiological examination of Foods. Third Edition. Editorial. American Public Health Association. p 121-680, 1992.
40. Editores Salvat. Enciclopedia Multimedia '99. Salvat Multimedia. Cd-Rom.
41. Gran Diccionario Enciclopédico Ilustrado de Selecciones del Reader's Digest. Editorial Reader's Digest México. p.p 1456, 1979.
42. Joklik, Wolfgang D.; Willett, Hilda P.; Amos, Bernard and Wilfert Catherine M. Zinsser Microbiología. 20ª Edición. Editorial Médica Panamericana. p 101-106, 1992.
43. Chefel, Jean Claude y Bensacon, Pierre. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos. Vol. II. Editorial Acribia. p.p 404, 1977.
44. Stites, P. Daniel; Terr, Abba I.; Carsolio Pacheco, Ma. del Rosario. Inmunología humana y básica. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D. F.-Santafé de Bogotá. p.p. 416, 1991.
45. Harris, C. Daniel. Análisis Químico Cuantitativo. 2ª. Edición. Editorial Reverté, S. A. de C. V. p.p 981, 2001.
46. Koneman, Elmer W.; Allen, Stephen D.; Janda, William M.; Schreckenberger, Paul C. and Winn, Washington C. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. 5ª ed. Editorial Médica Panamericana. p.p 981, 1997.
47. Furrer, B.; Candrian, U. and Lüthy, J. Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type 1 by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. Letters in Applied Microbiology. No. 10. p 35-37. 1990.
48. Schmelkes, Corina. Manual para la presentación de anteproyectos e informes de investigación. Tesis. 2ª Ed. Editorial Oxford University Press. p.p 206, 1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

49. 10 de Julio del 2002. <http://mcom.inia.jij.es/color/espectrotipos.htm>. El espectrofotómetro.
50. 10 de Julio del 2002. <http://www.micobiologia.com.ar/>. Bacteriología.
51. 12 de Julio del 2002. <http://ssa.gob.mx>.
52. Swaminathan, B. And L. Kong, Raymond. Immunoassays for detecting Foodborne Bacteria and Microbial Toxins. Microorganism and their toxins developing methodology. Editorial IFT (Institute of Food Technologists). p 253-343. 1986.
53. P. Doyle, Michael. Detection and Quantitation of Foodborne Pathogens and their Toxins: Gram-Negative Bacterial Pathogens. Microorganism and their toxins developing methodology. Editorial IFT (Institute of Food Technologists). p 317-343.. 1986.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN