



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Detección de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* Enterotoxigénica en agua para uso y consumo humano por PCR-Hibridación.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

MARTHA ALICIA MINOR VILLAR



MÉXICO, DF.

2009



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Prof. María del Carmen Cortes Decuir

**Vocal:** Prof. Ruth Edith Martín Fuentes

**Secretario:** Prof. Gonzalo Castillo Rojas

**1er. Suplente:** Prof. Alejandro Camacho Cruz

**2do. Suplente:** Prof. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

**Sitio en donde se desarrolló el tema:** Programa de Inmunología Molecular Microbiana, en el 4º piso del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.

---

Dr. Gonzalo Castillo Rojas

**Asesor**

---

Dra. Yolanda López Vidal

**Supervisor Técnico**

---

Martha Alicia Minor Villar

**Sustentante**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química por permitirme ser parte de la institución más noble y de enormes riquezas.

A la Dra. Yolanda López Vidal por su apoyo y enseñanzas para la realización del presente trabajo.

A la Dra. Marisa Mazari Hiriart por su ayuda en la obtención de muestras de agua ya que sin ellas no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por compartir sus conocimientos y el apoyo brindado durante todo este tiempo.

Los estudios de licenciatura fueron apoyados con la beca del Programa Nacional de Becas PRONABES-UNAM.

Durante la realización de la tesis fui becada por el CONACyT, proyecto 60577M y por el Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas del Macroproyecto “Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública” dentro de la línea de investigación ENFERMEDADES INFECCIOSAS 10 SDEI.PTID.05.4.

El proyecto fue financiado por los proyectos de CONACyT 50099M y 60577M, a la Partida Presupuestal del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

A los chicos del laboratorio Gaby, Karen, Paty, Lulú, Melissa, Maribel, Dra. Maritoña, Erick, Francisco y Xavier por su tiempo y ayuda.

## DEDICATORIAS

A ...

... Dios por darme la vida y darme salud

... mis padres Martina y Eleuterio quienes con su ejemplo me han enseñado que el trabajo y la honestidad son los medios para alcanzar cualquier meta.

... mis hermanos Fernando, Ana, Elias, Alberto, Leticia y Maricela porque son ustedes una bendición, no hay mejor equipo de trabajo que ustedes.

... mis sobrinas, quienes con una sonrisa llenan de alegría mi vida porque todo lo que en la vida uno puede desear no tiene comparación con ustedes.

... Juan José y Hugo por ser los mejores confidentes, por compartir tantos años de su vida conmigo y con ello tantas aventuras.

... Angélica, Araceli, Diana, Erick A., Faby, Grisel, Humberto, Jimena, Luis, Lupita V., Maru y Viridiana con ustedes compartí buenos y malos momentos y fue su amistad la que me impulso a seguir adelante, gracias por su cariño, apoyo y consejo.

.... A Karen, Gaby, Sebastian, Lupita C. por el placer de contar con su compañía y sobre todo de su alegría.

## ÍNDICE GENERAL

	Páginas
JURADO ASIGNADO	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
RESUMEN	viii
ABREVIATURAS	x
NOMENCLATURA	xii
INTRODUCCIÓN	1
El agua como fuente de transmisión de enfermedades gastrointestinales	1
Principales agentes causales de gastroenteritis	4
<i>Campylobacter</i> spp.	5
<i>Salmonella</i> spp.	8
<i>Shigella</i> spp.	11
<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	15
Importancia de las enfermedades diarreicas en México	19
JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23

METODOLOGÍA	24
La estandarización de la detección por PCR e hibridación	24
Recuperación de las cepas tipo	24
Extracción de DNA	26
Amplificación por PCR	26
Detección de productos amplificados por hibridación	27
Determinación de sensibilidad y especificidad de la detección	29
Secuenciación de productos de PCR	30
Análisis de muestras de agua para uso y consumo humano	30
Concentración de las muestras de agua	30
Extracción de DNA de las muestras de agua	31
Detección del DNA de los microorganismos por PCR-Hibridación	31
RESULTADOS	36
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS	60
REFERENCIAS	61

## RESUMEN

El uso y consumo de agua contaminada es un problema de gran importancia en materia de salud ya que el agua se considera como una vía de transmisión de enfermedades gastrointestinales. Uno de los principales síntomas de una enfermedad gastrointestinal es la diarrea por lo que se conocen también como enfermedades diarreicas. Las enfermedades diarreicas pueden ser ocasionadas por diferentes microorganismos tales como: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC), los cuales son prevalentes principalmente en países en desarrollo ocasionando un número elevado de enfermedades diarreicas. En el presente trabajo se determinó la presencia de estos microorganismos en diferentes muestras de agua (agua de toma domiciliaria, agua subterránea, agua residual, agua de reuso y agua de riego), a través de la reacción en cadena de la polimerasa e hibridación. Las muestras de agua procedieron de la zona sur del Distrito Federal considerando Ciudad Universitaria, Xochimilco, delegación Magdalena Contreras. El proyecto se dividió en dos fases:

- a) Estandarización del método, mediante el empleo de microorganismos cercanamente relacionados y comúnmente encontrados en las muestras de agua, extracción de ácidos nucleicos, amplificación por PCR de los microorganismos usando iniciadores específicos, determinación de la especificidad y sensibilidad, hibridación DNA-DNA y secuenciación de los amplicones;
- b) Análisis de muestras de agua para uso y consumo humano por PCR-Hibridación, para determinar la presencia de *Shigella* spp., *Salmonella* spp.,

*Campylobacter spp.* y *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC). Los resultados de este estudio indican que ETEC está presente en más del 50% de todos los tipos de agua y es la toxina termoestable (ST) la que detecta con mayor frecuencia. En las muestras en las que se encontró la toxina termolábil (LT) de ETEC también se evidenció la toxina termoestable, así como en algunas otras sólo se encontró a ST pero no se encontró a LT de manera individual. También se determinó la presencia de *Shigella spp.*, principalmente en el agua de reuso (55.6%) y en el agua de riego (42.1%), mientras que *Campylobacter spp.* y *Salmonella spp.* no fueron detectadas en ningún tipo de agua. El uso de las técnicas moleculares permite tener un instrumento de detección a nivel de género y especie (este último en el caso de ETEC), de manera rápida y con una alta sensibilidad. En conclusión, se detectó la presencia de *Shigella spp.* y *Escherichia coli* Enterotoxigénica en todo tipo de agua, excepto, *Shigella spp.*, en agua de toma domiciliaria. La presencia de patógenos entéricos es indicativo de contaminación fecal, además, implica que el uso y consumo de agua con microorganismos patógenos representa un riesgo para la salud.

## ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Colection
CDT	Toxina de distensión citoletal
CE	Cerro de la estrella
Cols.	Colaboradores
CU	Ciudad Universitaria
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido tetraetilendiaminacético
<i>eltB</i>	Gen que codifica para la toxina termolábil
<i>estA</i>	Gen que codifica para la toxina termoestable
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
fg	femtogramos
GES	Isotiocinato de Guanidina- EDTA- Sarcosinato de Sodio
<i>ipaH</i>	antígeno de invasión plásmidico
<i>InvA/InvE</i>	gen de invasión A y gen de invasión E
LT	Toxina termolábil
µg	microgramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
µL	microlitros
mL	mililitros
mM	milimolar
N	Normal
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
ng	nanogramos
nm	nanometros
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Fosfatasa alcalina

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	picogramos
pmol	picomol
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonucleasa
s	segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPI	Isla de patogenicidad
SSA	Secretaría de Salud
SSC	Solución de cloruro de sodio y citrato de sodio
ST	Toxina termoestable
TE	Tris base-EDTA
TBE	Tris base-Boratos-EDTA
U	Unidad
UV	Ultravioleta

## EVOLUCIÓN DE LA NOMENCLATURA EN EL GÉNERO *Salmonella*

Posición taxonómica	Género	Especie	Subespecie	Serotipo
Formato de escritura	Letra inicial mayúscula y con formato en cursivas	Letra con formato en cursiva	Letra con formato en cursiva	Letra inicial mayúscula, sin formato en cursivas.
Ejemplo	<i>Salmonella</i> <i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> <i>bongori</i>	<i>enterica</i> <i>salamae</i>	Typhi Typhimurium

Por lo que para escribir el nombre del serotipo puede ser: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis, ó bien, *Salmonella Choleraesuis*.

Las reglas de nomenclatura fueron tomadas de Lin-Hui, y cols. 2007 (44).

## INTRODUCCIÓN

### **El agua como fuente de transmisión de enfermedades gastrointestinales**

El consumo de agua contaminada es un problema de gran importancia en salud pública. La contaminación del agua ocurre de dos fuentes principales: por organismos patógenos y por la materia en suspensión. La contaminación del agua por organismos patógenos ocurre cuando la materia fecal humana y/o animal entra en contacto con las fuentes de agua potable (como ríos, lagos, pozos, o aguas subterráneas); esto es común durante las inundaciones y también en otras ocasiones, cuando la población es desplazada y los recursos de agua que están disponibles son frecuentemente de muy baja calidad (34).

Como se ha dicho una fuente importante de transmisión de enfermedades gastrointestinales es el agua contaminada; así como los alimentos ya sea que sean contaminados durante su irrigación o alimentos como peces y mariscos procedentes de aguas contaminadas (49).

Las enfermedades causadas por microorganismos que se transmiten a través del agua son predominantemente de origen fecal. La eficacia de los tratamientos de agua para remover bacterias patógenas se basa en la referencia de bacterias indicadoras de contaminación fecal, tal como: *Escherichia coli* (*E. coli*), el cual es excretado en heces de animales de sangre caliente, y por algunos reptiles. Sin embargo, hay patógenos entéricos diferentes a *E. coli* que son resistentes a la desinfección (filtración y cloración) y persistentes en el agua (por ejemplo: *Cryptosporidium parvum* y *Giardia*) (4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la diarrea es un síntoma común en infecciones gastrointestinales causada por una bacteria, virus o parásito y por ello gran número de enfermedades asociadas al consumo de agua se conocen como enfermedades diarreicas (49). Las enfermedades diarreicas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad alrededor del mundo y es clasificada como la cuarta causa de muerte y la segunda causa de pérdida de años de vida productiva, por mortalidad prematura y discapacidad (45). A nivel mundial se presentan 1,300 millones de gastroenteritis con una mortalidad de 3 millones anualmente (20).

La OMS estima que alrededor de 1.1 billones de personas en el mundo consume agua contaminada y en donde, la mayoría de las enfermedades diarreicas (88%) son atribuidas al consumo de esta, falta de sanidad e higiene. Varias aproximaciones en América del Norte sugieren que del 15 al 30% de las enfermedades gastrointestinales son transmitidas por el agua. Mientras que en regiones en desarrollo, donde hay un alto índice de endemidad de enfermedades gastrointestinales y elevadas concentraciones de patógenos en agua no se determina la proporción en la que estos se encuentran (4).

Los organismos que se encuentran en el agua y ocasionan enfermedades diarreicas, son de origen: bacteriano, viral y protozoario. De acuerdo al estudio realizado por Albert y cols., los principales patógenos entéricos de tipo viral son: rotavirus y adenovirus; protozoarios: *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*; y de tipo bacteriano: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., entre otros (1).

La dispersión por agua de los agentes patógenos causantes de enfermedad depende de varios factores como: la supervivencia del patógeno, su capacidad para multiplicarse en el ambiente y conservar su patogenicidad, aún tras un estado de latencia así como la dosis del patógeno requerida para causar infección en los individuos susceptibles (29).

El agua es utilizada varias veces, para consumo humano, para riego, para producción industrial, para generación de energía eléctrica, para remoción de desechos y a la vez es el soporte de los ecosistemas naturales. Los usos del agua se clasifican de varias formas:

Uso municipal, que incluye agua para uso doméstico, comercial e industrial y servicios al público.

Uso para riego agrícola, uso pecuario, acuícola o agua utilizada para fines recreativos y para transporte (29).

De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua de 2001 a 2004 los principales usos son:

- Agropecuario, que incluye usos agrícola, pecuario, acuicultura y otros.
- Abastecimiento al público, para uso público urbano y doméstico.
- Uso industrial, para uso de la industria, servicios y generación de energía eléctrica (29).

En el presente estudio se utilizó agua de diferentes sitios, las cuales se agruparon de acuerdo a su uso y procedencia, el agua de abastecimiento al público es agua de uso y consumo humano:

*Agua de uso y consumo humano*, es aquella que no contiene contaminantes objetables, ya sean químicos o agentes infecciosos y que no causa efectos nocivos para la salud, también denominada agua potable (42), que se dividió de acuerdo al sitio de muestreo en: *agua de toma domiciliaria* y *agua subterránea*;

El agua de uso agropecuario, para generación de energía eléctrica, es de tipo residual, o aguas tratadas:

*Agua residual*, aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, agrícolas, pecuarias, domésticos y similares, así como la mezcla de ellas (41).

*Agua residual tratada*, son aquellas que mediante procesos individuales o combinados de tipo físicos, químicos, biológicos u otros, fue adecuado para su reuso en servicios al público (41). El reuso en servicios al público son con contacto directo (llenado de lagos y canales artificiales, recreativos con paseo en lanchas, remo, canotaje, esquí, riego de parques y jardines) o con contacto indirecto u ocasional (riego de camellones, campos de golf, abastecimiento de hidratantes de sistemas contra incendio, lagos artificiales no recreativos, barreras hidráulicas y panteones) dividida por el sitio de muestreo en: *agua de riego* (agua de reuso con contacto directo) y *agua de reuso* (agua de reuso con contacto indirecto u ocasional) (41).

### **Principales agentes causales de gastroenteritis**

Como ya se mencionó algunos de los principales patógenos entéricos de origen bacteriano son: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y

*Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC). Estos patógenos entéricos al igual que otros tienen un ciclo tradicional que inicia con la entrada del patógeno, seguida por el establecimiento y la multiplicación evitando las defensas del hospedero causando un daño y su salida, esto es ejecutado por sistemas macromoleculares de los patógenos aunque las moléculas efectoras usadas y los efectos causados en el hospedero varían para cada patógeno aunque algunos son conservados (15).

❖ ***Campylobacter* spp.**

Las especies de *Campylobacter* son bacterias con forma espiral, microaerófilas, Gramnegativas, las cuales sobreviven en el tracto gastrointestinal de una amplia gama de organismos hospederos (13). Este género comprende 18 especies y 6 subespecies (12).

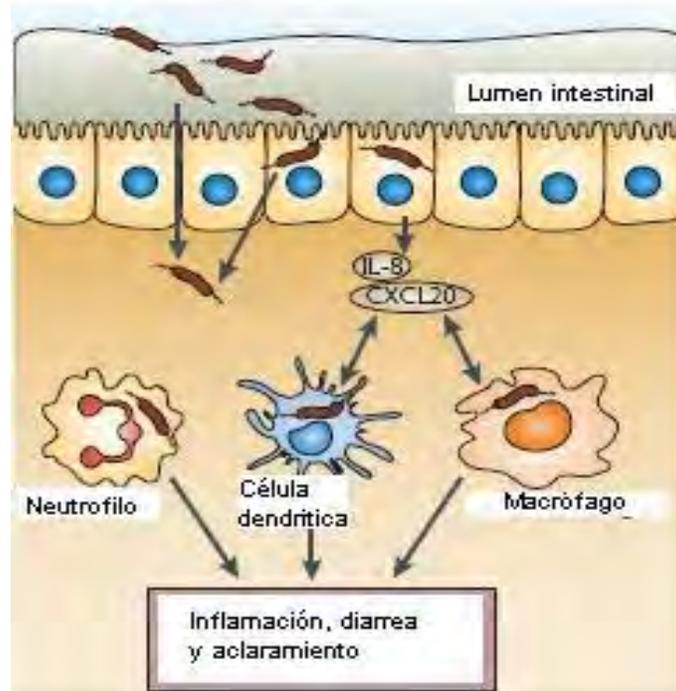
En la actualidad, *Campylobacter* es una de las causas más frecuentes de gastroenteritis bacteriana aguda, tanto en países desarrollados, como en desarrollo (13). Dentro de este género, *Campylobacter jejuni* subespecie *jejuni* (*C. jejuni*) y *Campylobacter coli* (*C. coli*) son los microorganismos más frecuentemente asociados con la enfermedad, lo que representa más del 95% de las infecciones cuando se utilizan medios de cultivo selectivos para su aislamiento (13), también se ha encontrado en menor frecuencia a *Campylobacter lari* como agente causal de gastroenteritis humana (23).

Se han considerado como fuentes de brotes de infección masiva por este microorganismo: un tratamiento inapropiado de la leche, el consumo de la leche cruda y un tratamiento inadecuado del agua (47).

La transmisión directa es principalmente ocupacional (agricultores, carniceros, trabajadores de mataderos y procesadores de aves de corral), pero los animales domésticos traen la infección a los hogares. En niños la transmisión entre humanos es poco frecuente. La propagación nosocomial dentro de las unidades neonatales fue observada en raras ocasiones. Las causa posibles de estos brotes son la desinfección inadecuada de las bañeras de los bebés y el no desinfectar las incubadoras a cada cambio de niño (47).

Varios determinantes de virulencia son propuestos para *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, incluyendo motilidad, adherencia, capacidad invasiva y producción de toxina (Figura 1). La toxina mejor caracterizada en *Campylobacter* spp., es la toxina de distensión citoletal (CDT). La CDT causa distensión celular progresiva en células epiteliales intestinales y recientemente, se ha demostrado que la CDT de *C.jejuni* causa sensibilidad celular al ser bloqueada en la fase G<sub>2</sub> de su ciclo celular, lo que indica que CDT tiene un novedoso mecanismo de acción para una toxina bacteriana (18).

El espectro clínico de enteritis por *Campylobacter* va de una diarrea acuosa, no sanguinolenta y no inflamatoria, a una diarrea inflamatoria severa con dolor abdominal y fiebre (18). La dosis infectiva para el desarrollo de una campilobacteriosis es tan baja como de 500 a 800 bacterias (50).



**Figura 1.** Invasión de *Campylobacter jejuni* a las células del epitelio intestinal. Tomada de Young IK y cols. 2007 (50)

Hasta hace poco, *Campylobacter fetus* (*C. fetus*) subespecie *fetus* fue considerado como un patógeno animal que causa aborto y esterilidad bovina y ovina. Recientemente, se demostró que *C. fetus* tiene la posibilidad de causar epidemias y enfermedades esporádicas de origen alimentario en humanos (6).

La identificación de *Campylobacter* spp., es problemática debido a su inercia bioquímica y a sus requerimientos nutricionales de crecimiento, lo que lo clasifica como un microorganismo fastidioso. La diferenciación entre *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (*C. jejuni* subsp. *jejuni*) y *Campylobacter coli* (*C. coli*) se complica por su relación genotípica y fenotípica. Bioquímicamente se diferencian sólo en su capacidad para hidrolizar hipurato, *C. coli* es hipurato negativa, pero son también conocidas cepas de *C. jejuni* subsp. *jejuni* hipurato

negativas. La correcta identificación proporciona información importante sobre la prevalencia de diferentes especies la cual es implementada en estudios epidemiológicos y de evaluación de riesgos ya que algunas de estas cepas presentan resistencia a eritromicina (13).

Se considera que las Campilobacteriosis causan del 5% al 14% de los casos de diarrea a nivel mundial, causando un número mayor de casos de diarrea en comparación con *Salmonella*, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (4). Tan solo en Estados Unidos se estima ocurren de 2.1 a 2.4 millones de casos de campilobacteriosis humana cada año (2).

#### ❖ ***Salmonella* spp.**

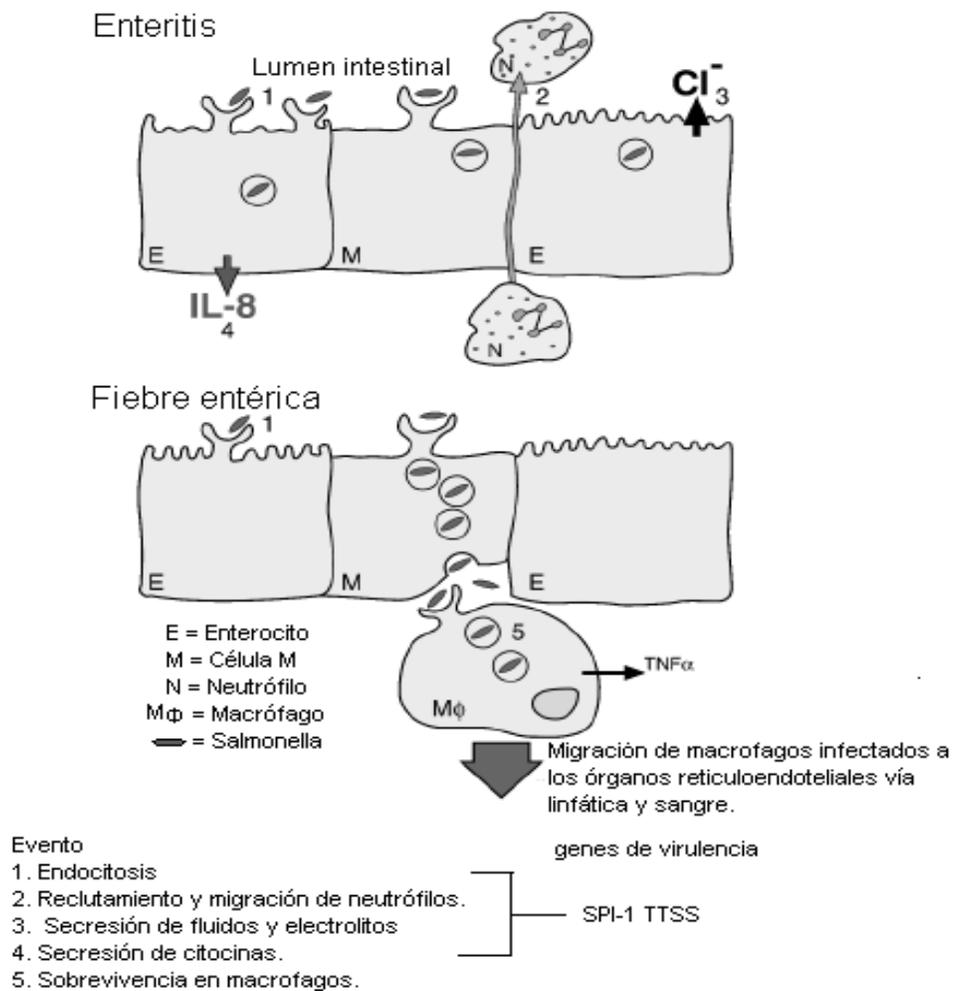
El género *Salmonella* comprende bacterias anaerobias facultativas Gramnegativas de la familia *Enterobacteriace*, conformado por tres especies; *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica* y *Salmonella subterranean* (44). El linaje de *Salmonella entérica* (*S. enterica*) se postula que han ramificado en distintas subespecies. Las subespecies de *S. enterica* están clasificadas en más de 2,300 serovares que incluyen patógenos de importancia médica y veterinaria. Estos serovares difieren en su gama de huéspedes y su grado de adaptación. Por ejemplo, *S. enterica* serovar Dublin (*Salmonella* Dublin) infecta al ganado vacuno; *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis (*Salmonella* Choleraesuis) infecta a cerdos y otros mamíferos; *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis) infectan múltiples hospederos incluyendo humanos, roedores, ganado vacuno,

aves de corral y ovejas; *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella* Typhi) y *Salmonella enterica* serovar Paratyphi (*Salmonella* Paratyphi) infectan a humanos (17).

El género *Salmonella* es el agente causal de diferentes infecciones intestinales, conocidas como salmonellosis. La salmonellosis humana se divide en dos síndromes: 1) La fiebre entérica, que incluye la fiebre tifoidea causada por *Salmonella* Typhi, y la fiebre paratifoidea que es patológica y clínicamente similar a la tifoidea, pero con síntomas menos severos, causada por *Salmonella* Paratyphi A, B, o C; 2) La gastroenteritis o envenenamiento por alimentos, la cual es la más común de las infecciones, causada por muchos serotipos. Los serotipos más comunes en la salmonellosis no-tifoidéica son *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Enteritidis (9).

*Salmonella* cuenta con cinco islas de patogenicidad, los genes localizados en la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) son genes involucrados en la invasión de células epiteliales, apoptosis de macrófagos, activación de cascadas dependientes de MAP cinasas (cinasas de proteínas activadas por mitógenos); los genes localizados en SPI-2 y SPI-3 regulan la supervivencia y replicación bacteriana. SPI-4 codifica para un sistema de secreción tipo I y SPI-5 codifica para factores involucrados en la secreción fluida y reacción inflamatoria en la mucosa intestinal (20). Después de la ingestión de agua y alimento contaminado *Salmonella* spp., entra al intestino delgado, atraviesa la capa de la mucosa intestinal encontrándose y adhiriéndose a las células del epitelio intestinal, posteriormente invade las células epiteliales por distintos procesos morfológicos, “endocitosis mediada por la bacteria”. Después de la adhesión de la bacteria a la superficie de las células

apicales ocurre un rearrreglo del citoesqueleto de la célula del hospedero rompiendo el borde de cepillo de las células epiteliales e induciendo subsecuentemente la formación de ondulaciones en la membrana que llegan y encierran a la bacteria en vesículas. La migración de los fagocitos infectados a otros órganos del sistema retículo endotelial probablemente facilita la diseminación de la bacteria al huésped (33), ver figura 2.



**Figura 2.** Eventos de la patogénesis asociada a *Salmonella*. Tomada de Ohl ME y Miller SI, 2001 (33).

En SPI-1 se encuentra además un complejo llamado *inv-spa* el cual está involucrado en promover la entrada de antígenos a las células del huésped a través de un sistema de secreción tipo III. El complejo *inv-spa* está conformado por 5 genes: *invH*, *invE*, *invA*, *spaM* y *spaN*. *invE* es un gen regulador e *invA* es un gen importante para el microorganismo, por su participación en el proceso de invasión a los enterocitos (7).

La gastroenteritis causada por salmonella es clínicamente indistinguible de otras causadas por otros microorganismos. Los síntomas son fiebre, dolor de cabeza, calambres abdominales y diarrea. Los síntomas de la fiebre entérica incluyen escalofríos, mialgia, artralgia, rash, diarrea. El diagnóstico requiere del aislamiento del patógeno, microscopia fecal, pruebas bioquímicas y serológicas (11), un estudio en sujetos sanos mostró que las dosis infectivas para diferentes serotipos de Salmonella son mayores a  $1 \times 10^6$  bacterias (27).

La salmonelosis es más prevalente en África, Asia, y Sudamérica. Se estima que a nivel mundial se presentan más de 16 millones de fiebre tifoidea por año con aproximadamente 6 millones de casos fatales (20).

#### ❖ ***Shigella* spp.**

Los miembros del género de *Shigella* son bacilos anaerobios facultativos, Gramnegativos perteneciente a la familia *Enterobacteriace*, son genéticamente relacionados con subtipos de *Escherichia coli* Enteroinvasiva. El género está dividido en cuatro especies *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y

*Shigella sonnei*. Estas especies son divididas en serotipos basados en sus diferencias bioquímicas y variaciones en el antígeno somático “O” (24).

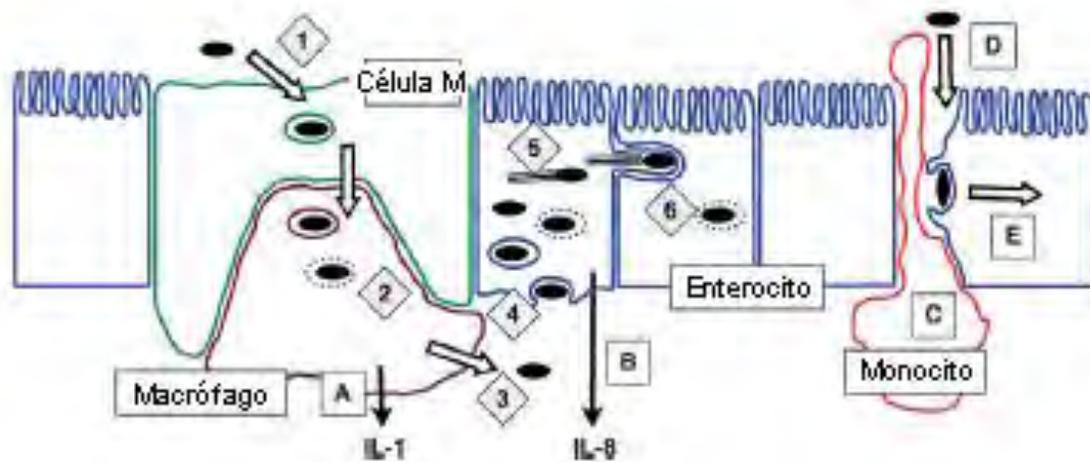
La patogénesis de las infecciones debidas a *Shigella* dependen primariamente de un plásmido que codifica para factores que permiten la entrada de la bacteria a la célula, de libre crecimiento en el citoplasma y propagarse a células adyacentes (15).

La habilidad de colonizar e invadir células intestinales es mediada en parte por el locus asociado a invasión (*ipa*) el cual es llevado en un plásmido de 120 a 140 MDa y el antígeno de invasión plasmídico H (IpaH) que se encuentra en múltiples copias tanto en el plásmido, como en el cromosoma de estos organismos; IpaH es una proteína necesaria para la invasión de células epiteliales (38).

Se ha descrito que en la mucosa del colon, las bacterias cruzan la mucosa epitelial por invasión a las células M sobreponiéndose a los folículos linfoides, los que les permite alcanzar el polo basolateral de las células epiteliales donde se induce su captura. La entrada a la célula epitelial involucra un rearrreglo del citoesqueleto de la célula que se extiende más allá de la zona de contacto entre la bacteria y la membrana celular, lo que conduce al ondulamiento y hundimiento de la bacteria dentro de la vacuola (36). La invasión a las células epiteliales de la superficie basolateral, es dependiente del aparato de secreción tipo III codificado en el plásmido. Dos proteínas son secretadas por este sistema IpaB e IpaC, las cuales, son insertadas en la membrana de la célula hospedera y median la entrada directa a la célula. Una vez internalizada por las células epiteliales, la bacteria rápidamente lisa la membrana de la vacuola de entrada y accede al

citoplasma de la célula donde se multiplica (15). Mediante la inducción de la polimerización de la actina en uno de sus polos, las bacterias intracelulares se mueven dentro del citoplasma de las células infectadas. Este movimiento genera la formación de protuberancias que contienen una bacteria y son absorbidos por las células epiteliales adyacentes, permitiendo así que la bacteria se disemine de célula a célula sin estar expuesto al medio externo (36).

Las bacterias liberadas por las células M (después de su internalización inicial) o de las células epiteliales (después dentro de la multiplicación intracelular) interactúan con los macrófagos, escapan de la vacuola fagocítica e inducen la apoptosis de las células infectadas, ver Figura 3 (36).



**Figura 3.** Modelo de la patogenicidad inducida por *Shigella* spp. La bacteria cruza la barrera del epitelio a través de la entrada a las células M (1). Hay liberación de macrófagos los cuales inducen apoptosis (2) y alcanzan el polo basolateral de las células epiteliales (3), en los cuales se induce su entrada (4). El movimiento intracelular de la bacteria (5) lleva a la formación de protuberancias y diseminación de la bacteria dentro del epitelio (6). La liberación de citocinas y quimiocinas, incluyendo IL-1 por macrófagos apoptóticos (A) e IL-8 por enterocitos infectados (B), promueven el reclutamiento de monocitos que migran a través del epitelio (C), facilitando la entrada de la bacteria a las células epiteliales (D) e incrementando la invasión del epitelio (E). Tomada de Parsot C. 2005 (36).

Otro factor de virulencia es la capacidad de producir una exotoxina llamada toxina Shiga (Stx) que es liberada durante la lisis celular relacionada a *Shigella dysenteriae* que es a la vez citotóxica y neurotóxica (46). La toxina Shiga y el lipopolisacárido de estos organismos permite la invasión del epitelio.

Una infección intestinal debida a *Shigella* spp., resulta en una inflamación severa del colón (37). La destrucción de las células del epitelio produce diarrea acuosa, dolor abdominal severo y calambres, en el caso de la disentería bacilar hay heces mucoides y sanguinolentas (24), es altamente infectiva ya que requiere menos de 100 células para causar una infección (24). Las complicaciones son raras e incluyen: síndrome urémico hemolítico, encefalopatía, deshidratación, sepsis y fallecimiento. Algunos estudios realizados demuestran la aparición de resistencia a antibióticos como ampicilina y trimetoprim-sulfametoxazol, que son los antibióticos más usados para el tratamiento de este tipo de gastroenteritis (8, 10).

La alta incidencia de *Shigella* en países en desarrollo es atribuida generalmente a la falta de agua limpia, pobres condiciones de higiene, desnutrición y el costo de los antibióticos para el tratamiento (24). *Shigella* spp., es un patógeno que se transmite por ruta fecal-oral. Es una de las causas más frecuentes de diarrea del viajero, afecta a niños con mayor frecuencia que a los adultos principalmente en países en desarrollo (10).

La frecuencia reportada de enfermedades causadas por estos microorganismos es de 60%, 15% y 6% para *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, y *Shigella dysenteriae* en países en desarrollo y de 16%, 77% y 1% en países desarrollados, respectivamente (38).

La identificación de *Shigella* en muestras ambientales donde el número de microorganismo es pequeño es limitada ya que depende del medio de enriquecimiento para su aislamiento, por lo que los ensayos directos de detección de ácidos nucleicos mediante el uso de sondas de DNA y amplificación por PCR son útiles para detectar la presencia del microorganismo (21).

Se estima que anualmente ocurren 165 millones de casos de enfermedades diarreicas causada por *Shigella* de los cuales 163 millones ocurren en países en desarrollo y 1.5 millones en países industrializados. Además, se estima que 1.1 millones de personas muere anualmente de una infección causada por *Shigella* spp. (38).

#### ❖ ***Escherichia coli* enterotoxigénica**

Entre las bacterias patógenas *Escherichia coli* (*E. coli*) tiene una función importante ya que es un microorganismo anaerobio facultativo Gramnegativo predominantemente no patogénico miembro de la microflora intestinal humana. Sin embargo, algunas cepas desarrollaron la capacidad de causar enfermedades gastrointestinales, urinarias, y del sistema nervioso central en el humano. Las cepas causantes de diarrea son divididas en cinco grupos: *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC) (30).

*Escherichia coli* Enterotoxigénica coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado y elabora enterotoxinas las cuales dan lugar a la secreción intestinal. La colonización es mediada por uno o más factores de colonización

(CFs) fimbriales o fibrilares los cuales son designados como CFA (factores de colonización antigénicos), CSs (antígenos coli de superficie) o PCF (factor de colonización putativo) seguido por un número (26).

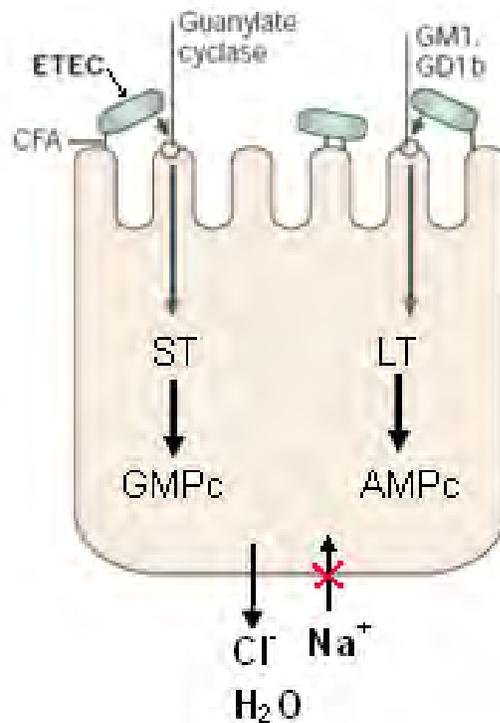
*Escherichia coli* Enterotoxigénica es toxigénica por la producción de enterotoxina termolábil (LT) y/o enterotoxina termoestable (ST). La toxina termoestable y termolábil son codificadas por genes codificados en plásmidos y son usualmente evaluados por métodos fenotípicos o genotípicos para la diferenciación de ETEC de otros tipos de *E. coli* (28).

La toxina termolábil es una clase de enterotoxina estrechamente relacionada en estructura y función a la toxina colérica (CT) la cual es expresada por *Vibrio cholerae*. LT tiene actividad de ADP-ribosil transferasa y transfiere una fracción de ADP-ribosil de NAD a la subunidad  $\alpha$  del sistema estimulador de la proteína G, lo que lleva a una activación permanente de la adenilato ciclasa y esto a su vez conduce a un incremento en los niveles de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular, activación de cinasas dependientes de AMPc y la eventual activación de canales de cloro en células epiteliales. LT también estimula la síntesis de prostaglandinas y al sistema nervioso entérico, ambas actividades llevan a la secreción e inhibición de la absorción de iones (26).

La toxina termoestable es una toxina pequeña de un sólo péptido que incluye dos clases (STa y STb), los cuales difieren en estructura y mecanismos de acción. El principal receptor para STa es la guanilato ciclasa de membrana; la unión de STa a la guanilato ciclasa estimula la actividad guanilato ciclasa y da como resultado un incremento de Guanosín monofosfato cíclico (GMPc) intracelular lo cual a su vez activa cinasa dependientes de GMPc o AMPc e

incrementa la secreción. STb eleva las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol y estimular la liberación de prostaglandina E2 lo que a su vez estimula la liberación de serotonina, todos estos mecanismos incrementan la secreción de iones (26).

*Escherichia coli* Enterotoxigénica expresa una o ambas toxinas LT y ST. La toxina termoestable es codificada por dos genes diferentes *estA* y *ST1* ambos codifican para péptidos pequeños (18 y 19 aminoácidos) con funciones y secuencias de genes similares. La toxina traducida es llamada STh (*estA*) originalmente encontrada en un aislamiento humano de ETEC y STp (*st1*) encontrada en ETEC proveniente de cerdo. Los genes de ST son expresados de forma individual o en combinación con los genes de LT (*eltA* y *eltB*). *eltAB* son expresado de forma individual únicamente, por lo que hay siete combinaciones que expresan las cepas de ETEC de manera individual: STh, STp, STh/LT, STp/LT, LT, y menos común, STh/STp y LT/STh/STp. ETEC también expresa diferentes factores de colonización (CFs) que median la adhesión bacteriana a las células del intestino, así como su unión a células del intestino (25). Las cepas de ETEC expresan uno o más de los 22 diferentes factores de colonización, lo que conlleva a una gran variación en los perfiles de virulencia en aislados clínicos (39).



**Figura 4.** Mecanismos de acción de las toxinas termolábil y termoestable de *Escherichia coli* Enterotoxigénica, tomada y modificada de Kaper JB y cols., 2004 (26).

*Escherichia coli* Enterotoxigénica es una de las bacterias más comunes causante de diarrea infantil en países en desarrollo y una causa mayor de diarrea de viajeros. ETEC es transmitida por la ruta fecal-oral, por comida contaminada y/o agua y afecta tanto a la población local y a los viajeros de estas zonas (28), la dosis infectiva probable para que ETEC se establezca en el intestino delgado va de 100 millones a 10 billones de bacterias (19).

El mecanismo por el cual se postula que *Escherichia coli* Enterotoxigénica sobrevive durante periodos interepidémicos en ambientes acuáticos es por la formación de biopelículas pero también por la capacidad de cambiar de una fase latente a una fase llamada viable pero no cultivable (VBNC, por sus siglas en

inglés: Viable But NonCulturable). La forma VBNC es inducido por estrés ambiental como la residencia en agua sugiere ser un mecanismo de supervivencia durante condiciones estresantes y también una ruta de transmisión (28).

El *estándar de oro* para la detección de *Escherichia coli* Enterotoxigénica en varios tipos de muestras es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la toxina gangliosido GM1. Este método es ampliamente usado para la detección de toxinas ETEC y la caracterización de ETEC. La ELISA GM1 requiere el cultivo de las muestras y tiene baja sensibilidad y consume por lo general mayor tiempo comparado con la reacción en cadena de la polimerasa (28).

### **Importancia de las enfermedades diarreicas en México.**

En el 2001, la Organización Mundial de Salud reportó que en México, se registraron 1,575 muertes en niños menores de un año siendo esta ocasionada por una infección intestinal, mientras que en el mundo de 2000 a 2003 el 5% de las muertes en niños menores de 5 años es causada por una enfermedad diarreica (48).

De acuerdo a los datos reportados por el sistema de información de la dirección general de epidemiología en nuestro país en 2007, las infecciones intestinales causadas por microorganismos diferentes a *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., y mal definidas es la segunda causa de enfermedad siendo las personas de 1 a 4 años y de 25 a 44 años de edad las más afectadas, con un total de más de cuatro millones de casos de infecciones intestinales en toda la

población. Las enfermedades como la fiebre paratifoidea y otras salmonelosis en 2007 se encontraron dentro de las primeras 20 causas de enfermedad siendo la población de 25 a 44 años de edad la más afectada y de acuerdo a las cifras estimadas en 2008 se presentaron más de 400,000 casos de fiebre tifoidea, paratifoidea y otras salmonelosis. También en 2008 se estima que hubo más de cinco millones de enfermedades infecciosas intestinales(14).

En México la Norma Oficial Mexicana 127 de la secretaría de salud (NOM-127-SSA1-1994) indica los límites permisibles de microorganismos de origen fecal y coliformes totales, al igual que la NOM-003-ECOL-1997, establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público pero no sugiere la búsqueda de microorganismos patógenos que se sabe están en agua para uso y consumo humano ocasionando problemas de salud de gran importancia y la NOM-001-ECOL-1996 establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de agua residuales pero no indica la búsqueda de microorganismos de ningún tipo (41, 40, 42). Por lo que hay un interés particular en el desarrollo y establecimiento de un método rápido, fácil y relativamente de bajo costo en adición a la exactitud y sensibilidad para la detección de patógenos.

## JUSTIFICACIÓN

En México sólo se considera obligatorio la búsqueda de indicadores generales de contaminación microbiológica, específicamente organismos coliformes totales y/o fecales, y ocasionalmente a *Escherichia coli* en el agua para uso y/o consumo humano; no se considera la búsqueda específica de microorganismos patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales, que debido a las cifras elevadas de casos en nuestro país es necesario un método que permita la detección rápida y eficiente de microorganismos tales como: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

## HIPÓTESIS

Ho. Si se detecta de la presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica en agua para uso y consumo humano por PCR-Hibridación, entonces el agua representa un riesgo para la salud.

## OBJETIVO GENERAL

- ❖ Detección de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* Enterotoxigénica en agua para uso y consumo humano.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Estandarizar el método de detección de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* Enterotoxigénica.
- ❖ Determinar la sensibilidad y especificidad del método de detección (PCR-hibridación).
- ❖ Detectar la presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* Enterotoxigénica en agua para uso y consumo humano.

## METODOLOGÍA

El presente proyecto se dividió en dos fases metodológica:

- 1) *La estandarización de la detección por PCR e hibridación.* En esta etapa se determinaron las condiciones para llevar a cabo la amplificación por PCR, de cada uno de los genes de los microorganismos estudiados, así como las condiciones de hibridación y con ello determinar la especificidad y sensibilidad de los ensayos de detección por PCR e hibridación.
- 2) *Análisis de muestras de agua para uso y/o consumo humano.* En esta fase experimental se determinó la presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica a través del PCR e hibridación.

### ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN POR PCR E HIBRIDACIÓN

#### *Recuperación de las cepas tipo*

Para realizar la estandarización de los diferentes ensayos de amplificación por PCR-Hibridación se emplearon las siguientes cepas tipo: *Campylobacter coli* ATCC 2232, *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13098, *Enterobacter aerogenes* ATCC 35029, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* Enterotoxigénica ATCC H10407 y *Escherichia coli* Enterotoxigénica ATCC 109C2

(Donadas por el M en C Armando Navarro, Facultad de Medicina, UNAM), *Escherichia coli* Enterotoxigénica ATCC 35401 (Donada por la M en C Gloria Luz Paniagua Contreras, Facultad de Estudios Superiores de Iztacala, UNAM), *Helicobacter pylori* ATCC 700824 (Hp J99), *Helicobacter pylori* ATCC 700392 (Hp 26695), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Salmonella* Cholerae-suis ATCC 700730, *Salmonella* Typhimurium ATCC13311, *Salmonella* Typhi ATCC 13018, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Vibrio cholerae* CDC Vc12, y *Shigella boydii* L1, *Proteus mirabilis* y *Salmonella* Enteritidis (aislamientos ambientales); Las cepas fueron recuperadas en caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas (a excepción de las cepas de *Campylobacter* y *Helicobacter* que se recuperaron en placas de agar sangre de carnero y en medio de prueba para *Haemophilus* suplementado con suero de caballo, respectivamente; en condiciones de microerofilia), posteriormente, se sembraron por estría cruzada en agar base sangre e incubadas a 37°C por 24 horas. La identificación de las cepas bacterianas se realizó con diferentes pruebas bioquímicas, tales como: Rojo de metilo-Voges Proskauer, caldo Malonato, Sulfhídrico-Indol-Movilidad, Movilidad-Indol-Ornitina, Citrato, Agar Hierro Triple azúcar, Agar de Kigler, agar DNAsa, adicionalmente las cepas de *Vibrio cholerae*, *Salmonella* y *Shigella* fueron aglutinadas con su antisuero correspondiente. Una vez confirmada su identificación, se sembró una colonia de cada una de las cepas en agar base sangre en estriado masivo y se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas, posteriormente, se cosecharon en solución reguladora de Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 - EDTA 1 mM (TE) para la extracción de los ácidos nucleicos.

### *Extracción de DNA*

A 200  $\mu$ L de la suspensión bacteriana en TE, se le adicionaron 500  $\mu$ L de Tiocinato de Guanidina-EDTA-Sarcosinato (GES: Guanidina 5 M, EDTA 0.1 M, Sarcosinato 1%) y 25  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se adicionaron 250  $\mu$ L de acetato de amonio 7.5 M frío, se mezcló suavemente por inversión y se incubó en hielo durante 20 minutos. Después, se adicionaron 550  $\mu$ L de una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó por inversión durante 5 minutos y se centrifugaron a 16,000 x g, durante 10 minutos a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa y se repitió una vez más. Posteriormente, a la fase acuosa, se le adicionó un volumen de isopropanol, se mezcló por inversión, los tubos se centrifugaron durante 5s a 16,000 x g, y se realizaron dos lavados con 500  $\mu$ L de etanol al 70% cada uno, se centrifugaron durante 5s a 16,000 x g y se decantaron. Finalmente, el DNA seco se resuspendió en 40  $\mu$ L de agua para PCR. Los DNA's fueron cuantificados a 260/280 nm mediante el uso de un NanoDrop (Thermo scientific NANODROP 1000 Spectrophotometer) y visualizados con luz UV en un gel de agarosa al 0.8% en 0.5X de Tris-Boratos-EDTA (TBE) y teñidos con bromuro de etidio.

### *Amplificación por PCR*

La detección de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. y *Escherichia coli* Enterotoxigénica se realizó con los iniciadores descritos por

Pacheco-Tena y cols. (35), Vu Nguyen y cols. (30) y Phantouamath y cols. (37); ver Tabla 1.

Para llevar a cabo la amplificación de los genes, el DNA obtenido se llevo a una concentración de 1 ng/ $\mu$ L del cual 1  $\mu$ L del DNA blanco fue adicionado a un mezcla de amplificación que contiene: 20 pmol de iniciadores, 0.2 mM de deoxirribonucleótidos, solución amortiguadora de amplificación 1X,  $MgCl_2$  acorde a cada ensayo (ver Tabla 1), 1U de Taq DNA polimerasa, a un volumen final de reacción de 25  $\mu$ L. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 94°C 1min, alineamiento 52°C ó 54°C 1 min, extensión 72°C 1 min, durante 30 ciclos, extensión final 7 minutos a 72°C. Finalmente, se observaron los productos amplificados por electroforesis usando gel de agarosa al 2% en TBE 0.5X, en presencia de bromuro de etidio.

#### *Detección de productos amplificados por hibridación*

Una vez obtenida la separación de los productos de amplificación en el gel de agarosa, se transfieren los amplicones a una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences).

La electrotransferencia de los productos amplificados se realizó de forma directa, durante 15 minutos en solución de TBE 0.5X utilizando un equipo de transferencia en semi-seco (Transfer-blot SD semi-dry Transfer cell, BioRad), posteriormente, se realizó la desnaturalización de los productos de amplificación, para lo cual se colocó la membrana sobre papel filtro humedecido con una solución de NaOH 0.4 N durante 10 minutos, posteriormente, se fijó el fragmento

de DNA a la membrana mediante luz ultravioleta (CL1000 Ultraviolet Crooslinker, UVP).

La hibridación de las membranas se realiza con los oligonucleotidos indicados en la tabla 1 y para el resto de los amplicones se utilizó como sonda el producto de PCR marcado con digoxigenina por PCR unidireccional, para ello se purificó el producto de PCR de acuerdo a las indicaciones de dos diferentes kit's de purificación utilizados (Ultra Clean PCR Clean-up, Mobio; High Pure PCR Product Purification kit, Roche Applied Science).

La sonda se marcó con la incorporación digoxigenina-dideoxiuridina trifosfato (DIG-ddUTP) en el extremo 3' del oligonucleotido siguiendo las indicaciones del kit de marcaje (DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling kit, Boehringer Mannheim Biochemica), marcada la sonda se llevó a cabo la hibridación.

Para la hibridación se hizo lo siguiente: a cada membrana se pre-híbrido con una solución que contenía: SSC 5X (SSC 1X = NaCl 0.15 M, citrato de sodio 0.015 M), Solución de bloqueo 2X, Reactivo Denhart's 5X, SDS 0.02 %, N-Lauril-Sarcocinato de sodio 0.1%; y se incubó a 42°C por una hora. Posteriormente, se retiró la solución de pre-hibridación y se adicionó la solución de hibridación (solución de pre-hibridación más 17.5 ng/mL de sonda específica o 20 ng/mL de producto de PCR) y se incubó a 42°C durante toda la noche.

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación, la membrana fue lavada con SSC 2X-0.1% SDS a 50°C, posteriormente, se lavó dos veces con SSC 0.5 X-SDS 0.1%; luego se equilibró la membrana durante un minuto con solución amortiguadora de malato, después, la membrana fue bloqueada con una dilución

1:5 de la solución de prehibridación por 30 minutos, y se colocó solución de bloqueo fresca más el anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (anti-DIG-PA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se eliminó la solución de bloqueo a la membrana con buffer de malato de 15 minutos cada uno, se equilibro la membrana con SSC 2X por 5 minutos, y utilizando los reactivos de detección ECL (ECL direct nucleic acid labelling and detection system, GE Healthcare) se reveló y la membrana fue expuesta a una placa de rayos X (Hyperfilm, ECL).

#### *Determinación de sensibilidad y especificidad de la detección*

Para determinar la especificidad se realizó la amplificación de cada gen (*16S-rDNA*, *invA/invE*, *ipaH*, *estA*, *eltB*) con DNA de cada una de las cepas tipo. El producto obtenido se visualizó a través de una electroforesis y se hibrido con la sonda de prueba.

Para determinar la sensibilidad se realizaron diluciones seriadas 1:10 del DNA y se amplificó cada gen utilizando una cepa tipo representante de cada género en estudio y de ETEC. A cada reacción de amplificación se adicionó: 1 ng de DNA, 100 pg de DNA, 10 pg de DNA, 1 pg de DNA, 100 fg de DNA, 10 fg de DNA y 1 fg de DNA. Los productos finales de cada reacción se visualizaron por electroforesis y se hibridaron con las sondas de prueba.

### *Secuenciación de productos de PCR*

Se llevo a cabo la amplificación de cada uno de los genes utilizando para ello solo las cepas tipo de cada género. Los productos de PCR se purificaron mediante el uso del kit Clean PCR Clean-up (Mobio) y Wizard PCR Preps DNA purification System (Promega), se realizó una electroforesis de los productos y se secuenciaron en ambas direcciones utilizando el sistema BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems) y el electroferograma se obtuvo mediante el equipo ABI PRISM 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias de DNA fueron analizadas con los programas Accelrys Gene (Scientific and Educational software) y BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) (3).

## ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO

### *Concentración de muestras de agua*

Los sitios de muestreo se ubican en la zona sur del Distrito Federal y son dos principalmente el primero es dentro de las instalaciones de Ciudad Universitaria (CU) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y la zona sur del Distrito Federal.

Los sitios de muestreo se dividen en cinco, los cuales son: Afluente de la planta de tratamiento de aguas residuales de CU y Cerro de la estrella (agua residual); efluente de planta de tratamiento de aguas residuales de CU y Cerro de

la estrella (agua de reuso); agua de aspersores que se encuentran en metro CU, rectoría y pumitas y riego de Xochimilco provenientes de planta de tratamiento (agua de riego); agua subterránea proviene de pozo multifamiliar, pozo de Facultad de Química, y pozo vivero alto de CU (agua subterránea); y agua de toma domiciliaria de la delegación Magdalena Contreras.

En la Figura 5 y 6 se indican los sitios de muestreo. El muestreo fue realizado por el Instituto de Ecología de la UNAM y el agua fue transportada del sitio de origen a 4°C en hielo hasta el laboratorio para concentrar. La cantidad recolectada fue de 1L y se concentraron por centrifugación a 13,000 x g a un volumen de 10 mL de solución de TE y se almacenaron a -20°C, hasta su análisis.

#### *Extracción de DNA de las muestras de agua.*

Se tomó 1 mL del concentrado de cada muestra y se realizó la extracción de DNA mediante el uso de GES (método descrito en la fase de estandarización). El DNA obtenido de cada muestra se resuspendió en 10 µL de agua para PCR.

#### *Detección del DNA de los microorganismos por PCR-Hibridación.*

Las condiciones de amplificación son las mismas que se utilizaron en la fase de estandarización. A cada reacción de amplificación se adicionó 1µL del DNA obtenido para obtener un volumen final de reacción de 25 µL.

Los amplicones obtenidos se visualizaron por electroforesis utilizando gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio en solución amortiguadora de TBE

0.5X. Cada mezcla de reacción del ensayo anterior se calentó a 95°C para desnaturalizar por 5 minutos, después se sumergieron de inmediato en hielo y se colocaron de manera directa sobre una membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences) y se fijó el fragmento de DNA a la membrana mediante luz ultravioleta. Finalmente, se realizó la hibridación de los productos de PCR y se obtuvieron los resultados en placas radiográficas.

Las muestras que fueron negativas a los diferentes ensayos de PCR-Hibridación se amplificaron con un control positivo de PCR utilizando para ello DNA del fago lambda e iniciadores específicos (Roche Applied Science) para descartar la posibilidad de que en estas muestras estuviera presente un inhibidor de la amplificación.

**Tabla 1.** Genes amplificados para la identificación de género y especie y condiciones para la amplificación por PCR.

Microorganismo	Gen	Secuencia 5' - 3'	Temperatura			Referencia
			de alineamiento (°C)	Concentración MgCl <sub>2</sub> (mM)	Amplicon (pb)	
<i>Campylobacter</i> spp.	16S RNAr	Camp-F GGCTGATCTACGATTACTAGCGAT	52	1.5	578	(35)
		Camp-R GCGCGCATTAGATACCCTAGTAGTCC				
		Dig-Camp-P CTCAACTTCCTAGCAAGCTAGCACTCTCT				
<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA/invE</i>	Sal-F TGCCTACAAGCATGAAATGG	52	1.2	457	(35)
		Sal-R AA ACTGGACCACGGTGACAA				
		Dig-Sal-P CTGGTTGATTTCTGATCGC				
<i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH*</i>	ipaH-F GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	54	2.0	619	(37)
		ipaH-R GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC				
		GCTAAACCAGTARGGTCTTCAAAA				
<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	<i>estA</i> *	CCC GG TACARGCAGGATTACAAACA	52	1.2	147	(30)
		TCTCTATGTGCATACGGAGC				
	<i>eltB</i> *	CCATACTGATTGCCGCAAT	52	1.2	321	

\*El producto de PCR marcado con digoxigenina fue utilizado como sonda en los ensayos de hibridación.



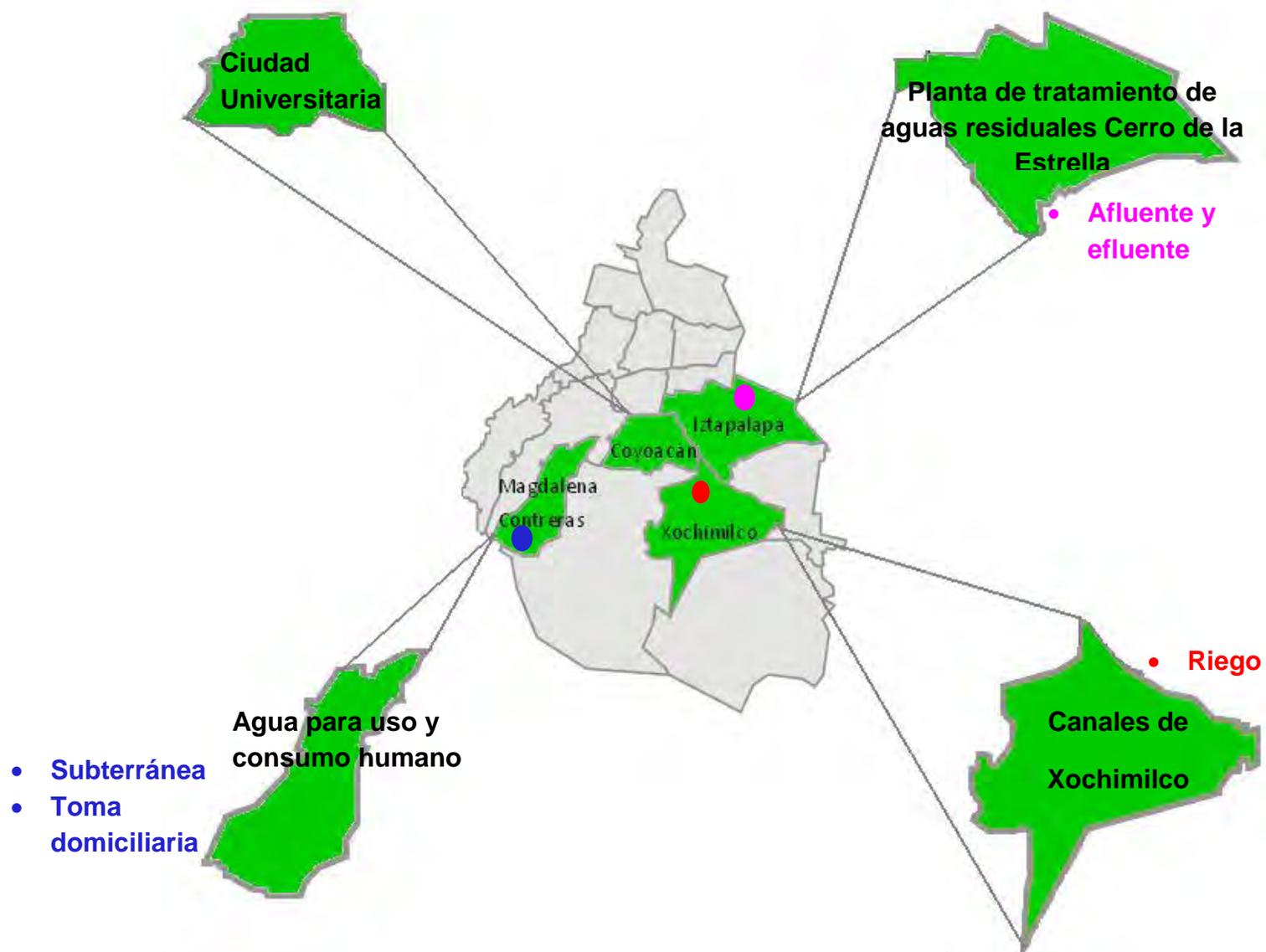


Figura 6. Sitios de muestreo ubicados al sur del Distrito Federal

## RESULTADOS

### ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN POR PCR E HIBRIDACIÓN

Una vez que se verificó la identidad de las cepas tipo y de los aislamientos ambientales mediante su patrón bioquímico y serológico (según el caso). Se procedió a realizar la extracción del DNA mediante la técnica de GES, la integridad de este fue valorado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, así como, la cuantificación del DNA purificado de cada muestra; esta última se determinó como el promedio de tres lecturas independientes para cada DNA. La electroforesis de los DNA mostró que estos estaban integros (resultados no mostrados), se obtuvieron valores de 1.6 a 2.0 en la relación 260/280nm y las concentraciones de cada DNA varían y en todas se tienen concentraciones de más de 200 ng/ $\mu$ L.

- Especificidad y sensibilidad de la detección de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y ETEC.

La sensibilidad en la detección de *Campylobacter* spp., fue de 1 pg de DNA que corresponde a 531 genomas (Tabla 2), para *Salmonella* spp. fue de 10 pg (1,952 genomas), para *Shigella* spp. fue de 1 pg (201 genomas) ver figura 7, mientras que para *Escherichia coli* Enterotoxigénica fue de 1pg (200 genomas), tanto para la cepa productora de toxina termoestable y termolábil. Cabe mencionar que un genoma equivale a una bacteria (Tabla 2).

Con respecto al ensayo de especificidad de la PCR-Hibridación, en el caso de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica, no hubo amplificación de productos de PCR a partir de los DNAs de microorganismos diferentes a estos géneros, solo de las cepas tipo para cada caso en específico, al igual que el ensayo de hibridación (Tabla 3), con respecto a *Campylobacter* spp., si hubo amplificación de los DNAs por PCR, esto debido a que en este ensayo se emplearon iniciadores universales, siendo específico el ensayo de Hibridación (Figura 8, Tabla 3).

El análisis de las secuencias de cada uno de los ensayos de amplificación mostró un alto porcentaje de similitud (Tabla 4), la cual va del 99% y 100% de identidad. En base a los resultados de especificidad y análisis de las secuencias indican que nuestros ensayos son específicos y sensibles.

**Tabla 2.** Resultados de sensibilidad de la amplificación e hibridación para *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

Espece	Cantidad de DNA	1 ng	100 pg	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg	1 fg
<i>Campylobacter</i> spp.	PCR	+	+	+	+	-	-	-
	Hibridación	+	+	+	+	-	-	-
	Número de genomas	531,915	53,191	5,319	<b>531</b>	53	5	1
<i>Salmonella</i> spp.	PCR	+	+	+	-	-	-	-
	Hibridación	+	+	+	-	-	-	-
	Número de genomas	195,200	19,520	<b>1,952</b>	195	19	2	0
<i>Shigella</i> spp.	PCR	+	+	+	+	-	-	-
	Hibridación	+	+	+	+	-	-	-
	Número de genomas	201,777	20,177	2,017	<b>201</b>	20	2	0
ETEC (LT)	PCR	+	+	+	-	-	-	-
	Hibridación	+	+	+	+	-	-	-
	Número de genomas	200,000	20,000	2,000	<b>200</b>	20	2	-
ETEC (ST)	PCR	+	+	+	-	-	-	-
	Hibridación	+	+	+	+	-	-	-
	Número de genomas	200,000	20,000	2,000	<b>200</b>	20	2	-

**Tabla 3.** Resultados de especificidad de la amplificación e hibridación para *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

Muestra de DNA	<i>Campylobacter</i> spp. <sup>a</sup>		<i>Salmonella</i> spp. <sup>b</sup>		<i>Shigella</i> spp. <sup>c</sup>		<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica				
	PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	LT <sup>d</sup>		ST <sup>e</sup>		
							PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	
<i>Campylobacter coli</i> ATCC 2232	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Choleraesuis ATCC 700730	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC13311	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 13018	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis (AA)	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i> L1 junio 84,	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
ETEC ATCC H10407(LT)	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
ETEC ATCC 35401 (E1188C) (ST y LT)	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
ETEC ATCC 109C2 (ST)	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 700392	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 700824	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Contin....

Muestra de DNA	<i>Campylobacter</i> spp. <sup>a</sup>		<i>Salmonella</i> spp. <sup>b</sup>		<i>Shigella</i> spp. <sup>c</sup>		<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica			
	PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	LT <sup>d</sup>		ST <sup>e</sup>	
							PCR	Hibridación	PCR	Hibridación
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> K12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13098	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 35029	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (AA)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> CDC Vc12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Gen 16S rDNA, <sup>b</sup> Gen *invA/invE*, <sup>c</sup> Gen *ipaH*, <sup>d</sup> Gen *eltB*, <sup>e</sup> Gen *estA*, AA = Aislado ambiental.

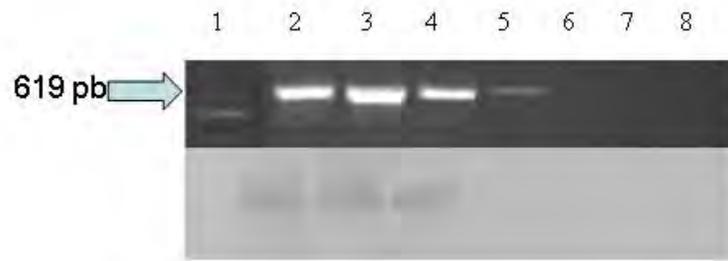
**Tabla 4.** Análisis comparativo de las secuencias de los productos amplificados con el banco de genes.

<b>Cepa reportada</b> <b>Cepa Secuenciada</b>	<i>Campylobacter coli</i> cepa X10 GQ167673.1*	<i>Campylobacter coli</i> cepa X3 GQ167672.1*	<i>Campylobacter jejuni</i> cepa INN-73-83 094400 GQ167679.1*	<i>Campylobacter jejuni</i> cepa RP0001 GQ167656.1*	<i>Campylobacter lari</i> subsp. <i>concheus</i> cepa LMG 21009T AM922330.1*
<i>Campylobacter coli</i> ATCC 2232	99%	99%	99%	99%	99%
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33291	99%	99%	99%	99%	99%
<b>Cepa reportada</b> <b>Cepa Secuenciada</b>	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Choleraesuis cepa SC-B67 AE017220.1*	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis cepa P125109 AM933172.1*	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A cepa ATCC 9150 CP000026.1*	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ( <i>Salmonella</i> Typhi) cepa CT18 AL627276.1*	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium cepa LT2 AE006468.1*
<i>Salmonella</i> Choleraesuis ATCC 700730	99%	99%	99%	99%	100%
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC13311	99%	100%	100%	100%	99%
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	99%	99%	99%	100%	100%

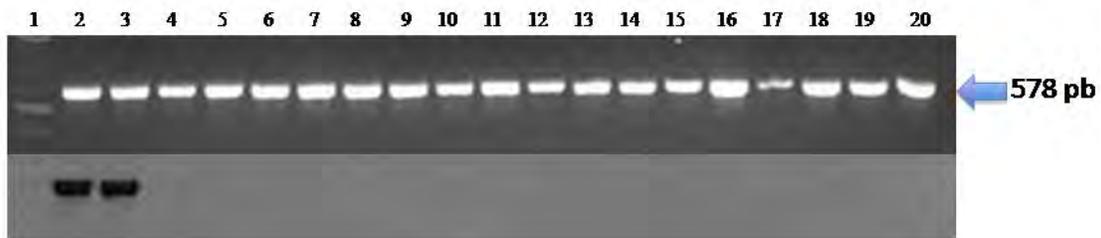
**Tabla 4.** Contin....

<b>Cepa reportada</b>	<i>Shigella boydii</i> cepa CDC 3083-94 CP001063.1*	<i>Shigella dysenteriae</i> cepa Sd197 CP000034.1*	<i>Shigella flexneri</i> gen ipaH M76444.1*	<i>Shigella flexneri</i> 2a cepa 301 AE005674.1*	<i>Shigella sonnei</i> cepa Ss046 P000038.1*
<b>Cepa Secuenciada</b>					
<i>Shigella boydii</i>	99%	99%	99%	100%	99%
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	99%	99%	99%	99%	99%
<b>Cepa reportada</b>	<i>Escherichia coli</i> cepa E24377A CP000795.1*	<i>Escherichia coli</i> cepa PE0615 EU113252.1*	<i>Escherichia coli</i> cepa 121-I EU113244.1*	<i>Escherichia coli</i> cepa 4702-1 EU113248.1	<i>Escherichia coli</i> cepa 21d S60731.1*
<b>Cepa Secuenciada</b>					
<i>Escherichia coli</i> ATCC H10407 (LT)	100%	100%	100%	100%	100%
<b>Cepa reportada</b>	<i>Escherichia coli</i> cepa WS-1858B AJ868113.1*	<i>Escherichia coli</i> O25:H42 AY342059.1*	<i>Escherichia coli</i> estA2 M18345.1 ECOESTA2*	<i>Escherichia coli</i> E24377A CP000795.1*	<i>Escherichia coli</i> . M29255.1 ECOTOXHS*
<b>Cepa Secuenciada</b>					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 109C2 (ST)	100%	100%	100%	92%	92%

\*Referencia del banco de genes.



**Figura 7.** Ensayo de sensibilidad para *Shigella* spp. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5X, teñido con bromuro de etidio. Carril 1) Marcador de Peso Molecular 100 pb, 2) 1 ng DNA, 3) 100 pg de DNA, 4) 10 pg DNA, 5) 1 pg de DNA, 6) 100 fg de DNA, 7) 10 fg de DNA, 8) 1 fg de DNA.



**Figura 8.** Ensayo de especificidad para *Campylobacter* spp. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5X, teñido con bromuro de etidio. Carril 1) Marcador de Peso Molecular 100 pb, 2) *Campylobacter coli* ATCC 2232, 3) *Campylobacter jejuni* ATCC 3329, 4) *Helicobacter pylori* ATCC 700824, 5) *Helicobacter pylori* ATCC 700392, 6) *Salmonella* Cholerae-suis, 7) *Salmonella* Typhimurium ATCC1331, 8) *Salmonella* Typhi ATCC 13018, 9) *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, 10) *Salmonella* Enteritidis, 11) *Enterobacter cloacae* ATCC 13047, 12) *Escherichia coli* ATCC 10536, 13) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13098, 14) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, 15) *Vibrio cholerae* CDC Vc12, 16) *Enterobacter aerogenes* ATCC 35029, 17) *Proteus vulgaris* ATCC 13315, 18) *Shigella flexneri* ATCC 12022, 19) *Shigella boydii*, 20) *Escherichia coli* K12.

## ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA PARA USO Y CONSUMO HUMANO.

En el presente estudio se analizaron 58 muestras de agua (3 muestras de toma domiciliaria, 17 de pozos o subterránea, 19 de planta de tratamiento y 19 de agua de riego). A las muestras se les extrajo el DNA, el cual se amplificó por PCR e hibridaron para cada uno de los microorganismos en estudio, por ejemplo el gen *eltB* de *Escherichia coli* Enterotoxigénica (Figura 9). En todos y cada uno de los ensayos tanto de amplificación como de hibridación se incluyeron: un control positivo y un control negativo.

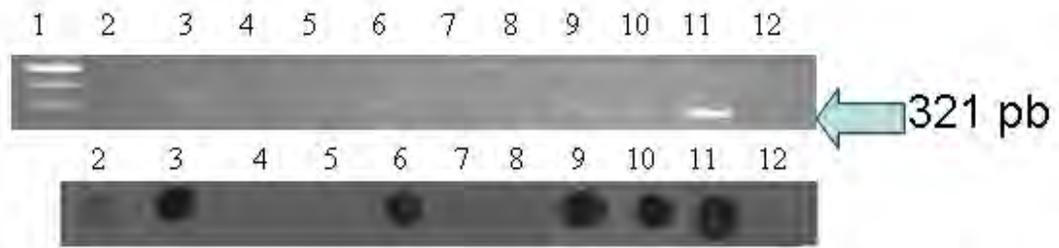
En la tabla 8 y figura 12, se muestran los resultados de las muestras de agua analizadas, para cada uno de los microorganismos estudiados. La amplificación por PCR con los iniciadores universales para el gen *16S DNAr*, mostró que el 60% de las muestras de agua fueron positivas, sin embargo, ninguna fue positiva a la hibridación de la sonda, indicando la ausencia de *Campylobacter* spp., en las muestras de agua estudiadas. Así mismo, ninguna de las 58 muestras de agua se detectó la presencia del gen *invA/invE* de *Salmonella* spp. (PCR e hibridación negativas), ver tabla 5.

El 26% de las muestras de agua fueron positivas a la presencia del gen *ipaH*, indicando la presencia de *Shigella* spp. (Tabla 5). Detectándose la presencia de *Shigella* spp. en el 5.9% de las aguas subterráneas, específicamente las muestras provenientes del pozo vivero alto, el 10% en aguas residuales (afluente de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella y CU), 71.4% en el efluente de la planta

de tratamiento de Ciudad Universitaria y en el 42.1% en el agua de riego (Figura 10).

Con respecto a la presencia de *Escherichia coli* Enterotoxigénica, se encontró que la hibridación mostró un mayor número de muestras positivas que la amplificación por PCR (Figura 11). Considerando el resultado de la hibridación para determinar la presencia del microorganismo en las muestras de agua, se encontró que el 77.6% de todas las muestras fueron positivas a la detección del gen que codifica para la toxina termoestable (ST) y 43.1% para la toxina termolábil (LT), además se observa que casi todas las muestras de agua presentaron la amplificación del gen que codifica para alguna o ambas toxinas (Tabla 6). Cuando se analizó la presencia de LT, se encontró que el 33.3% de las muestras de agua de toma domiciliaria son positivas a la detección de LT, el 5.9% de aguas subterráneas, el 60% de las muestras del agua residual, el 55.6% del agua de reuso y el 63.2% la de riego, en el caso de ST, se encontró: 100% para agua de toma domiciliaria, 52.9% en agua subterránea, 80% en agua residual, 88.9% en agua de reuso y del 89.5% en las muestras de agua para riego (Tabla 5 y Figura 9). En adición, se observó que ninguna de las muestras fue positiva a LT de forma individual (Tabla 6 y Figura 13).

Las muestras de agua que resultaron negativas a la amplificación de cualquiera de los ensayos, se confirmaron mediante un control positivo de amplificación por PCR (Figura 14), para descartar la presencia de inhibidores en las muestras de agua.



**Figura 9.** Electroforesis de los productos amplificados gen *eltB* de ETEC e hibridación de las diferentes muestras de agua. 1) Marcador de peso molecular 100 pb, 2) Aspersores bigotes, 3) Aspersores rectoría, 4) Pozo multifamiliar, 5) Pozo química, 6) Aspersores pumitas, 7) Pozo vivero alto, 8) Planta de tratamiento de aguas residuales CU afluente, 9) Planta de tratamiento de aguas residuales CU efluente, 10) Aspersores rectoría, 11) Control Positivo, 12) Control negativo.

**Tabla 5.** Resultados de la detección de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

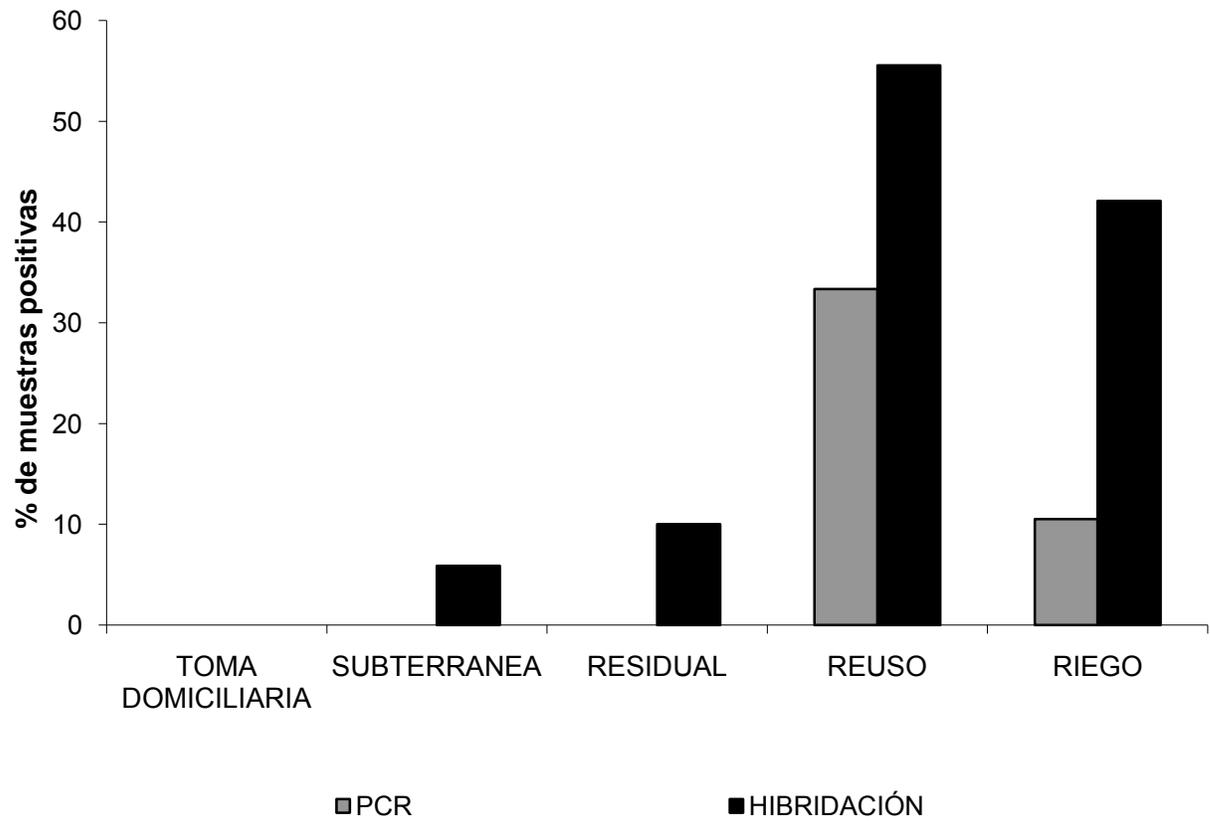
Tipo de agua	Sitio de muestreo	<i>Campylobacter</i> spp. <sup>a</sup>		<i>Salmonella</i> spp. <sup>b</sup>		<i>Shigella</i> spp. <sup>c</sup>		<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica			
		PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	LT <sup>d</sup>		ST <sup>e</sup>	
								PCR	Hibridación	PCR	Hibridación
<b>TOMA DOMICILIARIA</b>	ZR (n=3)	1 (33.3)	0	0	0	0	0	0	1(33.3)	2 (66.7)	3(100)
<b>SUBTERRANEA</b>	MF (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (25)	1 (25)
	FQ (n=4)	2 (50)	0	0	0	0	0	0	0	2 (50)	3 (75)
	VA (n=6)	4 (66.7)	0	0	0	0	1(16.7)	0	0	0	2 (33.3)
	ZR (n=3)	0	0	0	0	0	0	0	1 (33.3)	2 (66.7)	3 (100)
	<b>Subtotal (n =17)</b>	<b>6 (35.3)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1 (5.9)</b>	<b>0</b>	<b>1 (5.9)</b>	<b>5 (29.4)</b>	<b>9 (52.9)</b>
<b>RESIDUAL</b>	CU Afluyente (n=7)	4 (57.1)	0	0	0	0	0	0	4 (57.1)	3 (42.9)	5 (71.4)
	CE Afluyente (n=3)	3 (100)	0	0	0	0	1 (33.3)	0	2 (66.7)	3 (100)	3(100)
	<b>Subtotal Afluyente (n=10)</b>	<b>7 (70)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1 (10)</b>	<b>0</b>	<b>6 (60)</b>	<b>6 (60)</b>	<b>8 (80)</b>

Tabla 5. Contin....

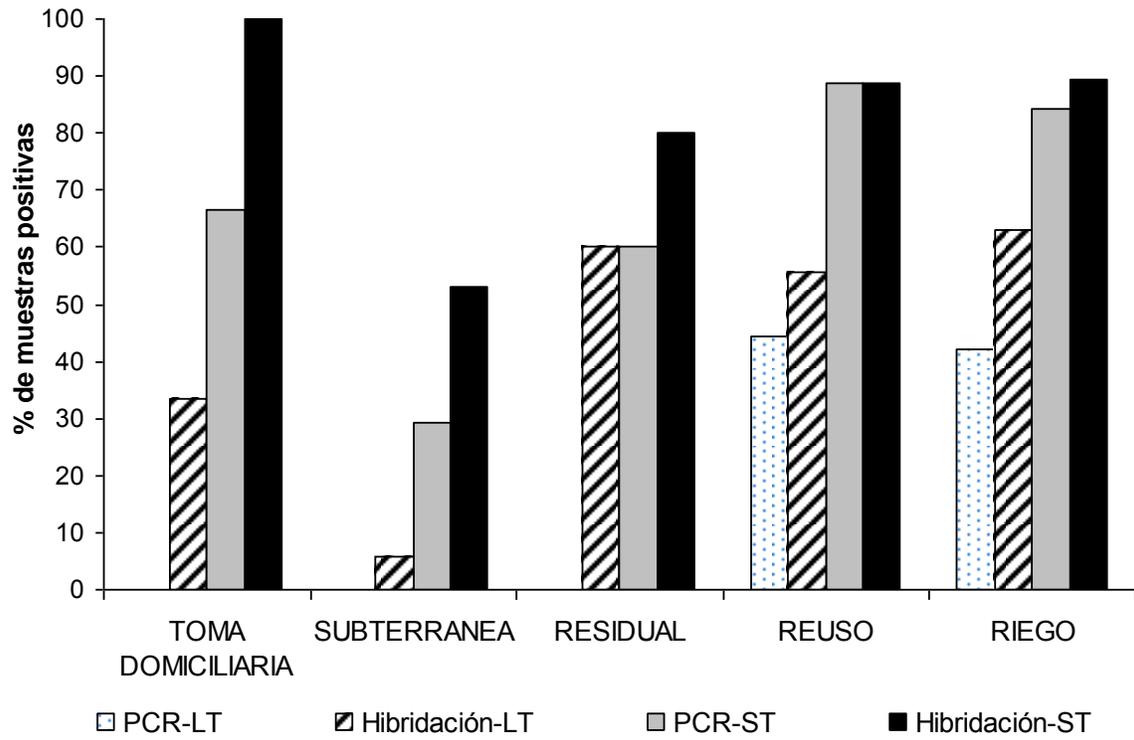
Tipo de agua	Sitio de muestreo	<i>Campylobacter</i> spp. <sup>a</sup>		<i>Salmonella</i> spp. <sup>b</sup>		<i>Shigella</i> spp. <sup>c</sup>		<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica			
		PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	PCR	Hibridación	LT <sup>d</sup>		ST <sup>e</sup>	
								PCR	Hibridación	PCR	Hibridación
REUSO	CU Efluente (n=7)	6 (85.7)	0	0	0	3 (42.9)	5 (71.4)	4 (57.1)	5 (71.4)	7 (100)	7(100)
	CE Efluente (n=2)	2 (100)	0	0	0	0	0	0	0	1(50)	1 (50)
	<b>Subtotal Efluente (n=9)</b>	<b>8 (88.9)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3 (33.3)</b>	<b>5 (55.6)</b>	<b>4 (44.4)</b>	<b>5 (55.6)</b>	<b>8 (88.9)</b>	<b>8 (88.9)</b>
RIEGO	AB (n=5)	4 (80)	0	0	0	0	1 (20)	2 (40)	3 (60)	3 (60)	4 (80)
	AP (n=5)	5 (100)	0	0	0	1 (20)	3 (60)	3 (60)	4 (80)	5 (100)	5 (100)
	AR (n=5)	4 (80)	0	0	0	1 (20)	4 (80)	3 (60)	4 (80)	5 (100)	5 (100)
	XO (n=4)	3 (75)	0	0	0	0	0	0	1(25)	3 (75)	3 (75)
	<b>Subtotal (n=19)</b>	<b>16 (84.2)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2 (10.5)</b>	<b>8 (42.1)</b>	<b>8(42.1)</b>	<b>12(63.2)</b>	<b>16(84.2)</b>	<b>17(89.5)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>N=58</b>	<b>38 (65.5)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5 (8.6)</b>	<b>15 (25.9)</b>	<b>12 (20.7)</b>	<b>25 (43.1)</b>	<b>37 (63.8)</b>	<b>45 (77.6)</b>

ZR = Toma domiciliaria de la Zona Sur DF; MF = Pozo multifamiliar; FQ = Pozo Facultad de Química; VA = Pozo Vivero Alto; CU = Ciudad universitaria; CE = Cerro de la Estrella; AB = Aspersores bigotes; AP = Aspersores pumitas; AR =Aspersores Rectoría; XO = Xochimilco

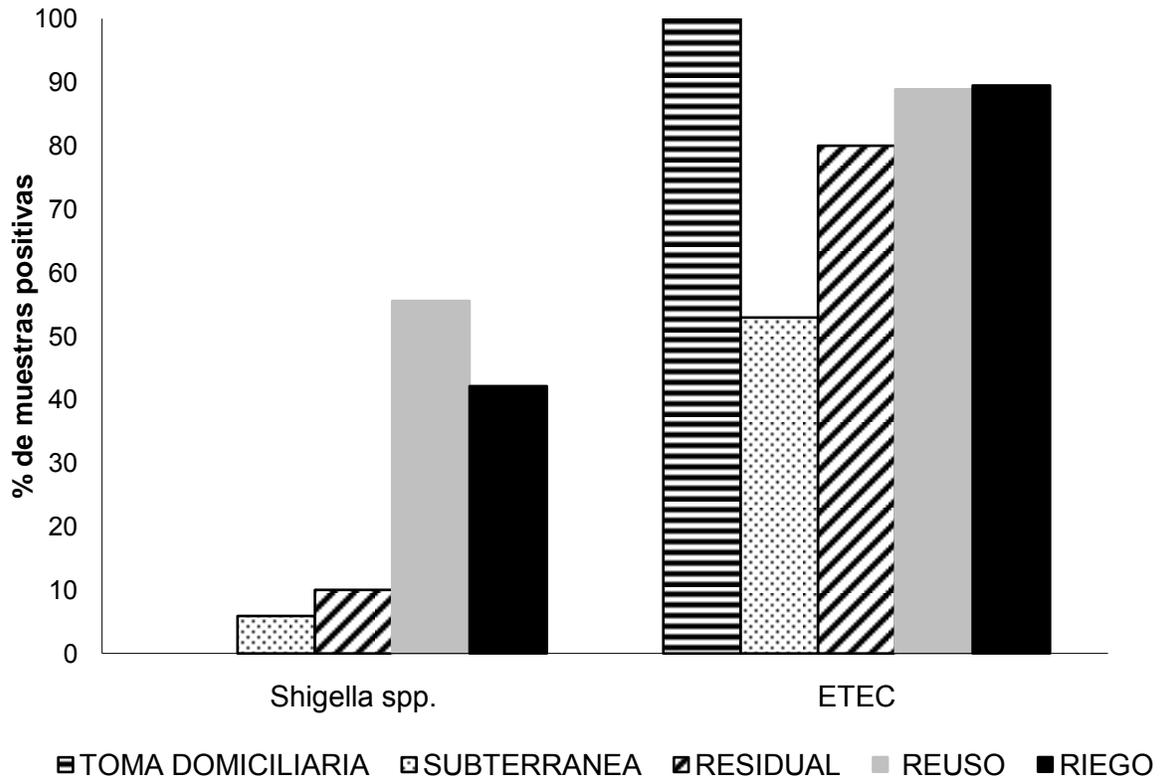
Casos positivos/porcentaje; n = número de muestras. <sup>a</sup> Gen *16S rDNA*, <sup>b</sup>Gen *invA/invE*, <sup>c</sup>Gen *ipaH*, <sup>d</sup>Gen *eltB*, <sup>e</sup> Gen *estA*.



**Figura 10.** Detección de *Shigella* spp. en agua por PCR e hibridación.



**Figura 11.** Detección de *Escherichia coli* Enterotoxigénica, por PCR e hibridación en agua.

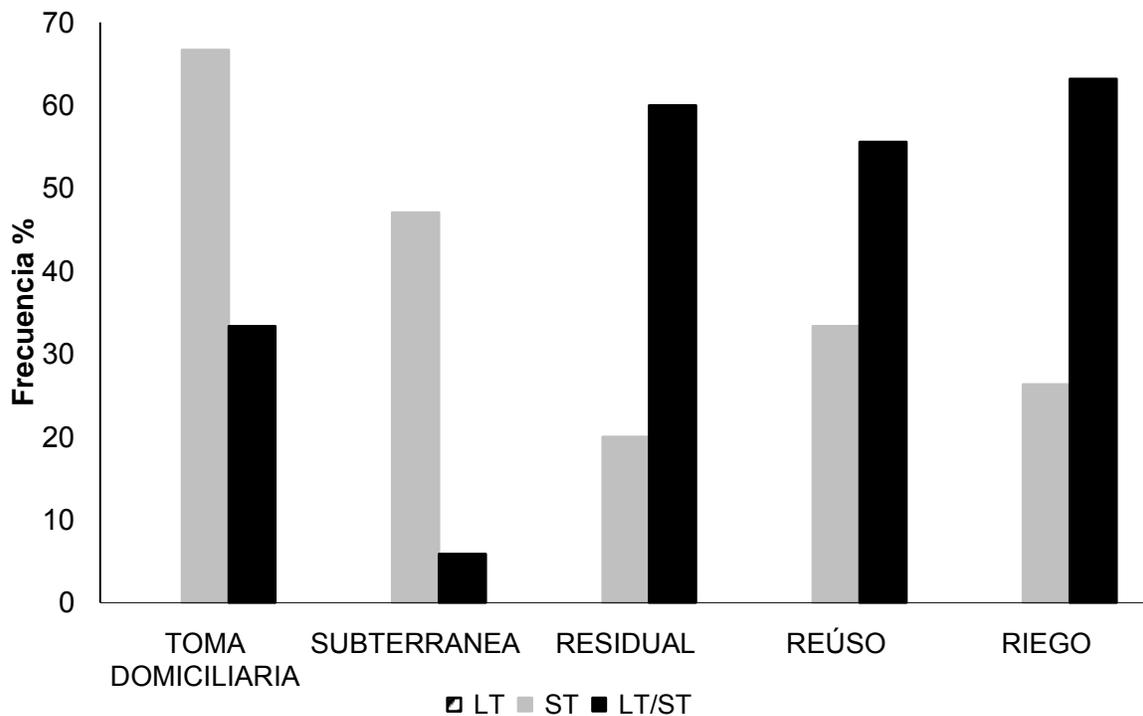


**Figura 12.** Presencia de microorganismos patógenos en diferentes tipos de agua.

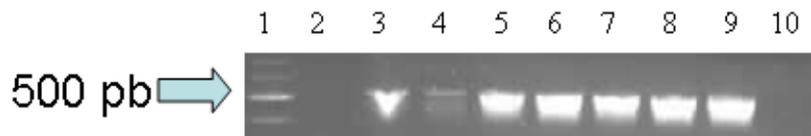
**Tabla 6.** Presencia de toxina termolábil (LT) y/o termoestable (ST) de *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC).

Tipo de agua	No. de muestras	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica		
		LT*	ST*	LT y ST*
POTABLE	3	0	2 (66.7)	1 (33.3)
SUBTERRANEA	17	0	8 (47.1)	1 (5.9)
RESIDUAL	10	0	2 (20)	6 (60)
REUSO	9	0	3 (33.3)	5 (55.6)
RIEGO	19	0	5 (26.3)	12 (63.2)

\*Casos positivos/porcentaje



**Figura 13.** Frecuencia de la toxina termolábil (LT) y termoestable (ST) de ETEC en los diferentes tipos de agua.



**Figura 14.** Electroforesis de los productos amplificados utilizando como iniciadores y DNA de lambda. Agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. 1) Marcador de peso molecular 100 pb, 2) Agua de riego de Xochimilco, 3) Pozo vivero alto, 4) Planta de tratamiento de aguas residuales CU afluyente, 5) Pozo multifamiliar, 6) Pozo vivero alto, 7) Pozo multifamiliar, 8) Control positivo + agua para PCR, 9) Control Positivo, 10) Control negativo.

Por otro lado, el grupo de la Dra. Marisa Mazari del instituto de ecología de la UNAM, realizó el análisis de las mismas muestras de agua en CU, en las cuales determinó la presencia de coliformes fecales. Los resultados mostraron que el agua del pozo multifamiliar, de Facultad de Química y del efluente de la planta de tratamiento no había la presencia de coliformes fecales mientras que nosotros detectamos a ETEC en el 25%, 75% y 100%, respectivamente. En el caso del agua de pozo de vivero alto los porcentajes de detección tanto de ETEC, como de coliformes fecales son los mismos (33.3%). Con respecto al afluente de la planta de tratamiento y agua de riego, se detectó a ETEC en el 71.4 y 93.3% de las muestras, en comparación del 100 y 55.5% para coliformes fecales, respectivamente. Estas diferencias pueden ser debido a que se procesó mayor volumen de muestra (centrifugación) y a la sensibilidad del método de detección (PCR-Hibridación).

## DISCUSIÓN

Las infecciones gastrointestinales son una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, en particular en los países en desarrollo. El cultivo microbiológico continúa siendo el método estándar para la detección de microorganismos enteropatógenos de origen bacteriano en los laboratorios clínicos, sanitarios y en microbiología ambiental; sin embargo, presenta la desventaja de requerir mucho tiempo para obtener un resultado positivo o negativo, otra desventaja es la aparición en algunos casos de microorganismos viables pero no cultivables (VBNC). Los métodos moleculares presentan ventajas importantes, tales como: reducción en el tiempo de detección y como herramienta epidemiológicas, lo que nos permite establecer intervenciones tempranas para su control (32). Adicional a esto, habrá que destacar que el uso de métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es más sensible que los métodos convencionales para la detección de *Campylobacter jejuni*, principalmente cuando esta en la forma viable pero no cultivable (31).

En nuestro estudio, realizamos la estandarización de los ensayos mediante el empleo de cepas tipo de los microorganismos de interés y de microorganismos cercana y no cercanamente relacionados de manera genética. Esto debido a que se ha mencionado que existen algunos ensayos de amplificación por PCR, en los cuales existe la detección de falsos positivos (32). En nuestros diferentes ensayos de especificidad realizados, encontramos que los iniciadores para la detección de *Campylobacter* spp., presentaron amplificación de todos los DNA utilizados,

excepto el control de reactivos sin DNA, esto es debido a que los iniciadores son universales para el gen *16S rRNA*, el cual está presente en las familias *Enterobacteriaceae*, *Campylobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, sin embargo, la sonda utilizada en los ensayos de hibridación (35), es específica para el reconocimiento del género *Campylobacter*. Además los productos de PCR derivados de los iniciadores de gen *16S rRNA* independientemente de la hibridación nos indican que en esas muestras hay DNA bacteriano.

Con respecto a los iniciadores para la detección del gen *invA/invE* de *Salmonella* spp., del gen *ipaH* de *Shigella* spp. y los iniciadores los genes *eltB* y *estA* para ETEC dan productos de PCR que son específicos para cada género y esto se corroboró con la hibridación, en todos los casos el uso de un control de reactivos que resultó negativo al PCR e hibridación nos permite confirmar nuestro resultados. El uso de la PCR en el diagnóstico de rutina ha ganado atención para la detección rápida de organismos infecciosos, tanto para la detección de microorganismos patógenos de muestras clínicas, alimenticias y ambientales debido a la especificidad mostrada (43).

La sensibilidad varía para cada especie debido a que el tamaño del genoma de cada especie es diferente, considerando que de cada bacteria tiene un tamaño de genoma diferente por lo que el número de genomas es el equivalente al número de bacterias. En el caso de ETEC a pesar de que los genes de LT y ST se encuentran en plásmido se determina el número de genomas, y esto es solo una aproximación, además se sabe que el número de plásmidos es diferente incluso para cada bacteria. Estas aproximaciones nos llevan a decir que los resultados de

la detección por PCR e hibridación tienen una alta sensibilidad, ya que para el caso de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica el número de genomas que se detecta en cantidades menores a la dosis infectiva, es decir el número de bacterias requeridas para la amplificación son cantidades inferiores a las que necesita ingerir un sujeto sano para presentar la enfermedad. En el caso de *Shigella* spp., el límite de la detección es cercano a la dosis infectiva, siendo el primero superior en aproximadamente 100 microorganismos.

En las muestras de agua se encontró principalmente los genes *eltB* y *estA* de *Escherichia coli* Enterotoxigénica, esto se debe a que el microorganismo tiene la capacidad de mantenerse en ambientes acuáticos por la formación de biopelículas y por la capacidad de cambiar de una fase latente a una fase llamada viable pero no cultivable (28). La alta prevalencia de *Escherichia coli* Enterotoxigénica es consistente con el hecho de que en México la mayor parte de los episodios de diarrea asociados a los patotipos de *E. coli* son principalmente causados por este, siendo las cepas acarreadoras de la toxina termolábil (LT) más frecuentemente asociadas a episodios de diarrea que las cepas portadoras de ST (16), lo que nos haría pensar que existen portadores de *Escherichia coli* Enterotoxigénica. Al igual que un estudio realizado en aguas superficiales en Bangladesh ST es la toxina que se detectó con mayor frecuencia en comparación con LT (5).

Trabajos previos reportaron la presencia de *Shigella* en aguas superficiales y en muestras de aguas negras lo que indica que las cepas de *Shigella* se transportan en aguas superficiales. Por otra parte, un estudio realizado por

Sharma y colaboradores sugiere que la presencia de cepas de *Shigella* es debida a la sobrevivencia y persistencia en ambientes acuáticos y no a la contaminación fecal reciente (38). La localización de genes multicopia como el gen *ipaH* es 100% específico para determinar la presencia de *Shigella* y su presencia en las muestras implica que el agua es un reservorio para estos microorganismos y son responsable de su transmisión a humanos (38). En otro estudio realizado se encontró que existen portadores sanos de *Shigella* spp., los cuales a pesar de no presentar una enfermedad diarreica contienen el patógeno portador el gen *ipaH*, y esto aunado a que el humano es el único reservorio de este patógeno se sugiere una contaminación del agua por materia fecal de humanos que viven en países en desarrollo debido a las bajas condiciones de higiene lo que da como resultado la presencia de *Shigella* en el agua.

*Campylobacter* spp., es un microorganismo exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales por lo cual su crecimiento es limitado, esto nos podría explicar que esté ausente en las muestras de agua provenientes de pozos ya que en este tipo de agua el contenido de materia orgánica esta disminuido. Por otra parte, Hörman y colaboradores en 2003 (22), encontraron que las radiaciones solares disminuyen la persistencia de *Campylobacter*, esto nos hace postular que en el agua proveniente de las plantas de tratamiento, la de canales de Xochimilco, y la de riego donde el agua está más expuesta a la radiación solar la cantidad de campilobacterias esta reducida, es importante mencionar que la presencia o ausencia esta determinada en base a los valores de sensibilidad obtenidos por lo

que no se descarta la posibilidad de que *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., estén presentes, en número necesario para detectarlas por PCR e hibridación.

La ventaja de esta técnica molecular es que detecta el DNA de la bacteria tanto en su forma vegetativa, como en viable pero no cultivable; y la presencia de ETEC y *Shigella* spp., son un indicador de que el agua representa un riesgo para la salud.

## CONCLUSIONES

La PCR e hibridación es un método sensible y específico para determinar la presencia de los microorganismos en estudio.

La presencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica se determinó mediante la PCR e hibridación en diferentes tipos de agua.

En el agua de riego se detectó principalmente a *Shigella* spp. y *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

Los genes que codifican por la toxina termolábil (LT) y termoestable (ST) de *Escherichia coli* Enterotoxigénica fueron los más prevalentes en las muestras de agua.

No existió relación alguna entre los coliformes fecales con la presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica.

El uso y consumo de agua con *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica representa un riesgo para la salud.

## PERSPECTIVAS

Proponer la búsqueda de microorganismos patógenos en agua para uso y consumo humano como indicador de la calidad de agua.

Utilizar técnicas moleculares para tener un método de detección a nivel de género y especie (este último en el caso de ETEC) de manera rápida y con una alta sensibilidad.

Aplicar la PCR e Hibridación para la detección de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., y *Escherichia coli* Enterotoxigénica en muestras clínicas.

## REFERENCIAS

1. **Albert, M. J., A. S. Faruque, S. M. Faruque, R. B. Sack, and D. Mahalanabis.** 1999. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* **37**:3458-64.
2. **Altekruse, S. F., N. J. Stern, P. I. Fields, and D. L. Swerdlow.** 1999. *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* **5**:28-35.
3. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-10.
4. **Ashbolt, N. J.** 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* **198**:229-38.
5. **Begum, Y. A., K. A. Talukder, G. B. Nair, F. Qadri, R. B. Sack, and A. M. Svennerholm.** 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water in urban and rural areas of Bangladesh. *J Clin Microbiol* **43**:3582-3.
6. **Blom, K., C. M. Patton, M. A. Nicholson, and B. Swaminathan.** 1995. Identification of *Campylobacter fetus* by PCR-DNA probe method. *J Clin Microbiol* **33**:1360-2.
7. **Boyd, E. F., J. Li, H. Ochman, and R. K. Selander.** 1997. Comparative genetics of the inv-spa invasion gene complex of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **179**:1985-91.

8. **Cabrera C. César, L. P. A. a. Puricaza F. Rosa, and C. Juan.** 2005. Sepsis por *Shigella flexneri*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública **22**:145-1477.
9. **Calva, E.** 2009. Microbios. In UNAM. (ed.), *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública.
10. **Colmenero Hernandez, A., A. Vila Calvo, E. Salcedo Lobato, F. Fernandez Jimenez, M. Sanchez Concheiro, and J. T. Ramos Amador.** 2008. [*Shigella* spp. infections in Getafe Hospital between 2001 and 2006]. An Pediatr (Barc) **68**:605-8.
11. **Darby, J., and H. Sheorey.** 2008. Searching for *Salmonella*. Aust Fam Physician **37**:806-10.
12. **Debruyne, L., S. L. On, E. De Brandt, and P. Vandamme.** 2009. Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov. Int J Syst Evol Microbiol **59**:1126-32.
13. **Debruyne, L., E. Samyn, E. De Brandt, O. Vandenberg, M. Heyndrickx, and P. Vandamme.** 2008. Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Res Microbiol **159**:88-93.
14. **Dirección General de Epidemiología (DGEPI).** 2008. Información epidemiológica, Boletín de epidemiología, 2008 ed. Secretaría de salud.

15. **Donnenberg, M. S.** 2000. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* **406**:768-74.
16. **Estrada-Garcia, T., C. Lopez-Saucedo, R. Thompson-Bonilla, M. Abonce, D. Lopez-Hernandez, J. I. Santos, J. L. Rosado, H. L. DuPont, and K. Z. Long.** 2009. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic E. coli with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* **47**:93-8.
17. **Eswarappa, S. M., J. Janice, A. G. Nagarajan, S. V. Balasundaram, G. Karnam, N. M. Dixit, and D. Chakravortty.** 2008. Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*. *PLoS One* **3**:e3829.
18. **Eyigor, A., K. A. Dawson, B. E. Langlois, and C. L. Pickett.** 1999. Cytolethal distending toxin genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates: detection and analysis by PCR. *J Clin Microbiol* **37**:1646-50.
19. **Food and Drug Administración (FDA).** 2009. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Enterotoxigenic *Escherichia coli*.
20. **Figueroa Ochoa, I. M., and A. Verdugo Rodriguez.** 2005. [Molecular mechanism for pathogenicity of *Salmonella* sp]. *Rev Latinoam Microbiol* **47**:25-42.

21. **Frankel, G., L. Riley, J. A. Giron, J. Valmassoi, A. Friedmann, N. Strockbine, S. Falkow, and G. K. Schoolnik.** 1990. Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. *J Infect Dis* **161**:1252-6.
22. **Hörman, A., R. Rimhanen-Finne, L. Maunula, C. H. von Bonsdorff, N. Torvela, A. Heikinheimo, and M. L. Hanninen.** 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.
23. **Hughes, L. A., M. Bennett, P. Coffey, J. Elliott, T. R. Jones, R. C. Jones, A. Lahuerta-Marin, A. H. Leatherbarrow, K. McNiffe, D. Norman, N. J. Williams, and J. Chantrey.** 2009. Molecular epidemiology and characterization of *Campylobacter* spp. isolated from wild bird populations in northern England. *Appl Environ Microbiol* **75**:3007-15.
24. **Jennison, A. V., and N. K. Verma.** 2004. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev* **28**:43-58.
25. **Jin, L. Q., J. W. Li, S. Q. Wang, F. H. Chao, X. W. Wang, and Z. Q. Yuan.** 2005. Detection and identification of intestinal pathogenic bacteria by hybridization to oligonucleotide microarrays. *World J Gastroenterol* **11**:7615-9.
26. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-40.
27. **Kothary, M. H., and U. S. Babu.** 2001. Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: A review. *J of Food Safety* **21**:49-68.

28. **Lothigius, A., A. Janzon, Y. Begum, A. Sjoling, F. Qadri, A. M. Svennerholm, and I. Bolin.** 2008. Enterotoxigenic *Escherichia coli* is detectable in water samples from an endemic area by real-time PCR. *J Appl Microbiol* **104**:1128-36.
29. **Mazari Hiriart Marisa, Jiménez Cisneros B. E., and y. López Vidal Y.** 2005. *El agua y su impacto en la salud pública*, 1 ed, Distrito Federal. pp 69
30. **Nguyen, T. V., P. Le Van, C. Le Huy, K. N. Gia, and A. Weintraub.** 2005. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol* **43**:755-60.
31. **Nogva, H. K., A. Bergh, A. Holck, and K. Rudi.** 2000. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol* **66**:4029-36.
32. **O'Leary, J., D. Corcoran, and B. Lucey.** 2009. Comparison of the EntericBio(R) multiplex PCR system with routine culture for the detection of bacterial enteric pathogens. *J Clin Microbiol*.
33. **Ohl, M. E., and S. I. Miller.** 2001. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* **52**:259-74.
34. **Procter & Gamble, H. S. I.** Procedimiento Standard para la utilización de PUR Purificador de Agua de Procter & Gamble para casos de ayuda de emergencia.
35. **Pacheco-Tena, C., C. Alvarado De La Barrera, Y. Lopez-Vidal, J. Vazquez-Mellado, Y. Richaud-Patin, R. I. Amieva, L. Llorente, A.**

- Martinez, J. Zuniga, M. Cifuentes-Alvarado, and R. Burgos-Vargas.** 2001. Bacterial DNA in synovial fluid cells of patients with juvenile onset spondyloarthropathies. *Rheumatology (Oxford)* **40**:920-7.
36. **Parsot, C.** 2005. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett* **252**:11-8.
37. **Phantouamath, B., N. Sithivong, S. Insisiengmay, Y. Ichinose, N. Higa, T. Song, and M. Iwanaga.** 2005. Pathogenicity of *Shigella* in healthy carriers: a study in Vientiane, Lao People's Democratic Republic. *Jpn J Infect Dis* **58**:232-4.
38. **Sharma, A., S. K. Singh, and D. Bajpai.** 2009. Phenotypic and genotypic characterization of *Shigella* spp. with reference to its virulence genes and antibiogram analysis from river Narmada. *Microbiol Res.*
39. **Sjoling, A., G. Wiklund, S. J. Savarino, D. I. Cohen, and A. M. Svennerholm.** 2007. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *J Clin Microbiol* **45**:3295-301.
40. **Secretaría de Salud.** 1997. NOM-001-ECOL-1996 Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de agua residuales en aguas y Bienes Nacionales.
41. **Secretaría de Salud.** 1996. NOM-003-ECOL-1996 Establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público.

42. **Secretaría de Salud.** 2000. Norma Oficial Mexicana 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, p. 21.
43. **Stone, G. G., R. D. Oberst, M. P. Hays, S. McVey, and M. M. Chengappa.** 1995. Combined PCR-oligonucleotide ligation assay for rapid detection of *Salmonella* serovars. J Clin Microbiol **33**:2888-93.
44. **Su, L. H., and C. H. Chiu.** 2007. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med J **30**:210-9.
45. **Talukder, K. A., B. K. Khajanchi, M. A. Islam, D. K. Dutta, Z. Islam, S. I. Khan, G. B. Nair, and D. A. Sack.** 2006. The emerging strains of *Shigella dysenteriae* type 2 in Bangladesh are clonal. Epidemiol Infect **134**:1249-56.
46. **Vargas, M., J. Gascon, M. T. Jimenez De Anta, and J. Vila.** 1999. Prevalence of *Shigella* enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. J Clin Microbiol **37**:3608-11.
47. **Wenzel, R., Bearman, G., Brewer, T., y Butzeler, J-P (ed.).** 2008. A guide to Infection Control in the Hospital, Fourth ed, Brookline, USA.
48. **World Health Organization.** 2006. Mortality country fact Sheet. [www.who.int](http://www.who.int)
49. **World Health Organization.** 2008. Water-related diseases. [www.who.int](http://www.who.int)
50. **Young, K. T., L. M. Davis, and V. J. Dirita.** 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. Nat Rev Microbiol **5**:665-79.