



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"IZTACALA"

UTILIZACION DE *Escherichia coli* y *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGENICA (ETEC) COMO INDICADORES
DE CONTAMINACION FECAL Y DE UN PATOGENO
HUMANO RESPECTIVAMENTE EN ALIMENTOS DE
VENTA CALLEJERA

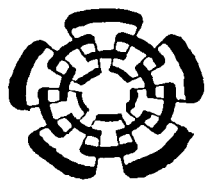
TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A :

MARIA DEL ROCIO THOMPSON BONILLA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA TERESA ESTRADA GARCIA



MEXICO, D.F.

DICIEMBRE DE 2007

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

A mis padres;

Por haberme dado la vida, por haberme dado los elementos para ser lo que soy, y por su constante esfuerzo para nuestra superación.

A mis hermanos;

Todos por haber crecido conmigo y por haber superado lo que hubo que superar.

A mis suegros;

Por su apoyo.

A mis cuñados;

Por ser quienes son.

A Elsa;

Por tú gran colaboración para con el cuidado de mis hijas.

A mis amigos:

A quienes no enumero por error a equivocarme, pero porque han sido y han estado conmigo. GRACIAS MIL.

A mí familia:

Gracias por comprenderme y apoyarme. LOS AMO.

A Nicolás por apoyarme, por estar conmigo y por caminar codo a codo junto a mí

A RUTH;

Por vivir junto a mí y por ser tan linda y madura como ha sido.

GRACIAS, estoy orgullosa de ti.

A ALBA;

Por todo tu amor y cariño para mí. GRACIAS.

A la Dra. Ma. Teresa Estrada García:

Por su confianza en mí persona, por haberme escuchado y por haberme guiado en tantas cosas. GRACIAS.

A la Química Catalina López:

¡Uf! Por tanto, tanto apoyo y colaboración. Por sus palabras que aunque son pocas son de gran valía.

Al equipo de laboratorio:

Bety, Benito, Jorge, Alejandra y Adriana. Gracias, por ser excelentes compañeros.

A alguien especial, muy especial:

GRACIAS Josefina, lo logre, rompí el paradigma.

A los profesores;

Que formaron parte de mi preparación profesional.

A los maestros;

Qué fueron asignados para la revisión de este trabajo y que colaboraron con el entusiasmo que les caracteriza. GRACIAS.

A las instituciones que me han formado y a mí País, mil gracias.

Y porqué un día entendí que:

Todo dependía de mí.

Que era yo quién debía decidir

Si actuaba o no,

Si seguía adelante

O si volvía atrás

Si decidía caminar valerosamente

Hacia metas lejanas

O sí me conformaba

Con permanecer donde estaba

Porqué todo eso

Dependía sólo de mí.

Gracias a la vida....

INDICE.

Tema	pág.
Resumen	1,2
1. Introducción	
Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)	3
Alimentos de venta callejera	3-5
Alimentos y enfermedades gastrointestinales	5
<i>Escherichia coli</i> y enfermedades gastrointestinales	5,6
ETEC y ETAs	6,7
2. Antecedentes.	
2.1 Generalidades	7
Enterobacterias	7
<i>Escherichia coli</i>	7,8
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	8,9
Características de las toxinas	9,10
Enfermedades diarreicas	10,11
Morbo-mortalidad por diarreas	11,12
Contaminación de alimentos	12
2.2 Antecedentes Históricos	13-15
<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	15-17
2.3 Antecedentes técnicos	17-18
Justificación	19
Objetivos	
Generales	20
Particulares	20
Hipótesis	21
Metodología	
Descripción del área de estudio	22
Mapa de localización de puestos (fig. 1)	23
Trabajo de campo	24
Parámetros ambientales	24
Tipo de muestras colectadas	24
Recolección de muestras	24
Recipientes de recolección	25
Dinámica de muestreo	25
Estudio observacional	25
Condiciones de traslado	26
Procesamiento de las muestras	26
Análisis microbiológico	26,27
Esquema general de trabajo	28
Fundamentos técnicos	
Hibridización de colonias en fase sólida	28
Protocolo	29-31
Reacción en cadena de la polimerasa " PCR "	32,33

Protocolo	29-31
Esquema de trabajo para " PCR "	34
Prueba estadística χ^2	35
Resultados	
1. Muestreos	36-38
2. Alimentos colectados durante los muestreos	
Tabla 2	38
3. Muestras colectadas contaminadas con cepas parecidas a <i>Escherichia coli</i> y no contaminadas.	
Tabla 3	39
4. Muestras contaminadas fecalmente	39
Tabla 4	39
Tabla 5	40
Tabla 6	40
Tabla 7	40
Tabla 8	40
Tabla 9	41
Tabla 10	41
Tabla 11	41
B. Contaminación fecal de alimentos con <i>Escherichia coli</i> en UFC/g por grupo de alimento.	
Tabla 12	42
Tabla 13	42
Tabla 14	43
C. Prueba del indol.	
Tabla 15	43
5. Comparación de cepas ETEC, positivas por los métodos de hibridación en fase sólida y " PCR ".	
Tabla 16	44
Tabla 17	44
6. Comparación entre las técnicas utilizadas	45
Foto 1 gel	46
Foto 2 membrana	47
Resultados estadísticos	48
Datos epidemiológicos	48,49
Discusión de resultados	50-55
Conclusiones	56,57
Bibliografía	58-64
Anexo I	
Anexo II	

RESUMEN.

Aunque desde finales del siglo XIX, se sabe que los alimentos pueden ser vehículos de enfermedad, los estudios a este respecto en los países en vías de desarrollo son muy escasos y más aún si estos son de alimentos vendidos en la vía pública. Aunque existen pocos reportes, estos han mostrado que las condiciones de almacenamiento, de manipulación, y venta de alimentos vendidos en la vía pública no son adecuadas, lo que puede resultar en su contaminación física, química y microbiológica. El presente estudio consistió en determinar en alimentos vendidos en vía pública la prevalencia de *Escherichia coli*, como indicador de contaminación fecal y de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), como indicador de un patógeno humano, debido a su gran importancia en salud pública. La determinación de ETEC se realizó a través de la utilización y comparación de dos técnicas de biología molecular; la hibridación en fase sólida y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con el fin de determinar cual era más sensible y más rápida. Además también se realizó un estudio observacional para determinar las condiciones higiénicas de los puestos y de los manipuladores de alimentos. El área seleccionada fue la Basílica de Guadalupe, por el gran número de visitantes que recibe al año, el cual se estima en 8 millones anuales. Para cumplir con los objetivos propuestos se realizaron 8 muestreos, 1 por semana, durante el verano y el inicio del otoño de 1999, se tomaron los datos ambientales, y se registraron los datos epidemiológicos. Se colectaron 91 muestras, se les determino su pH y de estas 34 fueron positivas para *Escherichia coli*, (intervalo $2-4.8 \times 10^6$ UFC/g) y 3 de éstas fueron positivas para ETEC (intervalo $8 \times 10^2- 2.6 \times 10^4$ UFC/g.) La técnica de

"PCR" mostró ser más rápida y económica que la técnica de hibridación en fase sólida. Se encontró que las condiciones higiénicas en general tanto de los puestos como de los manipuladores eran inadecuadas, por ejemplo los alimentos están expuestos a las condiciones de la calle por lo menos 8 horas al día y si los consumidores ingieren en promedio de 2 a 5 tacos y agregan por taco de 4 -8 ml de salsa.

Todo esto deja en evidencia que los alimentos vendidos en vía pública representan un riesgo para la salud de los consumidores.

INTRODUCCIÓN

Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs)

Desde 1880, se observó que los alimentos podían estar contaminados por organismos patógenos humanos (Jay, 1991.) Las enfermedades cuyo vehículo de transmisión son los alimentos, reciben el nombre de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), se estima que existen al menos 400 ETAs distintas y en su conjunto representan uno de los mayores retos a los que se enfrenta la salud pública mundial, ya que no están limitadas a ninguna región del mundo, ni se circunscriben a países subdesarrollados o a los industrializados. En los países industrializados el impacto de las ETAs en la salud pública apenas se empieza a conocer, se estima que tan sólo en los Estados Unidos, las ETAs, causan anualmente 76 millones de casos, 323 mil hospitalizaciones y 5,200 muertes, teniendo un costo aproximado de 5 billones de dólares (Mead y col. 1999). Mientras que en los países en vías de desarrollo, no existen prácticamente datos estadísticos sobre las ETAs (OPS, 1996).

Alimentos de Venta Callejera

En los países en vías de desarrollo como México existe un factor agregado en relación con las ETAs, prácticamente inexistente en países industrializados, que es; la enorme industria de la venta callejera de alimentos. Desde el punto de vista socioeconómico, esta industria ha crecido desenfrenadamente en los últimos 20 años ya que provee empleo y sustento a personas de bajos y medianos recursos, así como alimentos baratos y accesibles para una gran parte de la población,

especialmente en los grandes centros urbanos. Podemos decir que uno de los factores más importantes para este crecimiento, ha sido la migración de las poblaciones rurales hacia los centros urbanos. Una vez establecidos en las ciudades, se enfrentan con una limitada oferta de trabajo, por lo que esta población se ve obligada a buscar otras alternativas, una de las cuales encuentran en el comercio informal, incluida la venta callejera de alimentos. El impacto socioeconómico de esta industria se vio claramente en un estudio realizado por FAO en los años 1970's, tal vez el único estudio de venta callejera a escala mundial. Los resultados de esta única encuesta aún son impresionantes: ya que tan sólo en Malasia la venta anual de alimentos de venta callejera generaba 2.2 billones de dólares anuales. En Singapur se compraba un millón de comidas de venta callejera por día y en Kuala Lumpur (Malasia) aproximadamente un cuarto del gasto familiar para comida se empleaba en la compra de alimentos de venta callejera (FAO,1979).

Debido a las características de la manipulación de los alimentos en la vía pública en locales improvisados, sin acceso a agua potable, refrigeración y servicios públicos en general, es claro que estas características incrementan el riesgo de contaminación de los alimentos de venta callejera tanto física, como química y microbiológica y por ende su consumo pone en riesgo la salud de los consumidores (OPS,1996; Morse, 1995). En otro estudio realizado por la PAHO a mediados de los noventas en varios países de América Latina incluyendo México, reveló que las prácticas y condiciones en que se lleva a cabo la manipulación de alimentos por los vendedores ambulantes facilita la proliferación de microorganismos de origen fecal, puesto que no cuentan con un sistema de

abastecimiento de agua potable, ni en cantidad suficiente para cubrir las necesidades diarias, además de la reutilización de ésta en el lavado de utensilios, de las manos y de la superficies de trabajo (OPS,1996). Además la deficiente calidad higiénica de las materias primas frecuentemente utilizadas en la preparación de estos alimentos y su inadecuada conservación (exposición al medio ambiente / temperatura de almacenamiento) aumentan aún más el riesgo de contraer enfermedades (Morse,1995). Es claro que debido a la magnitud, de la industria de venta callejera de alimentos, su impacto en la economía y en la salud pública, no debe, ni puede soslayarse.

Alimentos y Enfermedades Gastrointestinales

Varios microorganismos patógenos cuya transmisión es fecal-oral son responsables de diversas enfermedades entre ellas las gastrointestinales que están asociadas con pérdida de días de trabajo, mal nutrición, disminución de la capacidad de aprendizaje y en algunos casos pueden producir hasta la muerte. Los alimentos pueden ser vehículo de transmisión de agentes etiológicos que causan infecciones gastrointestinales. Entre ellos podemos citar: a *Escherichia coli* (Sharpe y col., 1979 y Mosupye y Holy,1999), *Salmonella sp.*, *Shigella* (Lampel y col., 1990) y *Vibrio cholerae O1* (Estrada García y Mintz 1996.)

***Escherichia coli* y Enfermedades Gastrointestinales**

Escherichia coli es el organismo anaerobio facultativo predominante de la flora del colon humano y de animales de sangre caliente, por ende es un excelente indicador de contaminación fecal. Coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes

sólo horas después de que han nacido. Sin embargo, varias cepas de *Escherichia coli* han desarrollado la capacidad de producir un amplio espectro de enfermedades en humanos, por ejemplo: a) infecciones de vías urinarias, b) sepsis / meningitis y c) enfermedades diarreicas. Con relación a estas últimas se han descrito al menos 5 grupos (Nataro y Keper, 1998), que se han clasificado con base a sus propiedades de virulencia, interacción con la mucosa intestinal y producción de toxinas; estas son *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) y las *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), que es el grupo en el que estamos interesados en el presente trabajo.

ETEC y ETAS

ETEC tiene una gran importancia en la salud pública mundial. Ya que es el agente etiológico más frecuente de la diarrea de origen bacteriano en infantes en países en vías de desarrollo, especialmente durante el período de destete. Así como también de los alimentos que se les dan a los infantes durante este período. (Black y col., 1982). ETEC también produce diarrea en adultos, siendo la causa principal de la llamada diarrea del viajero (Caeiro y col., 1999.) Se estima que mundialmente hay 650 millones de casos por ETEC y 800,000 muertes anuales. Además en un estudio realizado por Tjao y col. en 1980, encontraron que el riesgo de contraer diarrea del viajero, aumentaba considerablemente cuando los viajeros consumían alimentos de venta callejera en México. Sin embargo, para el caso de México

existe un sólo reporte en donde ETEC se aisló de alimentos comprados en un supermercado en Guadalajara, México. (Wood y col., 1983.)

2. ANTECEDENTES.

2.1 GENERALIDADES.

Enterobacterias.

Entre las bacterias que con mayor frecuencia causan gastroenteritis, se encuentran las integrantes de la familia Enterobacteraceae; que se definen como un conjunto de bacilos Gram negativos, heterogéneos en cuanto a su hábitat y a su capacidad patogénica, son móviles con flagelos peritricos o bien son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, son oxidasa negativa y poseen la capacidad de reducir los nitratos a nitritos. (Jawetz, 1992.) Crecen a temperaturas que van desde los -2°C y hasta aproximadamente 50°C , el crecimiento en los alimentos es pobre o muy lento a los 5°C . Con respecto al pH se ha señalado que estos organismos crecen en intervalos que van desde 4.4 a 9.0. La facilidad con la que crecen estos microorganismos los convierte en excelentes indicadores de la calidad higiénica. (Griffin y Stuart, 1941).

Escherichia coli.

Escherichia coli, es un bacilo móvil, Gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteraceae y a la tribu Escherichia. Crece en medios semiselectivos como agar MacConkey y agar Azul de Metileno Eosina (EMB), a 37°C , en condiciones aerobias; en cultivo, forma colonias circulares, convexas y lisas con bordes defini-

dos, colonias planas y no viscosas, de color fucsia en agar MacConkey, y produce hemólisis en gelosa sangre. *Escherichia coli* produce descarboxilasa de la lisina y fermentación de manitol, lo mismo que gas a partir de la glucosa, el 90% de las cepas de *Escherichia coli* son lactosa positiva y un 99% de las *Escherichia coli* dan positiva la prueba del indol, que es una prueba que permite la diferenciación a las *Escherichia coli* de otras Enterobacterias (Bettelheim,1994; Edwards y Ewin,1972). Este microorganismo crece a pH's que van de 4.4 a 9, pero con óptimos a pH's bajos.(Buttiaux y Mossel, 1961.)

Escherichia coli posee una estructura antigénica compleja, con antígenos somáticos O termoestables que constituyen la parte más externa de los lipopolisacáridos de la pared celular, son resistentes al calor y al alcohol, y estos antígenos se identifican por aglutinación con serotipos. También poseen antígenos K que son termolábil y son los responsables de la fijación de las bacterias a las células y finalmente los antígenos H, que se localizan sobre los flagelos; el calor y el alcohol los desnaturalizan fácilmente (Edwards y Ewin, 1972; Jawetz, 1992; Lior y col., 1996).

***Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

En casi todos los países en vías de desarrollo la presencia de ETEC es endémica. Diversas investigaciones epidemiológicas han implicado agua y comida contaminada como los vehículos más comunes de infección por ETEC. La enfermedad por ETEC, es causada por cepas no invasivas, se presenta de manera repentina, tiene períodos de incubación cortos de 14 a 50 h., la diarrea es acuosa, sin san-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

gre, ni fiebre, y el vómito se presenta en la minoría de los casos. (Black y col., 1982.)

Para que se pueda presentar la patología provocada por ETEC se requieren de varias fases: 1) Ingestión de los microorganismos a través de agua o alimentos contaminados, (DuPont y col., 1971), 2) Unión de los microorganismos a la mucosa del intestino delgado a través de los factores de colonización (CFA), que culmina con su colonización (CFA) (Nataro y Kaper, 1998) y 3) Acción de sus enterotoxinas, que en este caso son las responsables de la diarrea secretora característica de ETEC. (Levine y col., 1987).

Las cepas de ETEC pueden producir la toxina termolábil (LT) o la toxina termoestable (ST) o ambas (Levine y col., 1987). Algunas cepas sólo producen (LT) como las: 06K15:H16, 08:K40:H9 y 08:K25:H9, otras producen tanto la LT como ST, por ejemplo las: 011:H27, 015:H22, 020:H11, 025:K7:H42, 027:H7, 063:H12, 080, 085 y O139 y otras solamente tienen la ST como la 078:H11, 078:H12, 0115:H40, 0128:H7, 0148:H28, 0149:H10, 0153, 0159:H20, 0166 y 0167 (Olarte, 1985.) Ambas toxinas LT y ST, están codificadas en plásmidos transferibles de una bacteria a otra, y aparentemente estos plásmidos se pueden perder con relativa facilidad (Olarte 1985).

Características de las toxinas.

La toxina LT, es similar en estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por *V. cholerae* O1. La LT, es una proteína dimérica de alto peso molecular de 86 kDa compuesta de una subunidad A de 28 kDa y una subunidad B,

constituida de 5 subunidades idénticas de 11.5 kDa (Streadfield y col., 1992). ; La subunidad A tiene actividad enzimática, esta constituida por las fracciones A1 y A2; la primera penetra a la célula e induce una ADP- ribosilación que incrementa los niveles de AMPc intracelular y provoca que las células de las criptas intestinales aumenten la secreción de agua y Cl con una consecuente disminución en la absorción de NaCl en las vellosidades; y la segunda participa en la unión de la subunidad A con la B, así como en el proceso de internalización de A1. La subunidad B forma un pentámero que se une a receptores de superficie del epitelio intestinal gangliosido GM1 y a algunas glicoproteínas intestinales (Teneberg y col. 1994.) La toxina ST, está constituida por 19 a 20 aminoácidos y tiene un peso molecular de (1 a 6 kDa.) contiene múltiples residuos de cisteína y enlaces bisulfuro que le confieren termo estabilidad. Su receptor es la guanilatoclasa, una enzima de la membrana celular. (deSavauge y col., 1992.) Esto resulta en el aumento de líquido intestinal, produciéndose lo que se conoce como diarrea osmótica o secretora.

Enfermedades diarreicas.

Las enfermedades diarreicas están caracterizadas por evacuaciones frecuentes de heces semisólidas, o líquidas, acompañadas de algunos otros trastornos, como son cólicos intestinales, fiebre, tenesmo, etc. Las enfermedades diarreicas pueden producir deshidratación y desnutrición, esta última se ve agravada por los siguientes mecanismos (Giono y col, 1994) y muerte.

- 1) La disminución de la ingesta de alimentos por vomito, fiebre, deshidratación y dispepsia.
- 2) La mal absorción de azúcares, grasas, proteínas, vitaminas y minerales.
- 3) Alteraciones metabólicas.

Morbi-mortalidad por diarreas:

Según los cálculos de población de 1990, la morbi-mortalidad en Asia, África y Latinoamérica se estimó entre 744 y 1,000 millones de episodios y de 1.5 a 5.1 millones de muertes lo que equivale a 1400 a 1900 episodios diarreicos y de 3 a 4 muertes por minuto. En México se estima una frecuencia anual de 2 a 4 episodios diarreicos por niño en las áreas urbanas y de 4 a 9 en las áreas rurales. La mortalidad anual por diarrea por cada 100 000 niños menores de 5 años fue de 212.3 en 1984 y disminuyó a 60.4 en 1993 y este comportamiento se asocia a las medidas preventivas implementadas durante la epidemia del cólera y al uso de las terapias de rehidratación oral. Por otra parte es importante mencionar que en México el patrón estacional que mostraba un pico entre primavera-verano, ha disminuido, pero en otoño-invierno se ha dado un aumento paulatino, y este se asocia a la presencia de rotavirus. (Velázquez C. y col, 1999.) Es importante recalcar que la mortalidad ha disminuido en gran proporción, pero este avance no se ha dado en la misma proporción en el caso de la Morbilidad, como ejemplo podemos mencionar que para 1997, se registraron 4,626,796 casos, para 1998 un total de 7,005,336 casos, para 1999 se registraron un total de 5,478,361 casos de enfermedades diarreicas y en el año 2000; 6,744,525 casos de diarreas sin identificar a el agente específico que las provoca, y estos datos comparados con la

mortalidad si son significativamente más elevados (Giono,1994; OPS, citado en Boletín epidemiológico, 2000, 2001.)

Contaminación de alimentos:

Los alimentos son un buen sustrato para las Enterobacterias,(Feachem y col., 1983), así como para *Vibrio cholerae* (Estrada García y Mintz, 1996), por ejemplo: Las frutas, y verduras pueden contaminarse con estos microorganismos ya sean en su lugar de cultivo por irrigación con aguas residuales crudas o parcialmente tratadas, lo que se llama contaminación primaria. También se pueden contaminar al ser lavadas con agua contaminada fecalmente o bien durante su transportación lo que se llama contaminación secundaria. (Feachem y col.,1983; CEPIS, 1990). Los alimentos también pueden ser contaminados por los manipuladores que pueden ser portadores asintomáticos (OPS,1996). Por contaminación cruzada con otros alimentos ya contaminados (tal es el caso del manejo de carne cruda en el mismo sitio que se preparan las ensaladas); o por malas prácticas de higiene que den lugar a contaminación fecal-oral. (Savarino y col., 1999.) Por todo lo anterior es necesario que se establezca el estado sanitario de los alimentos a través de la identificación de microorganismos que sean adecuados indicadores de contaminación fecal y de patógenos humanos. (OPS,1996). Para lo cual deberán cubrir las siguientes características:

- 1) Especificidad, del sitio del que provienen.
- 2) Se hallaran en gran cantidad, de tal forma que puedan ser detectados en altas diluciones.

- 3) Deberán ser muy resistentes a las condiciones ambientales extraintestinales.
- 4) Aun cuando se encuentren en escasa cantidad, podrán ser detectados en forma fácil y completa. (Jay, 1991).

2.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

En Europa en el siglo XIX, se acuñó el término "diarrea de verano" ya que se observaba un incremento de casos de diarrea durante este período del año, el cual estaba asociado a altas tasas de muerte infantil. Esta enfermedad afectaba a los infantes durante el primer mes de vida, si no es que en la primera semana, provocando una rápida deshidratación y muerte. En 1885, el profesor Escherich de Viena, Austria, aisló un microorganismo al que llamó *Bacterium coli*, de niños con diarrea de verano y en 1887 el mismo autor propuso, que este microorganismo era integrante de la flora intestinal normal. Posteriormente en 1905, Moro realiza una observación muy importante ya que propone por primera vez que la fuente de *E. coli*, son los alimentos. Massini en 1907, dos años después demostró que cuando inyectaba intra-intestinalmente a conejos con cepas de *E. coli* provenientes de niños enfermos de diarrea, estos enfermaban; y fué para 1923 cuando Adam y col. realizaron la primera clasificación serológica de estas cepas aisladas de niños con gastroenteritis. Posteriormente en 1925, Smith y Orcutt proponen que este tipo de diarrea esta asociada con una probable absorción de toxinas producidas durante la multiplicación de la bacteria. Y en 1943 Walliek y Stuart, cambian el

nombre de *Bacterium coli* por el de *Escherichia coli*, en honor al doctor Escherich. Para 1944, Kauffman, utilizando los sueros de niños con diarrea, observó que estos sueros aglutinaban específicamente a cepas aisladas del intestino de niños que habían muerto por gastroenteritis, sin embargo no aglutinaban con las cepas aisladas de las heces de niños sanos, esto le permitió establecer que sólo un grupo restringido de serotipos (combinaciones antigénicas somático- flagelares) de *Escherichia coli* estaban claramente asociados con la enfermedad diarreaica. (Robertson y col., 1985)

Los estudios recientes de genética de poblaciones indican que estas bacterias son en realidad clonas adaptadas para colonizar preferentemente el intestino humano, a través de tres diferentes mecanismos patogénicos: 1)La adherencia; indispensable para que la bacteria pueda pegarse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino. 2)Producción de proteínas bacterianas (toxinas), que son liberadas una vez que la bacteria se instala en el intestino y que producen una estimulación en la secreción de agua y electrolitos; 3)Por invasión y multiplicación bacteriana dentro del citoplasma celular, lo cual les permite a las bacterias evadir los mecanismos de protección del hospedero. Estos mecanismos son la base para clasificar a los diferentes grupos de *E.coli* por su patogenicidad, según Blanco y González, 1985)

Tabla a. Clasificación de las *Escherichia coli*. Basándose en el patrón de interacción.

Nombre	Características
<i>Escherichia coli</i> .	Patrón de interacción bacteria-enterocito en infecciones entéricas.
Enteroinvasiva (EICE)	Invasión intraepitelial citotónica y citotóxica
Enteropatogénica (EPEC)	Reestructuración epitelial citotónica.
Difuso-adherente (DAEC)	Difusa y adherente.
Enterotoxigénica (ETEC)	Epitelial citotónica.
Enterohemorrágica (EHEC)	Reestructuración epitelial citotónica con sangrado.
Enterogregativa (EAaggEC)	Epitelial citotónica..

Tomado de Blanco y González, 1985.

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)

En 1961 Taylor y col., describieron por primera vez que cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea eran capaces de producir la salida de líquido hacia la luz del intestino de conejo, en lo que se conoce como la prueba de asa ligada de conejo. Pero no fue hasta 1971 que DuPont y col. demostraron que cepas de *E. coli* causaban diarrea en humanos y se les llamo *Escherichia coli* enterotoxigénica. ETEC coloniza la superficie del intestino y libera enterotoxinas, siendo éstas las responsables de la diarrea secretora, característica de esta cepa. Las enterotoxinas producidas por ETEC están codificadas en plásmidos y son la toxina termolábil (LT) y termoestable (ST.) También se considera que la ETEC, es la causa principal de la llamada diarrea del viajero en el mundo, ya que se aísla de 20-40% de todos los casos de esta diarrea.(Nataro y kaper, 1998) La relación entre ETEC y la diarrea del viajero se demostró por primera vez en 1970 en un viajero Británico con diarrea que había visitado Arabia, ya que el único patógeno que se aisló de sus heces fue ETEC. Además en numerosos estudios epidemioló-

gicos realizados en turistas con diarrea que han viajado a Asia, África y México, se ha identificado a ETEC como el agente responsable de la enfermedad diarrea. (Pickering y col., 1978,; Benitez y col., 1991).

En un estudio realizado por Tjoa y col., en 1977, se analizaron muestras fecales de diarrea, obtenidas durante el verano; de estudiantes de los Estados Unidos de Norteamérica que habían visitado México. Los datos del coprocultivo se correlacionaron con el sitio de consumo de alimentos y observaron que la presencia de patógenos como *Shigella sp.* y ETEC, era mayor en aquellos estudiantes que comían fuera de casa, que los que no lo hacían, por lo que concluyeron que los alimentos consumidos fuera de casa pueden ser un vehículo de transmisión de enteropatógenos que producen la llamada diarrea del viajero. En 12 estudios realizados entre 1974 y 1987 se encontró implicado a ETEC en 42% de los episodios de diarrea del viajero en turistas en México. Ocho estudios en Asia establecen que ETEC es el responsable del 16% de los casos de diarrea del viajero. En tres estudios en África se reportó a ETEC como responsable del 36% de los casos de la diarrea del viajero (Cartright R. Y. 1993; Echeverria y col, 1984.)

En 1988 un estudio de ETEC y diarrea infantil realizado en México por Cravioto y col. se observó que la incidencia de diarrea producida por ETEC, se presenta con mayor frecuencia en niños que viven en zonas rurales y que nacieron en el verano, además de que se encontró con mayor frecuencia cepas con enterotoxina ST. En otros estudios se reporta que si se presenta la enfermedad en el infante,

este deberá recibir como tratamiento la rehidratación oral para evitar la deshidratación y por ende la muerte. (Giono y col., 1994)

En un estudio de 2 años (1998-2000) realizado por Qadri en Bangladesh, se encontró que la presencia de ETEC, manifiesta un marcado comportamiento estacional, ya que se presenta con mayor frecuencia en el verano, que en el resto del año, además de que la toxina que se logró identificar en un mayor número de casos fue la ST (49%), después la LT en un 25.4% y finalmente ambas en un 25.2% de los casos. En este estudio se hace hincapié en el hecho de que los casos en que se manifiesta la enfermedad y se logra identificar a la toxina ST, como la responsable de los síntomas, estos son más severos y sobre todo en los niños menores de 3 años (Qadri y col. 2000)

3.1 Antecedentes técnicos.

El diagnóstico de ETEC se basó durante muchos años en la prueba del asa ligada de conejo, con base en esta se identificaron serotipos que coincidían siempre con esta característica (Nataro y Keper, 1998). Por lo que posteriormente se desarrollaron las pruebas de cultivo celular como por ejemplo: las pruebas de cultivo de células adrenales Y1 (Donta y col., 1974), o en el cultivo de células de ovario de hamster Chino (CHO) (Guerrant y col., 1974), o los inmunoensayos como ELISA (Yolken y col., 1977), pruebas de radioinmunología (Giannella, y col. 1981), aglutinación del Latex (Kuwuhara y Yokota 1983), o la hibridación de colonias en fase sólida (Moseley y col., 1982) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (du Toit and Helden, 1993). Debemos mencionar por una parte que las primeras técnicas aquí mencionadas son muy costosas, ya que requieren

de la utilización de muchos animales de experimentación, espacio, tiempo y recursos económicos y humanos; A diferencia de las técnicas de biología molecular que igual que las otras requieren personal calificado, eliminan la utilización de animales de experimentación y de cultivos celulares. También los tiempos se reducen. Y por otra parte que las cepas diarreicas de *Escherichia coli* fueron de los primeros patógenos en los que se emplearon las metodologías moleculares que a la fecha siguen siendo las técnicas más populares y confiables para el diagnóstico y diferenciación de organismos patógenos y no patógenos. Es por ello que en este trabajo se plantea la utilización de 2 técnicas de biología molecular (hibridación de colonias en fase sólida y la reacción en cadena de la polimerasa), para la identificación de ETEC, de *Escherichia coli* aisladas de alimentos, así como su comparación, en cuanto al binomio costo- beneficio.

JUSTIFICACIÓN.

Varias Enterobacterias patógenas, son responsables de diversas enfermedades entre ellas las gastrointestinales, estas últimas están asociadas con pérdida de días de trabajo, mal nutrición, disminución de la capacidad de aprendizaje y en algunos casos pueden producir hasta la muerte. *Escherichia coli* es el organismo predominante de la flora del colon humano y de animales de sangre caliente, por ende es un excelente indicador de contaminación fecal. Por otro lado ETEC es la causa principal de la diarrea bacteriana en infantes en países subdesarrollados especialmente durante el período de destete, pero también es responsable de diarrea en adultos, siendo la causa principal de la llamada diarrea del viajero. Con base en esto es que el presente trabajo plantea utilizar *Escherichia coli* como indicador de contaminación fecal y ETEC como indicador de un microorganismo patógeno humano de relevancia. Se ha seleccionado la Basílica de Guadalupe como lugar de estudio por ser un centro de alta concentración de venta callejera de alimentos, así como de consumidores. Es importante mencionar que a pesar de la importancia en salud pública de ETEC no se identifica normalmente en los laboratorios clínicos y mucho menos en los alimentos. Esto se debe a que su identificación requiere de metodologías y técnicos especializados. Es por ello que en este estudio se estandarizarán dos técnicas de biología molecular para la identificación de ETEC de alimentos y se evaluará cual ofrece mejores resultados de diagnóstico, es más rápida y es más económica.

OBJETIVOS.

Generales:

Determinar el estado sanitario de alimentos de venta callejera colectados en los puestos de los alrededores de la Basílica de Guadalupe, estableciendo la presencia de *Escherichia coli* como un indicador de contaminación fecal y a ETEC como indicador de un patógeno humano, en (salsas, frutas, mariscos, verduras, tortilla y frijoles.)

Objetivos particulares:

Determinar la presencia de *Escherichia coli*, a través de una evaluación cuantitativa (UFC/g), como indicador de contaminación fecal en alimentos de venta callejera como salsas, frutas, mariscos, verduras, tortillas y frijoles, colectados en los puestos de los alrededores de la Basílica de Guadalupe.

Identificar la presencia de (ETEC), en los alimentos de venta callejera, como indicador de un patógeno humano.

Realizar un estudio epidemiológico del área de estudio.

Comparar dos técnicas de biología molecular reacción en cadena de la polimerasa "PCR" y la hibridización de colonias en fase sólida para la identificación de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), de aislados de *Escherichia coli* de alimentos de venta callejera.

HIPÓTESIS.

Los alimentos vendidos en vía pública están contaminados fecalmente.

La técnica de "PCR" multiplex para identificar los genes de patogenicidad *h*t y *st* de ETEC, es más reproducible, más rápida y económica que la técnica de hibridación en fase sólida utilizada tradicionalmente.

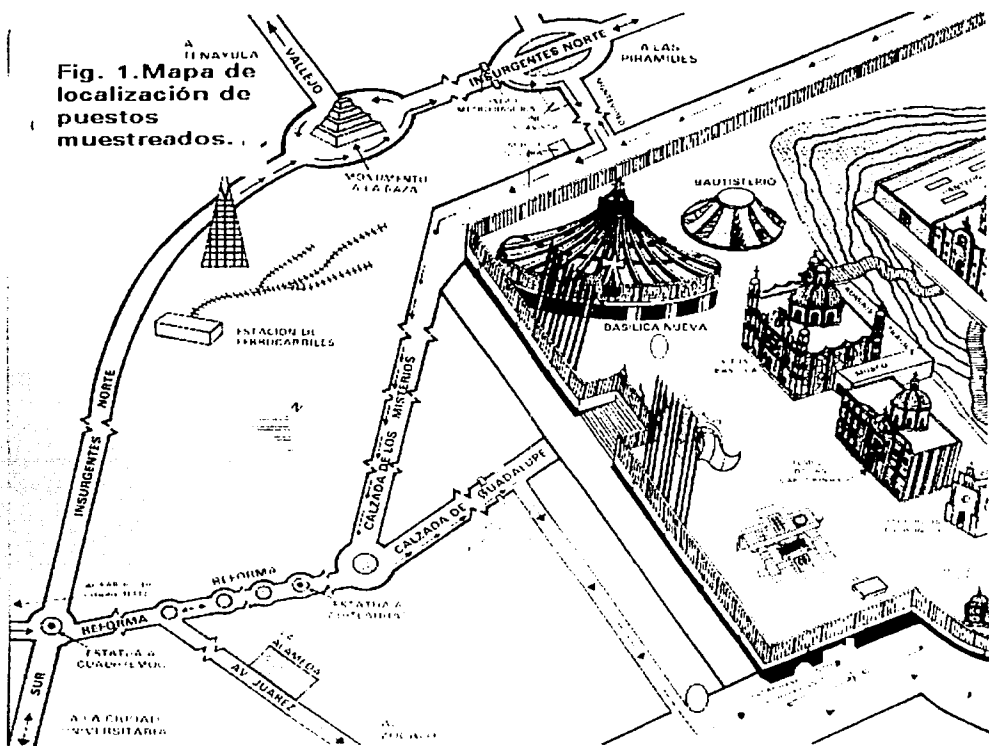
METODOLOGÍA.

Descripción del Área de Estudio:

El estudio se llevará a cabo en los puestos de venta callejera de alimentos, localizados en la periferia de la Basílica de Guadalupe en la delegación política Gustavo A Madero, enclavada en la zona Norte de la Ciudad de México, ubicada a 19° 29' longitud norte y a 87.7° latitud Oeste y a 2250 msnm. En una zona de suelo aluvial. El período de lluvias se presenta generalmente entre los meses de mayo a septiembre a cualquier hora del día y su temperatura media anual oscila entre los 25 y 28 °C, y como parte de la misma zona geográfica tenemos el cerro del Tepeyac ubicado en las mismas coordenadas pero a 2350 msnm., donde encontramos un bosque artificial con eucalipto y pirúl como flora principal, además de algunas cactáceas y pastizal inducido. (cartas topográficas del INEGI, 1982)

En los alrededores de este centro religioso se ubican gran cantidad de escuelas y áreas industriales por lo que es un área de paso obligado para muchas personas, además de la gran afluencia de feligreses que asisten a lo largo del año. Se estima que el número de visitantes a ésta nuestra área de estudio sea de 8 millones, y su distribución ésta representada en mayor proporción por niños, adultos y turistas que llegan a consumir alimentos en los locales semifijos que se encuentran en los corredores fuera del templo y en los locales ambulantes que están dentro del atrio o en el corredor comercial de la calle Fray Juan de Zumarraga, en los que se puede apreciar una carencia de servicios públicos (sanitarios, agua potable) y de limpieza.

Fig. 1. Mapa de localización de puestos muestreados.



En esta figura observamos los puestos de venta callejera ubicados en los alrededores de la basílica de Guadalupe, que fueron muestreados, para la realización de este estudio.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TRABAJO DE CAMPO:

Para determinar los puntos de muestreo, se realizó un recorrido previo en los alrededores de la Basílica de Guadalupe y se tomaron los siguientes criterios:

- Que fueran sitios de alta afluencia de personas, de automóviles y de viento.
- Que fueran lugares donde se vendían alimentos de fácil consumo, por ejemplo: quesadillas, enchiladas, tacos de canasta, tlaxudas, cóctel de frutas o mariscos (camarón y ostión)

PARÁMETROS AMBIENTALES:

Para determinar la hora del muestreo se consideró lo siguiente:

- La hora en que se inicia la venta.
- El tiempo estimado en que se realizaría el muestreo.
- El tiempo de traslado hacia el punto de muestreo, y del punto de muestreo hacia el laboratorio.
- El tiempo requerido para el procesamiento de las muestras.

TIPO DE MUESTRAS COLECTADAS:

Salsas verde, roja, chile piquín, mole verde o rojo, cócteles de ostión-camarón), camarón, frutas (sandía, papaya, mango jícama, melón), aderezos como cilantro, nopales, col y lechuga.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS:

Se realizara la recolección de muestras, y se registrara la temperatura, con un termómetro ambiental de -20°C a 110°C , marca Brannam.

RECIPIENTES DE RECOLECCIÓN:

Se colectaron las muestras de alimentos en bolsas de plástico limpias y nuevas, se cierran y se etiquetan con los siguientes datos:

- Número de muestra.
- Fecha.
- Hora.
- Observación.
-

DINÁMICA DE MUESTREO:

Se procuró realizar el muestreo siempre en el mismo orden y a la misma hora.

ESTUDIO OBSERVACIONAL:

Al realizar los muestreos, se hacían observaciones sobre el puesto, es decir, si tenía fuentes de abastecimiento de agua cercana, si contaban con refrigerador, con vitrina para exponer sus productos, la apariencia del dependiente o la dependiente, es decir, si tenía las manos limpias, uñas recortadas, si usaba gorrita o si tenía el cabello largo o corto, ¿cuántas personas había? Y en la medida de lo posible se establecía una charla con ellos para preguntar si los alimentos se preparaban en el lugar o en casa, si se reutilizaban los sobrantes, y que cuál era su clientela estimada.

Todo esto con cautela, ya que las autoridades no nos acompañaban y para evitar problemas con los comerciantes se llevaba a cabo los muestreos de incógnito, tratando de respetar en lo más posible las condiciones reales de venta.

CONDICIONES DE TRASLADO:

Al finalizar se guardaran las muestras en un recipiente de unicel, para su traslado al laboratorio de Epidemiología Moléculas del Departamento de Biomedicina Moléculas del CINVESTAV, donde se llevara a cabo su procesamiento.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

- Las áreas de trabajo deberán limpiarse con cloruro de benzalconio y alcohol en solución al 50% (v/v).
- Encendido de mecheros.
- Se sacaran las muestras del recipiente de traslado y se colocaran por número de orden creciente sobre papel secante.

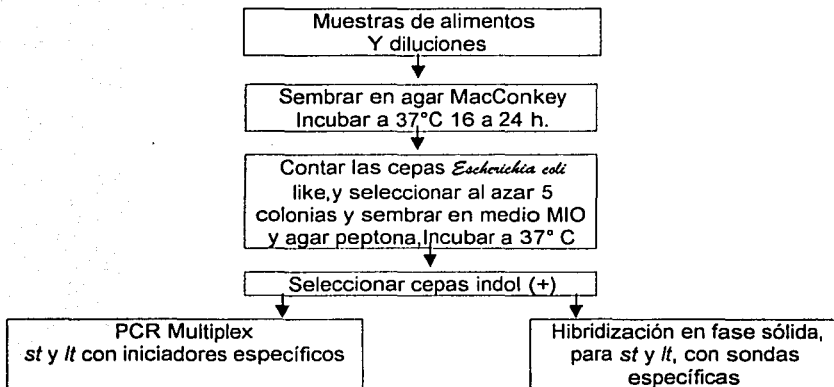
Antes de abrir la bolsa, se homogenizara perfectamente la muestra(si es necesario macerar), A cada muestra se le tomará la lectura del pH, con papel indicador marca Merk, con rango de 1- 14, y se pesará 1 gramo para realizar el análisis microbiológico y se procederá de la siguiente manera.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

- 1) Utilizando una pipeta Pasteur de plástico, estéril, de 3 ml, se pesó 1 gramo de cada muestra en un criobial, utilizando una balanza semianalítica marca Ohaus.
- 2) El tubo se rotuló con los datos de la muestra y se colocó en una gradilla, y se trasladó a un área estéril, acondicionada con mecheros para iniciar el procedimiento de dilución de las muestras.

- 3) Se realizaron diluciones por duplicado hasta 10^{-3} o hasta 10^{-6} , utilizando solución salina estéril al 0.85 %, todos los tubos se agitaron con el vortex, antes de realizar las diluciones y antes de colocar él inoculo en las placas de agar.
- 4) Se siembra en placas de Petrí con medio de agar MacConkey marca DIFCO, se colocaron 10 μ l de la muestra (cada dilución y a la muestra sin diluir), usando una punta por dilución, (las puntas se colocaron en bolsas de plástico para su posterior incineración), y se sembró por estría, se incubaron las cajas de Petrí en posición invertida de 18 a 24 h a 37°C.
- 5) Todos los datos se anotaron en la bitácora del laboratorio. Una vez que se termino el procesamiento de las muestras, las áreas de trabajo quedaban limpias.
- 6) Al día siguiente se sacaron las placas de Petrí del cuarto de incubación y se realizó el conteo de colonias parecidas a *Escherichia coli* es decir, colonias fermentadoras de lactosa (color fucsia), en agar MacConkey con bordes enteros, de estas se seleccionaron 5 colonias por caja y se sembraron en tubos con medio Motilidad Indol Ornitina (MIO), (para la prueba del indol) y en agar peptona, (para su conservación), y se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas, se realizó la prueba del Indol con el reactivo de Erlich.
- 7) Las colonias indol positivo (+), colonias que presentaron la formación de anillo rojo, se seleccionaron para sembrarse, de peptona a agar Mac Conkey, por estría cruzada y se seleccionó 1 colonia para iniciar las pruebas moleculares.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



FUNDAMENTOS TÉCNICOS.

Hibridización de colonias en fase sólida.

La técnica de hibridación de colonias en fase sólida, es un método que requiere del aislamiento de las colonias de *E. coli*. Una vez que ya han sido identificadas como (lactosa + e Indol +), se resiembran en placas de Agar de Soya y Tripticaseína (TSA), en donde se pueden colocar varias colonias, las que se incuban a 37°C durante 4 o 6 hrs. Después de este tiempo se coloca sobre la placa de TSA, una membrana de Nylon con carga positiva (+), y se incuban durante la noche a 37°C. Al día siguiente se retira la membrana y las colonias son lisadas y desnaturalizadas con hidróxido de sodio y dodecil sulfato de sodio (SDS), e hibridadas *in situ*, con sondas específicas marcadas radiactivamente P³² (Moseley y col., 1982) o con digoxigenina. Si los genes que nos interesan se encuentran en estas cepas las sondas específicas se unirán, manifestándose

una reacción positiva de hibridación y para revelarla utilizaremos el conjugado antidigoxigenina – fosfatasa alcalina (Rodríguez, 1999).

Protocolo para Hibridación de colonias en fase sólida.

1. Se siembran las cepas sobre una placa de agar TSA, utilizando una cuadrícula para tener de una manera ordenada nuestras cepas problema y siempre se siembra tanto la cepa de referencia de ETEC 10407 que será el control positivo (+) y la cepa E. coli 3030 como control negativo (-)
2. Se Incuba la placa de 4 a 6 h a 37° C.
3. Posterior a la incubación, se coloca sobre la placa de agar una membrana de hybond- N.
4. Se deja incubando toda la noche a 37 °C.
5. Se saca la placa de la incubadora y con mucho cuidado se retira la membrana y se coloca sobre un trozo de papel filtro Wathman No.1, impregnado con NaOH 0.5 N en una caja petri de mayor diámetro.
6. La membrana se mantendrá en NaOH 0.5 N, por espacio de 15 minutos.
7. Se transfiere la membrana a papel filtro saturado con solución Tris 1 M pH8, dejándola así durante 10 minutos.
8. Transferir la membrana a papel filtro saturado con solución Tris 1 M pH 8 -1.5 M NaCl y dejarla por 10 minutos.
9. Retirar la membrana y enjuagarla en Solución Salina Citratos (SSC) 2X, y en Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 5%.

10. Una vez enjuagada, se coloca sobre papel secante y se deja secar a temperatura ambiente.
11. Cuando la membrana este bien seca, se fija el DNA con luz UV en un Gene linker, con una intensidad de 30 mJoules, durante 60 segundos.
12. Colocar la membrana en una bolsa de plástico, con 5 ml de solución de prehibridación, (ver anexo) o hasta que este cubierta la membrana y cerrarla herméticamente con un sellador térmico.
13. Una vez sellada, se mete a incubar a 65 °C, durante 1 h en un baño de agua.
14. Terminada la incubación, retirar la solución de prehibridación con una pipeta de 1 ml.
15. Se adicionan 2.5 ml de líquido de prehibridación más sonda marcada con digoxigenina, y se sella nuevamente.
16. Se deja hibridizando a 65 ° C, toda la noche en baño de agua.
17. Se preparar una solución de lavado (Solución salina citratos SSC 1X y dodecil sulfato de sodio SDS 0.1 %) y se le mantiene a 65 ° C, hasta su uso.
18. Retirar al siguiente día la sonda con una pipeta y se guarda para su rehúso (hasta 5 veces).
19. Se saca la membrana de la bolsa y se coloca en un recipiente para enjuagarla con 20 ml de solución de lavado.
20. Se elimina la solución y se le adicionan 20 ml más de solución de lavado, por 15 min. A 65°C en agitación. Esto se repite 3 veces.
21. Se enjuaga la membrana con 20 ml de solución A, y agitar por 1 min.
22. Se transfiere la membrana a 20 ml de solución B, por 20 min. en agitación.

23. Se Incuba con el anticuerpo en 10 ml de solución B y 1.5 μ l de antidigoxigenina- fosfatasa alcalina.
24. Se deja incubando por 30 min. en agitación constante.
25. Se lava la membrana con 20 ml de solución A y se agita durante 15 min.
26. Se repite el paso 26.
27. Se enjuaga la membrana en 20 ml de solución C (ver anexo), agitando por 1 min.
28. Colocar la membrana en 10 ml de solución C, con 45 μ l NBT /BCIP.
29. Incubar la membrana a temperatura ambiente hasta la aparición de color morado, el cual indicaría una reacción positiva.
30. Para detener la reacción enjuagar la membrana en agua destilada.

FUNDAMENTO TÉCNICO.

La reacción en cadena de la polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular que fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1985, esta técnica consiste en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de DNA blanco, flanqueado por un par de iniciadores que son secuencias de DNA complementario a una región determinada y que son usados como plantillas a través de la DNA polimerasa, que en varios ciclos logra extender las cadenas de interés. Por lo general cada ciclo consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos que son: 1) Desnaturalización, en el cual se separan las dos cadenas complementarias del DNA blanco. 2) Alineación, en el

que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA blanco desnaturalizado. y 3) Extensión, en el cual la DNA polimerasa extiende el DNA a partir de iniciadores apareados al DNA blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción. (Barrera y col. 1993.)

Protocolo para la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.

- 1) Extracción del DNA; se toma una colonia de la cepa de interés, (es decir, aquellas que fueron Lactosa + e indol (+)), de una placa de agar MacConkey y resuspende en 1ml de agua milli Q, contenida en un tubo eppendorf, se agita vigorosamente.
- 2) Colocar el tubo en agua en ebullición durante 1 minuto, para eliminar las DNAsas, y que así el DNA se conserve por más tiempo.
- 3) Para la amplificación del gene que codifica para la toxina LT, se utilizara a los iniciadores, en una dilución 1:10 TW20(5'-GGCGACAGATTATACCGTGC-3'), TW11(5'CGGTCTCTATATCCCTGTT-3'), y para la amplificación del gene que codifica para la toxina ST, se utilizaran los iniciadores JW14 (5'ATTTTCTTTCTGTATTTGTCTT-3') y el JW7 (5'CACCCGGTACAAGCAGGATT-3'), posteriormente procedemos a realizar las siguientes mezclas de reacción:

Tabla 1. Mezcla para la reacción.

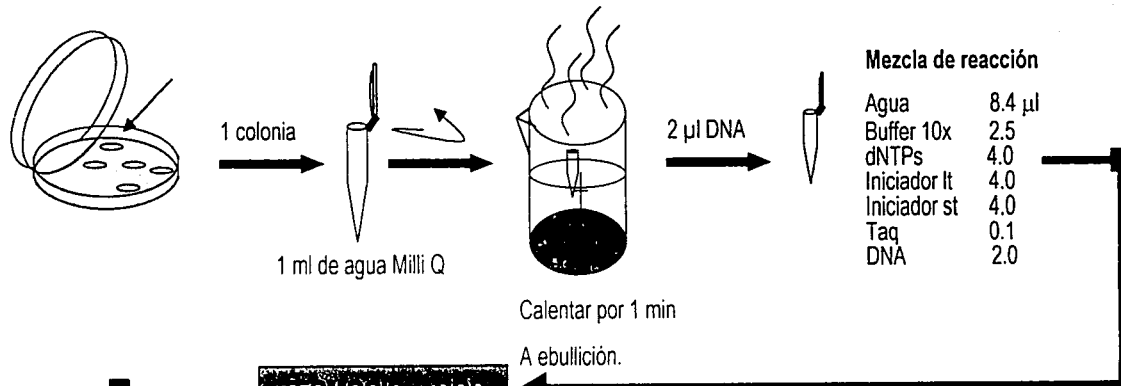
Volúmen de reactivos	Nombre del reactivo
2.0 μ l	DNA mezcla, problema o C*.
8.0 μ l	Mezcla de iniciadores
0.1 μ l	Taq polimerasa
2.5 μ l	Regulador
2.0 μ l	dNTP' s **
10.4 μ l	Agua
25.0 μ l	Volumen final

*C Control.

**Los DNTP's deoxiadenosin trifosfato (dATP), deoximetidina trifosfato (dTTP), deoxicitidina trifosfato (dCTP), y deoxiguanocin trifosfato (dGTP), para cada reacción.

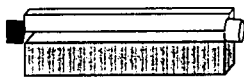
La amplificación de estos genes se realizó en una sola reacción en un volúmen final de mezcla de 25 μ l, tanto para los tubos de las muestras problema, como para el control (+) de las *Escherichia coli* enterotoxigénicas ETEC 10407. La reacción final de amplificación contiene 2 μ l del DNA problema o control, en 10 mM Tris-HCl, (pH 8.0) –50 mM KCl₂ ; 200 mM de cada DNTP dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Perkin- Elmer, Norwalk, Coon) – 0.75 U Ampli Taq Polimerasa Boehringer Mannheim), 10 pmolas de cada iniciador y 2mM de MgCl². Cada tubo se mezcló por agitación en vortex y se introdujo en el equipo Perkin- Elmer-Cetus DNA termociclador, y se siguió el siguiente programa: Calentar las muestras a 50 °C por 2 min y a 95 °C por 5 min durante 40 ciclos, cada uno a 95 °C por 45 seg y a 50 °C por 45 seg. Una vez terminados los ciclos se realiza una extensión final de 10 min a 72 °C.

El producto de PCR, se colocó en un gel de agarosa al 2%; en regulador TAE 1X y se corre en electroforesis a 80 Volts, 400 mAmperes, por 1 h. y se revela con bromuro de etidio. (ver esquema 1).



TERMOCICLADOR

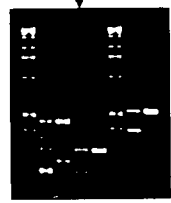
PASOS	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	1	50 °C	2 min
2	40	95 °C	5 min
		95 °C	45 seg
3	1	50 °C	45 seg
		72 °C	10 min



Electroforesis

80 V
400 mA
60 min

2.0%
Agarosa
Gel



Esquema 1. Protocolo para "PCR".

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Nota: Para la preparación de medios, reactivos, soluciones, diluciones y concentraciones utilizadas en este estudio. Ver los anexos.

Para determinar la diferencia entre las técnicas moleculares empleadas, en base a la presencia de los genes, se realizó una prueba de Chi cuadrada χ^2 de dependencia, con la finalidad de detectar diferencias estadísticas ($p < 0.05$). Daniels, 1995.)

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

$$\text{Donde: } E = \frac{T_L \times T_R}{T..}$$

Donde: E = valores obtenidos.

T_L = sumatoria de la columna

T_R = sumatoria de la fila.

T = total

RESULTADOS.

1. MUESTREOS.

Durante el verano y otoño de 1999 (16 de agosto al 4 de octubre), se realizaron 8 muestreos (1 por semana) de alimentos de venta callejera.

Se colectaron un total de 91 muestras de diferentes alimentos, entre ellos, salsas verdes y rojas, arroz, cóctel de camarón y ostión, frutas con chile piquín, verduras cilantro, col, rábano, lechuga, nopales, y frijoles. (ver tabla 2)

Al final de los 8 muestreos se encontraron 51 muestras contaminadas con colonias parecidas a *Escherichia coli* y el resto no presentó crecimiento de colonias parecidas a *Escherichia coli*, o no hubo ningún tipo de crecimiento. (ver tabla 3)

Se obtuvieron un total de 34 muestras con *Escherichia coli*. (ver tablas de 4 a 11)

Sólo 3 muestras fueron positivas para ETEC. (ver tablas 16 y 17).

Las temperaturas registradas durante los muestreos oscilaron entre los 15°C y 28°C. (ver tabla 3)

Los pH's de las muestras oscilaron entre 3 y 7.

Los pH's de las muestras en las que se observó crecimiento de *Escherichia coli* estuvo entre 4 y 6. (ver tablas de 4 a 11)

Las cuentas en UFC/g presentaron intervalos desde 2 – 4.8 X 10⁶, por lo que no deben dejarse pasar por alto, ya que si consideramos el tiempo de replicación de las bacterias que es de 20 minutos y el tiempo que los alimentos están expuestos

en la vía pública, que es de aproximadamente 8 horas, hay tiempo necesario, para que estas se repliquen y alcancen las dosis infectivas sin ningún problema.

Se observó que las fuentes de abastecimiento de agua, están muy alejadas de los puestos de venta de alimentos.

Se recabaron datos acerca de que los alimentos son preparados en el 90% de los puestos en el mismo sitio en el que se expenden y sólo un 10 % preparaba los alimentos en su casa.

Ningún comerciante acepta que sus productos fueran de mala calidad o bien que los mismos sean reutilizados en el día siguiente a su preparación.

También se observó que en muchas ocasiones los utensilios sin enjuagar, son reutilizados para colocar nuevos alimentos.

En ningún local se utilizaban gorras para cubrirse el cabello o guantes para las manos.

Las frutas eran rociadas para mantenerlas frescas, con agua de botes que no estaban cubiertos, por lo que están expuestos al aire, polvo y contaminación química proveniente de los escapes de los autos. (Durán y Kaufer, 1993.)

Los comerciantes comentaron que en promedio se atendía a unos 50 clientes al día y que cada uno de ellos consumía de 2 a 4 quesadillas o gorditas y 1 coctel por persona, una tlayuda o una orden de enchiladas (ningún extranjero consumía este producto debido a la apariencia de el platillo, informe dado por la vendedora), según fuera el caso.

Un aspecto que nos llamo enormemente la atención es que los alimentos no son nada económicos, ya que una quesadilla o gordita tenía un costo de entre \$ 8.00 y \$ 10.00 o los cócteles de mariscos \$ 18.00 y las enchiladas \$ 15.00 , las tlayudas

\$ 12.00 y las frutas \$ 5.00 el vaso, lo que de ninguna manera indica que sean alimentos accesibles a toda la población.

Los puestos son atendidos principalmente por los miembros de la familia y en el 64% de ellos son atendidos por mujeres y en un 36% por varones.

2. ALIMENTOS COLECTADOS DURANTE LOS MUESTREOS.

En la tabla 2, se muestra el tipo de alimentos colectados. Los alimentos más frecuentemente colectados fueron salsas picantes. Puesto que se considera que éstas se adicionan a casi todos los alimentos vendidos en vía pública y que por lo tanto pueden ser un importante vehículo de ETAs. Se colectaron 30 salsas verdes, de las cuales 18 tuvieron presencia de colonias parecidas a *E. coli*, 12 de salsas rojas de las cuales 6 tuvieron crecimiento de colonias parecidas a *E. coli*. Además se colectaron 6 muestras de mole, 1 de ellas con crecimiento de colonias parecidas a *E. coli*, y 3 muestras de chile piquín, 1 de ellas presentó crecimiento de colonias parecidas a *E. coli*.

Tabla no. 2 Alimentos colectados durante los 8 muestreos.

ALIMENTO	1ero.	2do.	3ero.	4to.	5to.	6to.	7mo.	8vo.	Total
Salsa verde	6	4	3	4	3	3	4	3	30
Salsa roja	1	1	2	1	1	3	1	1	11
Arroz	1	1	1	1	1				5
Mole		2	1	1	1	1			6
Pata		1							1
Fruta	1	1	1	2	2				7
Camarón/ostión	1	1				1			3
Ostión			1				1		2
Camarón				1	1	1	1	1	5
Frijoles				1					1
Entomatadas			1	1					2
Tortillas					1	1	1		3
Cilantro					1	1	1	1	4
Cilantro/nopales			1	1					2
Nopales								1	1
Col/rabano					1				1
Col.						1			1
Rábano						1		1	2
Lechuga								1	1
Chile piquín						1	1	1	3
Total	10	11	11	13	12	14	10	10	91

En cada columna se anota el total de muestras colectadas en cada muestreo.

3. MUESTRAS COLECTADAS CONTAMINADAS CON CEPAS PARECIDAS A *E. coli* y NO CONTAMINADAS con *E. coli*.

Tabla No. 3. Aquí se observan los datos de cada muestreo realizado durante este proyecto, y la temperatura ambiental registrada durante el muestreo.

Fecha del Muestreo.	Total de muestras recolectadas	Muestras contaminadas con colonias parecidas a <i>E. coli</i> .	Muestras no contaminadas.	Temperatura Ambiental °C
16-08-99	10	7	3	22 °C
24-08-99	11	5	6	18 °C
30-08-99	11	6	5	20 °C
06-09-99	13	4	9	15 °C
13-09-99	12	5	7	18 °C
20-09-99	14	11	3	24 °C
27-09-99	10	7	3	28 °C
04-10-99	10	6	4	18 °C
Total	91	51	40	

4. MUESTRAS CONTAMINADAS FECALMENTE.

A. Muestras contaminadas con *Escherichia coli*.

A continuación en las tablas de la 4 hasta la 11, se muestra que alimentos estuvieron contaminados fecalmente con *Escherichia coli*, por muestra, los niveles de contaminación fecal en UFC/ g, su pH y el número de puesto de procedencia. Se encontraron un total de 34 muestras contaminadas fecalmente con *Escherichia coli*, en todo el trabajo.

Tabla 4. 1er Muestreo. 16-08-99

Tipo de alimento (4/10)	PH	UFC/g, de <i>Escherichia coli</i> .	Puesto número
Salsa verde.	5	3×10^2	4
Cóctel de camarón/ostión.	4	3.8×10^3	5
Salsa verde.	5	8×10^2	9
Salsa verde.	4	13×10^4	10

Tabla 5. 2do. Muestreo 24-08-99.

Tipo de alimento (1/10)	pH	UFC/g de <i>Escherichia coli.</i>	Puesto número.
Mole	6	1.2×10^3	4

Tabla 6. 3er. Muestreo 30-08-99.

Tipo de Alimento (7/11)	PH	UFC/g De <i>Escherichia coli.</i>	Puesto número
Salsa roja	4	1.7×10^3	2
Entomatadas	7	1.4×10^3	4
Ostión	4	1.8×10^3	5
Salsa roja	4	6.6×10^2	7
Salsa verde	4	2×10^2	9
Salsa verde	4	6×10^2	10
Cilantro/nopales	5	1.8×10^5	7

Tabla 7. 4to. Muestreo. 06-09-99.

Tipo de Alimento (4/13)	PH	UFC/g De <i>Escherichia coli.</i>	Puesto número.
Cóctel de camarón	4	8.4×10^2	5
Salsa roja	5	3.2×10^2	7
Salsa verde	5	1.28×10^3	9
Nopales/cilantro	5	4×10^5	7

Tabla 8. 5to. Muestreo. 13-09-99.

Tipo de Alimento (7/12)	PH	UFC/g de <i>Escherichia coli.</i>	Puesto número.
Salsa verde	5	2×10^2	1
Tortilla	7	6.4×10^3	4
Papaya picada	6	2×10^2	6
Salsa roja	5	2.6×10^3	7
Mango	4	1.6×10^3	6
Cilantro	5	5×10^3	7
Col/ rabano	7	96	4

Tabla 9. 6to. Muestreo. 20-09-99.

Tipo de alimento (8/14)	PH	UFC/g, de <i>Escherichia coli.</i>	Puesto número.
Tortilla	8	4.4×10^4	4
Cóctel de camarón/ostión	5	5.8×10^4	5
Salsa verde	5	4×10^3	8
Salsa verde	5	2.6×10^4	9
Camarón	7	1.2×10^3	5
Cilantro	6	1.6×10^5	7
Col	5	2.6×10^5	4
Rabano	7	4.8×10^6	4

Tabla 10. 7mo. Muestreo 27-09-99.

Tipo de Alimento (82/10)	PH	UFC/g, de <i>Escherichia coli.</i>	Puesto número.
Salsa verde	6	7.2×10^2	1
Salsa roja	4	1.2×10^4	7

Tabla 11. 8vo. Muestreo. 04-10-99

Tipo de Alimento (1/10)	PH	UFC/g de <i>Escherichia coli.</i>	Puesto número.
Lechuga	6	8.2×10^4	4

B. Contaminación fecal de alimentos con *Escherichia coli* en UFC/g por grupo de alimento.

También se analizaron por grupo de alimento y el que más frecuentemente se colectó fué el de las salsas y se encontró que 15 de 41, presentaron contaminación con *Escherichia coli.*, lo que no deja de llamar la atención si se considera que estas salsas son consumidas como aderezo de gran parte de los alimentos vendidos en la vía pública. (ver tabla no. 12.)

Tabla 12. SALSAS

GUSTAVO A. MADERO (Basílica)			
Alimento	No. de Muestras contaminadas/ total	UFC/g. de <i>Escherichia coli</i> . Intervalo	Media
Salsa verde	10 / 30	2 - 26,000	4,710
Salsa Roja	5 / 11	3.2 - 12,000	3,456
Total	15 / 41		

Tabla 13. En la siguiente tabla observamos los valores de UFC/g *Escherichia coli* de un grupo de alimentos que son un importante vehículo de ETAs.

Tabla 13. MARISCOS

GUSTAVO A. MADERO (Basílica)			
Alimento	No. de Muestras contaminadas/ total	UFC/g. de <i>Escherichia coli</i> . Intervalo	Media
Cóctel de Camarón y Ostión	2 / 3	38 - 580,000	309,000
Ostión	1 / 2	18,000	18,000
Camarón	1 / 4	12,000	12,000
Total	4 / 9		

Obsérvense los datos de UFC/g de *Escherichia coli* contabilizados en este estudio, son realmente altos y si hacemos la consideración de que los muestreos se realizaron a temprana hora y que estos alimentos estaban expuestos por lo menos 6 horas más, las cuentas de estas bacterias para el caso de camarón que es de 1.2×10^4 UFC/g, a las 6 horas sería de 2.16×10^5 UFC/g, lo que no deja de ser alarmante.

Tabla 14. En esta tabla, observamos elevados niveles de UFC/g de *Escherichia coli* en frutas y verduras, lo que nos lleva a pensar que para estudios posteriores deberán considerarse como importantes vehículos de microorganismos patógenos.

Tabla 14. VERDURAS Y FRUTAS

GUSTAVO A. MADERO (Basílica)		
Alimento	Número de Muestras	UFC/g. de <i>Escherichia coli</i> ...
Nopales/ cilantro	1	1.8×10^5
Nopales / cilantro	1	4×10^5
Cilantro	1	5×10^3
Cilantro	1	1.6×10^5
Col /Rábano	1	96
Rábano	1	4.8×10^6
Col	1	2.6×10^5
Lechuga	1	8.2×10^4
Papaya	1	2×10^2
Mango	1	1.6×10^3
Total	10	

C.Prueba del indol.

Para conocer cuales muestras estaban en efecto contaminadas fecalmente, usamos a *E. coli*, como indicador. Se determinó cuales y cuantas de las 5 cepas aisladas por muestras eran positivas a la prueba del indol, ya que esta prueba nos indica con un 99% de certidumbre si una cepa parecida a *E. coli*, es realmente una *E. coli*. (Nataro and Kaper, 1998.) En la tabla No. 15 se muestra que del total 233 cepas seleccionadas, resultaron ser indol positivas 63 (27.03%), precisamente estas cepas son las que se procesaron por las dos técnicas de biología molecular (Hibridización en fase sólida y "PCR").

Tabla No. 15 Cepas aisladas.

Fecha de muestreo	Cepas Lactosa +	Cepas Indol +
16-08-99	36	15
24-08-99	10	1
30-08-99	34	11
06-09-99	29	7
13-09-99	42	12
20-09-99	55	12
27-09-99	23	4
04-10-99	4	1
Total	233	63
Porcentajes	100%	27.03%

5. COMPARACIÓN DE CEPAS ETEC, POSITIVAS POR LOS MÉTODOS DE HIBRIDIZACIÓN EN FASE SÓLIDA Y PCR.

Se analizaron las 63 cepas indol (+), provenientes de 34 muestras, para presencia o ausencia de los genes *lt* y *st* de patogenicidad por los métodos de Biología molecular propuestos, encontrándose que por el método de hibridación en fase sólida, se identificaron 5 cepas con el gene *st* y 10 cepas con el gene *lt*. Por el PCR se identificaron no sólo los genes *lt* y *st* de las cepas identificadas por hibridación en fase sólida, sino que se observó que las 5 cepas *st*, eran en también *st* positivas y finalmente se identificó otra cepa *st* que paso desapercibida por el método de hibridación en fase sólida, esto lo observamos junto con su procedencia, en las tablas no. 16 y 17.

Tabla no. 16.

Número de Cepa.	Muestreo Número.	Origen de la muestra y No. de Local.	Temp... en °C	pH	Gene identificado a través de: hibridación en fase sólida <i>lt</i> <i>st</i>	
26	1ero.	S. verde 9	22	5	+	+
27	1ero.	S. verde 9	22	5	+	+
28	1ero.	S. verde 9	22	5	+	+
29	1ero.	S. verde 9	22	5	+	+
30	1ero.	S. verde 9	22	5	+	+
31	1ero.	S. verde 10	22	5	+	-
32	1ero.	S. verde 10	22	5	+	-
33	1ero.	S. verde 10	22	5	+	-
34	1ero.	S. verde 10	22	5	+	-
35	1ero.	S. verde 10	22	5	+	-
287	6to.	S. verde 9	24	5	-	-

En la tabla no. 17 se observa el total de cepas ETEC positivas por PCR, así como el alimento de donde se aislaron.

Tabla no. 17.

Muestra*	Fecha de Aislamiento	Local de origen	pH	No. de cepas Positivas	Gen Identificado	Grupo de <i>E. coli</i> Patogénica	UFC/g de <i>Escherichia coli</i> .
Salsa verde	18-08-99	9	5	5/5	LT-ST	ETEC	8×10^2
Salsa Verde	18-08-99	10	4	5/5	LT-ST	ETEC	1.3×10^4
Salsa Verde	21-09-99	9	5	1/5	ST	ETEC	2.6×10^4

* Son muestras de puestos diferentes

5. COMPARACIÓN ENTRE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS.

En el caso de hibridación en fase sólida.

- La hibridación en fase sólida requiere de 72 horas para su procesamiento y análisis.
- El costo del análisis por hibridación en fase sólida por muestra, es de \$ 482.35 (ver anexo 2)
- Se requiere la utilización de una sonda específica, por cada gen que se desee identificar.

En el caso de la reacción en cadena de la polimerasa. (PCR)

- El PCR, requiere tan sólo de 24 horas para su procesamiento y análisis.
- El costo del análisis de PCR por muestra es de \$ 57.85 (ver anexo 2).
- Permite la identificación de genes múltiples, en una sola reacción.
- El PCR es una prueba más reproducible que la hibridación en fase sólida como se puede observar en la tabla no. 15 de resultados.
- El PCR, permite una identificación más rápida y eficiente, de tal forma que se pueda incidir en el diagnóstico de una enfermedad.
- Ambas técnicas requieren de personal calificado para su realización. Sin embargo tiene menos pasos la PCR, lo que la hace más fácil para entrenar al personal. (ver fotografías 1 y 2).

Marcador de peso molecular	Control (+)	Control (-)	Cepa prob no 26	Cepa prob no 29	Cepa prob no 32	Cepa prob no 35	Cepa prob no 187
	ETEC 10407						

TISEN CON FALLA DE ORIGEN

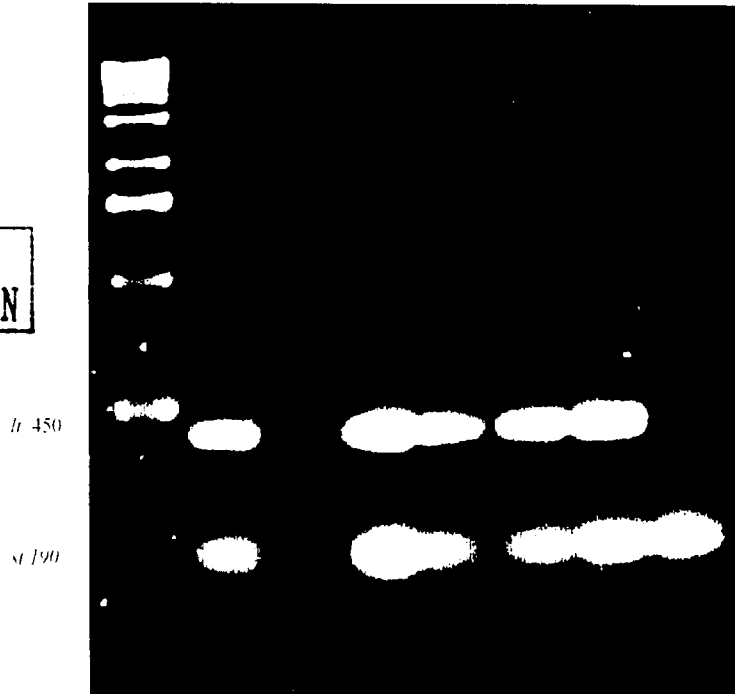


Fig. 4 En esta fotografía se muestra un gel de agarosa al 2%, en donde observamos claramente los genes de patógena identificados en 5 de las 11 cepas ETEC positivas y los controles correspondientes (+) y (-), después de ser corridos por electroforesis a 80 V, 400 mAmpers y durante 60 minutos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Membrana con sonda *st*

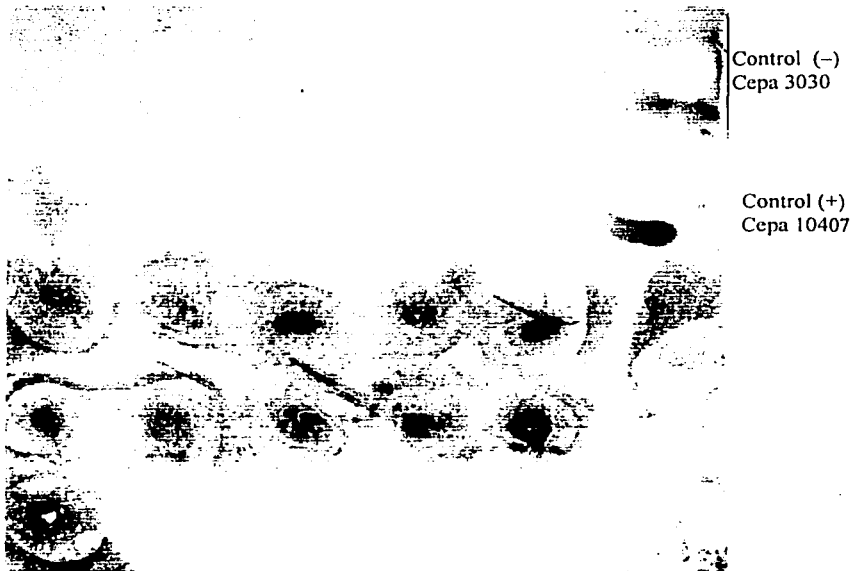


Foto no. 2 nos muestra las cepas que fueron identificadas con la sonda para los genes *It*, a través de la técnica de hibridización en fase sólida. Es importante recalcar que las marcas en ocasiones se pueden interpretar erróneamente, sobre todo lo que observamos en el margen derecho. El orden de las cepas positivas es como sigue 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35. También están el control (+), cepa 10407 y el control (-) cepa 3030.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de χ^2 de independencia, obteniéndose el siguiente valor $\chi^2_{.05, 1} = 3.84$

De los resultados obtenidos en el análisis de χ^2 , no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), lo cual indica que la presencia de los genes (*fl* y *st*), son independientes de la técnica de detección utilizada (hibridización en fase sólida o PCR)

6. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.

Se observó que los alimentos se preparan el mismo día o un día antes de la venta y no se colocan en vitrinas para su exposición, por lo que están expuestos mínimamente 8 horas, sin refrigeración, lo cual los expone a factores que permiten la posibilidad de contaminación química y la proliferación de microorganismos. (Durán y Kaufer, 1993.)

Que los puestos ambulantes y semifijos no cuentan con servicios como agua potable, de desagüe, sanitarios ni electricidad, por lo que las condiciones de almacenamiento y manipulación de alimentos no son adecuadas.

Al no haber redes de agua potable cercanas a los puestos de venta callejera, los manipuladores no cuentan con la posibilidad de lavarse las manos o de lavar sus utensilios en forma adecuada, por lo que muchas de las veces son reutilizados para agregar más alimentos sin haber sido lavados. Por otra parte que la poca agua que tienen a su disposición al ser utilizada para la higiene personal y limpieza de los utensilios, se convierte en un caldo de cultivo para las bacterias

debido a la presencia de materia orgánica, a la temperatura y al tiempo de permanencia.

También se observó que los manipuladores además de no lavarse las manos, no se cubren el cabello, no utilizan batas, o guantes para manipular, servir o cobrar los productos.

Contrario a lo que se piensa sobre este tipo de alimentos de que son de bajo costo, por lo menos en este sitio de estudio no fue así, pues una quesadilla o gordita tenían un costo de \$ 8.00 o una orden de enchiladas sin pollo \$ 15.00, un cóctel de camarón u ostión \$ 18.00 y las tlayudas \$ 12.00.

El análisis se realizó en doce puestos ambulantes semifijos (la localización se puede observar en el mapa) Encontrándose que estos puestos eran atendidos por 22 personas, en un promedio de 2 personas por puesto, de las cuales 14 eran mujeres (64%) y 8 eran varones (36%)., estos datos permiten destacar el papel preponderante de la mujer en esta actividad, y este se puede asociar a dos causas, por ser el papel tradicional de la mujer o bien porque la mujer se ha convertido en el principal sostén económico de un gran número de familias mexicanas.(Durán y Kaufer, 1993.)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Con base en los resultados obtenidos durante los 8 muestreos realizados en los alimentos vendidos en los alrededores de la Basílica de Guadalupe Cd. de México, un 37% de ellos (salsas verdes, frutas, mariscos, verduras, tortillas), se encuentran contaminados con *Escherichia coli*, lo que nos indica que el estado sanitario de dichos alimentos no es admisible (OPS, 1996) pero del 63 % restante no se puede decir que sean inocuos, sino que indica mejores condiciones. (Jay, 1991.)

Se encontró que las condiciones higiénicas en general tanto de los puestos como de los manipuladores eran inadecuadas,

Otra observación interesante es que no hay correlación entre los niveles de contaminación por *Escherichia coli* y la presencia o ausencia de ETEC (ver tablas nos. 16 y 17.) Esto toma gran importancia por ejemplo ya que aun ahora se habla de permitir ciertos niveles de contaminación fecal, tal es el caso de la leche pasteurizada, en donde el valor no debe ser mayor a 10 coliformes fecales por mililitro o que para la carne de cangrejo no deberá superar el valor de 100/g. Y nosotros encontramos que una muestra de salsa verde solo presentó 8×10^2 UFC/g pero que sin embargo todas las *Escherichia coli* aisladas de la muestra fueron ETEC positivas. Esto pone en evidencia el alto riesgo que consumir este alimento a pesar del bajo nivel de contaminación fecal. Esto es aún más claro si hacemos la consideración que nosotros observamos en este y otros estudios acerca de que una persona consume de 2 a 5 tacos y que a cada taco se le agregan de 4 a 8 ml de salsa picante. Volviendo al ejemplo de la salsa verde contaminada por ETEC

esto nos llevaría a pensar que un individuo estaría consumiendo aproximadamente 1.6×10^4 UFC/g por comida. Esto aunado al hecho de que esta bien establecido que ciertos alimentos disminuyen la dosis infectiva al menos dos logaritmos (Estrada-García y Mintz 1996), esto indica claramente el riesgo que estos alimentos implican para los consumidores. Desde el punto de vista epidemiológico es interesante mencionar que 2 de 3 de las muestras ETEC positivas fueron homo cultivos de *Escherichia coli* y provenían del mismo puesto. Esto nos indica contaminación secundaria del alimento y muy probablemente por el manipulador (Jay, 1991; OPS, 1996), aunque sería necesario haber realizado un coprocultivo del vendedor y verificar si había presencia de ETEC.

En el presente trabajo no solo se analizaron salsas, si no también otros alimentos que debido a su origen y preparación pueden representar un vehículo de ETAs. Tal es el caso de los mariscos que al comerse crudos y estar expuestos a las condiciones de la calle por al menos 8 horas representan un riesgo potencial para la salud del consumidor. A pesar de que no se encontró ETEC si se identificaron 4 de 9 muestras que presentaron crecimiento de *Escherichia coli*, con cuentas bastante elevadas, en una muestra de cóctel de camarón con ostión donde se detectó un valor de 5.8×10^5 /g (ver tabla 13.) y si recordamos que estos alimentos están altamente ligados a la infección por virus como el de la Hepatitis A o a los Calicivirus ((Blacklow, 1991), debería preocuparnos la venta de estos productos sin las medidas higiénicas necesarias para su conservación y manipulación.

Se colectaron otro tipo de alimentos cuyas cuentas de *Escherichia coli* son altas, lo que sugiere que en muestreos futuros será necesario incluir estos alimentos(frutas

y verduras crudas), en la recolección, ya que son vehículos comunes de contaminación. Pues como propone Benenson, 1995. Los alimentos contaminados, son la primera modalidad de transmisión de ETEC y este microorganismo es el principal causante de diarrea infantil (Black y col. 1990) y de la diarrea del viajero DuPont y col, 1970 y Caeiro y col, 1999).

Lo antes mencionado nos muestra el alto impacto que estos alimentos pueden tener en la salud pública, ya que la mayoría de estos son consumidos por la población del sector productivo e infantil en edad escolar, por lo que su relevancia en lo económico y en lo social no puede soslayarse puesto que ven afectada su salud y calidad de vida por el consumo de estos alimentos contaminados(OPS, 1996.)

Arduino, 1993, propuso que la diarrea del viajero es un problema de salud importante en los países desarrollados, debido a que se presentan más de 3 episodios de diarrea al día y síntomas como dolor abdominal, calambres, náusea, vómito y tenesmo, lo que provoca que las personas disminuyan su productividad. Cartwright, en 1993, propuso que la diarrea del viajero, es el problema de salud más común en los visitantes de países desarrollados que visitan países en vías de desarrollo. Se estima que al año hay aproximadamente 16 millones de turistas de países desarrollados en países en vías de desarrollo y de ellos del 30 al 50 %, llegan a presentar diarrea del viajero (Arduino, 1993). Aunque estas proporciones pueden variar según las estaciones del año, ya que ETEC, es aislada hasta en 32% en el verano y en sólo 8% en el invierno, es decir, presenta comportamiento estacional (Matilla, 1992). En México se ha observado que las diarreas en el invierno están asociadas con los Rotavirus (Velázquez, 1999).

En estudios realizados por la FAO, 1979 y por la OPS, 1996, se demostró que la venta callejera de alimentos es un problema de tipo social y de salud, para las autoridades, pero también representan parte de la economía informal, y en este estudio podemos observar que las personas que se dedican a esta actividad, sino tuvieran este trabajo, no tendrían alguno de otro tipo, por lo que se convierte en su único sostén económico.

En México se estima que existen aproximadamente 120,000 puestos callejeros de comida, y que esta actividad produce unos \$ 100 millones de pesos diarios, y que este tipo de actividad es responsable de por lo menos 6 episodios de diarrea por consumidor al año (Lomeli, 2001).

Tal vez una de las aportaciones más interesantes de este trabajo es la observación de que la morfología de algunas cepas de *Escherichia coli* aisladas de MacConkey de los alimentos, no correspondió a la definición funcional de cepas aisladas de muestras clínicas (lactosa +, de color fucsia, cóncavas y de bordes enteros.) Puesto que se observaron cepas de *Escherichia coli* cuya morfología denominamos estrellada (lactosa +, color rosado, con bordes irregulares. Esto nos lleva a pensar que al parecer *Escherichia coli*, presenta una morfología diferente dependiendo del medio en que se encuentra, algo similar a lo reportado para *Vibrio cholerae* (Singleton, 1982) de aislados ambientales comparada con la morfología de aislados clínicos. Esto adquiere especial relevancia ya que fue precisamente de una colonia estrellada de *Escherichia coli* que se detectó la presencia del gen *st* de ETEC. Esto también nos hace pensar que muy posiblemente el número de cepas de *Escherichia coli* se hayan subestimado.

El presente trabajo es sólo un estudio piloto que nos indica la importancia de encontrar técnicas de diagnóstico rápidas para la detección de cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*. Especialmente ahora con el surgimiento de nuevas cepas como las enterohemorrágicas cuyo vehículo principal de transmisión son los alimentos (Nataro y Kaper 1998).

Por otro lado el impacto de las ETAs en México se desconoce haciendo imperativo la realización de estudios epidemiológicos-microbiológicos de los alimentos en general.

Caeiro en 1998, realizó una comparación entre los métodos utilizados en este estudio para muestras clínicas y determino que el PCR es más sensible que el hibridación en fase sólida, entre otras cosas por que es posible detectar la presencia del DNA, aun en bajas cantidades, su límite de detección va desde 10 hasta 100 organismos de ETEC, además de que propone que está técnica pueda usarse como un método rutinario de diagnóstico. Nosotros también comparamos las dos técnicas de biología molecular propuestas, para identificar genes patogénicos (*lt* y *st*) de ETEC, a partir de muestras ambientales de *Escherichia coli* de alimentos. Estas técnicas fueron Colony Blot(Hibridación en fase sólida) y un PCR (Reacción en Cadena de la polimerasa) múltiplex, Una vez realizadas las dos técnicas con las mismas cepas de *Escherichia coli* fue posible compararlas. Estableciendo que la técnica de PCR, es más rápida, menos laboriosa, más reproducible y más barata que la técnica de hibridación en fase sólida El PCR múltiplex permite la identificación en una sola reacción de ambos genes, en tan sólo 24 horas, tiene un costo aproximado de \$ 50.85. Pero tal vez lo más

importante es que es más sensible, ya que identifico más genes en las mismas cepas y otras cepas negativas por el método de hibridación en fase sólida (ver resultados, tablas 16 y 17.) De tal manera que nosotros proponemos este PCR como una técnica para utilizarse para el diagnóstico de ETEC tanto de muestras de *Escherichia coli* aisladas de alimentos como de muestras clínicas (esto ya se ha demostrado en nuestro laboratorio)

Dentro de las 63 cepas *Escherichia coli*, que se lograron aislar en este proyecto se logró identificar a 21 que poseían el gen *lt* y *st* y 1 que sólo tenía el gen *st*, esto por PCR, pero el resto de las cepas aisladas podrían o no pertenecer a alguno de los otros grupos patogénicos, por lo que se propone la integración de una PCR, para los 4 grupos de *Escherichia coli* patogénicos restantes.

CONCLUSIONES.

- Se detecta *Escherichia coli*, en alimentos de venta callejera, lo que indica contaminación fecal en niveles elevados, por lo que deben ser considerados importantes vehículos de ETAs, tal es el caso de salsas verdes y los mariscos que se pueden asociar no sólo a ETEC, o a *Vibrio*, sino también a VAH (virus de la hepatitis A) y a los Calcivirus.
- Se logró la identificación de los genes *lt* y *st* que codifican para las toxinas LT y ST, en bacterias aisladas de alimentos vendidos en la vía pública.
- Se logra la comparación de las dos técnicas de Biología Molecular (hibridación en fase sólida y PCR), para la identificación de *Escherichia coli* enterotoxigénica en alimentos.
- Se encontró que la técnica de PCR, es más reproducible, más barata y más rápida que la "hibridación en fase sólida" ya que brinda resultados en tan sólo 24 horas y porque al hacerse múltiplex, permite la identificación de varios genes de patogenia en una sola reacción.
- Que las cuentas encontradas de ETEC, pueden alcanzar la dosis infectiva, en el transcurso del día ya que los alimentos no son almacenados en condiciones adecuadas y están expuestos por lo menos 8 horas, lo que permite la supervivencia y proliferación de los microorganismos.
- Si consideramos que el área seleccionada para este estudio, es un sitio de alta incidencia (se estima que es visitada por 8 millones de visitantes al año), de peregrinos nacionales y de turistas internacionales por un lado y

que la ETEC, es responsable de la llamada diarrea del viajero, los resultados de este estudio no deben dejarse pasar por alto.

RECOMENDACIONES.

- 1) Dar entrenamiento en prácticas de inocuidad de alimentos a los manipuladores.
- 2) Concentrar a los vendedores ambulantes en lugares con acceso a los servicios públicos necesarios para este comercio, esto con la finalidad de disminuir los riesgos de salud pública y sus consecuencias, en la población.
- 3) Educar a los consumidores, sobre que tipo de alimentos implican menor riesgo en su consumo y cuales implican un mayor riesgo para su salud (frutas, verduras crudas y no desinfectadas, y los mariscos " frescos").
- 4) Establecer regulación sanitaria para la venta de alimentos en la vía pública.
- 5) Dar a conocer las técnicas modernas de diagnóstico, en los laboratorios clínicos de los servicios de salud pública para que se identifique a ETEC.

BIBLIOGRAFIA.

- Arduino, R. C. and DuPont, H. L. 1993. Travelers' diarrhoea. *Baillieres Clinical Gastroenterology*. **7:365-385**
- Balows, A. W., Hausler, K. L., Hermann, H. D., Isenberg and H.J. Shadomy. 1991. Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Barrera, S., Ortiz, L., Rojas, M, Reséndez, P. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa. Una nueva época dorada en la Biología Molécula. *Ciencia Médica*. Facultad de Medicina de la UNAM. **6**.
- Benenson A.S. 1995. Control of Communicable Disease Manual. American Public Health Association.
- Benitez, O., U. F. N, N. A. y col. 1991. Etiología de la diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. *Boletín Medico Hospital Infantil de México*. **48:65-70**.
- Bettelheim, K. A. 1994. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. In C.L. Gyles ed. *Escherichia coli* in domestics animals and humans CAB International. Wallingford, United Kingdom. **3- 30**.
- Beutin, I. S. Aleksic, S. Zimmermann and Gleier, K. 1994. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from human patients in Germany. *Medical Microbiology Immunology*. Berlin **183:13-21**.
- Black, R. E., Brown, K. H., Becker, S. y col. 1982. Contamination of weaning foods and transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea in children in Bangladesh. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. **76:259-264**.
- Blacklow N:R., Greenberg, H.B. 1991, Viral Gastroenteritis. *New England Infectious Medicine*. **25:252-264**.
- Blanco, J. y González, E. A. 1985. Características de las *Escherichia coli* que causan diarrea en seres humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **3(4) 145-150**.
- Boom R., Sol, C. J., Salimans, M. M. y col. 1990. Rapid and simple method in PCR- based detection of food pathogens. *Trends in Food Science Technology* **5:384- 389**.
- Bultiaux, R. and Mossel A.A. 1961. The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water. *Journal Applied Bacteriology*. **24: 353-364**.

Caeiro, J. P. Estrada García, M. T., Jiang, Z. D., Mathewson, J. J. and DuPont, H. L. 1999. Improved detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* among patients with travelers diarrhea using by polymerase chain reaction technique.

Cartwright, R. Y. 1993. Travellers' diarrhoea. *British Medical Bulletin*. **49:348-362**.

Crane, J. K., Wehner, M. S., Bolen, J. J., Sando, J. Linden, R. L., Guerrant and Sears. S.L. 1992. Regulation of Intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (Sta) and protein kinase. *Current Infection and Immunity*. **60:5004-5012**.

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

Cravioto, A., Reyes R. E., Ortega y col 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural mexican children: Incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiology Infection*. **101:123-134**.

CEPIS. 1990. Evaluación de riesgos para la salud por el uso de las aguas residuales en la agricultura. Lima Peru. **1-32**.

DeSavauge, F. J., Horuk, J. R., Bennett, G., Quant, C. Burnier, J.P. and Goedel, D. V. 1992. Characterization of the recombinant human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Journal of Biology and Chemistry*. **267:6479-6482**.

Donta, S. T., Moon, H. W. and Whipp C.S. 1974. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cell in tissue culture. *SCIENCE* **183:334-336**.

DuPont, H. L. Formal, S. B., Hornick, R. B., Snyder, M. J., Libonati, J. P., Sheanan, D. G. LaBrec E. H. and Kalas J. P. 1971. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. England Journal Medical*. **285:1-9**.

DuPont, H. L., Ericsson, C. D., Pickering, L. K. and Sullivan, P. 1980. The role of location of food consumption in the prevention of travelers' diarrhea in México. *Gastroenterology*. **79:812-816**.

Duran V., Kaufner H.M. 1993. La venta de alimentos en la vía pública. *Cuadernos de Nutrición*. Editado por el *Instituto Nacional de Perinatología*. **21(3): 21-28**.

DuToit, R. T. Victor, C. T. and van Helden, P. D. 1993. Empirical evaluation of conditions influencing the polymerase chain reaction: enterotoxigenic *Escherichia coli* as a test case. *Europe Journal of Clinical Chemistry*. **31:225-231**.

Echeverría, P., Seriwatana, J., Leksomboon U, y col. 1984. Identification by DNA hybridisation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in homes of children with diarrhoea. 1984. *The Lancet* 63-65.

Edwards, P. R. and Ewin, W. H. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. Burgess publishing C. Minneapolis Minnesota.

Ericsson C. D., DuPont H. L. Mathewson III J.J. 1995 Epidemiologic Observations on Diarrhea Developing in U.S. and Mexican Students Living in Guadalajara México. *Journal Travel Medicine*. Mar. 1;2(1);6-10.

Ericsson C.D. Pickering L.K., Sullivan P., DuPont H. L. 1980. The role of location of food consumption in the prevention of travelers' diarrhea in México. *Gastroenterology*. Nov; 79(5 Pt 1): 812-816.

Estrada García, M. T and Mintz, E. D. Cholerae. 1996. Foodborne transmission and its prevention. *Europe Journal Epidemiology*. 12:461-469.

FAO 1979. Street- Foods. 46.

Feachem, R. G., Bradley, D. J., Garelick, H. and Mara, D. D. 1983. Sanitation and disease health aspects of excreta and wastewater management. Chichester, John Wiley and Sons. 297-325.

Gianella, R. A. Drake, K. W. and Luttrell, M. 1993. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infection and Immunity*. 14:95-99.

Giono, C., Rodríguez, A., Rodríguez, C., Valdespino, G. 1994. Identificación de enterotoxinas y Citotoxinas de *Escherichia coli* por cultivo de células Vero e hibridación en fase sólida (HIBRIDIZACIÓN EN FASE SÓLIDA). *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 36:231-241.

Guerrant, R. L., Brunton, L. L., Schnaitman, T. C., Rebhun, L. I., and Guilman, G. A. (1974) Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 10: 320-327.

Ito, T. S., Kuwahara, and Yokota. 1983. Automatic and manual latex agglutination test for measurement of cholera toxin and heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Journal Clinical Microbiology*. 17: 7-12.

Jann, k. and Hoschutsky, H. 1991. Nature and organization of adhesions. *Current Tropical Microbiology Immunology*. 151: 55-85.

Jawetz, E., Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. 1992. *Microbiología médica*. 14a. ed. Ed. *El manual moderno*. México 633.

Jay, James. M. 1991. *Microbiología moderna de los alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza , España. 319.

Katayama, S., Ninomiyan, M. y col. 1990. Transcriptional control plays an important role for the production of heat-labile enterotoxin in enterotoxigenic *Escherichia coli* of human origin. *Microbiology and Immunology*. 34: 11-24.

Lampel, K. A. ,Jagow, J. A., Trucksess, M., Hill, W.E.1990. Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. *Applied Environmental Microbiology*. 56:(6) 1536 -1540.

Lanata C.F.,J.B. Kaper, M.M. Baldini, R.E. Black and M.M. Levine. 1985. Sensitivity and specificity of DNA probes with the stool blot technique for detection of *Escherichia coli* enterotoxins. *Journal Infectious Diseases*. 152: 1087-1090.

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

Lior, H. 1996. Classification of *Escherichia coli*. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. In C. L. Gyles Ed. CAB International Wallingford, United Kingdom. 31-72.

Matilla L., Sittonen, A., Kironseppa H. y col. 1992. Seasonal variation in etiology of travellers' diarrhea. *Journal of infectious Disease*. 165: 385-388.

Mead, S. P., Slutsker, L. Vance Dietz , McCaig, F. L. ,Bresse, S. J. ,Craig Shapiro, Griffin, P. and Tauxe, V. R.1999. Food related illness and death in the United States *Emerging Infectious Diseases*. 5:(5) 606-619.

Morse, S. S. 1999. Factors in the emergence of infectious diseases. CDC, *Emerging Infectious Diseases*. 1: (2). Atlanta, GA, USA.

Moseley, S. L. Echeverria, P, Seriwatana, Trapat, W., Chaicumpa,T. Sakuldaipeara, and Falkow S. 1982. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. *Journal Infectious Diseases*.145:863-869.

Mosupye, F. M., von Holy, A.1999. Microbiological quality and safety of ready-to-eat street- vend foods in Johannesburg, South Africa. *Journal Food Prot*. 62:(11) 1278-1284.

Myron, M. L. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *The journal of Infectious Diseases*. 155:(3) 377 -389.

Nataro, J. P., and Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review*. 142: 142-201.

Olarte, J. 1985. Etiopatogenia de las diarreas infecciosas. *Boletín Médico Hospital Infantil México*. 42(1) 66-72. D.F. México.

Organización Panamericana de la Salud (OPS.) Almeida, R. C., Schuch, T. M., Gelli, S. D., Cuellar, A. J., Diez, R. A. V., Escamilla, A. J. 1996. Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública. 2-18.

Organización Panamericana de la Salud (OPS) 2001. Citado en el Boletín del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 2(18): 4. y 51(51).

Pickering, L. K. T. G. Obrig, and Stapleton, F. B. 1994. Hemolytic- uremic syndrome and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 13: 459-476.

Qadri, F. Das, S. K., Faruque, A. S., Fuchs, G. J., Albert, M. J. Sack, R. B., Svennerholm A. M. 2000. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2- year period from diarrheal patients in Bangladesh. *Journal Clinical Microbiology*. 38(1): 27-31.

Robertson, C. D., McDonel, J. L. and Dorner, F. 1985. *Escherichia coli* heat- labile enterotoxin. *Pharmacy. Ther.* 28 : 303 -339.

Rodríguez, A. M. G. 1999. I Curso básico teórico-práctico, estudio y diagnóstico molecular de *Escherichia coli*, Instituto Nacional de Diagnóstico y referencia Epidemiológicos. México. 3-20.

Savarino, S. J., Mcveigh, A., Watson, J., Molina, J., Cravioto, P., Echeverría, M., Bhan, M. M. , Levine and Fasano, A. 1996. Enteroggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal Infectious Diseases*. 173: 1019-1022 .

Sharpe, A. N., Pterkin, P. I. Malik, N. 1979. Improved detection of coliforms and *Escherichia coli* in food membrane filter method. *Applied Enviromental Microbiology*. 38(3):431-435.

Singleton L.F., Attwell R., Jangi S. and Colwell R.R., 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Applied and Enviromental Microbiology*. 44(5):1047-1058.

Stacy- Phipps, Mecca, J. J., and Weiss, J. B. 1995. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detected enterotoxigenic *Escherichia*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

coli DNA during the course of infection. *Journal Clinical Microbiology*. **33**:1054-1059.

Streadfield, S. J., Sandkvist, M., Sixma, T. K., Bagdasarian, M., Hol, W. G. J. and Hirts, T. R. 1992. Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability *in vivo*. *Proc. National Academy Science*. **89**:12140-12144.

Tehs, V. L., Ramegowda, B. and Samuel, J. E. 1994. Purified shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infection and Immunity*. **62**:5085-5094.

Teneberg, S. T. R., Iest, J. M., Payne, Angstrom and K. A. Kartsson. 1994. Comparison on the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. *Glycoconjugate. Juornal*. **11**: 533-540.

Thompson M.R., R.L. Jurdan, M.A. Luttrell, H. Brandwein, J.B. Levine and Giannella. 1986. Blinded two laboratory comparative analysis of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin production by using monoclonal antibody enzyme linked immunoabsorbent assay and gene probes. *Journal Clinical Microbiology*. **24**:753-758.

Tjoa, W. S., DuPont, H. L., Sullivan, P., Pickering, L. k., Holguin, A. H., Olarte, J. Evans, D. G. and Evans, D. J. 1977. Location of food consumption and travelers' diarrhea. *American Journal Epidemiology* **106**: 61-66.

Valdespino, G., García, G. del Río, Z. Giono, C., Salcedo, A. y Sepúlveda, A. 1994. Epidemiología y etiología de las diarreas infecciosas. El caso de México. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **36**: 307-324.

Velásquez C. R. 1999. Importancia de los agentes virales como causa de diarrea grave en los niños menores de 5 años de edad que requieren hospitalización y factores de riesgo asociados. Las múltiples facetas de la investigación en salud. *Proyectos Estratégicos del I.M.S.S.* editores García Peña M.C., Reyes Morales H. Viniegra Velásquez L. **133-153**.

Wernars, K., Delfgou, E., Soentoro, P. S. Y col. 1991. Successful approach for detection of low numbers of enterotoxigenic *Escherichia coli* in minced meat by using polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 1914-1919.

Wood, L. V., Ferguson, L. E. Hogan, P. Thurman, D. ,Morgan, R. D., DuPont, H. L. and Ericsson, D. C. 1983. Incidence of bacterial enteropathogens in food from Mexico. *Applied and Enviromental Microbiology*. 46: (2) 328-332.

Yamamoto, T. and Echeverría, P. 1996. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enetrotoxicogenic *Escherichia coli* strains pathogenic for humans. *Infection and Immunity*. 64:1441-1445.

Yolken, R. H., H. B. Greenberg, M. H. Merson, R. B. Sack and A. Z. Kapikian. 1977. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Journal Clinical Microbiology*. 5: 439-444.

ANEXOS.

ANEXO 1.

- **Hidróxido de sodio 1 N**

NaOH 40 g
Agua destilada..... 1000 ml

Preparación: Pesar 40g de hidróxido de sodio y colocar en un matraz volumétrico y complementar un volumen de 1000 ml con agua destilada.

- **Reactivo de Erlich**

p-dimetil-amino-benzaldehido..... 1 g
alcohol etílico absoluto..... 85 ml
HCL concentrado..... 20 ml

Preparación: Pesar 1 gramo de p-dimetil-amino-benzaldehido y disolver en 85 ml de alcohol etílico absoluto, agregar 20 ml de HCL concentrado.

- **Solución salina 0.85%**

NaCl..... 8.5 g
Agua destilada..... 100 ml

Preparación: pesar 8.5 g de NaCl y disolverlos en 100 ml de agua destilada, esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, conservar en refrigeración.

- **MEDIOS DE CULTIVO**

Para la preparación de los mismos se deben utilizar medios de cultivo deshidratados, de procedencia idónea, realizando la mejor uniformidad en los mismos; olor, color y consistencia.

- **Agar Nutritivo (agar para manutención de cepas.)**

Formúla:
Extracto de carne 5.0 g.
Peptona 10.0 g.
Cloruro de sodio (NaCl) 5.0 g
Agar 15.0 g.
Agua destilada 1000.0 ml

Preparación:

Pesar los ingredientes y agregar 1000ml de agua destilada fría, dejar reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta la completa disolución del medio. Distribuir volúmenes de 3.0 a 4.0 ml en tubos de (1.5 x 30mm), tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Después de esterilizar y aún caliente colocar los tubos en posición inclinada hasta que el medio solidifique, el pH final deberá ser de 7.4 ± 0.2 a 25 °C.

• MEDIOS DE IDENTIFICACION

• Medio para movilidad- indol (MIO)

Formula:

Extracto de levadura	3.0 g.
Peptona de gelatina	10.0 g.
Peptona de caseína	10.0 g.
L- ornitina	10.0 g.
Dextrosa	1.0 g.
Purpura de bromocresol	0.02 g.
Agar	2.0 g.
Agua destilada	1000 ml.

Preparación: Disolver 31g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada fría, dejar reposar por aproximadamente 15 minutos, calentar a ebullición hasta disolución completa, distribuir de 3 a 4 ml, durante 15 minutos, enfriar y dejarlos en reposo en posición vertical, conservar los tubos preparados en refrigeración de 2 a 8° C. debiendo obtenerse un pH final 6.5 a 25° C.

Usos: Esta prueba es de gran utilidad para la identificación de algunas enterobacterias. *Escherichia coli* da la prueba positiva la prueba del indol. Este método tiene las ventajas de poder observar la fermentación de la glucosa, la producción de indol, la movilidad y la descarboxilación de la ornitina.

MEDIOS DE AISLAMIENTO SELECTIVOS

- **Agar MacConkey.**

Formula:

Peptona especial	3.0 g.
Peptona de gelatina	17.0 g.
Lactosa	10.0 g.
Mezcla de sales biliares	1.5 g.
Cloruro de sodio	5.0 g.
Rojo neutro	0.03 g.
Cristal violeta	0.001 g.
Agar agar	13.5 g.
Agua destilada	1000.0 ml.

Preparación:

Pesar 50 g. De medio deshidratado y agregar 1000 ml de agua destilada fría, dejar reposar aproximadamente 15 minutos. Calentar agitando constantemente hasta su completa disolución, tapar y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Distribuir 25 ml en cajas de Petri de 120mm de diámetro, dejarlos enfriar y guardar en refrigeración de 2 a 8 °C con un pH final de 7.1 ± 0.2 a 25 °C.

Especificaciones, este es un agar selectivo, para el aislamiento de enterobacterias como Salmonella, Shigella y bacterias coliformes como Escherichia coli, a partir de heces, orina, agua y alimentos etc, según McConkey.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LA Sonda MARCADA CON DIGOXIGENINA:

Se obtiene el ácido nucleico (DNA), del microorganismo, y este se corta con enzimas de restricción como las endonucleasas, que rompen el DNA en sitios específicos de bases nucleotídicas dando como resultado pequeños fragmentos de ácido nucleico que se secuenciarán posteriormente a través de.

- 1.- La realización de una Reacción en cadena de la polimerasa.
- 2.- Se toman 10 µl del producto y diluir 1:10, este servirá como DNA molde.
- 3.- Se adicionan los cuatro nucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP.)
- 4.- Se agrega el nucleótido con la molécula reportera dUTP digoxigenina.
- 5.- Se agrega la enzima polimerizante Taq polimerasa y su regulador.
- 6.- Adicionamos los iniciadores TW 11, TW20, JW 7 y JW 14.

6.- Esta mezcla se somete a un programa de PCR, en el equipo Perkin- Elmer, con el protocolo mencionado en metodología.

CÁLCULOS PARA SOLUCIONES DE Hibridización en fase solida.

- NaOH 0.5 N

Pm= 40 g.

$$\begin{array}{r} 40\text{g} \quad \text{_____} \quad (1000 \text{ ml}) \quad \text{___} \quad 1\text{N} \\ \times \quad \text{_____} \quad (1000 \text{ ml}) \quad \text{___} \quad 0.5 \text{ N} \end{array}$$

x= 20 g.

$$\begin{array}{r} 20\text{g} \quad \text{_____} \quad (1000\text{ml}) \quad \text{___} \quad 0.5 \text{ N} \\ \text{X} \quad \text{_____} \quad (250 \text{ ml}) \quad \text{___} \quad 0.5 \text{ N} \end{array}$$

X= 5 g.

Colocar 5 g de NaOH y aforar a 250 ml, para obtener una normalidad final de 0.5N.

- Para la solución TRIS 1M pH 8.

P.M. = 121.14 g.

$$\begin{array}{r} 121.14 \text{ g} \quad \text{_____} \quad (1000 \text{ ml}) \quad \text{___} \quad 1\text{M} \\ \text{X} \quad \text{_____} \quad (250 \text{ ml}) \quad \text{___} \quad 1\text{M} \end{array}$$

X= 30.28 g

Se colocan 30.28 g de Tris base en 250 ml. de agua, para obtener una molaridad final de 1 M, y se ajusta el pH a 8 con HCl 1N.

- Solución TRIS 1M

NaCl 1.5 M.

P.M. 58.44 g NaCl.

58.44 g Tris _____ (1000ml) _____ 1M

$$X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad (250\text{ml}) \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1\text{M}$$

$$X = 14.61 \text{ g.}$$

$$14.61\text{g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad (250 \text{ ml}) \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1\text{M}$$
$$x = \underline{\hspace{2cm}} \quad (250 \text{ ml}) \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1\text{M}$$

$$x = 21.92 \text{ g.}$$

Se pesan 21.92 g y se colocan en 250 ml de agua para obtener una molaridad de 1.5 M.

Y para obtener la solución Tris 1 M- NaCl 1.5 M se pesan los 30.28 g de trisma base y 21.92 g de NaCl, posteriormente se le agregan 250 ml. De agua y se ajusta el pH con HCl 1 N.

• **Solución Salina Citratos. (SSC) 2X**

0.3 M NaCl

0.03 M Citrato de sodio.

PH 0 7.0 - 0.2

$$\text{NaCl } 58.44\text{g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \text{ ml} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1\text{M}$$

$$X = \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \text{ ml} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 0.3 \text{ M}$$

$$X = 17.53\text{g.}$$

$$17.53\text{g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \text{ ml} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 0.3 \text{ M}$$

$$x = \underline{\hspace{2cm}} \quad 250 \text{ ml} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 0.3 \text{ M}$$

$$x = 4.38 \text{ g de NaCl y } 2.2 \text{ g de Citrato de Sodio a pH } 7.0 \pm 0.2$$

Peso molecular del citrato de sodio.

$$294.10 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \text{ ml} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad (1\text{M})$$

$$x = \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \text{ ml} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad (1\text{M})$$

$$x = 8.82 \text{ g}$$

$$8.82\text{g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \text{ ml} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 0.03 \text{ M}$$

$$x = \underline{\hspace{2cm}} \quad 250 \text{ ml} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 0.03 \text{ M.}$$

x = 2.20 g de Citrato de sodio, se mezclan los reactivos y se agregan 250 ml de agua y se ajusta el pH a 7.0 ± 0.2 con HCl 1 N

- **Solución de Prehibridación.**

SSC 5X

0.75 M de NaCl

0.75 M Cit Na. pH 7.0 ± 2.0

10.9 g de NaCl

5.5 g de Citrato de Na.

pH 7.0 ± 2.0

- **Reactivo Bloqueador** (Albumina sérica bovina 1 % o leche en polvo al 5%).

2.5g ____ 250 ml

N- Laurilsarcosina 0.1 %

0.25g ____ 250 ml

- **SDS al 0.2 %**

0.05 g ____ 250 ml

- **Solución de Lavado.**

SSC 1X

0.15 M NaCl =

2.19g NaCl.

0.015 m Cit Na =

1.10g Cit Na.

pH 7.0 ± 2.0

pH 7.0 ± 2.0

- **Solución A:**

- TRIS 100 Mm pH = 7.5

- P.M. 121.14g

- 121.14g ____ 1000 ml ____ 1M

- X = ____ 250 ml ____ 1 M

- X = 30.28 g

•

- 30.28 g ____ 250 ml ____ 1000 mM

x = ____ 250 ml ____ 1000 mM.

X = 3.02g en 250 ml en una concentración final de 100 mM.

- NaCl 150 mM

$$58.44 \text{ g} \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ mM}$$

$$x = \frac{\quad}{\quad} 250 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ mM}$$

$$x = 14.61 \text{ g}$$

$$14.61 \text{ g} \frac{\quad}{\quad} 250 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ mM}$$

$$x = \frac{\quad}{\quad} 250 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 150 \text{ mM}$$

$$x = 2.19 \text{ g}$$

Colocar 2.19g en 250 ml para obtener una concentración final de 150 mM.

- Solución B.

12.5 g de leche descremada.

- Solución C

TRIS 100mM pH= 9.5

3.02g $\frac{\quad}{\quad}$ 250 ml.

NaCl 100mM

$$58.44 \text{ g} \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ mM}$$

$$x = \frac{\quad}{\quad} 250 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ mM}$$

$$x = 14.61$$

$$14.61 \text{ g} \frac{\quad}{\quad} 250 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 1000 \text{ mM}$$

$$x = \frac{\quad}{\quad} 250 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 100 \text{ mM}$$

x = 1.46 g en 250 ml para una concentración final de 100 mM

MgCl₂ 50 mM

P.M: 203.31g

203.31g $\frac{\quad}{\quad}$ 1000 ml (1M)

$$x = \frac{\quad}{\quad} 250 \text{ ml} (1 \text{ M})$$

$$x = 50.82 \text{ g}$$

50.82 g $\frac{\quad}{\quad}$ 250ml $\frac{\quad}{\quad}$ 1000 mM

$$x = \frac{\quad}{\quad} 250 \text{ ml} \frac{\quad}{\quad} 50 \text{ mM}$$

$$x = 2.54 \text{ g}$$

- **SSC BUFFER 20X POWDER.**

175.2g NaCl.
88.2g Citrato de sodio.

Para 1 lt. A pH 7.6 ± 0.3

- **SSC BUFFER 1X**

Cada litro contiene 0.15 M NaCl
0.015 M de Citrato de sodio.
pH 7.0 ± 2.0

- **SSC 20X concentrado.**

Cada litro contiene 3.0 M de NaCl.
0.3 M de Citrato de sodio.
pH 7.0 ± 2.0

1.5 M de NaCl.
0.15 M de Citrato de Sodio.
pH 7.0 ± 2.0

- **SSC 20 X**

Cada bote contiene 3.0 M de NaCl
0.3 M de Citrato de sodio
pH 7.0 ± 2.0.

ANEXO 2.

El laboratorio deberá contar con el siguiente material.

- Asa bacteriológica.
- Cajas de Petri.
- Cajas de almacenamiento de criotubos.
- Criobiales.
- Encendedor.
- Espátula de vidrio.
- Gradillas.
- Marcador indeleble.
- Matraces erlenmeyer.
- Mecheros.
- Papel indicador o papel pH.
- Pipeta Pasteur.
- Puntas para pipeta de diferentes volúmenes.
- Tubos Eppendorf.
- Tubos para PCR.
- Viales para cepas.
- Vasos de precipitados.

El laboratorio deberá contar con el siguiente Equipo:

- Campana o Gabinete de Seguridad biológica.
- Incubadora.
- Micropipetas mecánicas de diferentes volúmenes.
- Platina de alta temperatura.
- Cámara de electroforesis.
- Fuente de poder de 80 v, 400 mAmp.
- Baño de agua.
- Termociclador.
- Gene linker.
- Transiluminador
- Refrigerador.
- Agitador vortex.
- Balanza semianalítica.

- Cepas certificadas o ATCC de interés

Reactivos para la prueba de Colony Blot.

Tabla no. 18

Nombre del reactivo	Marca utilizada	Contenido Neto.	Precio	Cantidad Utilizada.	Costo Unitario.
Medio TSA	Bioxon	500 g.	\$ 462.37	3g- 100ml	\$ 2.77
Membrana de naylon N	Naylon Bond - N	0.300m x 3m.	\$ 1576.79	0.066 m.	\$ 11.56
Hidróxido de Sodio NaOH	JTBacker	500 g	\$ 117.00	5 g	\$ 1.17
Dodecil sulfato de sodio SDS	Kr	100 g	\$ 437.60	0.30g	\$ 1.32
Papel filtro #1	Wathman	46 x 57cms.	\$ 99.66	15 x 20cms.	\$ 11.40
Tris ultrapuro	USB	500 g	\$ 576.90	60.68 g	\$ 79.15
Cloruro de sodio NaCl	JTBacker	500 g	\$ 92.65	11.12 g	\$ 2.06
Citrato de sodio	JTBacker	500g	\$148.00	8.80 g	\$ 2.60
Albumina sérica bovina	Free K.R.	10 g	\$ 1153.91	1.0 g	\$ 115.39
N-Lauril sarcosina	Sigma	50 g	\$ 240.00	0.05 g	\$ 0.24
Iniciadores LT Tw 20	Gibco	20 bases	\$ 220.80	0.2 µl	\$ 0.09
LT Tw 11	Gibco	20 bases	\$ 220.80	0.2 µl	\$ 0.07
Iniciadores ST Jw 14	Gibco	23 bases	\$ 253.92	0.2 µl	\$ 0.08
ST Jw 7	Gibco	20 bases	\$ 220.80	0.2 µl	\$ 0.08
dNTPs	Gibco	320 µl	\$2,605.44	4.0 µl	\$ 2.08
Taq polimerasa	Boehringer Mannheim	250U/ 50µl 10X/ 1ml.	\$1,269.60	0.1 µl	\$ 2.53
Dogoxigenina	Lackeside	25 µl	\$ 1,702.94	1.5µl	\$ 102.17
Leche des-Cremada.	Sveeltes	360 g	\$ 36.50	12.5 g	\$ 1.27
Antidogoxigenina.	Lackeside AP.	25 µl	\$ 1,749.83	1.5µl	\$ 104.99
MgCl ₂	JT Backer	500 g	\$ 362.00	2.54 g	\$ 1.84
NBT/ BCIP Combo	Lackeside	2 ml/2 ml	\$ 799.65	45µl /35µl 80 µl	\$ 31.99
Total					

En esta tabla observamos los reactivos y las proporciones utilizadas, para la realización del Colony Blot, así como su costo.

Reactivos para la prueba de PCR.

Tabla no. 19

Nombre del reactivo	Marca Utilizada	Contenido Neto.	Precio	Cantidad Utilizada.	Costo Unitario.
Iniciador LT Tw 20	Gibco	20 bases	\$ 220.80	2.0 μ l	\$ 0.010
Iniciador LT Tw 11	Gibco	20 bases	\$ 220.80	2.0 μ l	\$ 0.072
Iniciador ST Jw 14	Gibco	23 bases	\$ 253.92	2.0 μ l	\$ 0.080
Iniciador ST Jw 7	Gibco	20 bases	\$ 220.80	2.0 μ l	\$ 0.080
Taq polimerasa Regulador	Boehringer Mannheim	250U/ 50 μ l	\$6,519.92	0.1 μ l	\$13.04
dNTP's(dTTP, dATP, dGTP, dCTP).	Gibco	10X/ 1ml. 320 μ l	\$ 2,605.44	4 μ l	\$10.43
Agua	Milli- Q			6.3 μ l	
Agarosa TAE 1X	Gibco	100 g 1000 ml	\$ 576.90 \$ 500.00	0.40 g 100 ml	\$ 2.307 \$ 50.00
Bromuro de Etidio	Gibco	10ml(10mg/ml)	\$ 3,450.00	2 μ l	\$ 0.69
Marcadores de PM.	Gibco	1 Kb.	\$ 2000.00	2 μ l	\$ 0.002
Total.					\$ 57.85

En esta tabla observamos los reactivos y las proporciones utilizadas, para la realización de la PCR, así como su costo.

Todas las diluciones y mezclas de reacción se llevaron a cabo con agua Milli Q.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cálculos :

Para los dNTP's.

Cada dNTP contiene 320 μl en [10mM] cada uno
[3.2 U μmol] \rightarrow 10 U μmol
dilución
3.2 U μmol \rightarrow 1 ml

3.2 μmol en mmol \approx 100 mMolar
1 μl \rightarrow 9 μl es decir, 1:10

10 mM cada uno

125 μl dATP

125 μl dCTP

125 μl dGTP

125 μl dTTP

500 μl dNTP's

500 μl agua

1000 μl ó 1ml \rightarrow 250 reacciones

x \leftarrow 1 reacción

x = 250 reacciones \rightarrow \$ 2605.44

1 reacción \rightarrow x

x = \$ 10.43

cada dNTP tenía una concentración final de 1.25 mM, equivalente a 1x.

4 μl \rightarrow 25 μl \rightarrow [200 μM]

16 μl \rightarrow 100 μl \rightarrow [200 μM]

4 μl \rightarrow 25 μl \rightarrow x = 200 μM

- Taq Polimerasa contiene 5 unidades por μl

5 U $>$ 1.0 μl

x = $<$ 0.1 μl

x = 0.5 unidades de Taq polimerasa. \rightarrow

Mi tubo tiene 50 μl

50 μl $>$ \$ 6,519.92

0.1 μl $>$ x = \$ 13.04

Debo mencionar que el kit de la Taq incluye el regulador o buffer y el Cloruro de magnesio por el mismo precio y sólo se anotan aquí para señalar la concentración de los mismos.

Regulador o Buffer

2.5 μl \rightarrow 25 μl
con dilución final 1:10.

Cloruro de magnesio

50 mM \rightarrow 1 μl

$x = \leftarrow$ 25 μl

$x = 2 \text{ mM}$ entonces la concentración final del cloruro de magnesio es de 2 mM .

Nombre	Disuelto en	Dilución	Volumen	# de reacciones
LT TW 20	488 μl 100 μM	1:10	4880/ 2	2240
LT TW 11	605 μl 100 μM	1:10	6050/ 2	3025
ST JW 14	633 μl 100 μM	1:10	6330/ 2	3165
ST JW 07	558 μl 100 μM	1:10	5580/ 2	2790

Cálculos para resuspender iniciadores marca Gibco.

Una vez resuspendidos, se utilizarán en una dilución 1:10 por lo tanto se tomará un volumen de 100 μl por iniciador y se diluirán en 800 μl de agua Milli Q para cada gene de interés.

ETEC {

- LT_TW 11 \rightarrow 48.8 nmol por lo tanto 0.488 ml de agua
- TW 20 \rightarrow 60.5 nmol por lo tanto 0.605 ml de agua
- ST_JW 07 \rightarrow 6.33nmol por lo tanto 0.633 ml de agua
- JW 14 \rightarrow 5.58nmol por lo tanto 0.558 ml de agua

LT

TW 11: 48.8 nmol \rightarrow 1 l equivale a 48.8 nM
48.8 nmol \rightarrow 1 ml equivalente a [48.8 μM]

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(48.8 \mu\text{M}) (1 \text{ ml}) = (100 \mu\text{M}) (x)$$

$$V_2 \text{ ó } \chi = \frac{(48.8 \mu\text{M})(1 \text{ ml})}{100 \mu\text{M}} = 0.488 \text{ ml} \text{ resuspender en } 0.488 \text{ ml}$$

Tw 20

$$60.5 \text{ nmol} \longrightarrow 1 \text{ lt}$$

$$60.5 \text{ nmol} \longrightarrow 1 \text{ ml equivalente a } [60.5 \mu\text{M}]$$

entonces:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(60.5 \mu\text{M})(1 \text{ ml}) = (100 \mu\text{M})(\chi)$$

$$\chi = \frac{(60.5 \mu\text{M})(1 \text{ ml})}{100 \mu\text{M}} = 0.605 \text{ ml} \quad V_2 = 0.605 \text{ ml, resuspender en } 0.605 \text{ ml}$$

ST

JW 14

$$63.3 \text{ nmol} \longrightarrow 1 \text{ lt}$$

$$63.3 \text{ nmol} \longrightarrow 1 \text{ ml equivalente a } [63.3 \mu\text{M}]$$

entonces:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(63.3 \mu\text{M})(1 \text{ ml}) = (100 \mu\text{M})(\chi)$$

$$\chi = \frac{(63.3 \mu\text{M})(1 \text{ ml})}{100 \mu\text{M}} = 0.633 \text{ ml} \quad V_2 = 0.633 \text{ ml} \text{ resuspender en } 0.633 \text{ ml}$$

JW 14

$$55.8 \text{ nmol} \longrightarrow 1 \text{ lt}$$

$$55.8 \text{ nmol} \longrightarrow 1 \text{ ml equivalente a } [55.8 \mu\text{M}]$$

entonces:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$(55.8 \mu\text{M})(1 \text{ ml}) = (100 \mu\text{M})(\chi)$$

$$\chi = \frac{(55.8 \mu\text{M})(1 \text{ ml})}{100 \mu\text{M}} = 0.558 \text{ ml} \quad V_2 = 0.558 \text{ ml}$$

Todas las mezclas de reacción se realizan con agua milli Q estéril.