



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

DETECCIÓN DE FACTORES DE
VIRULENCIA DE *ESCHERICHIA*
COLI, *SHIGELLA* Y *SALMONELLA*
EN AGUA SUPERFICIAL Y
SUBTERRÁNEA DE XOCHIMILCO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

MARÍA DEL JAZMÍN AGUILAR MEDINA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARISA MAZARI HIRIART

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de abril del 2007, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) de la alumna **Aguilar Medina María del Jazmín** con número de cuenta **89223224** con la tesis titulada: **"Detección de factores de virulencia de Escherichia coli, Shigella y Salmonella en agua superficial y subterránea de Xochimilco"** bajo la dirección de la **Dra. Marisa Mazari Hiriart**.

Presidente:	Dra. Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María Guadalupe Souza Saldivar
Vocal:	Dra. Blanca Elena Jiménez Cisneros
Secretario:	Dra. Marisa Mazari Hiriart
Suplente:	Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Suplente:	M. en C. Juan José Calva Mercado

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 30 de mayo del 2007


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

Reconocimientos

Esta investigación fue realizada con una beca completa por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Esta investigación fue realizada con un apoyo de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

La investigación fue realizada con recursos financieros de los proyectos :

CONACYT

"Calidad microbiológica y química del agua en sistemas acuáticos de la Ciudad de México" (32505-T) de 1999 a 2001.

DGAPA-PAPIIT

"Evaluación de la desinfección en sistemas acuáticos en función de bacterias, virus y bacteriófagos (IN219303) de 2003 a 2004.

Agradezco a los miembros del Comité Tutorial

Dra. Marisa Mazari Hiriart

Dra. Valeria Souza Saldivar

M. en C Juan José Calva Mercado

Su apoyo en la planeación, dirección, conclusión y comentarios sobre este trabajo

Dedicatoria

A Naima

A mis padres y hermanos

A mi familia

A mis amigas y amigos

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Marisa Mazari por su apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

Agradezco a las Dras. Valeria Souza y Yolanda López-Vidal por sus valiosos comentarios y facilidades prestadas para la realización de este trabajo, así como a los Drs. Juan Calva y Gonzalo Castillo, por sus importantes aportaciones en el trabajo metodológico y escrito.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Ecología química: Elia Velásquez, Pilar Islas, Paola Cisneros, Alba Zarco, Gustavo Pérez, Sara Bonilla y especialmente a la Dra. Ana Cecilia Espinosa por su gran ayuda, apoyo, comentarios y compañía en este proceso.

Agradezco a Laura Espinosa, Aldo Valera, Antonio Cruz, Rene Cerritos y Rocío Cruz por su ayuda durante la fase experimental y de análisis de esta investigación.

Agradezco al Sistema de Aguas de la ciudad de Mexico, y a la delegación Xochimilco por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Agradezco al laboratorio de síntesis del Instituto de Biotecnología por la síntesis de los cebadores utilizados, y a la M. en C. Laura Márquez del Instituto de Biología por los resultados de las secuencias.

A mis queridos amigos de la Fac. Paty Hernandez, Tamara Osorno, Angel Serrano, Laura Gonzalez, Violeta Bautista, Ivette Galicia, Marcela Ruedas y Alejandro Pico Heredia por que se que aunque en espacios distantes, nos mantenemos en contacto.

A mis amigos que me acompañan en el mundo y a todas las personas que con su ayuda y apoyo han contribuido en la elaboración de este proyecto.

Y a la memoria de mis seres queridos que se adelantaron mi hermano Mario y mi Abuela Lupita.

La ciencia son hechos, de la misma manera que las casas están hechas de piedras, la ciencia está hecha de hechos pero un montón de piedras no es una casa y una colección de hechos no es necesariamente ciencia

Henri Poincare

Índice general

Índice general	i
Índice de tablas y figuras	ii
Glosario	iii
Resumen	iv
Abstract	v
1. Introducción	1
1.1 Enterobacterias causantes de diarrea	3
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC) y <i>Shigella</i>	7
1.1.3. <i>Salmonella</i>	8
1.1.4. Factores relacionados con la patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i>	8
1.1.5. Área de estudio	11
1.2. Antecedentes	12
1.3. Justificación	14
1.4. Hipótesis	14
2. Objetivos	15
3. Metodología	16
3.1.1. Detección de coliformes por filtración de membrana	16
3.2.0. Detección de factores de virulencia causantes de diarrea	17
3.2.1. Concentración de muestras para aislar bacterias por centrifugación	17
3.2.2. Cultivo de enriquecimiento	17
3.2.3. Extracción de ADN	17
3.2.4. Secuencias utilizadas para detectar factores de virulencia	18
3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	19
3.2.6. Prueba de sensibilidad	20
3.2.7. Secuenciación de muestras positivas a los factores de virulencia	21
3.2.8. Parámetros fisicoquímicos	21
3.2.9. Pruebas estadísticas	21
4. Resultados y Discusión	22
5. Conclusiones	33
6. Referencias complementarias	34
7. Publicaciones derivadas de la maestría	44
Artículo “Detection of <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> , and <i>Salmonella</i> virulence factors in surface water and groundwater from southern Mexico City	

Índice de tablas y figuras

Tabla 1	Parámetros permisibles de organismos indicadores considerados en las normas de calidad para agua de uso y consumo humano y reuso	13
Tabla 2	Secuencias utilizadas para amplificar los factores de virulencia de cinco cepas diarreicas de <i>E .coli</i>	18
Tabla 3	Condiciones del termociclador para amplificar los factores de virulencia por PCR	19
Tabla 3a	Condiciones de reacción para amplificar factores de virulencia por PCR	19
Tabla 4	Bacterias indicadoras, factores de virulencia y parámetros fisicoquímicos en agua superficial y subterránea en la zona de Xochimilco, Distrito Federal	23
Tabla 5	Parámetros microbiológicos en agua de la zona de Xochimilco, Distrito Federal	24
Tabla 6	Parámetros fisicoquímicos en agua de la zona de Xochimilco, Distrito Federal	26
Tabla 7	Similitud de las secuencias obtenidas por PCR de los factores de virulencia con secuencias depositadas en el Gen Data Bank.	30
Tabla 8	Correlación entre bacterias indicadoras y factores de virulencia en la temporada de secas en agua superficial	31
Figura 1	Porcentajes del muestreo total, canales y pozos de la zona de Xochimilco, Distrito Federal	24
Figura 2	Mapa con sitios de muestreo y factores de virulencia detectados	29

Glosario

μL	Microlitros
A/E	Adherencia y esfacelamiento
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APHA	Asociación Americana para la salud pública
<i>bfpA</i>	Gen formador de pilus en paquete A
CF	Coliformes fecales
CT	Coliformes totales
DAEC	<i>Escherichia Coli</i> de adherencia difusa
DOF	Diario Oficial de la Federación
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
<i>eae</i>	Gen de la intimina
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EAF	Plásmido Factor de adherencia de EPEC
EDTA	Acido etilenodiaminotetracético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
<i>eltA</i>	Gen codificado de la toxina termolábil A
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogénica
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigenica
FISH	hibridación Fluorescente <i>in situ</i>
FM	Filtración a través de membrana
H	antígeno flagelar
<i>ial</i>	Locus asociado con invasividad
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
LEE	Locus de esfacelamiento enterocítico
<i>ler</i>	Regulador del locus enterocítico
LT	Toxina termolábil
mL	mililitros
mM	milimoles
NMP	Número mas probable
O	Antígeno capsular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pcvd432	Plásmido de patrón asociado de adherencia agregativa
<i>putP</i>	Gen de la Prolina permeasa
UFC	Unidad formadora de colonia
SLTI	Toxina Shiga-like1
ST	Toxina termoestable
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
OMS	Organización mundial de la salud

Resumen

La calidad microbiológica del agua en México se determina mediante la detección de bacterias indicadoras (BI), sin embargo, la utilización de éstas ya que se han reportado casos en donde los conteos microbiológicos fueron aceptables pero se identificó posteriormente el agua analizada como fuente de brotes epidemiológicos. El objetivo de este trabajo fue determinar si la presencia de bacterias indicadoras (BI) está relacionada con la presencia de bacterias causantes de diarrea detectadas mediante sus factores de virulencia, por lo que se realizó la detección de BI mediante la técnica de Filtración a Través de Membrana y la detección de ocho factores de virulencia presentes en *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella* así como el gen esencial *putP* de *E. coli*, por la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa d en agua superficial (AS) y agua subterránea (AG) en temporada de secas (TS) y lluvias (TLL) a lo largo de un ciclo anual en la zona de Xochimilco, Distrito Federal. Se detectaron cuatro factores de virulencia; *pcvd432*, *ial*, *ler* y SLTI, los cuales únicamente se encontraron en AS. Los 17 productos de PCR obtenidos fueron secuenciados y comparados con secuencias depositadas en el Gen Data Bank. La similitud de estas secuencias fue superior al 96 % en 14 de los casos, al 84% en un caso, ninguna secuencia mostró similitud con el factor *ial*, por lo que se consideró como negativo. El resultado de los análisis estadísticos mostró correlación únicamente entre las bacterias coliformes fecales, el gen esencial *putP* y el factor de patogenicidad pCVD432 en el AS durante la TS, lo cual concuerda con lo señalado por otros autores sobre el comportamiento diferente de bacterias indicadoras y patógenas. Sin embargo, al comparar la presencia del gen esencial de *E. coli*, con los factores de virulencia se encontró correlación con los cuatro factores de virulencia confirmados por secuenciación, por lo que en este trabajo se demuestra que la detección de *E. coli*, es un mejor indicador que las bacterias coliformes.

Se presentaron diferencias significativas entre los tipos de agua al comparar los parámetros fisicoquímicos, especialmente en el AS, en el AG las condiciones son constantes a lo largo del año.

Abstract

Water quality in Mexico is determined by the use of indicator bacteria, nevertheless in some cases where the microbiological water quality was acceptable, water was related to epidemiological outbreaks. The objective of this work was to determine if the indicator bacteria presence is related to diarrheagenic bacteria detected by virulence factors. The analysis were done by using Membrane Filtration method (MFM) and Polymerase Chain Reaction (PCR) of eight virulence factors in *Escherichia coli*, *Shigella* y *Salmonella* and essential gen *putP* of *E. coli*, in two water types and two seasons during an annual cycle in Xochimilco Federal District.

Four of the virulence factors analyzed were detected; *pcvd432*, *ial*, *ler* and SLTI, which were founded exclusively in surface water. PCR products (17) were sequenced and compared with sequences in Gen Data Bank, similarity was higher than 96% in 14 of cases, 84% in one case and any sequence was similar to *ial*, therefore it was considered negative result. Statistic analysis should correlation only with fecal coliform, the indicator factor *putP*, and the virulence factor pCVD432 in surface water during the dry season, which agree with other authors in relation to the different behavior between indicator and pathogenic bacteria. Nevertheless, when comparing *putP* with virulence factors correlation were found in all cases confirmed by sequencing, which shows, that *E. coli* is a better indicator than coliform bacteria. Physicochemical parameters show differences in surface water, in groundwater the conditions are constants along the year.

1. Introducción

La calidad y disposición del agua se ha reducido en las últimas décadas debido a diversos factores entre ellos, el crecimiento poblacional y un uso inadecuado del recurso, lo que afecta la salud pública y el medio ambiente a escala mundial. Uno de los problemas de salud más evidentes es el caso de las enfermedades gastrointestinales. Estas infecciones son transmitidas a través de las heces de humanos y animales que al no ser adecuadamente manejadas contaminan las fuentes de abastecimiento de agua para uso y consumo humano (Nash, 1993).

La diarrea es la enfermedad entérica más común, numerosos agentes infecciosos participan en el desarrollo de ésta, entre ellos se encuentran las bacterias entéricas, los virus y los protistas. En general, los virus se limitan a un solo hospedero, mientras que las bacterias y protistas tienen una gran variedad de hospederos animales. Estos agentes infecciosos son transmitidos principalmente por la ruta fecal-oral, además de utilizar al agua como ruta de transmisión (Theron y Cloete, 2002).

En los países en desarrollo la diarrea es una de las principales causas de mortalidad, reportándose alrededor de 2.2 millones de fallecimientos, de los cuales 1.5 millones corresponden al grupo de niños menores de cinco años. Se estima que se presentan 4 mil millones de episodios diarreicos en el mundo y representa el 5% de las causas de pérdida de salud (WHO, 2000). La diarrea afecta más gravemente a los niños menores de cinco años y en nuestro país representa para este grupo la cuarta causa de mortalidad (INEGI, 1999).

La necesidad de prevenir estas enfermedades ha requerido de la implementación de técnicas de monitoreo de la calidad microbiológica del agua. La técnica comúnmente utilizada a nivel mundial es la filtración a través de membrana para la detección de bacterias coliformes totales y coliformes fecales, las cuales son indicadores de contaminación fecal desde hace un siglo, el grupo de coliformes pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* bacterias gramnegativas (APHA, 1998; Millipore, 2000). Sin embargo, aunque la técnica es de fácil implementación y bajo costo no brinda información sobre la forma de vida de las bacterias detectadas, ya que no permite distinguir entre las que actúan como comensales y las que provocan enfermedad, se han reportado brotes por agua contaminada, la cual en los reportes de monitoreo cumplía con las normas para la detección de coliformes (Rompré *et al.* 2002). La detección de enterococos fecales es una prueba alternativa que se realiza mediante la técnica de filtración a través de membrana, este grupo que está constituido por bacterias grampositivas (APHA, 1998; Millipore, 2000).

Entre las técnicas alternativas para la identificación del tipo bacteriano se ha usado la serotipificación, sin embargo, desde el aislamiento de coliformes hasta la confirmación de la cepa es necesario realizar pasos adicionales de cultivo selectivo y el uso de anticuerpos que en el caso de la identificación de cepas patógenas de *E. coli* comprende tan solo 176 diferentes antígenos O y 112 antígenos H. La serotipificación se basa en la detección de dos antígenos; el antígeno O u somático que señala el serogrupo y el antígeno H o flagelar, que conjuntamente con el serogrupo conforma el serotipo. Aunque se identifiquen los serotipos y se relacione a estos con cepas que han causado enfermedades no es una regla general que este aspecto confiera virulencia a la bacteria (Nataro y Kaper, 1998).

El desarrollo de técnicas moleculares permite en la actualidad no sólo identificar el origen de la contaminación, sino el determinar la presencia de los genes relacionados con la

patogenicidad de los organismos invasores, a través de la amplificación y visualización de secuencias específicas, entre estas técnicas se encuentran la reacción en cadena de la polimerasa reversa (PCR), la hibridación y más recientemente implementada hibridación fluorescente *in situ* FISH por sus siglas en inglés (Rompré *et al.*, 2002).

1.1 Enterobacterias causantes de diarrea

La Organización Mundial de la Salud señala que entre las principales bacterias causantes de diarrea distribuidas a escala mundial se encuentran *Campylobacter*, *Vibrio cholerae* y las enterobacterias *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*, las cuales con excepción de *Vibrio* son también las más frecuentemente involucradas en casos de diarrea en México (WHO, 2000; Calva, 1998).

1.1.1 Escherichia coli

Escherichia coli es la bacteria predominante en la flora intestinal, es incluso la especie que típicamente coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos en las primeras horas de vida y puede vivir como comensal. Sin embargo, cuando las defensas del huésped son bajas y/o las barreras gastrointestinales son atravesadas, pueden causar infecciones especialmente en grupos vulnerables como son los bebés, los adultos mayores y los que padecen enfermedades que afectan al sistema inmunológico (Gray, 1995).

Existen además de las cepas simbiotes, cepas patógenas que pueden provocar distintos tipos de enfermedades, como infecciones del tracto urinario, meningitis y diarrea. Son cinco los tipos principales de *E. coli* que provocan diarrea y se han separado en categorías de acuerdo a características bioquímicas y mecanismos de patogenicidad, éstas son: *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y *Escherichia coli*

enteroinvasiva (EIEC) (Nataro y Kaper, 1998). Además de estas cepas diarreicas de *E. coli* se han reportado en años recientes otras como la *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC), de las cuales se tiene poca información acerca de la naturaleza de la invasión y la fuente de contagio, pero al no presentar serotipos similares a los antes mencionados se ha considerado como una de cepa distintas (Nataro y Kaper, 1998), y en este trabajo no son consideradas por la poca información que existe sobre esta.

Las diarreas que estas bacterias pueden provocar son; diarreas someras, diarreas severas similares a las provocadas por *Vibrio cholerae*, e incluso complicaciones potencialmente fatales como el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), el cual provoca falla renal (Levine, 1987).

Se han descubierto tres formas básicas de acción de estas cepas patógenas para provocar diarrea; 1) a través de la producción de toxinas que estimulen la secreción de las células, 2) invasión de las células, y 3) adherencia y señalización sobre la célula huésped (Nataro y Kaper, 1998.). Las toxinas producidas pueden dividirse en dos tipos principales; enterotoxinas y verotoxinas. Las enterotoxinas afectan a la célula superficialmente y generalmente no causan muerte celular, mientras que las verotoxinas afectando funciones vitales de la célula hospedera y consecuentemente la muerte (Granum y Brynestad, 1999).

En estudios realizados en Latinoamérica se ha detectado como agente causal de la diarrea del viajero a *E. coli* en un 42% de los casos (Jiang *et al.*, 1999). Las bacterias identificadas en la categoría ETEC son causantes de diarrea infantil en los países en desarrollo y la llamada diarrea del viajero en los visitantes a estas regiones. Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tiene diversas formas llamadas CFA (colonization factor antigens) y por la producción de dos enterotoxinas; la toxina termoestable ST y la toxina termolábil LT las cuales pueden presentarse individualmente o en conjunto (Schultz *et al.*, 1994; Gray, 1995). Las toxinas se localizan en plásmidos, aunque también pueden localizarse en

transposones, Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, en la superficie de la membrana de células intestinales, provocando la salida de agua y iones (Kaper *et al.*, 2004). Mediante estudios epidemiológicos se ha determinado que los vehículos más comunes para la infección por ETEC son los alimentos y agua contaminados (Wood *et al.*, 1983), con dosis infecciosa entre 10^5 y 10^8 bacterias (Granum y Brynestad, 1999).

EPEC es la cepa más comúnmente encontrada en los casos de diarrea en niños (Clarke *et al.*, 2003) y fue también el primer tipo de cepa en ser descrito. Las bacterias del tipo EPEC causan diarreas acuosas sin sangre, la invasión y daño en el huésped son causados por factores de adherencia que atacan el epitelio intestinal, el mecanismo de patogenicidad es complejo y comienza con una estrecha adherencia entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, y la formación de polímeros de actina, que llevan a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión, se incrementan los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, este mecanismo ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E). La habilidad para inducir esta patología es codificado por genes cromosomales como *eae* que codifica para la proteína intimina y se encuentra en una región denominada isla de patogenicidad llamada LEE (Locus de esfacelamiento del enterocito) y por genes codificados en un plásmido denominado EAF (factor de adherencia de EPEC) el cual promueve la adherencia por pilis llamadas *bfp* (pilus formador de haces). La isla tiene homólogos en otro tipo de bacterias como cepas EHEC y *Citrobacter rodentium*. (Rodríguez-Angeles, 2002., Kaper *et al.*, 2004). Se reconocen como cepas típicas EPEC a aquellas que tienen los genes para la intimina y el plásmido EAF que codifica para *Bfp*, y se dice que son atípicas cuando solo presentan el gen *eae* y carecen del plásmido EAF (Rodríguez-Angeles, 2002). Se han aislado cepas de este tipo tanto en alimentos y agua contaminados, como en el aire y arena, la dosis infecciosa es de 10^8 a 10^{10} organismos (Nataro y Kaper, 1998).

Las cepas EHEC producen diarrea con sangre y dolores abdominales, se ha identificado a esta categoría como la causante del SUH, la invasión es realizada por la producción de verotoxinas como la “Shiga-like” (Stx). El mecanismo de acción de esta categoría es mediada principalmente por la producción de Stx su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago Stx, que está inserto en el genoma. La Stx actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60s de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero, como se mencionó anteriormente pueden adicionalmente presentar el mecanismo de adherencia y esfacelamiento. El vehículo de transmisión son los alimentos de origen vacuno y también ha sido aislada de agua (Griffin y Tauxe, 1991). La importancia de esta cepa radica en su baja dosis infecciosa que es de 10 organismos únicamente (Granum y Brynestad, 1999).

La cepa del tipo EAEC provoca diarreas crónicas, la forma de daño al huésped consiste en una prominente aglutinación sobre células de tipo HEp-2, la adherencia de estas bacterias se debe a la presencia de una fimbria flexible, llamada fimbria 1 de adherencia agregativa, la cual es codificada por el gen *aggA* que se encuentra en un plásmido, en este también se encuentra un gen que codifica para la toxina EASTI (Savarino *et al.*, 1996). Investigaciones recientes señalan a esta cepa como la principal causa de diarrea del viajero en países subdesarrollados como India, Jamaica y México (Adachi *et al.*, 2001). No se ha precisado la fuente de infección (Gray, 1995) y no se ha definido aún la dosis infecciosa, pero estudios con voluntarios muestran que ocurre infección al consumir entre 10^8 y 10^{10} organismos (Mathewson *et al.*, 1986).

1.1.2. EIEC y *Shigella*

El modo de acción de las cepas del tipo EIEC es similar al de *Shigella* ya que comparten algunas características bioquímicas, ambas son negativas a la descarboxilasa y lactosa, produce enteritis invadiendo la mucosa del colon, el primer paso en el proceso de patogénesis es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de las proteínas mucinasa y adhesina, posteriormente entra por endocitosis a la célula, reproduciéndose en el interior y diseminándose a las células adyacentes, causando consecuentemente la muerte de las células epiteliales (Nataro y Kaper, 1998). Este mecanismo de patogénesis combina la acción de genes que permiten la invasión y se encuentran codificados en un plásmido llamado pInv, y la producción de enterotoxinas cuyos genes participantes se encuentran en el cromosoma. Los síntomas característicos de las personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa con sangre y moco, pero en ocasiones solo se puede presentar diarrea y puede ser confundida con la diarrea provocada por cepas EPEC. Las cepas de EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados en cuyo caso las fuentes de contagio más comunes son agua y alimentos, sin embargo, también ocurre la transmisión de la enfermedad de persona a persona. La dosis infecciosa es similar a la de *Shigella* ver a continuación (Gray, 1995.).

El género *Shigella* esta compuesto por cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. sonnei* y *S. flexneri*, todas son patógenas de humanos y se transmiten usualmente de persona a persona, así como por la ingestión de agua y alimentos contaminados, con una dosis infecciosa muy baja variando de 10^2 a 10^5 organismos. Las cepas virulentas de *Shigella* causan una enfermedad conocida como shigellosis, los síntomas clínicos de esta enfermedad incluyen diarrea, fiebre, disentería e incluso la muerte, si no se toman las medidas adecuadas. (Theron y Cloete, 2001; Granum y Brynestad, 1999, Rodríguez-Angeles, 2002).

1.1.3 *Salmonella*

Las especies de *Salmonella* son reconocidas como los mayores patógenos de animales y humanos difundidos en todo el mundo, incluso en países industrializados y afectan gravemente a la industria alimenticia. Este grupo de bacterias es resistente a los cambios ambientales, algunas especies pueden crecer a 54°C, mientras que otras pueden hacerlo entre los 2 y 4°C. Son capaces además de tolerar pH de 6 a 9 y son uno de los mayores problemas en los productos cárnicos; principalmente en la carne de pollo y el huevo.

La invasión al huésped es mediada por la producción de toxinas, con una dosis infecciosa baja, de 1 a 10² organismos (Granum y Brynestad, 1999). Las enfermedades más conocidas provocadas por especies de *Salmonella* son la tifoidea causada por *S. typhi* y la paratifoidea causada por *S. paratyphi*, se estima que ocurren 17 millones de casos a nivel mundial (WHO, 2000).

1.1.4. Factores relacionados con la patogenicidad de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella*

En este trabajo de investigación se seleccionaron nueve genes, de los cuales la presencia del primero *putP*, permite detectar la presencia de *E. coli*, mientras que los otros ocho permiten distinguir a las bacterias patógenas de las no patógenas, ya que estos genes codifican para factores que promueven daño en el huésped.

El operón *put* esta compuesto de dos genes estructurales: *putP* y *putA*, *putP* codifica para una proteína integral de membrana llamada permeasa de prolina y se ocupa de transportar prolina al interior de la células donde es degradada a glutamato ya que es usada como fuente de nitrógeno o carbono, esta degradación es realizada por la proteína bifuncional (oxidasa deshidrogenasa) codificada por el gen *putA*, la actividad del operón *put* no es requerido para la sobre vivencia y crecimiento, excepto cuando la prolina es la única fuente de nitrógeno (Nakao *et al.*, 1987). El

gen *putP* por ser parte de la maquinaria esencial de esta bacteria se encuentra presente en todas las cepas de *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997).

La toxina termolábil (LT) esta muy relacionada con la toxina del cólera, ya que tienen una identidad de aproximadamente el 80% sin embargo el daño producido por LT es menor, ya que los síntomas duran pocos días. La toxina está constituida de dos subunidades: una subunidad A y cinco subunidades B. La subunidad B permite la unión de la holotoxina a los gangliósidos de superficie GM1 y GD1b, y la subunidad A es la responsable de la actividad enzimática, La permanente activación de la adenilato ciclasa en las células hospederas incrementa los niveles de cAMP, actividad que a su vez activa los canales de cloro en las células epiteliales, lo cual provoca diarrea. LT puede estimular también la síntesis de prostaglandinas y estimular el sistema nervioso entérico, ambas actividades provocan una estimulación de la secreción y una inhibición de la absorción (Kaper *et al.*, 2004). El gen *eltA* codifica para la subunidad A (Spicer y Noble, 1988).

ST puede ser clasificado dentro de dos genotipos mayores, STa y STb, típicamente cepas ETEC aisladas desde humanos producen STa codificado por el gen *estA*. Dos diferentes subtipos de STa existen; STIb y STIa. STIa ha sido encontrado mayoritariamente en ganado porcino, mientras que en humanos se han encontrado ambos (Rao, 1985). Estas dos variantes de STa son muy similares en estructura y función, STIb consiste de 18 aminoácidos y STIa de 19 aminoácidos, ambos se unen a receptores específicos de las vellosidades del intestino delgado para activar el sistema de guanilato-ciclasa-cGMP, lo cual resulta en diarrea (Moseley *et al.*, 1982), ambas toxinas son codificadas por plásmidos (Schultz *et al.*, 1994).

El locus de esfacelamiento enterocítico (LEE) es una isla de patogenicidad presente en las cepas EPEC y EHEC se localiza en una región del cromosoma de 35-kb, esta región contiene a

genes como *eaeA*, *eaeB* (que participan en la adherencia y esfacelamiento), genes *sep* los cuales son necesarios para la secreción de proteínas extracelulares por cepas EPEC. El regulador de LEE (*ler*) juega un papel central en la regulación de los genes de virulencia presentes en esta isla (Elliot *et al.*, 2000). LEE posee toda la maquinaria para producir las lesiones de tipo adherencia y esfacelamiento (A/E), típico de las cepas EHEC y EPEC (McDaniel *et al.*, 1995). Adicional al mecanismo de A/E en cepas EPEC existen plásmidos con el EAF (factor de adherencia de EPEC) que incluyen al gen *bfpA* que sintetiza pili con forma rizada el cual permite la invasión y los genes *per* (regulador codificado por plásmido) (Sears y Kaper 1996).

El gen *stx* codifica para la verotoxina shiga-like (SLTI) y provoca la muerte de las células afectadas por las cepas de tipo EHEC. SLTI esta compuesta por dos subunidades; una subunidad A y múltiples copias de la subunidad B, la actividad de la toxina es citotóxica en células de tipo HeLa y Vero (Obrien y Holmes, 1987).

En las cepas EAEC se utilizó un fragmento del plásmido pCVD432 presente en la mayoría de los serotipos, el cual posee la maquinaria para adherirse y afectar a la célula hospedera mediante enterotoxinas que promueven el desarrollo de diarrea, la detección de este factor se conoce también como prueba EAggEC (Schmidt *et al.*, 1995).

En las cepas EIEC y *Shigella* se utilizó una región del plásmido de invasión *inv* que comparten ambas especies y que posee al menos cuatro loci de virulencia, (la región seleccionada) corresponde al sitio del invasive locus association *ial* por sus siglas en inglés (Schoolnik, 1993).

El gen *invA* forma parte del locus *inv* el cual esta codificado en el cromosoma y es fundamental en las especies de *Salmonella* para introducirse en las células epiteliales. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la proteína InvA es un componente esencial del aparato de secreción

independiente *sec*, el cual permite la virulencia completa de este tipo de bacterias (Ginocchio y Galán, 1995; Clark *et al.*, 1996). La proteína InvA, es miembro de una familia de proteínas involucradas en la síntesis flagelar así como en la secreción de factores de virulencia por un gran número de patógenos de plantas y mamíferos, la estructura secundaria de estas proteínas es muy similar y esta compuesta por una región hidrofóbica amino terminal que consiste de 6 u ocho dominios y una región hidrofílica carboxilo terminal la cual, reside en el citoplasma.

1.1.5. Área de Estudio

El área de Xochimilco se localiza al sur de la Ciudad de México y forma parte del sistema acuífero Chalco-Xochimilco, desde el cual se extraen 27 m³/s de los 63 m³/s del agua utilizada para consumo humano en la zona metropolitana de la Ciudad de México (Mazari *et al.*, 1996). El área esta compuesta por un sistema de canales los cuales reciben aportes de lluvia, agua tratada desde tres en plantas de tratamiento (en orden de importancia Cerro de la estrella, Coyoacán y San Luis Tlaxialtemaco) y agua no tratada. Una importante cantidad de los vegetales consumidos en la ciudad de México se producen en esta zona (Rosas y Coutiño, 1984). Se seleccionó esta zona por poseer dos tipos de agua que son utilizados para uso y consumo humano, es decir agua subterránea (pozos) y agua superficial (canales).

1.2 Antecedentes

En estudios previos realizados en la zona de Xochimilco se ha detectado la presencia de organismos indicadores y bacterias patógenas, entre los indicadores microbiológicos se ha detectado al bacteriófago MS-2 (virus que infecta a *E. coli*), el cual ha sido el más frecuentemente encontrado (en un 72% de los casos), mientras que los coliformes totales se han detectado en un 48% de los casos, enterococos fecales 28% y coliformes fecales en un 14% considerando un total de 50 muestras (Mazari-Hiriart *et al.*, 1999). Considerando la frecuencia de organismos indicadores en los acuíferos poniente y sur de la Ciudad de México, el poniente presenta un mayor grado de contaminación del agua de los pozos que el sur. En la zona de Xochimilco específicamente se ha detectado la presencia de bacterias patógenas como *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus* y bacterias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* entre otras (Mazari-Hiriart *et al.*, 2000). La presencia de *Helicobacter pylori* (bacterias asociada con úlcera y un factor de riesgo para cáncer gástrico) ha sido detectada por PCR en cinco puntos de muestreo de la zona de canales de Xochimilco (Mazari-Hiriart *et al.*, 2001).

Por otro lado los estudios epidemiológicos realizados en México para determinar cuales son los organismos más frecuentemente relacionados con casos de diarrea en infantes, se ha determinado que las cepas de *E. coli* involucradas y citadas en orden decreciente son: ETEC en la mayoría de los casos (48%) y EIEC, EPEC, EHEC no 0157:H7 cada una con menos de 10% de los casos (Rodríguez-Angeles *et al.*, 2002; Cortes-Ortiz *et al.*, 2002; Calva, 1998). También se ha relacionado la calidad del agua con la incidencia de enfermedades diarreicas en el estado de Sonora en donde se observó que la frecuencia de infecciones era menor en los sitios con mejor calidad (Gutiérrez *et al.*, 1989).

En México la calidad del agua es regulada a través de las normas oficiales Mexicanas. Entre las Normas que consideran la calidad del agua principalmente se encuentran; la NOM-001-

SEMARNAT-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales (DOF, 1997), la NOM-003-SEMARNAT-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público (DOF, 1998) y la NOM-127-SSA1-1994 salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización (DOF, 2000) .

A continuación se presenta una tabla comparativa de las tres normas y los límites de organismos indicadores.

Tabla 1. Parámetros permisibles de organismos indicadores considerados en las normas de calidad para agua de uso y consumo humano y reúso

Parámetro (unidad)	Límite permisible/Guía	Uso	Referencia
CT (NMP/100 mL o UFC/100 mL de acuerdo con la metodología empleada)	Ausencia o no detectables	Uso y consumo humano	DOF, 2000.
CF (NMP/100mL o UFC/100mL de acuerdo con la metodología empleada)	Ausencia o no detectables	Uso y consumo humano	DOF, 2000
CF (NMP/100 mL)	1000 promedio mensual 2000 promedio diario	Riego agrícola	DOF, 1997.
CF (NMP/100 mL)	1000	a. Fuente abastecimiento para uso público urbano b. Riego agrícola, c. Protección vida acuática: agua dulce	DOF, 2004.
CF (NMP/100 mL)	240 promedio mensual	Servicios al público con contacto directo	DOF, 1998.
CF (NMP/100 mL)	1000 promedio mensual	Servicios al público con contacto indirecto u ocasional	DOF, 1998.
Huevos de helminto Huevo/L	1 huevo riego restringido 5 huevos riego no restringido	Riego agrícola	DOF, 1997.
Huevos del helminto (h/L)	≤ 1 huevo	Servicios al público con contacto directo	DOF, 1998.
Huevos del helminto (h/L)	≤ 5 huevos	Servicios al público con contacto indirecto u ocasional	DOF, 1998.
pH	6.0-9.0	Riego agrícola	DOF, 2004.
pH	6.5-8.5	Protección vida acuática	DOF, 2004.
Oxígeno disuelto (mg/L)	4.0	Fuente de abastecimiento para uso público urbano	DOF, 2004.

1.3 Justificación

La incidencia de enfermedades diarreicas sigue siendo una importante causa de enfermedad e incluso de muerte en niños menores de 5 años, una de las fuentes de contaminación es el agua que se utiliza para consumo humano, así como la que se utiliza para el riego de alimentos, los indicadores señalados en las normas oficiales mexicanas informan sobre la presencia de bacterias, sin embargo, es importante distinguir entre las que naturalmente ocurren en los ambientes acuáticos y aquellas que son patógenas, las cuales pueden distinguirse de las no patógenas, mediante la identificación directa de sus factores de virulencia.

1.4 Hipótesis

La presencia de bacterias causantes de diarrea determinadas por sus factores de virulencia debe estar correlacionada con la detección de bacterias indicadoras.

2. Objetivos

Objetivo general

2. Determinar la relación que existe entre las bacterias indicadoras coliformes y la presencia de cepas patógenas de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*.

Objetivos particulares

2.1 Detectar la presencia de factores de virulencia de cepas de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* causantes de diarrea en agua superficial y subterránea de la zona de Xochimilco.

2.2 Determinar si hay de diferencias significativas en las características microbiológicas y fisicoquímicas entre los tipos de agua superficial y subterránea.

2.4 Determinar las variaciones en la frecuencia de bacterias indicadoras coliformes y factores de virulencia por el efecto de temporadas (secas y lluvias).

3. Metodología

Se realizaron muestreos en la zona de Xochimilco en dos temporadas; lluvias y secas, y fueron seleccionados al azar para cada estación un total de 20 sitios, 10 sitios fueron pozos del acuífero (agua subterránea) y 10 del sistema de canales (agua superficial), seis de estos canales corresponden a la zona de riego y cuatro a la zona turística. Se realizó un muestreo del agua subterránea en las etapas de pre y post cloración. La toma de muestras se realizó desinfectando la llave con alcohol y dejando correr agua del pozo durante 5 minutos. Se colectaron 2 L de agua en botellas de polipropileno previamente esterilizadas 1 L para las pruebas microbiológicas (detección de coliformes) y 1 L para las pruebas moleculares (detección de genes relacionados con patogenicidad por PCR). Las muestras fueron mantenidas en refrigeración a 4°C en hielo y se adicionó a las muestras que contenían cloro 1 mL de tiosulfato de sodio al 10% para frenar la actividad del cloro en el agua. Las muestras fueron procesadas para las pruebas moleculares y detección de coliformes el mismo día a las 4 horas $\pm$ 1 de la toma de la muestra, estas últimas siguiendo el procedimiento señalado por APHA (1995).

3.1 Detección de coliformes por la técnica de filtración a través de membrana

La determinación microbiológica de la calidad del agua se realizó mediante la detección de bacterias indicadoras; coliformes totales y coliformes fecales. Se filtraron 100 mL de agua previamente agitada a través de membranas de acetato de celulosa, con un poro de 0.45 μ m para cada Caja Petri, y se utilizaron dos repeticiones para cada tipo de indicador de acuerdo con APHA (1998) y Millipore (2000). Los coliformes totales fueron sembrados en caldo m-Endo

(Difco) y los coliformes fecales fueron sembrados en agar m-Fc (Difco), después de 24 hrs y 48 hrs respectivamente se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC).

Se filtraron 100 mL de agua debido a que estudios previos han determinado que mayores cantidades de agua no incrementan la sensibilidad del método usado (Mazari *et al.*, 1999).

3.2.0. Detección de factores de virulencia causantes de diarrea

Las muestras para la reacción en cadena de la polimerasa fueron procesadas de acuerdo con la metodología que se describe a continuación.

3.2.1 Concentración de muestras para aislar bacterias por centrifugación

Cada muestra de 1 L fue concentrada por centrifugación a 10,000 X g por 30 min a 4 °C, los sedimentos fueron resuspendidos en 10 mL de Tris-HCL 10 mM (pH 8.0) 1 mM EDTA y se tomaron 10 alícuotas de 1 mL, de las cuales 9 fueron almacenadas a -70 °C (Mazari *et al.*, 2000) y una alícuota fue utilizada posteriormente para cultivo de enriquecimiento.

3.2.2. Cultivo de enriquecimiento

Se sembró 1 mL del concentrado de cada muestra obtenida con 9 mL de caldo de soya y tripticaseína y se incubó por 18 hrs. a 37°C, se tomo 1 mL para la extracción de ADN y 0.5 mL fueron resuspendidos con 0.5 mL de glicerol estéril para su conservación a -70°C.

3.2.3. Extracción de ADN

Se realizó una extracción del ADN mediante el uso de kit (DNAm mini kit QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante para bacterias en cultivos líquidos (QIAGEN, 1999).

3.2.4. Secuencias utilizadas para detectar factores de virulencia

Se seleccionaron en total 10 pares de cebadores, ocho pares de cebadores se seleccionaron de artículos publicados previamente y probados para cepas patógenas de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*, el gen *ler* fue diseñado por la Dra. Amanda Cobian y el gen *putP* (gen esencial presente en todas las cepas de *E. coli* fue diseñado por la Dra. Valeria Souza a partir de secuencias depositadas en el Gen data Bank (números de acceso [AF328682](#) y [U00096](#) respectivamente), todos los cebadores fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias de los cebadores son mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias utilizadas para amplificar factores de virulencia en cinco cepas causantes de diarrea de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*.

Cepa	Factor	Secuencia del cebador	Fragmento	Referencia
<i>E. coli</i>	<i>putP</i>	CTATATCTTTGGCATGATA CGTATTAGTATGACCTGGA	796	Valeria Souza com. personal.
ETEC	ST1b	TCACCTTTCCCTCAGGAT GTGTTGTAATCCTGCTTG TA	169	Bölin, <i>et al.</i> , 2006
	LT	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	696	Schultsz 1994
EPEC	EAF	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA TATGGGGACCATGTATTATCA	397	Franke <i>et al.</i> , 1994
	<i>bfp</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTATCCAACCTGGTA	330	Gunzburg, <i>et al.</i> , 1995
	<i>ler</i>	TTTCCTCTTCGGTGTCTTC TTTACGATAGACTTCTCGAC	340	Amanda Castillo com. Personal
EHEC	SLTI	TTTACGATAGACTTCTCGAC CACATATAAATTATTTGCTC	227	Fratamico <i>et al.</i> , 1995
EAEC	Plásmido pCVD432	CTGGCGAAAGACTGTATCAT CAATGTATAGAAATCCGCTGTT	630	Schmidt <i>et al.</i> , 1995
EIEC y <i>Shigella</i>	<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAATTATTTCC	300	Schoolnik 1993
<i>Salmonella</i>	<i>invA</i>	CCTGATCGCACTGAATATCGTACTG GACCATCACCAATGGTCAGCAGG	598	Kapley <i>et al.</i> , 2001

3.2.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las condiciones para amplificar cada uno de los factores y la mezcla de amplificación se muestran en la Tabla 3 y 3ª respectivamente, se basan en lo señalado por diversos autores, aunque algunas fueron modificadas; estas modificaciones se muestran subrayadas, las reacciones fueron realizadas utilizando el kit Geneamp PCR reagent Kit (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, U.S.A), y el termociclador personal (Eppendorf, Hamburg, Germany). El volumen final de la reacción fue de 25µl.

Tabla 3. Condiciones de amplificación de factores de virulencia de *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella* por PCR.

Cepa	<i>E. coli</i>	ETEC	EPEC				EHEC	EAEC	EIEC	<i>Salmonella</i>
Factor	<i>putP</i>	STIb	LT	EAF	BFP	<i>ler</i>	SLTI	pCVD432	<i>ial</i>	<i>invA</i>
DI	120s/94°C	60s/94°C	60s/95°C	60s/94°C	60s/94°C	60s/95°C	60s/94°C	120s/94°C	60s/94°C	120s/94°C
Ciclos	35	24	35	35	30	30	35	35	30	30
D	60s/94°C	60s/94°C	60s/95°C	40s/94°C	30s/94°C	60s/95°C	90s/95°C	40s/94°C	40s/94°C	60s/94°C
A	60s/50°C	60s/52°C	60s/55°C	60s/60°C	60s/56°C	60s/60°C	60s/48°C	60s/55°C	60s/55°C	60s/50°C
E	60s/72°C	60s/72°C	60s/70°C	45s/70°C	60s/72°C	120s/72°C	90s/72°C	60s/72°C	60s/72°C	60s/72°C
Ez 72°	2min	1min	7min	5min	5min	10min	5min	8min	8min	10min
ciclos		4								
A2		120s/52°C								
E2		480s/72°C								
Cc+	<i>E. coli</i>	E7476	H10407	E2348/69	E2348/69	E2348/69	O157:H7	O44:H18	<i>Shigella</i>	

DI= desnaturalización inicial, D= desnaturalización, A= alineamiento, E= Elongación, Ez= elongación final, Cc= cepa control positivo. En el caso del factor STIb se utilizaron dos pasos de ciclos, en los cuales A2= alineamiento 2 y E2= elongación 2 corresponden al segundo paso.

Tabla 3ª. Mezcla de amplificación de los factores de virulencia por PCR.

Cepa	<i>E. coli</i>	ETEC	EPEC				EHEC	EAEC	EIEC	<i>Salmonella</i>
[] inicial	<i>putP</i>	STIb	LT	EAF	BFP	<i>ler</i>	SLTI	pCVD432	<i>ial</i>	<i>invA</i>
Buffer (x)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mg Cl (mM)	1.5	1.5	2.5	2.5	2.5	1.5	2.5	1.5	1.5	3
DNTPs (µM)	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Taq polimerasa (u/ml)	2.6	2.5	2.6	2.5	2.5	2	2.5	3	2.5	2.5
Cebador 1 (p/mol)	3.5	10	9.6	14.3	21.2	1	21.4	9	12.6	0.5
Cebador 2 (p/mol)	1.0	10	9.71	13.4	12.9	1	18	10	18.5	0.5
templado	5	5	5	5	5	0.5	2.5	5	2.5	5

X= concentración x, mM =milimolar, µM= micromolar, u/ml= unidades sobre mililitro, p/mol= picomolar,

3.2.6 Prueba de sensibilidad

Las cepas bacterianas de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp. y *Proteus* spp. obtenidas de muestras ambientales (agua subterránea y agua superficial) y cepas control de ETEC H10407, EPEC E2348/69, EHEC O157:H7, EAEC O44:H18 y *Shigella flexneri*, fueron sembradas individualmente en caldo de soya tripticaseína (TSB) hasta la fase exponencial de crecimiento correspondiendo a 1×10^8 UFC ($A_{600}=0.35$).

Se prepararon diferentes concentraciones a partir de diluciones seriadas (en solución salina 0.9% NaCl). Los conteos celulares fueron confirmados por plaquéo en cajas con agar de soya tripticaseína considerándose cada UFC.

Alícuotas de 10 µl de las diluciones de las bacterias antes mencionadas fueron cosechadas en 910 µl de muestras ambientales filtradas (agua superficial y agua subterránea con filtro de 0.45 µm de acetato de celulosa, Millipore MA) para un volumen final de 1000 µl, fueron incubadas durante 6 h a temperatura ambiente $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (temperatura promedio durante la temporada de secas, en ambos tipos de agua).

Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a $10,000 \times g$ por 5 min y resuspendidos en 1 mL de TSB e incubados por 12 horas. El sembrado se realizó con las concentraciones 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 y 1×10^1 de cada tipo de bacteria y por duplicado, se adicionaron dos tubos como testigos conteniendo solamente agua superficial y agua subterránea filtrada. Las muestras artificialmente contaminadas y los tubos testigos fueron tratadas posteriormente como las muestras ambientales iniciando con una extracción de ADN para los ensayos de PCR.

3.2.7. Secuenciación de muestras positivas a los factores de virulencia.

Todos los productos de PCR positivos fueron purificados con el uso del kit (QIAquick PCR purification Kit QIAGEN, Hilden Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN, 2000), y fueron enviadas en volúmenes de 15µl de concentrado a secuenciar por el método de terminación de cadena al Instituto de Biología de la UNAM.

3.2.8 Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos temperatura, conductividad y pH fueron medidos con un multiparámetros portable YSI modelo 3500 [serial No. 93J09730, Yellow Spring, Ohio]. El oxígeno disuelto fue determinado con el medidor de oxígeno YSI 51B, [serial No. 95A27799]; todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

3.2.9. Pruebas estadísticas

Los resultados fueron analizados de la siguiente manera: en los conteos de bacterias se consideró la media geométrica y la prueba de T , a los factores de virulencia se aplicaron pruebas no paramétricas como la prueba de Spearman ya que no presentan un comportamiento normal (Siegel and Castellan, 1995). En el caso de los fisicoquímicos se consideró la media aritmética y la prueba de T .

4. Resultados y Discusión

La sensibilidad de los PCR mostró que los factores *putP*, LT, *bfp*, pCVD432, e *ial*, fueron detectables en 1×10^2 (ml)⁻¹ en agua superficial y subterránea, mientras que ST, SLTI y *invA* pueden ser detectados en 1×10^3 (ml)⁻¹ en ambos tipos de agua, el factor *ler* es detectado en 1×10^2 (ml)⁻¹ en el agua subterránea y un 1×10^3 (ml)⁻¹ en agua superficial.

En la tabla 4 se ilustran los valores obtenidos del muestreo total en los dos tipos de agua y en las dos temporadas. En el caso de las bacterias indicadoras, los resultados mostrados corresponden a la media geométrica del duplicado, en los factores de virulencia se ilustran únicamente aquellos que fueron positivos en al menos una de las muestras, los factores no detectados fueron LT, EAF, *bfp* de *E. coli* y el factor *invA* de *Salmonella*. En los parámetros fisicoquímicos se muestran las medias aritméticas de los resultados obtenidos por duplicado.

En el 65% (26/40) de las muestras se detectó la presencia de un indicador o un factor de virulencia. El 55% (22/40) de las muestras fue positivo a la prueba de coliformes fecales (CF), mientras que el 42.5% (17/40) fue positivo a coliformes totales (CT) y *E. coli* detectada por PCR, se detectó en un 20% (8/40). El factor de virulencia encontrado en un mayor número de sitios fue pCVD432 que se detectó en el 10% (4/40) de las muestras (Figura 1).

Tabla 4. Bacterias indicadoras, factores de virulencia y parámetros fisicoquímicos en agua superficial y subterránea de la zona de Xochimilco, Distrito Federal.

Sitios		CT	CF	<i>E. coli</i>					<i>Shigella</i>	pH	Condu	T	O ²
				<i>putP</i>	<i>pCVD</i>	ST	<i>ler</i>	SLTI	<i>ial</i>			°C	mg/L
											µS cm ⁻¹		
Canales	Secas												
	1 Japón	6500	0	-	-	-	-	-	-	8.57	0.75	14.1	3.6
	2 La comunidad	2000	0	-	-	-	-	-	-	8.59	0.75	13.6	5.2
	3 Atizapa 1	3500	200	-	-	-	-	-	-	8.31	0.77	14.3	5.4
	4 Atizapa 2	500	200	-	-	-	-	-	-	8.77	0.76	16.0	4.4
	5 Club de Remo	1000	150	+	-	-	-	-	-	7.38	0.77	15.2	2.0
	6 P.Tratamiento	0	900	-	-	-	-	-	-	7.44	0.75	16.3	2.4
	7 La Curva	500	1550	+	+	-	-	-	+	7.15	0.59	15.2	3.6
	8 Canal Ayac	0	10000	+	+	-	-	-	-	7.19	0.75	14.0	3.8
	9 San Cristóbal	35500	10000	+	+	+	-	+	-	6.95	0.68	15.9	4.4
Pozos	10 Xilopa	0	2300	+	+	-	+	-	-	7.52	0.71	16.9	4.6
	11 S-7	0	0	-	-	-	-	-	-	7.15	0.32	16.2	1.2
	12 San Luis 17	0	0	-	-	-	-	-	-	6.68	0.83	15.3	2.4
	13 Mirador 3	0	0	-	-	-	-	-	-	7.72	0.00	14.3	1.1
	14 N. San Luis	0	0	-	-	-	-	-	-	7.40	0.17	14.1	4.6
	15 Nativitas	0	0	-	-	-	-	-	-	7.19	0.16	14.1	3.8
	16 S-6	0	0	-	-	-	-	-	-	7.23	0.15	14.5	3.8
	17 Reclusorio Sur	0	0	-	-	-	-	-	-	7.54	0.22	16.3	4.6
	18 La Noria	0	0	-	-	-	-	-	-	6.93	0.17	15.1	4.6
	19 Noria 2	0	0	+	-	-	-	-	-	7.85	0.39	18.9	2.8
Canales	20 Pista Olímpica	0	0	-	-	-	-	-	-	7.73	0.52	25.3	2.0
	Lluvias												
	21 Trancanatlita	2600	10900	-	-	-	-	-	-	7.64	0.45	20.0	6.8
	22 Tlilac	0	600	+	-	-	+	-	-	8.49	0.48	21.0	8.6
	23 Japón	0	200	-	-	-	-	-	-	8.13	0.47	19.6	4.6
	24 Tezhuilo	0	350	-	-	-	-	-	-	8.42	0.43	18.3	1.0
	25 Apatlaco	100	200	+	-	-	-	-	-	8.62	0.52	21.5	5.3
	26 Puente Urrutia	150	50	-	-	-	-	-	-	8.61	0.51	20.9	8.0
	27 P.Tratamiento	7700	8950	-	-	-	-	-	-	7.66	0.48	19.7	3.0
	28 Santísima	800	360000	-	-	-	-	-	-	7.33	0.46	19.7	1.0
Pozos	29 Miramar	2000	850	-	-	-	-	-	-	7.14	0.49	19.1	0.8
	30 Acoyotitla	2950	5150	-	-	-	-	-	-	7.20	0.50	19.2	0.2
	31 Noria 4	4	7	-	-	-	-	-	-	7.98	0.50	16.5	2.8
	32 Noria 6	10	4	-	-	-	-	-	-	7.81	0.46	16.1	2.4
	33 S-2	0	41	-	-	-	-	-	-	7.64	0.48	16.2	3.0
	34 Rec.Sur1	0	0	-	-	-	-	-	-	7.8	0.49	16.5	4.4
	35 P. San Lucas	0	0	-	-	-	-	-	-	7.77	0.45	15.0	4.0
	36 Santa. Cruz	0	0	-	-	-	-	-	-	7.88	0.50	19.8	4.6
	37 San Luis 18	5	7	-	-	-	-	-	-	7.57	0.44	14.3	4.0
	38 San Gregorio	0	0	-	-	-	-	-	-	8.07	0.47	15.4	3.0
	39 San Luis 12	0	0	-	-	-	-	-	-	8.19	0.43	15.4	3.8
	40 San Luis 19	0	0	-	-	-	-	-	-	7.62	0.45	15.0	3.2

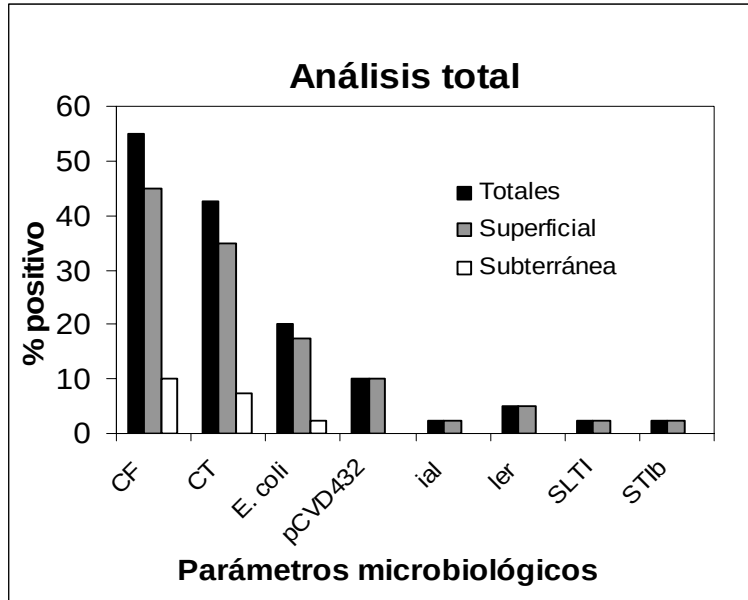


Figura 1. Porcentajes del muestreo total, canales y pozos de la zona de Xochimilco, Distrito Federal.

La media geométrica e intervalo de confianza de los parámetros microbiológicos para cada tipo de agua y temporada se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros microbiológicos en agua de la zona de Xochimilco, Distrito Federal

Tipo de agua	CT		CF	
	MG	IC95%	MG	IC95%
Secas				
<i>Canales</i>	2357	±9420	1085	±2970
<i>Pozos</i>	0	0	0	0
Lluvias				
<i>Canales</i>	1051	±1947	1517	±70009
<i>Pozos</i>	5.85	±3.64	8.96	±17.13

MG = media geométrica, IC = intervalo de confianza

La presencia de bacterias indicadoras y el factor putP no necesariamente señala la presencia de cepas virulentas, ya que *E. coli*, también puede vivir como comensal (Tabla 4).

Bacterias indicadoras

En el agua superficial (canales) se detectó un mayor número de CT en la temporada de secas, mientras que los CF fueron más abundantes en la temporada de lluvias (ver Tabla 4 y Tabla 5), lo cual también coincide con un aumento de la temperatura en esta temporada, en ambos casos el número de unidades formadoras de colonia (UFC) (tabla 5) en 100 mL rebasa las 240 UFC de bacterias indicadoras en promedio mensual en servicios al público con contacto directo y los 1000 de promedio mensual en servicios al público con contacto indirecto u ocasional establecido por la norma para agua de reuso (DOF, 1998). La temperatura media en los canales puede ser una condición que permite la supervivencia de coliformes fecales (CF) por periodos más largos incluso se ha sugerido que estos organismos ocurren de manera natural en aguas y suelos tropicales (Toranzos, 1991), y que dado a que se encuentran frecuentemente presentes, aún sin la influencia de actividad humana, no se consideran como buenos indicadores de contaminación fecal y riesgo a la salud pública (Santiago-Mercado y Hansen, 1987), por lo que se ha sugerido utilizar otro tipo de indicadores para las zonas tropicales como *E. coli* y los enterococos fecales y (Maier *et al.*, 2000).

En el agua subterránea (pozos) se detectaron UFC/100 mL con conteos bajos o nulos de ambos indicadores durante la temporada de lluvias (Tabla 5), estos valores superan lo establecido en la norma de agua para uso y consumo humano y que los conteos deben ser ausentes o no detectables (DOF, 2000), mientras que en la temporada de secas no se detectó ninguna bacteria indicadora, esta diferencia sugiere una posible contaminación hacia los pozos por infiltración a través del suelo y/o daños en el sistema, lo que permite la entrada de contaminantes al acuífero durante la temporada de lluvias en algunos sitios y es en la temporada de secas cuando se cumple con lo establecido por la norma para uso y consumo humano.

Los intervalos de confianza de las medias de las bacterias indicadoras, en ambos tipos de agua y temporadas muestran una gran variación en el intervalo de los valores por lo cual se aplicó una prueba no paramétrica, específicamente la prueba de Spearman, la cual mostró correlación únicamente entre coliformes totales y coliformes fecales, en el agua superficial, durante la temporada de lluvias obteniéndose una $R = 0.65$ considerando una $p < 0.05$; lo que significa que en un 65% de los casos la presencia de coliformes totales esta relacionada con la presencia de coliformes fecales.

Factores fisicoquímicos

La media aritmética de los parámetros fisicoquímicos para cada tipo de agua y temporada se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos en agua de la zona de Xochimilco, Distrito Federal

Tipo de agua	pH		Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		T ($^{\circ}\text{C}$)		O^2 Mg/L	
Secas	MA	IC95%	MA	IC95%	MA	IC95%	MA	IC95%
Canales	7.79	± 1.12	728	± 35	15.15	± 0.69	3.94	± 0.68
Pozos	7.34	± 0.23	293	± 147	16.41	± 2.14	3.09	± 0.86
Lluvias								
Canales	7.92	± 0.37	477	± 16	16.41	± 2.14	3.09	± 0.86
Pozos	7.83	± 0.12	465	± 16	16.02	± 0.94	3.52	± 0.46

MA = media aritmética, IC = intervalo de confianza

Los valores promedio de pH en agua superficial fueron de 7.79 y 7.92 en la temporada de secas y lluvias, respectivamente, el valor del intervalo de confianza 1.12 en el caso de secas muestra un mayor intervalo de variación entre los sitios analizados. En agua subterránea los valores promedio fueron de 7.34 y 7.83 en secas y lluvias, respectivamente, lo cual muestra una tendencia hacia la alcalinidad, lo cual podría ser el resultado de un incremento en el aporte de compuestos de naturaleza básica. La prueba de T mostró diferencias significativas entre el agua

superficial y subterránea solo en la temporada de lluvias, obteniéndose una $P < 0.01$, lo cual muestra que la lluvia tuvo un efecto en el pH.

La conductividad en el agua superficial fue más alta durante la temporada de secas respecto a la temporada de lluvias obteniéndose mediante la prueba de T diferencias significativas con una $p < 0.001$ (Tabla 6), debido probablemente a un incremento en la acumulación de materia orgánica producto de la disminución del nivel del agua por la extracción. Al comparar los dos tipos de agua en la temporada de secas también se obtuvieron diferencias significativas y una $p < 0.001$. Por otro lado, los valores promedio de la conductividad entre los dos tipos de agua durante la temporada de lluvias fueron muy similares ya que no se encontraron diferencias significativas.

La temperatura fue mayor en las muestras de agua superficial durante la temporada de lluvias respecto a la temporada de secas, probablemente por el aumento en la cantidad de radiación solar en esta temporada, la prueba de T mostró diferencias significativas obteniéndose una $p < 0.001$. También se observaron diferencias significativas al comparar la temperatura del agua superficial y agua subterránea en la temporada de lluvias, obteniéndose una $p < 0.001$. En el caso del agua subterránea no se detectaron diferencias significativas, lo que sugiere que este factor permanece constante durante todo el ciclo anual. En regiones templadas la variación de la temperatura es más aguda, se ha determinado en estudios previos que factores como las bajas temperaturas en invierno y la radiación solar en el verano tiene efectos en la supervivencia de bacterias, como en el caso de *Campylobacter*, cuya persistencia es mayor en el invierno y menor en el verano (Hörman *et al.*, 2003).

Factores de virulencia

Se detectó la presencia de cinco factores de virulencia; pCVD432, *ler*, ST, SLTI y *ial*, de los ocho analizados, los cuales señalan la presencia de cepas patógenas de *E. coli* (EAEC, EPEC, EIEC y *Shigella*, respectivamente), no se detectó la presencia de *Salmonella* en ninguna de las muestras y ningún factor de virulencia fue detectado en agua subterránea.

En el agua superficial durante la temporada de secas fue en la que se detectó un mayor número de factores de virulencia como se muestra en la figura 1.

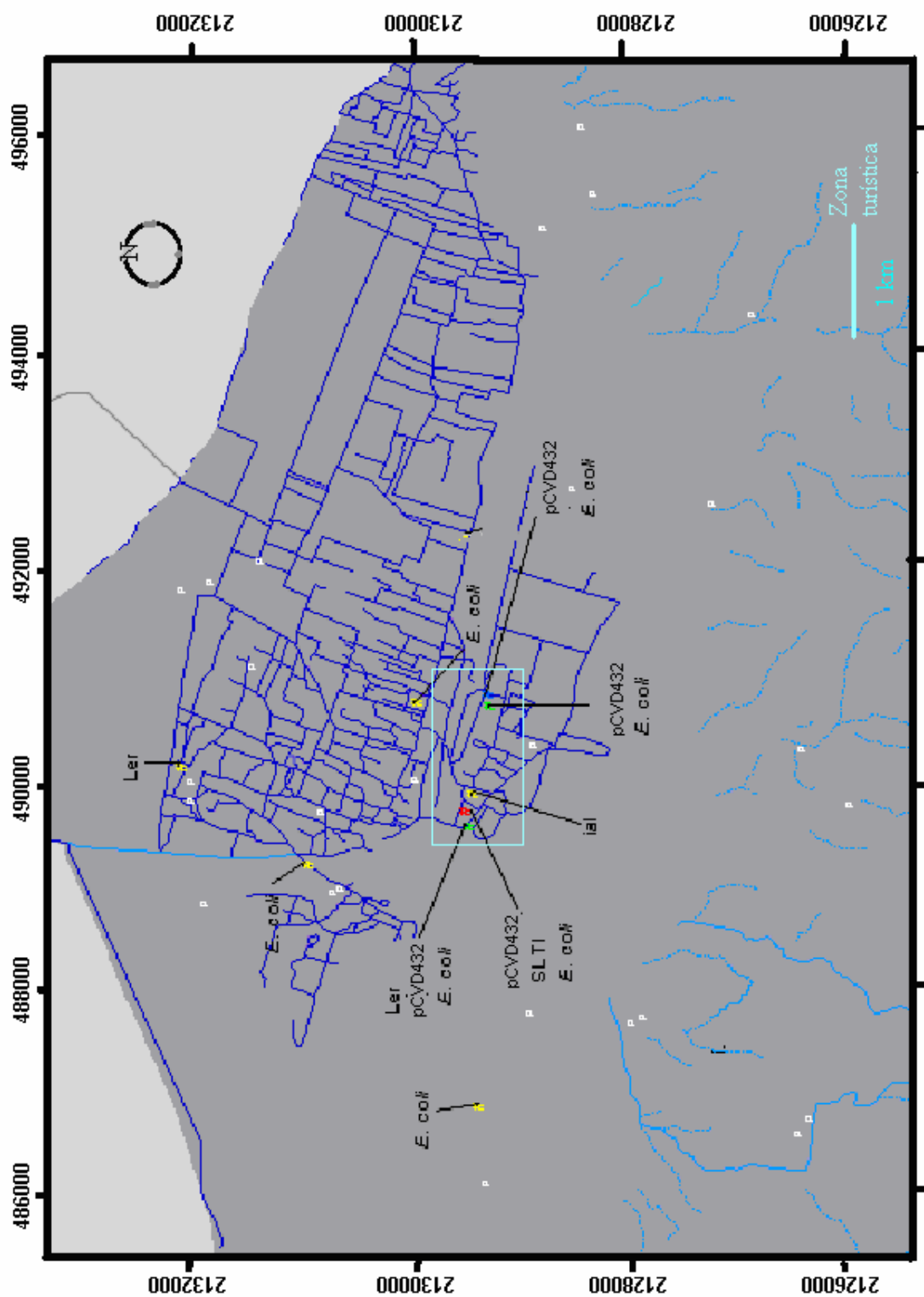
El factor no patogénico *putP* indicador de la presencia de *E. coli* fue encontrado en el mayor porcentaje de las muestras 20% (8/40) (Figura 1). En una de las muestras en las que fue detectado no se detectaron coliformes, probablemente por una mayor sensibilidad del PCR sobre MF. El factor de virulencia más frecuente fue pCVD432 detectado en el 10% (4/40) de los casos, pCVD432 fue exclusivo del agua superficial en la temporada de secas y la bacteria predominante de este tipo de agua ya que se presentó en cuatro de los seis sitios positivos a *E. coli*, los cuatro sitios en los que fue detectada corresponden a la zona turística la cual es más fuertemente afectada por la actividad humana y en la cual se observa un mayor número de descargas domésticas ver Figura 2.

El factor *ial* se detectó en agua superficial en la temporada de secas y también se encontró el factor identificador de *putP* por lo que se consideró que la cepa corresponde a una *E. coli*.

El factor *ler* fue detectado en el 5% (2/40) de las muestras, ambas secuencias tuvieron homología superior al 98% con secuencias depositadas en el Gen bank de *E. coli*, por lo que se consideró que el factor encontrado corresponde a esta bacteria.

La detección del factor STa el cual ha sido comúnmente encontrado en cepas que afectan a humanos, muestra que la fuente de contaminación es potencialmente humana.

Figura 2. Factores de virulencia encontrados en agua superficial y subterránea de la zona de Xochimilco



El sitio nueve el cual corresponde al agua superficial de la temporada de secas fue el que presentó el mayor valor de UFC de coliformes totales y en este sitio también se identificaron tres factores de virulencia, lo cual muestra una fuerte contaminación de origen fecal en un sitio (Tabla 4). Los resultados del análisis de secuencias se muestran a continuación en la Tabla 7

Tabla 7. Similitud de las secuencias obtenidas por PCR de los factores de virulencia con secuencias depositadas en el Gen Data Bank.

Factor	sitio	% de similitud	Secuencia en gen data bank
<i>putP</i>	5	728/729 (99%)	gb L01132.1 ECOPUTPA proline permease (putP)
<i>putP</i>	7	736/744 (98%)	gb L01132.1 ECOPUTPA proline permease (putP)
<i>putP</i>	8	764/772 (98%)	gb L01132.1 ECOPUTPA proline permease (putP)
<i>putP</i>	9	741/749 (98%)	dbj AP009048.1 proline:sodium symporter
<i>putP</i>	10	684/690 (99%)	dbj AP009048.1 proline:sodium symporter
<i>putP</i>	19	723/746 (96%)	gb L01132.1 ECOPUTPA proline permease (putP)
<i>putP</i>	22	747/749 (99%)	gb L01132.1 ECOPUTPA proline permease (putP)
<i>putP</i>	25	656/773 (84%)	gb L01159.1 ECOPUTPL proline permease (putP)
<i>ler</i>	10	302/304 (99%)	emb AJ277443.1 ECO277443 (LEE II)
<i>ler</i>	22	266/270 (98%)	emb AJ277443.1 ECO277443 (LEE II)
<i>pCVD432</i>	7	563/568 (94%)	emb X81423.1 ECPCVD432 pCVD 432
<i>pCVD432</i>	8	470/473 (94%)	emb X81423.1 ECPCVD432 pCVD 432
<i>pCVD432</i>	9	607/628 (96%)	emb X81423.1 ECPCVD432 pCVD 432
<i>pCVD432</i>	10	621/629 (98%)	emb X81423.1 ECPCVD432 pCVD 432
SLTI	9	193/195 (98%)	gb AF525041.1 Shiga toxin 2 subunit A (stxA2)
STI	9	110/110 (100%)	gb M29255.1 ECOTOXHS heat-stable toxin (st)

Se obtuvieron en total 17 productos de PCR, los cuales fueron enviados a secuenciación, 16 secuencias fueron similares a las depositadas en el Gen Data Bank, y la similitud en 15 de los casos fue superior al 94%, un caso con el 84% y el sitio positivo a *ial* de *EIEC-Shigella*, el cual no se ilustra en la tabla la secuencia obtenida presentó muchas bases indeterminadas por lo que no tubo similitud con ninguna secuencia conocida, y se consideró tras esta prueba, como un resultado negativo. Los resultados obtenidos de la secuenciación muestran que los productos obtenidos corresponden a los factores investigados, lo cual confirma por un lado la efectividad de las PCRs y la identidad de las bacterias encontradas mediante la detección de sus factores de virulencia.

Al realizar la prueba de Kruskal–Wallis para comparar los factores de virulencia no se encontraron diferencias significativas entre las temporadas o los tipos de agua, sin embargo, el análisis obtenido de la prueba de correlación de Spearman entre las bacterias indicadoras CT y CF contra los factores de virulencia detectados en cada tipo de agua y en cada temporada únicamente presentó valores significativos entre CF y los factores *putP* y pCVD432 (ver Tabla) en el agua superficial durante la temporada de secas.

Tabla 8. Correlación de Spearman entre bacterias indicadoras y factores de virulencia en la temporada de secas en agua superficial

	CT	CF	<i>E.coli</i>	pCVD432	<i>ler</i>	SLTI	<i>ial</i>	STIb
CT	1.00	0.73***	0.21	0.22	0.22	0.19	-0.03	0.11
CF		1.00	0.37*	0.45**	0.19	0.18	0.01	0.18
<i>E.coli</i>			1.00	0.67***	0.46**	0.32*	0.17	0.32*
pCVD432				1.00	0.31	0.48**	0.31	0.48**
<i>ler</i>					1.00	0.70***	-0.05	-0.04
SLTI						1.00	-0.04	-0.03
<i>ial</i>							1.00	0.70***

P < 0.05 *, P < 0.01 **, P < 0.001 ***

Se observó correlación entre CF el factor *putP* de *E. coli* y el factor pCVD432 de la cepa EAEC, ésta se presentó en el agua superficial durante la temporada de secas. En la temporada de lluvias los CF fueron más abundantes y se detectó la presencia de *E. coli* solo en dos sitios de agua superficial, aunque en la mayoría de los casos la presencia de los factores de virulencia coincide con la presencia de las bacterias indicadoras las pruebas estadísticas no mostraron correlación entre estas al comparar los tipos de agua y temporadas, por lo que se considera que el comportamiento de indicadoras y patógenas es variable y el valor de los coliformes es cuestionable, lo cual coincide con estudios anteriores que han mostrado que la presencia de indicadoras y patógenas puede presentar diferentes patrones de comportamiento en los ambientes acuáticos sin que exista correlación (Lemarchand y Lebaron, 2003).

Por otro lado, la detección por PCR del factor *putP* en un sitio en donde no se detectó la presencia de coliformes muestra una mayor sensibilidad de la técnica, sin embargo, la ausencia de factores de virulencia detectados simultáneamente, muestra que la cepa detectada no es patógena. Al considerar el factor *putP* contra los factores de virulencia se encontró correlación con pCVD432, *ler*, SLTI y STIb, lo cual muestra que la detección de *E. coli* podría ser un mejor indicador que el uso de los coliformes, lo cual coincide con lo encontrado por otros autores (Horakova et al., 2006) y que las pruebas moleculares son más precisas que los métodos de plaquéo (Bej *et al.*, 1991).

El comportamiento y diversidad de patógenos (bacterias, virus, protistas, helmintos) es distinto por lo que es cuestionable utilizar un solo tipo de indicador como es el caso de las Normas oficiales mexicanas que basan dicho monitoreo en la detección de bacterias coniformes. Las pruebas moleculares como la PCR son más específicas aunque costosas, por lo que indicadores alternativos que utilicen metodologías de fácil implementación y bajo costo que permita el monitoreo sistemático y efectivo de la calidad del agua, en especial la utilizada para el uso y consumo humano deben ser buscadas (Harwood *et al.*, 2005).

Los datos epidemiológicos realizados en el Instituto de Diagnóstico y referencia Epidemiológicos (InDRE) muestran que la cepa de *E. coli* más frecuentemente identificada en casos de diarrea en México es la ETEC (48% de los casos), seguida de EIEC (9%) y EPEC (4%), no existen estudios aún con la cepa EAEC ya que está en proceso de estandarización, en el presente estudio esta fue la cepa más frecuentemente encontrada y estudios recientes mencionan que esta categoría de *E. coli*, es la segunda causa de la diarrea del viajero, antecedida por ETEC, sin embargo es uno de los organismos emergentes a nivel mundial que podría convertirse en la primera causa (Rodríguez *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2006).

5. Conclusiones

El tipo de agua más contaminada fue la superficial considerando la presencia de bacterias indicadoras y *E. coli*.

La temporada con mayor contaminación microbiológica fue la de secas, en donde se observó correlación entre CF y la cepa EAEC.

La presencia de enterobacterias causantes de diarrea pueden ser detectadas por PCR aunque no se detecten bacterias indicadoras por FM.

Aunque se encontró correlación entre bacterias indicadoras y cepas patógenas de *E. coli* en el agua superficial durante la temporada de secas, esta relación no se conserva en otra temporada, lo que la hace una condición variable y por lo tanto su valor predictivo es cuestionable.

No existe una marcada estacionalidad en la presencia de bacterias indicadoras y patógenas en los tipos de agua analizados en la zona de Xochimilco.

La detección de *E. coli* es un mejor indicador de la presencia de factores de virulencia en agua superficial que los coliformes totales y fecales.

Indicadores alternativos como la detección de *E. coli* que correlacionen fuertemente con la presencia de bacterias patógenas independientemente del tipo de agua y temporada son necesarios para determinar la calidad microbiológica del agua y predecir el riesgo potencial a la salud pública.

6. Referencias

Adachi, J., Jiang, Z., Mathewson, J., Verenkar, M., Thompson, S., Martínez-Sandoval, F., Steffen, R., Ericsson, C., DuPont, H., 2001. Enteraggregative *Escherichia coli* is a major etiologic agent in traveler`s diarrhea in 3 regions of the world. *Clin. Infec. Dis.* 32 (12):1706-1709.

American Public Health Association, 1995. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. Washington D.C. 20th Ed 9-56a 9-76.

Blattner, F., Plunkett, G., Bloch, C., Perna, N., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J., Rode, C., Mayhew, G., Gregor, J., Davis, N., Kirkpatrick, H., Goeden, M., Rose, D., Mau, B., Shao, Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1474.

Bej, A., McCarty, S., Atlas, R. 1991. Detection of coliform bacterias and *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction: comparison with defined substrate and plating methods for water quality monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:(8) 2449-2432.

Bölin, I., Wikland, G., Qadri, F., Torres, O., Bourgeois, A., Savarino, S., Svennerholm, Ann-Mari. 2006. Enterotoxigenic *Escherichia coli* with ST1b and ST1a genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travellers. *Journal of clinical Microbiol* 44:(11)3872-3877.

Calva J. 1998. Las enfermedades diarreicas en los niños mexicanos. Pac infecto-1. *Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica A.C.* pp. 11-17.

Clark, C., MacDonald, L., Ginocchio, C., Galán, J., Johnson, R., 1996. *Salmonella typhimurium* InvA expression probed with a monoclonal antibody to the c-terminal peptide of InvA, *Fems Microbiol. Lett.* 136:263-268.

Clarke, S., Haigh, R., Freestone, P., Williams, P., 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol Rev* 16 (3):365-378.

Cortes-Ortiz, I. A., Rodríguez-Angeles, G., Moreno-Escobar, E. A., Tenorio-Lara, JM., Torres-Mazadiego, BP., Montiel-Vazquez, E. 2002. Outbreak caused by *Escherichia coli* in Chalco, México. *Salud Pública Mex.* 44: 297-302.

Diario Oficial de la Federación.1998. Modificado a la Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997. Que establece los límites máximos permisibles contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público. *DOF.* México, D.F. pp. 17-24

Diario Oficial de la Federación. 1997. Norma Oficial mexicana NOM-001-ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas-residuales en aguas y bienes nacionales. *DOF.* México, D.F. pp. 68-86.

Diario Oficial de la Federación. 2000. Modificado a la Norma Oficial Mexicana NOM- 127-SSA1-1994. Que establece los límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. *DOF*. México, D.F. México, pp. 1-8

Diario Oficial de la Federación. 2004. Ley de Aguas Nacionales. 29 de Abril

Elliot, S., Sperandio, V., Giron, J., Shin, S., Mellies., Wainwright, L., Hutcheson, S., McDaniel, T., Kaper, J., 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE) encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 68 (11):6115-6126.

Franke J., Franke S., Schmidt H., Schwarzkopf A., Wieler H., Baljer G., Beutin L. and Karch H. (1994). Nucleotide Sequence Analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Adherence factor Probe and Development of PCR for Rapid Detection of EPEC Harboring Virulence Plasmids. *J.Clin. Microbiol.* 32(10), 2460-2463.

Fratamico P., Sackitel S., Wiedmann M., Yi-Deng M. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33(8), 2188-2191.

Ginocchio, C., Galán, J., 1995. Functional conservation among members of the *Salmonella typhimurium* InvA family of proteins. *Infec. Immun.* 63(2):729-732.

Granum, E., Brynestad, S., Bacterial toxins as food poisons. En Alouf, J., Freer, J., 1999. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. New York. Academic Press. p 669-689.

Gray, L., 1995. *Escherichia, Salmonella, Shigella, and Yersinia* En Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F., Tenover, R. (Ed.). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology Press. Washington. D.C: p 450-456.

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

Gunzburg S., Tornieporth N. and Riley L. 1995. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR. Based detection of the bundle forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* 33(5), 1375-1377.

Gutiérrez, H. Becerra, S. Brut, H., 1989. Quality of potable water and incidence of gastroenteritis in two cities en theState of Sonora, Mexico. *Salud Pública Mex* 31, 299-304.

Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S. R. and Rose, J. B. 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3163-3170.

Horakova, K., Mlejnkova, H., Mlejnek P. Direct detection of bacterial faecal indicators in water samples using PCR. *Water Sci Technol.* 54(3):135-140.

Horman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff C. H., Torvela, N., Heikinheimo, A. H., and Hänninen, M. L. 2004 *Campylobacter spp., Giardia spp., Cryptosporidium spp.,*

noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 87-95.

Huang, D., Mohanty, A., DuPont, H., Okhuysen, P., Chiang, T. 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Medical Microbiol.* 55:1303-1311.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1999. Estadísticas demográficas en cuadernos de población. México. INEGI Num. 10

Jiang, Z., Mathewson, J., Ericsson, C., Svennerholm, A., Pulido, C., DuPont, H., 1999. Characterization of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains in patients with Travelers' Diarrhea Acquired in Guadalajara, Mexico, 1992-1997. *J. Infectious Diseases* 181:(2) 779-782.

Kaper, J., Nataro, J., Mobley, H. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews* 2:123-140.

Kapley, A., Lampel, K. and Purohit, H. J. 2001 Rapid detection of *Salmonella* in water samples by multiplex PCR. *Water Environ. Res.* 73, 461-465.

Lemarchand, K. and Lebaron, P. 2003 Occurrence of *Salmonella* spp. and *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal indicators. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 203-209.

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

Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. 2000. Environmental Microbiology, 585 pp. Academic Press. San Diego, CA.

Mazari, M., Alberro, J., Mazari-Hiriart, M. and González, S. 1996. Agrietamiento de arcillas lacustres y su relación con el uso y reúso de agua. In: Hacia el Tercer Milenio. (M. Mazari, Ed.), El Colegio Nacional, México, pp. 113-156.

Mazari-Hiriart M., Torres-Beristain B., Velázquez E., Calva J. and Pillai S. 1999. Bacterial and viral indicators of fecal pollution in Mexico City's Southern Aquifer. *J. Environ. Sci. & Health* A34(9), 1715-1735.

Mazari, M., Cifuentes, E., Velázquez, E., Calva, J. 2000. Microbiological groundwater quality and health indicators in Mexico City. *Urban ecosystems* 4:91-103

Mazari-Hiriart M., López-Vidal Y., Castillo-Rojas G., Ponce de León S., Cravioto, A. 2001. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria freshwater environments in Mexico City. *Arch. Med. Res.* 32(5), 458-467.

Mc Daniel T., Jarvis, K., Sonnenberg, M., Kaper, J. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1664-1668.

Mathewson, J., Johnson, P., DuPont, H., Satterwhite, T., Winsor, D. 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J. infect. Dis.* 154(3):524-527.

Millipore, 2000. Análisis Microbiológico. Millipore España 4-18.

Moseley, S., Hardy, J., Imdadul, H., Echeverria, P., Falkow, S. 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. inmun.* 39 (3): 1167-1174.

Nakao, T., Yamamoto, I., Anraku, Y. 1987. Nucleotide sequence of putC, the regulatory region for the *put* regulon of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 210: 364-368.

Nash, L., 1993. Water quality and health. En: Water in crisis, a Guide to the World's Fresh Water Resources. Gleck, P.(Ed). New York, Oxford University Press. 25-39p.

Nataro, J., Kaper, J., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 142-201.

O'Brien, A., Holmes, R. 1987. Shiga and Shiga-Like toxins. *Microbiol. Rev* 51:206-220.

Rao, M. 1985. Toxins which activate guanylate cyclase; heat-stable enterotoxins. *Ciba Found, Syp* 112:74-93.

Rodríguez, G., Rincón, M., Cortés-Tenorio, U., Moreno, A. 2001. *Escherichia coli* causante de diarrea en México, identificada por hibridación en fase sólida colony blot. *Enfermedades Infecciosas y microbiología* 21 supl: S116.

Rodríguez-Angeles, G., 2002. Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* 44 (5):464-475.

Rosas I., Báez A. Y Coutiño M. 1984. Bacteriological quality of crops irrigated with wastewater in the Xochimilco plots, México D. F. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5),1074-1079

Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., Roubin-de, M., Laurent, P. 2002. Detection and Enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods.* 49:31-54.

Savarino, S., Mc Veigh, A., Watson, J., Molina, J., Cravioto, A., Echeverria, P. Enterοaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins not restricted to enterοaggregative *E. coli*. *J of Infect. Dis.* 173:1019-1022.

Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J., Karch, H., 1995. Development of PCR for screening of Enterοaggregative *Escherichia coli*. *J. Clinical Microbiology.* 33:(3) 701-705.

Sears, C., Kaper, J.1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological. Reviews.* Mar. 167-215.

Schoolnik, G. 1993. PCR detection of *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. In: Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. (Persing, D., Smith, T., Tenover, T. and White, F., Eds.), Mayo Foundation, Rochester, New York. pp. 277-281.

Schultz, C., Pool, G., Ketel, R., Wever, B., Speelman, P., Dankert, J. 1994. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradiactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *J. Clinical Microbiology* 32:(10) 2393-2397.

Siegel S., Castellan, N. J. 1995. Estadística no paramétrica. Aplicada a las ciencias de la conducta, 4rd edn, Trillas. México, pp. 157-166.

Theron, J. and Cloete, T. E. 2002. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 1-26.

Toranzos, G. 1991. Current and possible alternative indicators of fecal contamination in tropical water a short review. *Environ Toxicol Water Qual.* 6, 121-130

QIAGEN., 1999. QIAamp DNA Mini kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook. QIAGEN. C.A. 58p.

QIAGEN., 2000. QIAquick Spin Handbook. QIAGEN. C.A. 34p.

World Health Organization (WHO). 2000. The gateway to children's environmental health. www.who.int/peh/ceh/index.htm.

Wood, L., Ferguson, E., Hogan, P., Thurman, D., Morgan, D., DuPont, H., Ericsson, D., 1983.
Incidence of bacterial enteropathogens in foods from Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:328-
332.

"Detection of *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* virulence factors in surface water and groundwater from southern México City".

1 Detection of *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella* virulence factors in surface
2 water and groundwater from southern Mexico City
3
4 Jazmín Aguilar-Medina and Marisa Mazari-Hiriart*
5
6 Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
7 Apartado Postal 70-275, Tercer Circuito Exterior Ciudad Universitaria, Coyoacán,
8 04510. México, D.F., México

* Corresponding author:
Dra. Marisa Mazari-Hiriart
Instituto de Ecología,
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 70-275.
Tercer Circuito Exterior Ciudad Universitaria,
Coyoacán 04510, México, D.F., MEXICO
Tel.: +011(525) 5622 8998
Fax: +011 (525) 5622 8995
Email: mazari@servidor.unam.mx

Abstract

Virulence factors of *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella* detected by polymerase chain reaction (PCR) and their relationship with total and faecal coliforms by membrane filtration (MF) were investigated. During 2002, forty water samples were taken from randomly selected sites, including surface water and groundwater. Nine sequences were amplified by PCR: seven in *E. coli* strains, the *ial* gene in enteroinvasive *E. coli* and *Shigella* species, and the *invA* gene in *Salmonella* species. Samples were positive in 65% of cases to at least one PCR probe or MF. *E. coli* virulence factors were present in 17.5% of samples, followed by *Shigella*-enteroinvasive *E. coli*, present in 10% of samples; *Salmonella* was absent. Pathogenic factors were found in sites near the urban area. Bacterial indicators failed to predict virulence factors in only 5% of cases; nevertheless, a correlation was shown strictly for fecal coliforms vs. enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in surface water during the dry season.

- 1 Key Words: *Escherichia coli*; *Shigella*; *Salmonella*; Water quality; Polymerase
- 2 chain reaction; Mexico City.

1 Introduction

2
3 Coliform bacteria detection has been used since 1914 as a routine method to
4 determine the potential presence of faecal contamination in aquatic environments.

5 The coliform bacteria test is relatively easy and inexpensive [1,2]. However, its
6 effectiveness as a unique indicator has been questioned; therefore, additional tests
7 have been proposed for water quality evaluation [3].

8 Assays for direct detection of enteropathogens have been developed. Polymerase
9 chain reaction (PCR) is one technique suggested to detect low levels of
10 microorganisms in environmental samples [4], and allows direct and specific
11 identification of virulence factors present in pathogenic bacteria [5].

12 Waterborne enteropathogens cause different diseases, diarrhoea one of most
13 important, with approximately 2.2 million deaths annually among children <5 years
14 of age who are the most frequently affected, as well as elderly persons [6,7].

15 *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella* are enteric bacteria that cause diarrhea;
16 five categories of *E. coli* are reported as responsible for 25% of diarrhoeal diseases
17 in less developed countries [8]. The infective dose of these enterobacteria can range
18 from 10^1 in *E. coli* strain O157:H7 and *Salmonella* and 10^5 in *Shigella* to 10^8 in
19 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) [9].

1 The aim of this study was to detect the presence of *E. coli*, *Shigella*, and
2 *Salmonella* virulence factors by PCR in a freshwater surface system and in a
3 groundwater system, both located south of Mexico City. There was also interest in
4 determining their relationship with total and fecal coliforms (TC and FC), used as
5 microbiological indicators of faecal contamination in Mexico and in other
6 developing nations.

7 8 9 2. Materials and Methods

10
11 2.1. Study area. Xochimilco is located south of Mexico City and forms part of the
12 regional aquifer system, which provides 37% of the water used for human
13 consumption to the Mexico City Metropolitan Area [10, 11]. The area also includes
14 a complex surface canal system that receives rainfall, treated and non-treated
15 wastewater, which are used for irrigation and recreational activities without
16 primary contact. Vegetables cultivated in this area are consumed by Mexico City
17 inhabitants and represent a potential hazard to public health, especially when eaten
18 raw [12]. Bacterial contamination of groundwater has been previously reported in
19 this area [13,14], but virulence factors of enteropathogenic bacteria have not been
20 explored.

2.2 Sampling. Forty water samples were taken from randomly selected sites during the 2002 annual cycle, including the dry season (March-April) and the rainy season (October-November). Each season, were monitored 10 canals, from which surface water is extracted for irrigation and 10 extraction wells, from which groundwater is pumped for human use. Water samples were collected in sterile polypropylene flasks, 1 l flasks for microbiological analysis, 500 ml flasks for physicochemical parameters, and 500 ml flasks for PCR analysis. Samples were transported and stored refrigerated (4°C) until analyzed according to standard procedures for coliform detection. Bacteriological analyses were performed by MF filtering 100-ml water samples, and incubated in m-Endo Broth (Difco) for total coliforms, and m-FC Agar (Difco) for faecal coliforms [2].

Physicochemical analyses, temperature, conductivity, and pH were measured using a portable YSI model 3500 [serial No. 93J09730, Yellow Spring, Ohio]. Dissolved oxygen was determined with a YSI 51B oxygen meter Model 51B, [serial No. 95A27799]; samples were analyzed in duplicate.

2.3 Sensitivity probe. To ensure a minimal detectable number of bacteria in environmental samples, PCR assays were tested in artificially contaminated samples with pure cultures bacterial strain cultures (shown in Table 1.) Sensitivity

1 tests showed that PCR assays could detect *putP*, LT, *bfp*, pCVD432, and *ial* with 1
2 $\times 10^2$ (ml)⁻¹ organisms in surface water and groundwater, while ST, SLTI, and *invA*
3 could detect 1×10^3 (ml)⁻¹ in both water types. Detection of *ler* in groundwater was
4 1×10^2 (ml)⁻¹, while in surface water this was 1×10^3 (ml)⁻¹.

5
6 2.4. DNA extraction. Water samples collected for PCR probes were concentrated
7 by centrifugation at 10,000 X *g* for 30 min at 4°C, sediments were diluted in 10 ml
8 of 10 mM tris-HCL (pH 8.0) 1 mM EDTA (TE) [14], and 1-ml aliquots were
9 grown in 9 ml of Tryptic Soy Broth overnight at 37°C. DNA from each sample was
10 extracted from 1 ml of culture using a prepared kit (DNamp mini kit QIAGEN,
11 Hilden, Germany) according to manufacturer instructions; 5 µl of the extract was
12 used as a template for PCR.

13
14 2.5 Primer selection and design. We analyzed nine virulence factors. The *putP* gene
15 codified for a permease present in all *E. coli* strains as part of the elemental cell
16 machinery [15]. *ler*, a regulator of the pathogenicity island named locus of
17 enterocyte effacement (LEE), in enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and
18 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains [16]. Both primers were designed and
19 provided by A. Castillo (personal communication) from reported sequences
20 available in the Gene Data Bank (accession nos. **U00096** and **AF328682**)

respectively). Other sequences have been previously described (Table 1). All primers were synthesized at the Institute of Biotechnology, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), in Cuernavaca, Morelos (Mexico).

2.6 Polymerase chain reaction amplification. PCR reactions were performed in a personal Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The final volume of the reaction mix was 25 μ l containing 5 μ l template, 1X Geneamp PCR buffer, 200 μ M of each dNTP, 1 μ M of each primer, and 2.5 units of Amplitaq DNA Polymerase, all reagents from the Geneamp PCR reagent Kit (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). PCR optimal annealing for each factor is illustrated in Table 1. PCR reactions were performed for 30 cycles, and samples were analysed in duplicate. Control strains were kindly provided by the UNAM'S Molecular and Experimental Evolution Lab at the Institute of Ecology, and the Public Health Department of the UNAM's School of Medicine, both located in Mexico City.

2.7 Electrophoretic detection of PCR products. A 5- μ l sample of each amplified product was analyzed by electrophoresis in 1.8% agarose gels with ethidium bromide and examined under ultraviolet (UV) light for presence of DNA amplified fragments. A 100-bp DNA (Gibco BRL, Ghent, Belgium) was included in each gel as a molecular-size standard.

2.8 Statistical analyses. Statistical analyses were performed using Statistics for Windows (ver. 1984-2000) software. Non-parametric tests were applied, including the Spearman test to determine correlation among variables (i.e. water type, season, coliforms, and virulence factors) and the Kruskal-Wallis test to determine significant differences. Coliform counts used for statistical analysis correspond to the number of CFU ml⁻¹ in 100 ml of each sample.

3. Results and discussion

In 65% (26/40) of samples, we found at least one microbiological indicator or virulence factor analyzed, 55% (22/40) of samples were positive for faecal coliforms (FC), and 42.5% (17/40) of samples for total coliforms (TC). Positive percentages obtained from total sampling considering surface water and groundwater are shown in Figure 1.

3.1 Indicator bacteria

Higher TC counts were detected in surface water (canals) during the dry season, while FC were more abundant during the rainy season. This coincides with the temperature increase during the rainy season. In both cases, values obtained in 60% (12/20) of samples surpass the $240 \text{ CFU (100ml)}^{-1}$ of faecal coliforms established by Mexican regulations for water reuse with primary contact [24], and 40% (8/20) of samples showed values $>1,000 \text{ CFU (100ml)}^{-1}$ in water as stipulated by Mexican regulations and the World Health Organization (WHO) for agricultural irrigation [25, 26].

Although the studied system is a high altitude tropical wetland, mean water temperature could be the specific condition that allows survival of FC, as suggested

1 for these organisms in tropical waters [27]. While these organisms are found
2 frequently without even the influence of human activity, these are not considered
3 adequate indicators of faecal contamination and a public health risk [28], thus the
4 suggestion to utilize other indicators for tropical areas [1].

5 In groundwater (extraction wells), low CFU (20%) of both indicators were reported
6 during the rainy season (Table 2); these values surpass the level established in
7 Mexican stipulations for water for human use and consumption [29]; nonetheless,
8 in the dry season no indicator bacteria were detected. This difference suggests
9 potential contamination of wells through fractures or damaged distribution
10 pipelines, which allow entrance of contaminants into the aquifer during the rainy
11 season by means of infiltration at certain specific sites. The applied Spearman test
12 showed correlation only between TC and FC in surface water in the rainy season
13 obtaining an $r = 0.65$ considering a p value of <0.05 .

16 3.2 Physicochemical parameters

18 Physicochemical factors demonstrated no significant differences by water type and
19 season, and the temperature variation was minimal in groundwater samples in both
20 seasons, which suggests low fluctuation throughout the year. Based on the average

temperature obtained (Table 3) in surface water during the rainy season, this was higher with respect to the dry season that coincides with the summer, probably due to solar radiation. With regard to groundwater, values were very similar in both seasons, suggesting that this factor remains constant in this water type. In temperate regions, temperature variation is more pronounced and can affect indicators and pathogen behavior. It has been determined in previous studies that factors such as low temperatures in winter and solar radiation during the summer have effects on bacteria survival in the case of *Campylobacter*, for which survival is higher in winter and lower in summer [30]. Concentrations of dissolved oxygen in the range of 3.09 to 3.94 mg l⁻¹ are relatively low, and lower than stipulated by the Mexican regulations for human use [31]. Samples showed a neutral pH with tendency towards alkalinity (7.34- 7.92), and conductivity measurements are relatively low.

3.3 Virulence factors

Four virulence factors of the eight analyzed were detected (pCVD432, *ial*, *ler*, and SLTI), indicating the presence of *E. coli* pathogenic strains (enteroaggregative *E. coli* [EAEC], enteroinvasive *E. coli* [EIEC], and enteropathogenic *E. coli* [EPEC], respectively) and *Shigella*; *Salmonella* was not detected in any of the samples.

1 Virulence factors were detected principally in surface water (Figure 1), especially
2 during the dry season.

3 The non-pathogenic factor *putP*, an indicator of *E. coli* presence, was detected in
4 17.5% (7/40) of samples, as shown in Figure 1. In one sample in which *putP* was
5 detected, no coliform bacteria were registered, probably due to a better sensitivity
6 of the PCR over the MF method or to the presence of dead organism. The most
7 frequent virulence factors were pCVD432 and *ial*, detected in 10% (4/40) of cases;
8 pCVD432 was exclusive of surface water in the dry season, being the predominant
9 bacteria present in four of the six sites positive for *E. coli*. These sites correspond to
10 the tourist area, which is also the most affected by human activities, with a large
11 number of domestic outfalls and recreational activities such as boat rides, fishing,
12 and eating during trips through the canals. The *ial* factor was detected in both water
13 types, and mainly during the rainy season, and was the only virulence factor
14 detected in groundwater. The *ial* gene is shared by EIEC strains and the genus
15 *Shigella*. The presence of *putP* factor exclusive of *E. coli* that allows to distinguish
16 between both species. Therefore in the surface water site during the dry season in
17 which both factors were present, this was considered as the EIEC strain, while
18 during the rainy season in which *putP* was not simultaneously detected it was
19 considered as *Shigella*.

1 The *ler* factor was detected in 5% (2/40) of samples; at one of these sites, *putP* was
2 not detected, a factor permitting discrimination between *E. coli* and other bacteria
3 sharing the LEE pathogenicity island, *Citrobacter* among these [16, 32]; thus, its
4 presence does not correspond with an EPEC strain, but to another species that
5 shares the pathogenicity island and that is a regulator factor.

6 Comparison of virulence factors was carried out by applying the Kruskal-Wallis
7 test, which demonstrated no significant differences between seasons or water types.
8 Nevertheless, on applying the Spearman correlation between TC and FC, indicator
9 bacteria, against virulence factors detected in each season and water type, results
10 showed to be significant between FC vs. *putP*, ensuring *E. coli* presence and
11 pCVD432 factors corresponding to EAEC (Table 4) in surface water and during the
12 dry season.

13 This correlation was exclusive of surface water during the dry season. Although FC
14 was more abundant during the rainy season, *E. coli* presence was not particular to
15 the EAEC strain; therefore, it is considered that behavior of indicator bacteria and
16 pathogens is different, and the predictive value of coliforms is questionable in some
17 specific cases. This idea coincides with previous studies demonstrating that the
18 presence of indicators and pathogens may have correlation in freshwater sources
19 but that behaviour patterns in groundwater may be different [33]. On the other
20 hand, other studies have demonstrated absence of the correlation between

1 indicators and pathogenic microorganism such as *Salmonella* and *Cryptosporidium*
2 supporting the idea that indicator bacteria and pathogens behaviour may be
3 different [34].PCR Detection of the *putP* and *ial* factors in sites at which coliform
4 presence was not detected shows the failure of the indicators to predict the presence
5 of bacterial pathogens, but in our case this failure only represents 5% of samples.
6 Pathogen behaviour and variety including bacteria, virus, protozoa, and helminths
7 are different to such an extent that it is a mistake to base monitoring strategies on a
8 sole organism type such is the case of Mexican official regulations in which
9 monitoring is coliforms-based. Therefore, public health is not adequately protected
10 by a single monitoring strategy. Molecular tests such as PCR are much more
11 specific, although more expensive; thus, alternative indicators should be sought
12 [35].

13 Enteric disease incidence in developed countries is low, although in less developed
14 countries it remains one of the main morbidity causes, and even one of the most
15 important causes of mortality, for children <5 years of age. This situation in many
16 cases can be attributed to water, either drinking or irrigation, the latter not always
17 considered and represents a risk associated with prevailing sanitary conditions and
18 wastewater reuse for irrigation in many less developed nations.

4. Conclusions

The more contaminated water type was surface water, considering the presence of indicator bacteria and *E. coli*, although *Shigella* was more frequent in the rainy season. In groundwater, the only pathogenic factor detected was *ial*, which is relevant on taking into account that wells are the water source for human consumption. This fact suggests that at this site, the disinfection process is inadequate and represents a potential risk for public health.

The season with the majority of contaminated water samples was the dry season, in which there was a correlation between FC and the EAEC strain. The presence of bacteria causing diarrhoea can be detected by PCR, although indicator bacteria have not been detected by MF. Although there was a correlation between indicator bacteria and pathogenic enterobacteria in surface water during the dry season, this correlation did not prevail during the rainy season, which makes it a variable condition and predictive values are questionable. There is no marked seasonality in the presence of indicator bacteria and pathogens in analyzed water types in the Xochimilco area near Mexico City. Consumption of vegetables irrigated with surface water without previous disinfection represents a potential risk of diarrhoea in the presence of pathogenic bacteria in this area, especially during the dry season when these are more prevalent. Alternative indicators possessing a strong

correlation with the presence of pathogenic bacteria independently of water type and season are necessary to determine the microbiological water quality and to thus truly predict the potential public health risk.

Acknowledgments

Jazmín Aguilar-Medina acknowledges a CONACyT México scholarship for her M.Sc. degree, and the help of Ana Cecilia Espinosa and Paola Cisneros, and also Valeria Souza and Amanda Cobian by primers design. Both authors thank Valeria Souza for valuables comments along the project and some lab facilities to perform molecular determinations, Juan J. Calva for his critical comments, and Yolanda López-Vidal for carefully reviewing the manuscript. We acknowledge the support of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Project DGAPA-PAPIIT IN-219303.

References

[1] Maier, R. M., Pepper, I. L., Gerba, C. (2000) Environmental Microbiology, 585 pp. Academic Press. San Diego, CA.

1 [2] American Public Health Association (1998) Standard Methods for Examination
2 of Water and Wastewater 20th ed., American Water Works Association/Water
3 Environment Federation, Washington, D.C.

4 [3] Leclerc, H., Mossel, D.A., Edberg, S.C. and Struijk, C.B. (2001) Advances in
5 the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial
6 water safety. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 201-234.

7 [4] Theron, J. and Cloete, T. E. (2002) Emerging waterborne infections:
8 contributing factors, agents, and detection tools. *Crit. Rev. Microbiol.* 28, 1-26.

9 [5] Johnson, J. R. (2000) Development of polymerase chain reaction based assays
10 for bacterial gene detection. *J. Microbiol. Methods* 41, 201-209.

11 [6] World Health Organization WHO. (2000) The gateway to children's
12 environmental health. www.who.int/peh/ceh/index.htm

13 [7] Gleick, P. H. (2002) Dirty Water: Estimated deaths from water-related diseases
14 2000-2020. *Pacific Inst. Develop. Environ. Security* 1-12.

15 [8] Niyogi, S.K., Saha, M.R. and De S.P. (1994) Enteropathogens associated with
16 acute diarrhoeal diseases. *Indian J. Public Health* 38, 29-32.

17 [9] Granum, E. and Brynestad S. (1999) Bacterial toxins as food poisons. In: *The*
18 *Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins.* (J. Alouf and J. Freer,
19 Eds.), Academic Press, New York, pp. 669-689.

- 1 [10] Mazari, M., Alberro, J., Mazari-Hiriart, M. and González, S. (1996)
2 Agrietamiento de arcillas lacustres y su relación con el uso y reúso de agua. In:
3 Hacia el Tercer Milenio. (M. Mazari, Ed.), El Colegio Nacional, México, pp. 113-
4 156.
- 5 [11] Bojórquez, L., Ezcurra, E., Mazari-Hiriart, M., Díaz, S., Gómez, P., Alcantar,
6 G. and Melgarejo, D. (2000) Basin of Mexico: A History of Watershed
7 Mismanagement. Conference on Land Stewardship in the 21st Century: The
8 contribution of watershed management. USDA Forest Service Proceedings,
9 Tucson, Arizona. pp. 129-137.
- 10 [12] Rosas, I., Báez, A. and Coutiño M. (1984) Bacteriological quality of crops
11 irrigated with wastewater in the Xochimilco plots, México D.F. Appl. Environ.
12 Microbiol 47, 1074-1079.
- 13 [13] Mazari-Hiriart, M., Torres-Beristain, B., Velázquez, E., Calva, J. and Pillai, S.
14 (1999) Bacterial and viral indicators of fecal pollution in Mexico City's Southern
15 Aquifer. J. Environ. Sci. Health A34, 1715-1735.
- 16 [14] Mazari-Hiriart, M., López-Vidal, Y., Castillo-Rojas, G., Ponce de León, S. and
17 Cravioto, A. (2001) *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria freshwater
18 environments in Mexico City. Arch. Med. Res. 32, 458-467.
- 19 [15] Blattner, F., Plunkett, G., Bloch, C., Perna, N., Burland, V., Riley, M.,
20 Collado-Vides, J., Glasner, J., Rode, C., Mayhew, G., Gregor, J., Davis, N.,

1 Kirkpatrick, H., Goeden, M., Rose, D., Mau, B. and Shao, Y. (1997) The complete
2 genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science 277, 1453-1474.

3 [16] McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. and Kaper, J. B. (1995) A
4 genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial
5 pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 1664-1668.

6 [17] Olsvik, O. and Strockbine N. (1993) PCR detection of heat-stable, heat-labile,
7 and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: Diagnostic Molecular
8 Microbiology: Principles and Applications. (D. Persing, T. Smith., T. Tenover, F.
9 White, Eds.), Mayo Foundation, Rochester, New York. pp. 271-276.

10 [18] Schultsz, C., Pool, G. J., van Ketel, R., de Wever, B., Speelman, P. and
11 Dankert, J. (1994) Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in a stool samples
12 by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. J. Clin.
13 Microbiol. 32, 2393-2397.

14 [19] Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G. and Riley, L. W. (1995) Identification of
15 enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle forming
16 pilus gene. J. Clin. Microbiol. 33, 1375-1377.

17 [20] Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M. and Deng, M. Y. (1995)
18 Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 33,
19 2188-2191.

- 1 [21] Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S., Heesemann, J. and Karch, H.
2 (1995) Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. J.
3 Clin. Microbiol 33, 701-705.
- 4 [22] Schoolnik, G. (1993) PCR detection of *Shigella* species and enteroinvasive
5 *Escherichia coli*. In: Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and
6 Applications. (Persing, D., Smith, T., Tenover, T. and White, F., Eds.), Mayo
7 Foundation, Rochester, New York. pp. 277-281.
- 8 [23] Kapley, A., Lampel, K. and Purohit, H. J. (2001) Rapid detection of
9 *Salmonella* in water samples by multiplex PCR. Water Environ. Res. 73, 461-465.
- 10 [24] Diario Oficial de la Federación (1998) Modificado a la Norma Oficial
11 Mexicana NOM-003-ECOL-1997. Que establece los límites máximos permisibles
12 contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al
13 público. México, D.F. pp. 17-24
- 14 [25] Diario Oficial de la Federación (1996) Norma Oficial mexicana NOM-001-
15 ECOL-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en
16 las descargas de aguas-residuales en aguas y bienes nacionales. México, D.F. pp.
17 68-86.
- 18 [26] Blumenthal, U. J., Mara, D.D., Peasey, A., Ruiz-Palacios, G. and Stott, R.
19 (2000) Guidelines for the microbiological quality of treated wastewater used in

1 agriculture: recommendations for revising WHO guidelines. Bull. World Health
2 Organ. 78, 1104-1116.

3 [27] Toranzos, G. (1991) Current and possible alternative indicators of fecal
4 contamination in tropical water a short review. Environ. Toxicol. Water Qual. 6,
5 121-130.

6 [28] Santiago-Mercado, J. and Hazen, T. (1987) Comparison of four membrane
7 filter methods for fecal coliform enumeration in tropical waters. Appl. Environ.
8 Microbiol. 53, 2922-2928.

9 [29] Diario Oficial de la Federación (2000). Modificado a la Norma Oficial
10 Mexicana NOM- 127-SSA1-1994. Que establece los límites permisibles de calidad
11 y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. México, D.F.
12 México, pp. 1-8

13 [30] Horman, A., Rimhanen-Finne, R., Maunula, L., von Bonsdorff C. H., Torvela,
14 N., Heikinheimo, A. H., and Hänninen, M. L. (2004) *Campylobacter* spp., *Giardia*
15 spp., *Cryptosporidium* spp., Noroviruses, and indicator organisms in surface water
16 in southwestern Finland, 2000-2001. Appl. Environ. Microbiol. 70, 87-95.

17 [31] CNA, (2005) Ley Federal de Derechos 2005. México, D.F. pp. 16-20.

18 [32] Castillo, A. Eguiarte, L. E. and Souza, V. (2005) A genomic population
19 genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia*

- 1 *coli*: the search for the unit of selection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 1542-
2 1547.
- 3 [33] Chao, K. K., Chao, C. C., Chao, W. L. (2003) Suitability of the traditional
4 microbial indicators and their enumerating methods in the assessment of fecal
5 pollution of subtropical freshwater environments. J. Microbiol. Immunol. Infect.
6 36, 288-293.
- 7 [34] Lemarchand, K. and Lebaron, P. (2003) Occurrence of *Salmonella* spp. and
8 *Cryptosporidium* spp. in a French coastal watershed: relationship with fecal
9 indicators. FEMS Microbiol. Lett. 218, 203-209.
- 10 [35] Harwood, V. J., Levine, A. D., Scott, T. M., Chivukula, V., Lukasik, J.,
11 Farrah, S. R. and Rose, J. B. (2005) Validity of the indicator organism paradigm for
12 pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. Appl. Environ.
13 Microbiol. 71, 3163-3170.

1 Table 1

2 Primers used for PCR virulence factors of enterobacteria

Target organism	Target Loci	Sequence 5' 3'	Product size	Optimal annealing temperature	Reference
<i>E. coli</i>	<i>putP</i>	CTATATCTTTGGCATGATA CGTATTAGTATGACCTGGA	796	50°C/1 min	*
ETEC	ST	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAG G CTTGACTCTTCAAAAGAGAAAATT AC	147	58°C/0.7 min	17
	LT	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	696	55°C/1 min	18
EPEC	<i>bfp</i>	AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	330	56°C/1 min	19
	<i>ler</i>	GCACACAACAAGCCCATACA	340	60°C/1	*

					min
		TTTCCTCTTCGGTGTCTTC			
EHEC	SLTI	TTTACGATAGACTTCTCGAC	227	48°C/1	20
					min
		CACATATAAATTATTTTCGCTC			
EAEC	pCVD43	CTGGCGAAAGACTGTATCAT	630	55°C/1	21
	2				min
		CAATGTATAGAAATCCGCTGTT			
EIEC	Ial	CTGGATGGTATGGTGAGG	300	55°C/1	22
					min
Shigell		GGAGGCCAACAATTATTTCC			
a					
Salmon		CCTGATCGCACTGAATATCGTACT	598	50°C/1	23
-ella	invA	G			min
		GACCATCACCAATGGTCAGCAGG			

- 1 ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; EHEC,
- 2 enterohemorrhagic *E. coli*; EAEC, enteroaggregative *E. coli*; EIEC, enteroinvasive
- 3 *E. coli*. * Designed by Amanda Cobian

4

1 Table 2

2 Microbiological indicators in water from southern Mexico City

Water	TC		FC	
type	CFU/100ml ⁻¹		CFU/100ml ⁻¹	
Canals	GM	CI	GM	CI
Dry	2,357	±9,420	1,085	±2,970
Rainy	1,051	±1,947	1,517	±70,009
wells				
Dry	0		0	
Rainy	5.85	±3.64	8.96	±17.13

3 TC = total coliforms; FC = fecal coliforms, GM = geometric mean; CI = 95%

4 confidence interval.

1 Table 3

2 Average values of physicochemical parameters in water from southern Mexico City

Water type	pH		Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		T ($^{\circ}\text{C}$)		Dissolved oxygen (mg/l)	
Canals	A	CI	A	CI	A	CI	A	CI
Dry	7.79	± 1.12	728	± 35	15.15	± 0.69	3.94	± 0.68
Rainy	7.92	± 0.37	477	± 16	19.90	± 0.09	3.93	± 1.97
Wells								
Dry	7.34	± 0.23	293	± 147	16.41	± 2.14	3.09	± 0.86
Rainy	7.83	± 0.12	465	± 16	16.02	± 0.94	3.52	± 0.46

3 A= average, CI = 95% confidence interval.

1 Table 4
 2 Correlation between indicator bacteria and virulence factors in surface water during
 3 dry season

4

	FC	<i>putP</i>
	(R)	(R)
<i>putP</i>	0.66*	1
pCVD432	0.86**	0.81**

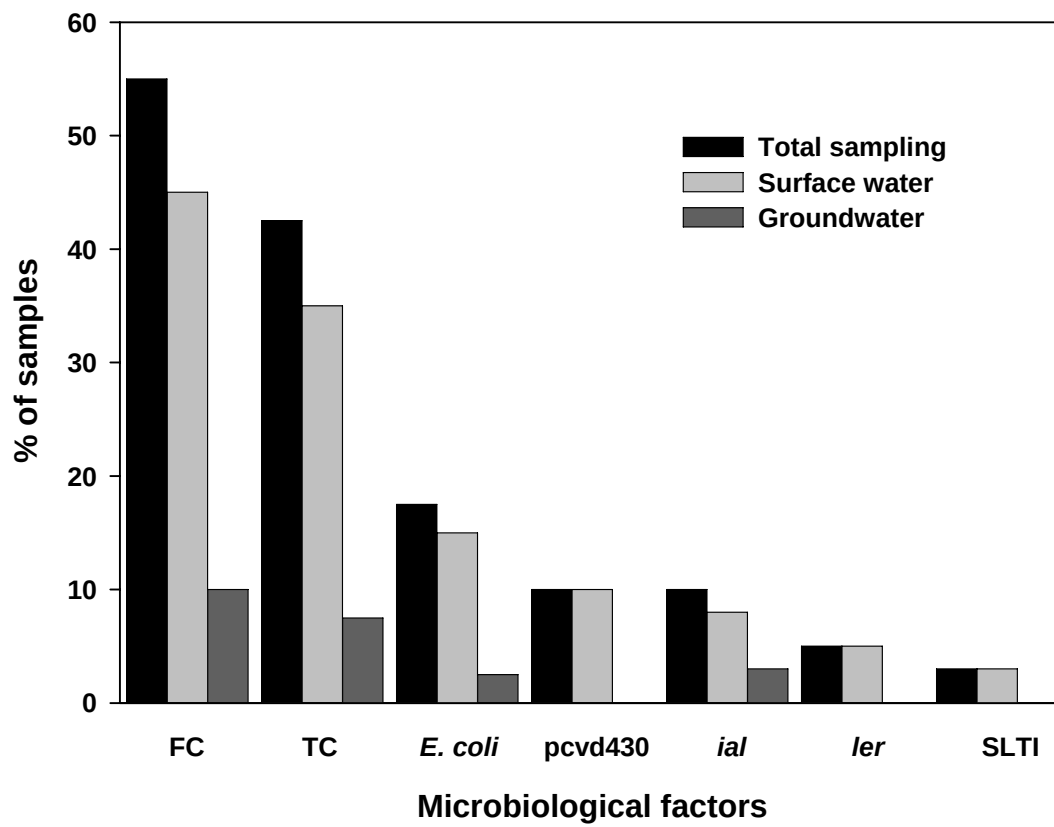
5 $P < 0.05^*$; $p < 0.01^{**}$. FC = (Fecal coliform)

1 Figure Legend

2

3 Figure 1

4 Percentage of total sampling results, surface water, and groundwater.



5