

10 00346



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

## FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS PATOGENICO Y MOLECULAR DE  
*Escherichia coli* AEROSOLIZADA DE  
SISTEMAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS  
RESIDUALES DE LA CIUDAD DE MÉXICO

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA CELULAR)  
P R E S E N T A:  
Q.F.B. HILDA ALICIA VALDEZ SALAZAR

DIRECTORES DE TESIS:  
DR. JOSÉ ANTONIO ENCISO MORENO  
DRA. IRMA AURORA ROSAS PÉREZ

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

Mayo, 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**La realización de este trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por la dirección General de Apoyo para el Personal Académico (DGAPA-IN204396)**

# AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del jurado:

Dra. Irma Aurora Rosas Pérez,  
Dr. José Antonio Enciso Moreno  
Dr. Edmundo Calva Mercado  
M. en C. Carlos Alberto Eslava Campos  
Dr. María Teresa Estrada García  
Dr. José Luis Puente García  
M. en C. María Eva Salinas Cortés

Por el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis, así como por sus valiosas contribuciones y enseñanzas, las cuales sin duda contribuyeron a mejorar la calidad de este trabajo. En especial a la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez, al Dr. José Antonio Enciso y al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos, por ser miembros del comité tutorial.

## **Al Dr. José Antonio Enciso Moreno.**

Por compartir tus conocimientos y tu gran ayuda en la realización de esta tesis.

## **A la Dra. Irma Aurora Rosas Pérez.**

Por toda la confianza, dedicación y paciencia que siempre me ha brindado. Por darme la oportunidad de trabajar a su lado y sobre todo por enseñarme a ser más crítica, contagiarme su interés por descubrir nuevas cosas y realizarlas de la mejor manera posible.

## **Al Dr. Carlos Eslava Campos.**

Por brindarme la oportunidad de realizar parte del trabajo en su laboratorio (Salud Pública, UNAM). Por su valiosa asesoría durante la revisión de este trabajo y sobre todo por su confianza y amistad.

## **A la M. en C. Eva Salinas Cortés**

Por tu gran ayuda en la realización de todo el trabajo experimental, por todos los conocimientos compartidos, por tu enseñanza y sobre todo, por tu apoyo constante y facilidades para la realización del mismo.

## **Al M. en C. Armando Navarro**

Por su valiosa ayuda en la serotipificación de las cepas, ya que sin su gran experiencia y conocimientos, hubiera sido más difícil.

## **Al Dr. Javier Torres López**

Por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis. Además por permitirme realizar este trabajo en la Unidad de Investigación a su cargo.

## **Al Dr. Raúl Ulloa Arvizu**

Por tu gran ayuda y apoyo en el aspecto estadístico de la tesis, ya que sin duda eres un experto en este campo; por todos tus conocimientos, por ser una persona muy linda y sobre todo por permitirme ser tu amiga.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que me hacen sentir fuerte.

# ÍNDICE

Resumen	a
Índice de tablas	b
Índice de figuras	d
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	1
Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	14
<b>2.- ANTECEDENTES</b>	
<b>3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	19
<b>4.- JUSTIFICACIÓN</b>	20
<b>5.- OBJETIVOS</b>	21
<b>6.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	22
Recolección, aislamiento e identificación de <i>E. coli</i>	22
Análisis de la susceptibilidad a antibióticos	22
Caracterización serológica	23
Identificación del serotipo	25
Hibridación mediante <i>colony blot</i>	26
Extracción de DNA genómico	29
Extracción de DNA de plásmidos	31
Elaboración de Dendrogramas de los perfiles de plásmidos	32
Amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD)	32
Elaboración de Dendrogramas de los perfiles RAPD	33
<b>7.- RESULTADOS</b>	34
Identificación de <i>E. coli</i>	34
Hibridación	36
Perfil de plásmidos	38
Análisis genotípico	43
<b>8.- DISCUSIÓN</b>	51
<b>9.- CONCLUSIONES</b>	57
<b>10.- BIBLIOGRAFÍA</b>	58

## RESUMEN

*Escherichia coli* es uno de los microorganismos más estudiados. Sin embargo, la existencia de este microorganismo en el ambiente (agua, aire, suelo) es un hecho al que no se le ha prestado la debida atención. Esto se debe parcialmente al desconocimiento de la capacidad que posee *E. coli* para sobrevivir en situación de estrés. Así, los objetivos de este estudio fueron aislar y caracterizar aislados de *E. coli* presentes en el agua y aire de una planta de tratamiento de la Ciudad de México, mediante serología, susceptibilidad a antibióticos, perfil de plásmidos, RAPD-PCR e hibridación de DNA-DNA. Se estudiaron 189 aislados de *E. coli* de diferentes épocas del año, para colectar las aerobacterias se utilizó un muestreador de partículas viables Andersen. Se analizó la susceptibilidad a antibióticos y el serotipo, empleando 175 antisueros. Se identificaron algunos factores de patogenicidad de los aislados por hibridación en colonia ("colony blot") incluyendo 12 cepas de referencia. El análisis genotípico de los aislados se realizó por RAPD, empleando 2 iniciadores, L1: 5'GTGCAATGAC3' y ER4: 5'GGTCGACGCG3'. Las cepas se agruparon en un dendrograma de acuerdo al índice de similitud de los patrones de bandas amplificadas por RAPD-PCR. Se recuperaron 108 aislados de *E. coli* del aire y 81 del agua proveniente de los lodos activados de la planta. De éstas, 13% fue resistente a ampicilina, ticarcilina y piperacilina, y 12% a trimetoprim/sulfametoxazol. El 6.9% correspondió a cepas de ETEC, 4.2% a EIEC, 2.1% a EPEC y 1.5% de cepas a EAEC. De las cepas resistentes a uno o más antibióticos se aislaron de uno a 18 plásmidos de diferente tamaño molecular (menos de 1Kb a más de 21 Kb). Se obtuvieron 4 grupos de los aislados mediante RAPD-PCR. Algunas cepas aisladas poseen factores de patogenicidad y son resistentes a los principales antibióticos empleados en la clínica por lo que pueden tener importancia en Salud Pública. Esto sugiere que un gran número de aislados de *E. coli* pueden estar ampliamente distribuidos en el ambiente de la Ciudad de México y estos presentar un alto grado de clonalidad.

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Serotipos característicos de las diferentes categorías de <i>E. coli</i> productoras de diarrea.	2
<b>Tabla 2</b>	Otros serogrupos de <i>E. coli</i> considerados enteropatógenos.	3
<b>Tabla 3</b>	Concentraciones de los antibióticos empleadas para determinar la susceptibilidad de los microorganismos Gram (-) mediante al prueba de UNICEPT KB/TYPE 2.	24
<b>Tabla 4</b>	Sondas de oligonucleótidos empleadas para identificar factores de patogenicidad en las cepas de <i>E. coli</i> , mediante hibridación DNA-DNA.	28
<b>Tabla 5</b>	Número de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de muestras de agua y aire en una planta de tratamiento de aguas residuales de la Ciudad de México.	34
<b>Tabla 6</b>	Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos de cepas de <i>E. coli</i> aisladas del aire y agua en dos épocas del año.	34
<b>Tabla 7</b>	Serotipos de <i>E. coli</i> aislados del aire y agua en una planta de tratamiento de aguas residuales de la Ciudad de México.	35
<b>Tabla 8</b>	Serotipos de <i>E. coli</i> aislados del aire y agua asociados a cepas patógenas previamente reportados.	35
<b>Tabla 9</b>	Serogrupos identificados en las cepas de <i>E. coli</i> aisladas del aire y agua.	36
<b>Tabla 10</b>	Análisis densitométrico de una autorradiografía de la hibridación mediante colony blot con la sonda de DNA STH <sup>32</sup> P.	37
<b>Tabla 11</b>	Grupos de <i>E. coli</i> enteropatógenos.	38
<b>Tabla 12</b>	Tamaño de los plásmidos observados en cepas de <i>E. coli</i> aisladas del aire y agua.	39
<b>Tabla 13</b>	Número de plásmidos que presentaron los diferentes aislamientos de <i>E. coli</i>	39
<b>Tabla 14</b>	Patrones de bandas obtenidos mediante RAPD de las diferentes <i>E. coli</i> aisladas del aire y agua de una planta de tratamiento de aguas residuales de la Ciudad de México.	46
<b>Tabla 15</b>	Asociación de la hibridación con sondas específicas para los grupos	47



patogénicos de *E. coli* con el perfil de bandas de RAPD.

**Tabla 16** Clonalidad de cepas de *E. coli* observadas por sus características de tipificación compartidas. 49

**Tabla 17** Hallazgos de clonas con características de tipificación iguales o similares en el agua y aire de la planta de tratamiento de aguas de la Ciudad de México. 50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Autorradiografía de un filtro Whatman 541 con colonias de <i>E. coli</i> , después de la hibridación mediante <i>colony blot</i> con la sonda de DNA STH <sup>32</sup> P.	37
<b>Figura 2</b>	Patrón de bandas de los plásmidos de las cepas ETEC obtenidas en una planta de tratamiento de la Ciudad de México.	40
<b>Figura 3</b>	Patrón de bandas de los plásmidos de las cepas EIEC y EPEC obtenidas en una planta de tratamiento de la Ciudad de México.	41
<b>Figura 4</b>	Patrón de bandas de los plásmidos de cepas de referencia.	42
<b>Figura 5</b>	Dendrograma de la asociación del perfil de los plásmidos obtenidos de <i>E. coli</i> patógenas de una planta de tratamiento de aguas.	42
<b>Figura 6</b>	Análisis de los patrones de amplificación por RAPD-PCR de las cepas ETEC obtenidas en el agua y en el ambiente de una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de México.	43
<b>Figura 7</b>	Análisis de los patrones de amplificación por RAPD-PCR de las cepas EIEC obtenidas en el agua y aire en la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de México.	44
<b>Figura 8</b>	Análisis de los patrones de amplificación por RAPD-PCR de diferentes cepas de referencia de <i>E. coli</i> .	45
<b>Figura 9</b>	Dendrograma de la asociación de diferentes aislados de <i>E. coli</i> obtenidos de muestras aisladas del aire y agua en una planta de tratamiento de aguas residuales de la Ciudad de México.	48

## 1. INTRODUCCION.

La familia *Enterobacteriaceae* incluye bacterias de los géneros *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Laclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pragia*, *Xenorhabdus*, *Yersinia* y *Yokenella* (Farmer, 1995).

Dado que la distribución de las enterobacterias es amplia, pueden ser localizadas en plantas, suelo y agua, y de forma natural en intestino humano y en otras especies de animales (Schoolnik, 1993; Farmer, 1995).

Los miembros de esta familia son bacilos Gram-negativos, móviles o inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos que crecen en medios con diferentes nutrientes y en medios selectivos. Fermentan la glucosa produciendo ácido y gas, con algunas excepciones, como es el caso de *Shigella*, que son anaerogénicas.

La tribu *Escherichia* incluye los géneros *Escherichia* y *Shigella*, los que a su vez están integrados por varias especies. *Escherichia coli* es la especie más común del género; ésta bacteria, durante el proceso evolutivo, se adaptó a vivir en diferentes hospederos con los que estableció un estado de comensalismo casi perfecto. Estas bacterias que habitan en el intestino, sólo ocasionan enfermedad cuando salen de su hábitat natural ó en estado de inmunodeficiencia del paciente.

Sin embargo, en los últimos años, se ha podido establecer que además de las cepas de *E. coli* que habitan en el tracto digestivo, existen clonas que en el proceso evolutivo han presentado cambios genéticos relacionados con la transferencia horizontal de genes, que originan que éstas se comporten como patógenos naturales, causantes de diferentes síndromes clínicos.

Hasta el momento, se han descrito 6 grupos de *E. coli* causantes de diarrea: enterotoxigénico (ETEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasivo (EIEC), enteropatógeno (EPEC), enteroagregativas (EAEC) y el enterodifuso (EDEC) (Gray, 1995).

Algunos serotipos específicos han podido ser asociados frecuentemente con ciertos grupos específicos de *E. coli* (tabla 1 y 2). Sin embargo, se han descrito a la fecha un total de 170 antígenos O, cada uno definiendo un serogrupo. (Nataro *et al.*, 1998).

Tabla 1: Serotipos característicos de las diferentes categorías de *E. coli* productoras de diarrea.

Categoría	Serogrupo	Antígeno (s) H asociado
ETEC	O6	H16
	O8	H9
	O11	H27
	O15	H11
	O20	NM
	O25	H42, NM
	O27	H7
	O78	H11, H12
	O128	H7
	O148	H28
	O149	H10
	O159	H20
	O173	NM
	EPEC	O55
O86		H34, NM
O111		H2, H12, NM
O119		H6, NM
O125ac		H21
O126		H27, NM
O127		H6, NM
O128		H2, H12
EHEC	O142	H6
	O26	H11, H32, NM
	O55	H7
	O111ab	H8, NM
	O113	H21
	O117	H14
EAEC	O157	H7
	O3	H2
	O15	H18
	O44	H18
	O86	NM
	O77	H18
	O111	H21
	O127	H2
EIEC	O <sup>9</sup>	H10
	O28ac	NM
	O29	NM
	O112ac	NM
	O124	H30, NM
	O136	NM
	O143	NM
	O144	NM
	O152	NM
	O159	H2, NM
	O164	NM
O167	H4, H5, NM	

\* O antígeno no tipificable por métodos convencionales

Tomada de Nataro *et al.*, 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*  
Clinical Microbiology Review 11(1):142-20

Tabla 2: Otros serogrupos de *E. coli* considerados enteropatógenos.

Categoría	Sero-grupo
ETEC	O26
EIEC	O42
	O173
EIEC	O68
	O77
	O114
	O115
	O126
	O139
	O153
	O167
EHEC	O4
	O45
	O128
	O145

Margall *et al.*, 1997 *Escherichia coli* enterohemorrágica.  
Rev Esp Salud Pública 71 (5):437-443.

El término de *E. coli* enteropatógena (EPEC), acuñado por Neter *et al.* (1950), se propuso para diferenciar a éstas bacterias causantes de diarrea, del grupo de *E. coli* pertenecientes a la microbiota intestinal. En la época de los 50, en estudios con voluntarios humanos adultos, se demostró que la ingestión de estas bacterias causaba diarrea severa. Koya *et al.* (1954), señalaron que la diarrea en estos voluntarios, sólo se presentaba cuando los individuos eran inoculados por vía oral y las bacterias colonizaban las primeras porciones del intestino delgado. En los años 60's, se identificaron cepas de *E. coli* que elaboraban una toxina semejante a la de *Vibrio cholerae* O1. El grupo enteropatógeno, a diferencia de estas cepas de *E. coli* denominadas enterotoxigénicas, no tenían la capacidad para producir toxinas (Levine *et al.*, 1978), por lo que surgió nuevamente la duda de su participación como patógenos causantes de diarrea en humanos. Tuvieron que pasar más de 10 años para poderse conocer los mecanismos de patogenicidad de las cepas EPEC.

La patogenicidad de EPEC radica principalmente en su capacidad de adherencia íntima a células de la mucosa intestinal y a la destrucción de las microvellosidades del intestino delgado (Knutton *et al.*, 1987; Cravioto *et al.*, 1979). Posteriormente, la importancia de la adherencia en la patogénesis de EPEC fue determinada por estudios con voluntarios. El suero de los voluntarios retados con una cepa EPEC, reaccionó con

una proteína de membrana externa de la bacteria de 94 kDa (Levine *et al.*, 1988), la cual fue relacionada con un plásmido llamado EAF (factor de unión y esfacelamiento). (Jerse *et al.*, 1991-1).

Se sugiere que la adherencia de EPEC se presenta inicialmente como un evento de acercamiento y acumulación de las bacterias a las células epiteliales. Este proceso inicial se lleva a cabo por haces de fimbrias denominadas BFP (Giron *et al.*, 1991; Soheli *et al.*, 1993). Una vez formadas las micro-colonias, se presentan re-arreglos en el citoesqueleto, caracterizado por la formación de acúmulos de actina polimerizada y enseguida comienza la segunda fase, donde la bacteria secreta e inyecta el receptor (Tir) a la célula, para que con la proteína de 94 kDa (intimina) se realice la adherencia íntima.

Diferentes observaciones han conducido a proponer que las alteraciones observadas en células epiteliales, infectadas con cepas EPEC, se deben a un evento de fosforilación de proteínas a través del sistema de la proteína cinasa C (PKC); con lo que se eleva el calcio intracelular con incremento de la salida de agua, cloro y potasio de la célula intestinal. Este incremento de secreción, unido a la disminución de la capacidad de absorción del intestino por falta de microvellosidades, conduce a la diarrea severa observada en los niños infectados por este grupo de bacterias.

Epidemiológicamente, la diarrea producida por EPEC se presenta como una enfermedad en niños menores de 2 años. En la actualidad, los casos de diarrea por cepas EPEC en países industrializados son poco frecuentes (Levine *et al.*, 1984). En los países en desarrollo, la incidencia de diarrea en niños menores de dos años por EPEC sigue siendo alta. Diferentes estudios realizados en México, Brasil y África del Sur, refieren que entre el 30 y 40 % de los casos de diarrea pueden ser atribuidos a EPEC. En México, Cravioto *et al.* (1988, 1991-1), encontraron a EPEC como uno de los diversos agentes causales de diarrea. Las cepas aisladas mostraron asociación entre el patrón de adherencia localizada, con los casos de diarrea aguda.

Como en el caso de otras enterobacterias, la transmisión de EPEC se realiza por la ruta oral-fecal, a través de las manos contaminadas, alimentación materna o fórmula poco higiénica, o por fomites que funcionan como vehículos transmisores. Rosas *et al.* (1997), aislaron de muestras de polvo y aire, cepas de los diferentes grupos de *E. coli*

causante de diarrea. Lo anterior sugiere la participación del aire en la transmisión directa por inhalación, seguida de la ingestión ó indirectamente por contaminación de alimentos o fomites.

En la búsqueda de vacunas, Cravioto *et al.* (1991-2), observaron que la inmunoglobulina A de tipo secretor (sIgA), presente en el calostro y leche de mujeres mexicanas, reconoce la PME de 94 kDa. También encontraron que estos anticuerpos son capaces de inhibir la adherencia localizada de cepas EPEC de diferente serotipo. La leche materna también contenía oligosacáridos de cinco residuos (pentasacáridos) y moléculas de lactosa con dos residuos de fucosa (difucosil-lactosa), capaces de inhibir la adherencia localizada.

En otro estudio (Loureiro *et al.*, 1998), se demostró la presencia de anticuerpos del tipo IgG contra BfpA y EspB como los más comunes, seguidos por anticuerpos anti íntimina y anti EspA. La lesión de adherencia y esfacelamiento se atribuye a la íntimina y a las proteínas secretadas EspA, EspB y EspD.

Manjarres *et al.* (1997, 2000), identificaron proteínas del borde en cepillo de células de intestino humano de 32 y 33 kDa, a las cuales se adhieren cepas de *E. coli*. La habilidad de las cepas EPEC con adherencia localizada para unirse a dichas proteínas, fue de 6 a 7 veces mayor, que las cepas no EPEC con adherencia difusa. Experimentos con células HEp-2, demostraron que las proteínas de 32 y 33 kDa o el antisuero específico, inhibían la adherencia de *E. coli* con un patrón localizado; por lo anterior, dichas proteínas podrían considerarse como candidatos para el desarrollo de vacunas recombinantes, con las cuales se proteja contra la colonización de la bacteria.

El grupo enterohemorrágico de *E. coli* (EHEC) (Levine, 1987), incluye, además del serotipo O157:H7, cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas. EHEC se ha asociado con la etiopatogenia de colitis hemorrágica (CH) y con el síndrome urémico hemolítico (SUH). Las cepas causantes de estos cuadros tienen la capacidad para producir una o más citotoxinas: Stx1 y Stx2 (Scotland *et al.*, 1985).

Los genes que codifican para Stx1 y Stx2 en EHEC, se encuentran localizados en bacteriófagos tipo  $\lambda$  en estado lisogénico (Scotland *et al.*, 1983; O'Brien *et al.*, 1984; Smith *et al.*, 1984; Eslava *et al.*, 1990).

La patogenicidad de este grupo se ha atribuido principalmente a la toxina Stx, la cual tiene una estructura AB<sub>5</sub>; la subunidad B tiene actividad de N-glicosidasa y escinde un residuo de adenina localizada a 376 nucleótidos del extremo 3' de la subunidad 28S del RNA ribosomal (rRNA) (Stein *et al.*, 1992). Esta despurinación tiene como resultado la inhibición de la síntesis de proteínas (Saxena *et al.*, 1989), que da como consecuencia la muerte celular. En general, las células que se ven dañadas por el efecto de esta toxina, son aquellas que poseen los receptores Gb<sub>3</sub> o Gb<sub>4</sub> (globotriasil o tetraosil cerámidas), como es el caso de las células del endotelio renal y de las líneas celulares Vero y Hela. Stx2 es la citotoxina que principalmente se ha relacionado con las alteraciones clínicas ocasionadas por EHEC (colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico) (Pierard *et al.*, 1991).

La adherencia y destrucción (A/E) del epitelio intestinal, es otro de los mecanismos de virulencia de EHEC. En este evento participan tanto genes cromosomales como plasmídicos (Donneberg *et al.*, 1991; Jerse *et al.*, 1991-2), que inducen y/o regulan la expresión de factores de virulencia de la bacteria. Los genes responsables del daño celular A/E, están insertados en una isla de patogenicidad de 35 kilobases (kb), llamada locus de esfacelamiento del enterocito (LEE), la cual incluye los dominios de la íntimina, el sistema de secreción tipo III y las proteínas ESP de secreción (Mc Daniel *et al.*, 1995). En el primer dominio se encuentra el gen *eae* que codifica para la íntimina, la proteína de membrana externa de 94 kDa que participa en el evento de adherencia íntima y destrucción de las microvellosidades (Jerse *et al.*, 1990). En este dominio, se encuentran además los genes para la síntesis del receptor translocado de la íntimina (Tir). El segundo dominio, es el sistema de secreción tipo III cuyos genes se conocen como *sep* y *esc*. Estos genes codifican para varias proteínas que comparten homología con proteínas del sistema de secreción tipo III de otras bacterias como *Salmonella*, *Yersinia* y *Shigella*. El tercer dominio corresponde a las proteínas de secreción (Esp, proteínas de *E. coli*) en estas proteínas se incluyen EspA (24-25 kDa),



EspB (37 kDa) y EspD (39kDa); los genes para esta última proteína se han reportado tanto en EPEC, como en cepas de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 (Jarvis *et al.*, 1996; Ebel *et al.*, 1996).

Desde el punto de vista epidemiológico, diferentes serotipos de EHEC se han relacionado con varias etiologías tales como diarrea esporádica en adultos, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico en niños y púrpura trombocitopénica. Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países con climas templados, como los Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Argentina, Alemania y, en Japón (Riley *et al.*, 1983; Takeda, 1997).

En México, se han observado que este tipo de microorganismos sólo se relaciona con diarrea de tipo secretor leve o moderada (Cravioto *et al.*, 1988). Los serogrupos O111 y O26, identificados en México son los mismos que se han observado en otras partes del mundo. Hasta el momento no existen reportes de cuadros de colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico en nuestro país, que se hayan relacionado con el aislamiento de *E. coli* O157:H7 o algún otro serotipo EHEC. Sin embargo, cepas de *E. coli* O157 no móviles o con antígeno flagelar diferente a H7, han sido aisladas de humanos (Cravioto *et al.*, 1990; Navarro *et al.*, 2000), animales, e incluso de polvo (Rosas *et al.*, 1997). Una revisión de 7200 cultivos de *E. coli* (Navarro *et al.*, 2000), demostró que sólo 33 cepas presentaban el serogrupo O157, de las cuales 26 eran O157:NM, 4 O157:H10 y una cepa era de cada uno de los serotipos O157:H28, O157:H51 y O157:H42.

Analizando la respuesta inmune de EHEC, se han realizado diferentes estudios donde se identifican que infecciones por cepas de EHEC O157:H7 y de otros serogrupos que inducen la formación de anticuerpos neutralizantes (Nabs), contra las verotoxinas y anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS) de la bacteria (Chart *et al.*, 1991; 1999). Resultados similares se han observado en pacientes con SUH que producen títulos elevados de IgM contra el LPS O157 (Chart *et al.*, 1989) y proteínas de membrana externa, pero no contra el flagelo bacteriano o contra LPS diferentes a O157. Otros estudios demuestran la producción de anticuerpos neutralizantes del tipo IgM, IgG e

IgA, contra las verotoxinas, y anticuerpos IgM e IgG contra el LPS de la bacteria (Greatorex *et al.*, 1994).

Hasta el momento no existe un sistema de prevención específico contra la infección por *E. coli* O157, o por alguno de los otros serogrupos EHEC. Sin embargo, se ha reportado que existe protección por anticuerpos contra *E. coli* O157, en población que radica en áreas endémicas.

Las cepas enteroagregativas de *Escherichia coli* (EAEC), derivan su nombre por su patrón de adherencia que presentan a células HEp-2 en cultivo (Nataro *et al.*, 1987-1). La adherencia agregativa, ésta íntimamente relacionada con la presencia de un plásmido de 65 mDa (Nataro *et al.*, 1987-2). Para el mecanismo de daño ocasionado por la infección por EAEC, se ha propuesto un modelo de tres fases: en la primera, se considera que se presenta un evento de adherencia inicial a la mucosa intestinal y/o a la capa de moco, por medio de fimbrias presentes en la bacteria; en la segunda, se presenta gran liberación de moco formando una biopelícula, en la cual se envuelven las bacterias, lo que conduce probablemente a la persistencia del proceso y origina problemas de mala absorción. Por último, la producción de toxinas y la aparición de una respuesta de tipo inflamatorio, que da lugar a que se altere la mucosa y se presente la secreción intestinal.

Las características clínicas de la infección intestinal por EAEC son una diarrea secretora acuosa con moco, fiebre en bajo grado y vómito ocasional (Bhan *et al.*, 1989; Paul *et al.*, 1994). La presencia de sangre en heces, se ha observado en una tercera parte de los pacientes relacionados con diarrea por EAEC (Baqui *et al.*, 1992).

La adherencia de tipo agregativo ha sido asociada con un plásmido de 65 mDa (Vial *et al.*, 1988; Nataro *et al.*, 1985); éste codifica para diferentes haces de fimbrias (AAF/I y AAF/II) (Nataro *et al.*, 1993). AAF/I media la adherencia a células HEp-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos. La estructura fimbrial AAF/II es el hallazgo más reciente y su estructura es distinta pero relacionada a AAF/I (Czeczulin *et al.*, 1997). En un estudio en el que se emplearon sondas de DNA, que reconocían los genes de ambas fimbrias, se encontró que éstas estaban presentes sólo en una minoría de cepas EAEC, lo que sugiere que la colonización intestinal por EAEC puede ser mediada por diferentes antígenos fimbriales.

Knutton *et al.* (1992) han sugerido que es la expresión de cuatro estructuras fimbriales, con las que las cepas EAEC se adhieren a la mucosa del colon humano, en ensayos *in vitro*. Esto contrasta con lo observado en cepas EPEC (Mathewson *et al.*, 1987), las cuales no se unen íntimamente a la membrana de la célula.

Dedroy *et al.* (1995), han sugerido que una PME no fimbriada puede ser la responsable del fenotipo de adherencia agregativa. Wai *et al.* (1996), describieron una PME de 38 kDa en cepas EAEC, con propiedades hidrofóbicas que pueden estar participando en agregación bacteriana, favoreciendo la colonización de grandes extensiones del epitelio intestinal.

También se ha sugerido que algunas cepas EAEC pueden invadir el epitelio intestinal (Benjamín *et al.*, 1995). Sin embargo, el análisis de muestras de intestino humano no ha permitido demostrar que EAEC se internalice (Hicks *et al.*, 1996) y las evidencias clínicas para demostrar la invasión no están bien fundamentadas.

Savarino *et al.* (1991; 1993), identificaron una toxina termoestable de aproximadamente 10 kDa, la cual denominaron enterotoxina termoestable 1 de EAEC (EAST1). El gen que codifica para esta proteína (*astA*), está localizado en el plásmido de 65 mDa. La EAST1, al igual que la toxina termoestable de ETEC, incrementa los niveles de GMPc.

En la década de los años 90, Baldwin *et al.* (1992) identificaron, en diferentes cepas de EAEC, una proteína de 120-140 kDa que reaccionaba con anticuerpos preparados contra la porción carboxilo terminal (RTX), de la hemolisina alfa producida por *E. coli*. Esta proteína, al ser probada sobre células HEp-2 en cultivo, incrementó los niveles de calcio intracelular y eventos de fosforilación de proteínas. Eslava *et al.* (1993), identificaron dos proteínas de alto peso molecular en cepas de EAEC, aisladas de niños que murieron a consecuencia de la diarrea persistente, ocasionada por estas bacterias. Posteriormente, se determinó que el gen que codifica para una de las toxinas, está localizado en el plásmido de 65 mDa presente en EAEC. El gen se clonó, y con la secuencia (Eslava *et al.*, 1998) obtenida se estableció que era una proteína de 104 kDa. Tanto a la proteína como al gen se les denominó Pet (por las siglas en inglés de "Plasmid-Encoded Toxin"). El gen de la otra proteína identificada por Eslava *et al.*

(1998) se localiza en el cromosoma de EAEC y es compartido con cepas de *Shigella flexneri*. Este gen también fue clonado y secuenciado (Henderson *et al.*, 1999), resultando corresponder a una proteína de 116kDa denominada Pic (“Protein Involved in intestinal Colonization”).

Ambas toxinas son miembros de la familia de las proteínas autotransportadoras tipo IV, que se caracterizan por presentar un motivo de serina proteasa, tanto por sus secuencias de aminoácidos y de bases, así como por su sitio activo. Pet y Pic han sido incluidas dentro de una subfamilia denominada SPATE (“*Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae*”). Pet incrementa la liberación de moco, exfoliación de células y la formación de abscesos en las criptas (Hicks *et al.*, 1996); en células HEp-2 y HT29 C<sub>1</sub>, en cultivo, tratadas con esta toxina, se indujeron efectos sobre el citoesqueleto, que se caracterizaron por el redondeamiento de las células, alteración del contacto celular focal que conduce a su desprendimiento de la preparación, sin afectar de manera ostensible su viabilidad. (Navarro *et al.*, 1998). Con respecto a Pic, se ha demostrado que posee actividad de mucinasa, resistencia al suero y capacidad hemaglutinante (Henderson *et al.*, 1999).

En México, en el Instituto Nacional de Pediatría, se presentaron dos brotes de diarrea que afectaron a 127 niños internados en la sala de nutrición: cinco de los niños murieron a consecuencia del padecimiento (Eslava *et al.*, 1993-3). En ambos brotes, cepas EAEC fueron aisladas de las heces de los niños: en el primer brote, el serotipo identificado fue O?:H10 y del segundo, la bacteria se tipificó con el serotipo O44:H18, mismo que en otros estudios se considera dentro del grupo enteroagregativo (Scotlan *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1994). En otro estudio se asoció al serotipo O?:H10 (Itoh *et al.*, 1997), con un brote de diarrea que afectó 2,697 niños de 16 escuelas en Gifu, Japón, debido al parecer al consumo de alimentos escolares contaminados.

Hasta el momento, no existe un sistema de prevención específico contra la infección por EAEC. Como posibles candidatos, se han propuesto cepas recombinantes que expresan alguna de las fimbrias que se han identificado en este grupo de bacterias, pero faltan estudios en modelos de animales o con voluntarios humanos, que demuestren su efectividad.

El grupo de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), se caracteriza por incluir cepas que producen alguna o los dos tipos de enterotoxinas llamadas termoestable (ST) o termolábil (LT). La enfermedad producida por ETEC es de inicio rápido con un corto período de incubación; la diarrea es líquida abundante, sin sangre, moco o pus y la fiebre o el vómito se pueden presentar en un pequeño número de casos. Aunque de forma general la diarrea ocasionada por las cepas ETEC es poco severa, de corta duración y autolimitada, en algunos casos puede resultar como un cuadro severo parecido a una infección por *Vibrio cholera* 01.

Este grupo de bacterias afecta principalmente niños menores de 5 años residentes de países en vías de desarrollo y adultos de países industrializados que viajan a estos lugares. Este último hecho fue la razón por la que se le conoce como diarrea del viajero. Estudios epidemiológicos han mostrado que los vehículos de transmisión de ETEC son agua y alimentos contaminados. Su patogenicidad se relaciona con la producción de las enterotoxinas que elabora la bacteria. La toxina termolabil (LT) es semejante en estructura y función a la toxina causante del cólera (CT) producida por *Vibrio cholerae* 01. La toxina LT es dimerica con una subunidad B pentamérica, responsable de la unión del enterocito. La otra subunidad, conocida como A, es la que posee actividad enzimática específicamente en la fracción A<sub>1</sub>, la cual induce un evento de ADP-ribosilación. Durante este proceso esta toxina, transfiere una molécula de ADP-ribosa del NAD a la sub-unidad alfa de la proteína G<sub>s</sub> (proteína que acopla GTP), estimulando la actividad de la adenilato ciclasa y ocasionando que se mantenga permanentemente activada. Esto tiene como consecuencia un incremento de los niveles intracelulares del AMP cíclico (AMPC). Por lo que la proteína cinasa dependiente de AMPC (cinasa A), es activada ocasionando la fosforilación de los canales de cloro localizados en las membranas de las células epiteliales. Por efecto de dicho proceso, se estimula la secreción de iones Cl<sup>-</sup> por las criptas, y se inhibe la absorción del NaCl por las vellosidades de las células, el resultado final es la presencia de una diarrea osmótica.

Recientemente, se ha mencionado que tanto la LT como CT, pueden inducir la secreción de líquidos, al activar la síntesis y liberación de metabolitos del ácido

araquidónico, como es el caso de prostaglandinas y leucotrienos que estimulan el transporte de electrolitos y movilidad intestinal (Nataro *et al.*, 1998).

Con respecto a la enterotoxina termo-estable (ST), se conocen dos clases no relacionadas de STs que difieren tanto en su estructura como en su mecanismo de acción. Los genes que codifican para la expresión de ambas, se encuentran en plásmidos, aunque también se ha identificado que alguna de ellas se presentan en transposones. La enterotoxina STa, descrita también como ST-1, es producida tanto por cepas ETEC como por otras bacterias Gram-negativas. Sin embargo, STb, la otra variedad de estas enterotoxinas, sólo es producida por cepas ETEC.

El blanco celular de STa es la enzima guanilato ciclasa C (GC-C) que se localiza en la membrana apical de las células del epitelio intestinal. La guanilina es un péptido de aproximadamente 15 aminoácidos que contiene cuatro cisteínas que también activa GC-C. Se considera que este péptido, participa de manera normal en la homeostasis intestinal y que de manera oportunista, STa utiliza GC-C para causar diarrea. La unión de STa a GC-C estimula la actividad de GC, ocasionando consecuentemente un incremento en los niveles intracelulares de GMPc. Esta activación estimula la secreción del cloro y/o la inhibición de la absorción de cloruro de sodio cuyo resultado es la secreción de líquido intestinal (Sprangler, 1992).

La enterotoxina STb se ha relacionado principalmente con cepas ETEC aisladas de cerdos, aunque se ha identificado también en cepas de origen humano. La molécula STb es una proteína de 48 aminoácidos y peso molecular de 5.1 kDa, ocasiona alteraciones histológicas que se caracterizan por pérdidas y atrofia parcial de las vellosidades del epitelio intestinal. STb estimula la secreción de bicarbonato de las células intestinales e incrementa los niveles de calcio intracelular, a partir de fuentes extracelulares, y también estimula la liberación de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) (Fujii *et al.*, 1995; Hitotsubashi *et al.*, 1992).

Como todos los patógenos, para que ETEC cause diarrea requiere primero colonizar el epitelio intestinal. La adherencia a los enterocitos, la realiza a través de estructuras antigénicas fimbriales de superficie denominadas factores de colonización (Cassels *et al.*, 1995).

Las cepas ETEC que causan enfermedad en humanos, presentan factores de colonización específicos conocidos como CFA (“Colonization Factor Antigen”). Los estudios epidemiológicos muestran que casi el 75% de las cepas ETEC de origen humano expresan CFA/I, CFA/II, CFA/IV (Wolf, 1997). En 1994 se describió un factor de colonización denominado *longus*, el cual ha sido identificado en un gran número de cepas ETEC aisladas de humano. Los genes que codifican para los CFAs se localizan en plásmidos, los cuales también codifican para las enterotóxicas ST y/o LT. (Girón *et al.*, 1991).

El grupo enterotoxigénico de *E. coli* está relacionado principalmente con diarrea en niños pequeños de países en desarrollo y con diarrea llamada del viajero. Un aspecto que se considera importante, en los países en donde la diarrea por ETEC es endémica, es la alta prevalencia de este grupo de bacterias en el ambiente. Lo anterior, se ha relacionado con la eliminación de grandes cantidades de cepas ETEC, por las heces de individuos portadores sanos. La existencia de éstos portadores sanos, se debe probablemente, a la inmunidad en mucosas que han desarrollado desde épocas tempranas de la vida. La mayoría de los estudios epidemiológicos han concluido que el agua y alimentos contaminados por ETEC (Quintino, 1995), son los principales vehículos implicados en la transmisión de éste patógeno (Long *et al.*, 1994).

Para la identificación de este grupo de bacterias, se han utilizado ensayos *in vivo* como es el caso de asas ligadas en diferentes animales para la detección de cepas productoras de LT. Para las cepas ST se utilizaba el modelo de ratón lactante. Los procedimientos inmunológicos, como el radioinmunoensayo y el método de ELISA, así como el empleo de cultivos de células CHO (Ovario de Hamster Chino) o Vero (Riñón de mono verde africano), también fueron utilizados para la identificación de ETEC.

## 2. ANTECEDENTES

La Ciudad de México es una de las más densamente pobladas del mundo (Escurrea *et al.*, 1996). Debido a esto, enfrenta problemas importantes de sanidad como lo son la colección y disposición de desechos sólidos y el tratamiento de aguas residuales (Rosas *et al.*, 1997). A diferencia de los países industrializados que cuentan con una economía sólida, para los países menos desarrollados la solución a estos problemas es cada vez más difícil, ya que la demanda de servicios generalmente excede la tasa de crecimiento económico (Salinas, 1998).

Como consecuencia en las deficiencias sanitarias, los microorganismos patógenos proliferan (Lacey, 1989; Rosas *et al.*, 1996), y pueden ser liberados a la atmósfera, ya sea por la erosión del viento, la turbulencia del flujo de aire, la actividad vehicular, el diseño y construcción de plantas de tratamiento de aguas residuales, los procesos industriales (especialmente aquellos que involucran animales y sus productos), así como por la industrialización de la agricultura (Rosas *et al.*, 1994).

La contaminación de lechos acuíferos es importante porque la mayoría de las infecciones gastrointestinales son frecuentemente causadas por patógenos flotantes en agua (Kramer *et al.*, 1996), como lo son ríos y lagos, los cuales son fuentes importantes de consumo de agua. En las ciudades de países industrializados, las aguas residuales son usualmente usadas bajo la regulación de las autoridades de Salud Pública. Esto no ocurre en ciudades de países subdesarrollados, donde las aguas negras contaminadas con gran cantidad de microorganismos son vertidas directamente a lagos, estanques y ríos, lo que origina que se conviertan en fuente importante para la diseminación de enfermedades diarreicas (Craun, 1988; Fogarty *et al.*, 1995).

Anteriormente, se consideraba que cuando las bacterias enteropatógenas se encontraban en el ambiente, sólo eran capaces de sobrevivir en sistemas de agua dulce y/o en los alimentos. Se consideraba que la mayoría de las bacterias provenientes del desagüe de los grandes núcleos poblacionales, que eran descargadas en los mares o aquellas presentes en suelo por el fecalismo al aire libre, morían rápidamente por el estrés osmótico al que están sujetas (Rosas *et al.*, 1994).



En la actualidad estas ideas están siendo modificadas, ya que existe evidencia de la capacidad osmorreguladora de algunas bacterias, como es el caso de *E. coli* (Gauthier *et al.*, 1990). Lo anterior, pone de manifiesto que es necesario manejar una información científica sólida que permita mejorar los reglamentos sanitarios, con base en una mejor caracterización del riesgo de contaminación por bacterias en el ambiente (Rosas *et al.*, 1994).

La aerosolización puede causar estrés en las poblaciones bacterianas. La sobrevivencia de las bacterias bajo estas condiciones, está influenciada por situaciones como el crecimiento previo, o factores ambientales como la temperatura y la humedad (Marthi *et al.*, 1990).

Experimentos con bacterias de los géneros *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Klebsiella planticola*, y *Pseudomonas syringae*, demuestran que cuando estos organismos son sometidos a condiciones similares de aerosolización, presentan diferente capacidad de sobrevivencia durante éste proceso (Marthi *et al.*, 1990).

Desde el punto de vista de Salud Pública, la presencia de bacterias entéricas en agua de mar es de gran interés. Es por ello, que la sobrevivencia de patógenos entéricos en ambientes estuarinos y marinos, ha sido objeto de estudios extensos, durante casi cien años. Con estos estudios, se ha asumido que existen factores químicos, físicos y biológicos que influyen en la declinación y desaparición de bacterias patógenas en agua del mar (Gholl *et al.*, 1990).

Sin embargo, también se ha observado que las bacterias estresadas sobreviven por largos períodos de tiempo en el agua de mar, lo que sugiere que éstas entran en un estado de latencia, durante el cual permanecen viables y virulentas (Gholl *et al.*, 1990). Diferentes trabajos han mostrado que *E. coli* sobrevive durante más tiempo en los sedimentos estuarinos que en agua de mar; esto se ha atribuido principalmente al mayor contenido de materia orgánica en el sedimento que en el agua de mar (Gholl *et al.*, 1990).

La sedimentación se considera como un factor importante en la dispersión de las bacterias en el agua de mar. Sin embargo, para nuestro conocimiento, no se ha presentado información sobre la capacidad de *E. coli* o de otras bacterias para sobrevivir

al estrés osmótico causado por la alta salinidad en agua de mar. Se ha sugerido que sustancias osmoprotectoras, principalmente betainas, tienen un papel importante en el crecimiento de *Enterobacterias*. Así, por ejemplo, cepas de *E. coli* crecidas en sedimentos marinos estériles resisten el estrés salino por la acumulación y concentración de glicina-betaina de los sedimentos (Gholl *et al.*, 1990).

Con relación al estrés ambiental, *E. coli* requiere de respuestas adaptativas para la sobrevivencia a largo término, las cuales están controladas por genes reguladores especiales (por ejemplo *rpoS* [*kat F*]), que regula un número de genes involucrados en la sobrevivencia bajo condiciones desfavorables (Ohno *et al.*, 1997).

A pesar de los avances en este tema, existe muy poca información de las especies y de las concentraciones de las bacterias en el aire de las casas (Hunter *et al.*, 1994). En Australia, (Godish *et al.*, 1993) identificaron bastones Gram-positivos (incluyendo *Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*) en el 57 % de las bacterias identificadas de muestras aire de 40 casas examinadas. También se identificaron cocos Gram (+) (*Mycrococcus* y *Staphylococcus*), *actinomycetes* y formadores de esporas), en proporciones del 22, 9 y 6% de las bacterias. Por otro lado, sólo se observaron bacilos Gram-negativos en el 5% de las colonias identificadas en el mismo estudio (Hunter *et al.*, 1994). En un estudio realizado en el centro y sur de la ciudad de México (Rosas *et al.*, 1994), se identificaron niveles de hasta 12 UFC/m<sup>3</sup> al sur, incrementándose hasta 76 UFC/m<sup>3</sup> en el centro. En cuanto a bacterias totales, los niveles fueron de hasta 3.0x10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup> y 4.4x10<sup>3</sup> UFC/m<sup>3</sup>, en el centro y sur de la Ciudad de México, respectivamente.

En otro estudio del aire urbano de la ciudad de México (Rosas *et al.*, 1994), la mayoría de las bacterias identificadas correspondió a *E. coli* (>14%), seguido por otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Serratia spp.* (más del 12%), *Enterobacter spp.* (10%), *Hafnia spp.* (6%), *Proteus spp.* (4%) y bacterias de la familia *Enterococci*: *Streptococcus feacalis* (10%). Algo importante de notar, es que las concentraciones de bacterias obtenidas, fueron extremadamente variables en todo el estudio (14-2999 UFC/m<sup>3</sup>). En cuanto a su asociación con partículas, el 37 % del total de las bacterias fue obtenido de fracciones de partículas pequeñas (<4.7µm), siendo en este caso del 9% para bacterias coliformes (Rosas *et al.*, 1994).

De los estudios de Rosas y colaboradores se pone de manifiesto, la presencia de materia fecal en la atmósfera, particularmente por el hecho de haber identificado *E. coli* y estreptococos fecales. Con relación a la época del año, la concentración total de bacterias fue más alta en la época de secas que en la de lluvias. Esto correlaciona con los datos de infecciones gastrointestinales, ya que los casos de diarrea de etiología bacteriana registrados en la ciudad de México (Boletín Epidemiológico de SSA, 1991), se presentan en su mayoría durante la época de secas, por lo que se tiene un patrón estacional bien definido.

En estudios realizados en otros países subdesarrollados como Bolivia, también se han aislado cepas de *E. coli* del ambiente. En cuatro muestreos realizados se aislaron nueve cepas de *E. coli* patógenas: 5 del grupo enterotoxigénicas (ETEC), 2 enteropatógenas (EPEC) y 2 enteroinvasivas (EIEC), así como tres cepas de *Salmonella* serotipo O4. En conjunto con estos resultados, se encontró que el río de la Paz, Bolivia, está altamente contaminado con *E. coli* y con *Salmonella spp.* (Ohno *et al.*, 1997) y con cepas con una alta tasa de resistencia a diferentes agentes antimicrobianos (Ohno *et al.*, 1997).

Existen estudios donde se demuestra que la dispersión de bacterias contenidas en aerosoles de aguas negras (aerosolizadas) puede ser peligrosa, tanto para los trabajadores de las plantas de tratamiento, como para personas expuestas a estos aerosoles. Sin embargo, no existe consistencia en los datos epidemiológicos, por lo que hay razones para cuestionar la relación entre la exposición a estos aerosoles y la producción de enfermedad (Cronholm, 1980).

En estudios recientes, se determinó que en ambientes ocupacionales, se presentan concentraciones mayores de  $1 \times 10^3$  bacterias Gram-negativas/m<sup>3</sup>, lo cual puede causar efectos dañinos a los trabajadores por inflamación de las mucosas, principalmente por el contenido de más de  $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de endotoxinas (Rosas *et al.*, 1994).

En general, los microorganismos viables del aire no se contemplan como contaminantes del aire; sin embargo, la presencia de organismos patógenos debe ser considerada como un factor que afecta la calidad del aire, ya que la inhalación de

aerosoles microbianos induce una variedad de reacciones asociadas con enfermedad (Rosas *et al.*, 1994).

Las enfermedades diarréicas son de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Snyder *et al.*, 1982) en niños, causando una muerte estimada de 4 millones por año. En particular, la desnutrición provocada por este proceso, tendrá un efecto directo en la demora del crecimiento y en el desarrollo infantil (Laney *et al.*, 1993). En Bolivia, la muerte por enfermedades diarréicas, en niños menores de cinco años, alcanza valores de hasta 15,000 muertes por año. Esta tasa de mortalidad es extremadamente alta, comparada con países desarrollados, como en EU donde sólo ocurren 500 muertes por diarrea por año (Utsunomiya *et al.*, 1995).

En un estudio de los ambientes intramuros en la ciudad de México, se aislaron *E. coli* patógenas del aire, aún cuando, con anterioridad, sólo se había reportado la presencia de cepas patógenas en ambientes en los cuales se había demostrado la contaminación con materia fecal, humana o animal (Rosas *et al.*, 1997). No obstante, la mayoría de los serotipos bacterianos obtenidos en este estudio, pertenecieron a la microbiota autóctona del intestino humano, también se aislaron cepas de *E. coli* de serotipos patógenos como O20:H, O28:H-, O86:H34, O127:H9 y O142:H34; cabe aclarar que todos estos serotipos pertenecían a los grupos patógenos ya descritos (Law, 1994).

Además, al relacionar la presencia de plásmidos con la resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* ambientales, se encontró que las cepas resistentes presentaron un mayor número de bandas de plásmidos con respecto a las cepas sensibles, con predominancia de resistencia a trimetoprim y tetraciclina (Rosas *et al.*, 1997).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*E. coli* es una bacteria que presenta diferentes facetas, una de ellas es su interacción con el hospedero, constituyendo parte de la microbiota intestinal. Estas clonas de *E. coli* que establecen un estado de simbiosis estricta pueden, bajo situaciones particulares (inmunodepresión, malos hábitos de higiene, iatrogenia etc.), ocasionar enfermedad, principalmente cuando salen del intestino, su hábitat natural.

En los años 40 del siglo pasado, se logró establecer que existen algunas cepas de *E. coli* capaces de producir enfermedad intestinal. Asimismo, en los últimos 60 años, ha sido posible establecer que existen por lo menos cinco grupos de *E. coli* causantes de diarrea, donde cada grupo presenta mecanismos de patogenicidad particulares, relacionados con tipos patogénicos específicos, y tienen características y una distribución epidemiológica diferente. Las características de los grupos diarreogénicos de *E. coli*, se ha adquirido a través de aceptar material genético de forma horizontal. *E. coli*, al igual que otros patógenos causantes de enfermedad intestinal, son transmitidos por el agua y los alimentos contaminados con material fecal. La presencia de *E. coli* también se ha demostrado en el polvo, tanto de intramuros como extramuros, lo que plantea la interrogante de la existencia de clonas ambientales de *E. coli* (Rosas *et al*, 1997). Ante esta interrogante, surge la necesidad de elucidar si las cepas aisladas en el ambiente, presentan un comportamiento fenotípico y genotípico particular, o se trata en realidad de las clonas causantes de enfermedad que son capaces de resistir los cambios ambientales y pueden utilizar diferentes vehículos para llegar a su hospedero.

## 4. JUSTIFICACION

La existencia de bacterias patógenas en el ambiente (agua, aire, suelo), es un hecho al que no se le ha prestado la debida atención dentro del campo de la salud pública. Lo anterior, en gran medida se debe al desconocimiento que existe sobre la capacidad que estos microorganismos tienen para sobrevivir en situaciones de “estrés” ambiental (Marthi *et al.*, 1990). Así también, se conoce muy poco de la influencia del ambiente sobre la inducción de patogenicidad en bacterias.

Debido al potencial infeccioso de las cepas de *E. coli* causantes de diarrea en el hombre, resulta importante evaluar si el ambiente influye sobre sus características patogénicas y sobre su capacidad para sobrevivir en situaciones de estrés. El conocimiento de la influencia del ambiente en las propiedades de virulencia de *E. coli* permitirá establecer estrategias que permitan realizar la prevención y el control de enfermedades.

Se seleccionó una planta de tratamiento, con la idea de obtener información sobre la presencia de *E. coli* patógenas en las heces de miles de habitantes de la Ciudad de México y de esta manera conocer la incidencia de éste patógeno y el riesgo que implicaría la utilización de aguas crudas en riego.

## 5. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

1) Caracterización de cepas de *E. coli* presentes en el aire y en aguas residuales de una planta de tratamiento de la ciudad de México.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1) Aislamiento e identificación de cepas de *E. coli* del agua y en aerosoles presentes en una planta de tratamiento de aguas residuales de la Ciudad de México.

2) Establecimiento de los perfiles de resistencia a antibióticos de los aislados recuperados.

3) Identificación de los factores de patogenicidad presentes en los aislados de *E. coli*, mediante hibridación DNA-DNA, empleando sondas específicas para ETEC, EHEC, EIEC, EPEC y EAEC.

4) Caracterización genotípica por medio de RAPD-PCR, de los diferentes aislados de *E. coli* y la obtención de dendrogramas de asociación entre las cepas de *E. coli* aisladas de agua y aire.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### **Recolección, aislamiento e identificación de *E. coli*.**

Se realizaron cuatro muestreos en la planta de tratamiento de aguas residuales “Cerro de la Estrella”, ubicada en Iztapalapa en la Ciudad de México, durante el período comprendido de 1996 a 1997, incluyendo la época de lluvias (Agosto-October) y la de secas (Febrero-Abril).

La toma de muestras de aire se realizó empleando impactadores de cascada para partículas viables de 6 etapas (Andersen Sampler Inc., 1984), los cuales se colocaron en torres de aluminio a una altura de 2 metros sobre el nivel del suelo, manteniendo un flujo constante de aire de 28.3 l/min (1 pie<sup>3</sup>/min), durante 15 min. Como medios de impactación para las bacterias mesófilas cultivables, se usó el agar de soya y tripticaseína (TSA; Difco Laboratories, Detroit, Mich.) adicionado con 0.05 g/l de cicloheximida (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo), como inhibidor del crecimiento de hongos. Para el desarrollo de las bacterias Gram-negativas, se empleó el agar de bilis rojo violeta (ABRV, Becton Dickinson, México).

La toma de muestras de agua se realizó obteniendo directamente del contenedor de lodos activados 3 muestras de 500 ml cada una. El análisis de estas muestras se realizó de acuerdo al método de tubos múltiples de fermentación (American Public Health Association, 1985).

El aislamiento de las cepas de *E. coli* obtenidas tanto del aire como del agua, así como la identificación del serotipo y susceptibilidad a antibióticos fue realizada previamente en el laboratorio de Aerobiología y en el de Salud Pública (UNAM).

### **Análisis de la susceptibilidad a antibióticos de los aislados de *E. coli*.**

Para la caracterización de los aislados obtenidos durante los muestreos, se empleó el equipo “UNICEPT KB/TYPE 2” (BioMérieux Vitek, Inc). Ésta es una prueba de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, que emplea un procedimiento de



microdilución en medio líquido, para determinar patrones de susceptibilidad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas de rápido crecimiento. Este sistema consta de 40 pozos con una serie de agentes antimicrobianos liofilizados, que son suspendidos en medio de crecimiento. La concentración de los antibióticos está diseñada para identificar niveles bajos y altos de resistencia, ya que cada antibiótico se prueba con dos concentraciones expresadas en  $\mu\text{g/ml}$  (tabla 4).

La prueba se realizó hidratando cada uno de los pozos con 100 $\mu\text{l}$  de una suspensión de *E. coli*, equivalente a  $1 \times 10^6$  UFC/ml, e incubando el sistema a 37°C. Los resultados fueron leídos observando la presencia o ausencia de crecimiento en cada uno de los pozos. La interpretación de los resultados se realizó midiendo el crecimiento en cada uno de los pozos, tanto de concentración alta como baja, e interpretando resistencia intermedia como aquellas cepas que crecieron en los pozos que contenían la concentración más baja del antibiótico.

Por consiguiente, las bacterias que crecieron en la concentración más alta se consideraron como resistentes: mientras que los pozos que no presentaron crecimiento bacteriano fueron considerados sensibles a un antibiótico dado.

#### **Caracterización serológica de los aislados de *E. coli*.**

Preparación del antígeno somático (O).

La obtención del antígeno somático se realizó siguiendo el protocolo descrito por Orskov, (1984). Para obtener la biomasa celular, se adicionaron 10ml de solución salina, 0.85%, sobre la superficie de cada una de las colonias que previamente fueron sembradas en tubos con agar Casoy. La suspensión obtenida se transfirió a un tubo y se calentó con vapor de agua durante 1h. Una vez obtenido y enfriado el antígeno, éste se conservó con formalina al 0.6%.

Tabla 3: Concentraciones de los antibióticos empleadas para determinar la susceptibilidad de los microorganismos Gram (-) mediante la prueba de UNICEPT KB/TYPE 2.

Antibiótico	[baja] µg/ml	[alta] µg/ml
Trimetropim/su	2	38
Ifamectoxasol		
nitrofurantoina	25	50
norfloxacina	4	8
ciprofloxacina	1	2
ampicilina;	8	16
ticarcilina	16	64
piperacilina	64	128
cefalotina	8	16
cefazolina	8	16
cefoxitin	8	16
cefuroxima	8	
cefotaxima	8	32
ceftazidima	8	16
amikacina	16	32
gentamicina	4	8
tobramicina	4	8
cloranfenicol	12	24
tetraciclina	4	8
imipenem	4	8
Control de crecimiento	+	

#### Preparación del antígeno flagelar (H).

Para obtener el antígeno flagelar, las diferentes cepas de *E. coli* aisladas fueron sembradas en un medio semisólido que en su interior contenía un tubo de Craigie, con el propósito de evaluar la movilidad. Los diferentes medios fueron incubados a 30°C, hasta observar el enturbiamiento del cultivo (15 días o más). Cuando las bacterias del cultivo mostraron movilidad, se analizó el nivel de crecimiento en el exterior del tubo de Craigie. Cuando se observó crecimiento del cultivo presente en esta parte del tubo, se tomó una asada y se sembró en esterilidad en caldo de peptona de biotriptasa al 2% (pH 7.2), incubando durante 24 h a 30°C. El antígeno flagelar se conservó de la misma manera que el antígeno somático.

### **Identificación del serotipo de los aislados de *E. coli*.**

La serotipificación de las cepas de *E. coli* se realizó siguiendo el procedimiento empleado en el Laboratorio de Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la UNAM de acuerdo con Orskov (1984), utilizando sueros específicos (SERUNAM, México) obtenidos en conejos Nueva Zelanda blanco, contra 175 antígenos somáticos y 56 flagelares. Las reacciones de aglutinación se efectuaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano.

#### Reacciones de aglutinación para el antígeno somático.

Para las reacciones de aglutinación, a cada pozo de la microplaca se le adicionaron 100  $\mu$ l del suero monovalente y 50  $\mu$ l del antígeno somático. Posteriormente, la placa de 96 pozos de fondo plano (Dynatec, Dinamarca), se cubrió con plástico adherente (para evitar la evaporación) y se incubó a 50°C por 24 h. La interpretación de una prueba positiva fue dada por la aglutinación, la cual se observó como un precipitado en el fondo del pozo. Cuando se observó reacción cruzada, el antígeno se desafió contra sueros absorbidos puros, los cuales fueron previamente diluidos 1:50. El serogrupo se definió, al determinar el mayor grado de aglutinación con la mayor dilución del suero.

#### Reacciones de aglutinación para el antígeno flagelar.

Las reacciones de aglutinación para el antígeno flagelar, se realizaron de igual forma, que en las reacciones de aglutinación para antígeno somático. A cada pozo de la microplaca se le adicionaron 100  $\mu$ l de cada uno de los 56 sueros específicos y 50  $\mu$ l del antígeno flagelar. Posteriormente, la placa de 96 pozos de fondo plano (Dynatec, Dinamarca) se cubrió con plástico adherente (para evitar la evaporación) y se incubó a 50°C por 2 h. La interpretación de una prueba positiva fue dada por la aglutinación, la

cual se observó como un precipitado en el fondo del pozo. Al igual que en el ensayo anterior, cuando se observó reacción cruzada, el antígeno se desafió contra sueros absorbidos puros, diluidos 1:50. El serogrupo se definió, al determinar el mayor grado de aglutinación con la mayor dilución del suero.

#### CARACTERIZACION GENOTÍPICA DE CEPAS DE *E. coli* AISLADAS DE AGUA Y AIRE.

##### **Hibridación mediante *colony blot* para la identificación de cepas patógenas.**

La identificación de factores de patogenicidad en las cepas de *E. coli* se realizó mediante la técnica de “colony blot”, la cual emplea la hibridación de DNA a través de una colonia que ha sido fijada a un soporte sólido (membrana), lisada y su material genético desnaturalizado. Para este método, se empleó el protocolo descrito por Hill *et al.*, (1984) modificado en el Laboratorio de Salud Pública, de la Facultad de Medicina (UNAM). En el análisis se emplearon 189 cepas de *E. coli*, 10 cepas de referencia que poseen algunos marcadores de patogenicidad: SLT1, LT1, AGG2, BFP, EAE1, STH, CDT, LTH/STH, EAF /EAE, IPA, y una cepa de *E. coli* K12 empleada como control negativo.

Cada una de las cepas de *E. coli* se cultivó en 3 ml de agar Luria (Gibco BRL, Life Technologies, USA) a 37°C durante 18hrs. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron colonias individuales y se sembraron en caldo Luria, bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Posteriormente, se empleó este cultivo para sembrar las bacterias por picadura en una caja de agar Mac Conkey (Bioxon, Becton Dickinson, México); sembrando un total de 25 cepas por placa y 3 controles, contando cada ensayo con un control o estándar positivo y 2 negativos. Las cajas de agar Mac Conkey se incubaron a 37°C durante 18 h. Una vez finalizado este tiempo, las colonias fueron transferidas a una membrana Whatman 541 (Whatman, Inc Clifton, N. J), para la cual, ésta se colocó dentro de la caja de agar Mac Conkey en condiciones de esterilidad y se oprimió ligeramente para transferir las colonias por simple contacto. Al final, se incubó la caja de agar con la membrana durante 1 hr a 37°C; una vez transcurrido este tiempo,

cada una de las membranas se despegó del agar y fueron tratadas para la lisis de las colonias y desnaturalización del DNA, como se describe a continuación.

Las membranas Whatman conteniendo las colonias, se depositaron dentro de una caja Petri de vidrio la cual contenía un papel filtro Whatman número 3 y se les adicionaron 10 ml de amortiguador de lisis NaOH 0.5N (Merck, México) y NaCl 1.5M (Merck, México). Las membranas con las colonias transferidas se colocaron a vapor fluente durante 10 min. Para desnaturalizar el DNA, la membrana se colocó en 10ml de amortiguador de desnaturalización [Tris 0.1M pH 7 (Sigma, St Louis, MO) y NaCl 2M]. Nuevamente, la membrana con las colonias desnaturalizadas se puso a vapor fluente durante 10 min. Finalmente, las membranas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron dentro de cajas Petri hasta su uso.

Las sondas que se emplearon para identificar factores de patogenicidad en las cepas de *E. coli* se muestran en la Tabla 5. Cada sonda seleccionada, contenía parte de la secuencia específica codificadora para los diferentes factores de patogenicidad de cada grupo de *E. coli*.

Las sondas fueron marcadas previamente por el método de marcaje terminal en 5' o "*end-labeling*", con la enzima polinucleótido cinasa del fago T4 (United States Biochemical Corporation). En la reacción se utilizó una mezcla que contenía 5µl de la sonda (10 pmoles/µl), 5µl de amortiguador de cinasa, 3µl de <sup>32</sup>P ATP, 2µl de T4 polinucleótido cinasa y 50µl de agua; la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo incubando a 65°C durante 5 min, adicionando 5 µl de EDTA 0.5 M pH 8. Para quitar el <sup>32</sup>P no incorporado a la sonda, se adicionaron 4.5 ml de acetato de amonio 4M y en seguida la mezcla se pasó por una columna Nacs prepac (Nalgene, USA). Para remover el DNA de la columna, se adicionaron 200 µl de acetato de amonio 4 M (Sigma, St Louis, MO), y se colectaron tres fracciones de 200 µl, cada una con el objeto de calcular la cantidad total de radiactividad recuperada. Para ello, se colocaron 2 µl del volumen removido sobre un papel filtro, dejando secar y éste se colocó en un vial para centelleo. Generalmente, cuando se usó ATP a una actividad específica de 3000 a

7000 Ci/mmol, la sonda registró valores de  $1-2 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g. Las fracciones marcadas radiactivamente se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Tabla 4: Sondas de oligonucleótidos empleadas para identificar algunos factores de patogenicidad en las cepas de *E. coli*, mediante hibridación DNA-DNA.

<i>E.coli</i>	Sonda	Secuencia	Codificación
EHEC	SLT1	5' TGC CAT TCT GGC AAC TCG CGA TGC A 3'	Toxina ST
ETEC	LT1	5' AAA TCG CCA TTC GTT GAC TAC TTC T 3'	Toxina LT
EAEC	AGG2	5' CAA TGT ATA GAA ATC CGC TGT T 3'	Fimbria
EPEC	BFP	5' GCT ACG GTG TTA ATA TCT CTG GCG 3'	Fimbria
EPEC	EAE1	5' TTC TGA AAG CGA AAT GAT GAA GG 3'	Fimbria
ETEC	STH	5' GCT GTG AAT TFT GTT GTA ATC C 3'	Toxina
EPEC	CDT	5' CAC GTC TGC AAG GCA CTA C 3'	Fimbria
ETEC	LTH/STH	5' GCG AGA GGC ACA CAA ACC GG3' 5' GAT GTG ACT TAT GTC GTA CTC C 3'	Toxinas LTH/STH
EPEC	EAF /EAE	5' CAC GTC TGC AAG GCA CTA C 3'	Factor de adherencia
EIEC	IPAH	5' CAA GTA TTC ACG GCA CAA C 3'	Proteínas invasivas

Para la hibridación del DNA con sondas específicas y poder reconocer factores de patogenicidad en las cepas de *E. coli*, las membranas con las cepas fijadas, se bloquearon con 10 ml de una solución que contenía 60 ml de amortiguador SSC, 20 ml de una solución de Denhardt's, 0.4 ml de EDTA 0.5 M (pH 8), 4 ml de DNA de esperma de salmón desnaturizado a  $95^\circ\text{C}$  por 10 min y 115.6 ml de agua. El volumen requerido de la sonda para obtener  $1 \times 10^6$  cpm fue calculado y finalmente éste se adicionó a la solución anterior, agitando suavemente e incubando a  $41^\circ\text{C}$  toda la noche.

Una vez transcurrido este tiempo, la membrana fue lavada para eliminar la sonda que no se unió específicamente en el DNA de las colonias lisadas. La solución de hibridación fue retirada y se adicionaron 10 ml de una solución SSC 6X, previamente calentada a  $54^\circ\text{C}$  durante 10 seg. Enseguida se realizó otro lavado con la misma solución durante 1 h Finalmente, se realizó un lavado con 10 ml de una solución de SSC 2X durante 10 minutos y los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para revelar la zona de hibridación se realizó una reacción de detección. Esta consistió en colocar las membranas en un chasis (Cronex-lighting Plusintensitying

Screens, Du Pont Photo Products, Kodak, Rochester, N.Y.) con una película de rayos X (Kodak XAR-2 en 8X10 in, N.Y.), exponiendo la placa a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 48 hrs. Después de este tiempo, la película se reveló (revelador de rayos X, Kodak, N. Y.) y se fijó (fijador de rayos X, Kodak, N.Y.). Este procedimiento se realizó en un cuarto oscuro.

La lectura de las autorradiografías se realizó mediante densitometría, empleando el Software "*Gene Tools*" (Syn Gene, USA): éste considera la densidad de la reacción de hibridación (mancha) del control positivo (cepa de *E. coli* con el marcador de patogenicidad que se va a probar), una vez que ha eliminado la densidad que se obtiene para el control negativo (cepa K12); el valor obtenido se compara con las reacciones de las cepas.

#### **Extracción de DNA genómico de *E. coli*.**

Las cepas de *E. coli* aisladas del aire (108) y del agua (81), se cultivaron en 5ml de caldo Luria en un tubo cónico de 15 ml y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 h; posteriormente, las células se centrifugaron 5min a  $3600 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se removió cuidadosamente con una pipeta estéril, y la pastilla celular se resuspendió en 5 ml de amortiguador de suspensión (3.3 ml NaCl 3 M, 1 ml Tris 1 M pH=8, 2 ml EDTA 0.5 M pH=8, 58.5ml de sacarosa y se aforó a 100ml). La suspensión se centrifugó nuevamente bajo las condiciones antes descritas y se procedió a extraer el material genómico. En algunos casos, las pastillas se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La extracción del DNA se realizó de acuerdo al protocolo descrito para la preparación de DNA genómico de bacterias (Ausubel *et al.*, 1989). Brevemente la pastilla celular se resuspendió en  $567\mu\text{l}$  de amortiguador TE (Tris HCl 10mM pH=8 y EDTA 1mM) y se le adicionó  $30\mu\text{l}$  de SDS al 10%, mezclando al final suavemente por inversión y posteriormente se adicionaron  $3\mu\text{l}$  de proteinasa K (20 mg/ml). La suspensión se mezcló nuevamente por inversión y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1hr. Para lograr la lisis celular, se adicionaron  $100\mu\text{l}$  de NaCl 5M. Enseguida, todos los restos celulares y proteínas se precipitaron, adicionando  $80\mu\text{l}$  de una solución al 10% de

bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB), diluido en NaCl 0.7M. Nuevamente los tubos se mezclaron por inversión y se incubaron a 65°C por 10 min. Los ácidos nucleicos se extrajeron con un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (CI), en una proporción vol/vol de 24:1, mezclando vigorosamente y posteriormente se centrifugó durante 10min a 12000 x g recuperándose la fase acuosa. Los ácidos nucleicos se extrajeron nuevamente con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico PCI 25:24:1 (vol/vol), bajo las condiciones antes mencionadas. Los ácidos nucleicos de la fase acuosa, se precipitaron adicionando 0.6 volúmenes de isopropanol al 100% y enfriando 30min a -70°C ó durante toda la noche a -20°C. Para recuperar el DNA, la solución se centrifugó durante 30min a 14,500 x g. El DNA se lavó con 500µl de etanol al 70 % para eliminar sales y la pastilla de ácidos nucleicos se secó por vacío. La pastilla de DNA finalmente se resuspendió en 100µl de amortiguador TE (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH 8). La concentración de DNA se evaluó por espectrofotometría a 260/280nm. La lectura de densidad óptica a 260nm, permitió el cálculo de la concentración de los ácidos nucleicos en la muestra. El ratio entre las lecturas a 260 y 280nm nos proporcionó una estimación de la pureza del DNA. Se consideraron preparaciones adecuadas aquellas que presentaron un ratio entre 1.7 y 1.9. Así, para cuantificar el DNA obtenido, se tomaron 5µl de DNA y se realizaron diluciones 1:200 con amortiguador TE. Posteriormente, se tomó la lectura de absorbancia a 260 y 280nm en el espectrofotómetro para luz UV (JASCO Co, Japón).

El cálculo de la concentración de DNA, se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Sambrooks *et al.*, (1994), y fue calculado de la siguiente manera:

1UDO 260nm=50µg/ml DNA de doble cadena

Pureza = DO 260nm/DO 280nm =1.8

DNA=(50µg/ml)(UDO 260nm)(Vf en ml)/5µl =µg/µl

Donde:

UDO= Unidades de densidad óptica a 260 nm.



Vf= Volumen final usado en la dilución expresando en ml.

Para visualizar el DNA, se prepararon geles de agarosa al 1% y se tiñeron por 30 min con una solución del colorante fluorescente bromuro de etidio, a una concentración de 5µg/ml. Finalmente, el gel se observó bajo luz ultravioleta a 302nm, utilizando un transiluminador de luz UV, y se hizo un registro fotográfico de cada corrida usando una cámara Polaroid MP4 (Sigma Co., USA), con película instantánea Polaroid 55 P/N 4X5 (Polaroid Co., St. Lous, Mo., USA).

#### **Extracción de DNA de los plásmidos de *E. coli*.**

Para la extracción de los plásmidos se eligieron 54 cepas de *E. coli*, de las cuales 36 presentaron resistencia a uno o más antibióticos empleados en este estudio: 18 cepas fueron sensibles. Dentro de las 54 cepas, 20 presentaron marcadores de patogenicidad identificados por “*colony blot*”, además se incluyeron 11 cepas de referencia de los grupos EPEC (BFP, EAE), EIEC (IPAH), EHEC (SLT), ETEC (LT, STH, LTH/STH), EAEC (AGG2) y una cepa de *E. coli* K12 que carece de marcadores de patogenicidad, proporcionadas por el laboratorio de Salud Pública de la UNAM. La extracción se realizó mediante el equipo “Quantum Prep Plasmid Miniprep” (BioRad; US). Cada una de las cepas de *E. coli*, se incubaron en 2ml de caldo Luria a 37°C durante 18 h y se obtuvo la pastilla celular centrifugando a 12,000 x g durante 30 segundos. A la pastilla celular se le adicionaron 200µl de solución de resuspensión y se mezcló usando una micropipeta. Para lisar las células, se adicionaron 250 µl de una solución de lisis celular y se mezcló suavemente por inversión del tubo. Posteriormente, se adicionaron 250ml de solución de neutralización y se mezcló de la misma forma. Para obtener el sobrenadante conteniendo el DNA de los plásmidos; los esferoplastos fueron empastillados por centrifugación a 12000 x g’ durante 5 min. El sobrenadante fue adicionado a una columna; posteriormente se agregaron 200µl de matriz de sílica. Las suspensiones se mezclaron y se centrifugaron 12000 x g’ durante 30 seg. Para lavar el DNA, se

adicionaron 50  $\mu$ l de amortiguador de lavado (etanol al 50%) y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores. Finalmente, para remover el DNA de la columna, se adicionaron 100 $\mu$ l de amortiguador TE (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM pH 8) y se centrifugó a 14000 x g' durante 1 minuto. Una vez obtenido el DNA de los plásmidos, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio para visualizarlos, y un registro fotográfico fue hecho como se indicó anteriormente.

#### **Elaboración de dendrogramas de los perfiles de plásmidos.**

Como es bien sabido, la resistencia a antibióticos se da principalmente por la transferencia de plásmidos entre las bacterias. Debido a esto, se realizó un dendrograma para observar la relación existente entre los plásmidos de las cepas de *E. coli* y su perfil de sensibilidad a antibióticos.

Se calcularon los pesos moleculares de los perfiles de plásmidos, empleando el software "*GeneTools*" (Syn Gene, USA). Este equipo calcula los pesos moleculares de cada uno de los plásmidos, empleando un marcador de peso molecular, el cual se cargó en cada gel de agarosa, en este caso se empleó el marcador Lambda/*Hind III*- $\phi$ X174/*Hae III* (Stratagene, USA).

Posteriormente, se empleó el índice de similitud o de bandas compartidas y la distancia de los patrones de bandeo se calculó utilizando el Software (SPSS, USA).

#### **Amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD) de los aislados de *E. coli*.**

Para realizar los ensayos de RAPD-PCR, se utilizaron 2 iniciadores elegidos al azar: L1: 5' GTGCAATGAG3' y ER4: 5'GGTCGACGCG3'. Ambos iniciadores fueron sintetizados por Genosys Biotechnologies Inc., (Woodlands, Texas., USA).

La reacción de PCR, se llevó a cabo en un volumen final de 50 $\mu$ l, el cual contenía la siguiente mezcla: 1X de amortiguador PCR (Tris-HCl 100mM, KCl 500mM, BSA 1mg/ml), 4mM de MgCl<sub>2</sub>, 400 $\mu$ M de dNTPs, iniciadores 1pmol/ $\mu$ l de cada uno, 500ng de DNA de *E. coli* y 2.5 U Taq polimerasa.

Las condiciones de baja astringencia fueron precedidas por una desnaturalización a 95°C/5 min, seguida de 3 ciclos de alineamiento a 39°C/1.5 min, con una extensión a

72°C/1 min y una nueva desnaturalización a 94°C/1 min. Posteriormente se realizaron 30 ciclos a alta astringencia con una temperatura de alineación de 41°C/1min, extensión a 72°C/1 min y desnaturalización a 94°C/1 min. Finalmente, se realizó un alineamiento a 41°C/5min y una extensión a 72°C/ 10 min. Los patrones de amplificación obtenidos, se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% y todas las corridas fueron registradas fotográficamente como se describió anteriormente.

### **Elaboración de dendrogramas de los perfiles de RAPD.**

El análisis del polimorfismo de las diferentes cepas de *E. coli*, se realizó, en primer lugar, calculando los pesos moleculares de los patrones de bandas empleando el software “Gene Tools” (Syn Gene, USA), el cual calcula los pesos moleculares de cada una de las bandas obtenidas por RAPD, empleando un marcador de peso molecular (*Lambda/Hind III- φX174/Hae III*, Stratagene, USA)

Posteriormente, se empleó el índice de similitud o de bandas compartidas y la distancia de los patrones de bandeos, se calculó utilizando el Software (Phyllip, USA), el cual emplea la siguiente fórmula:

$$F = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y}$$

donde F es el índice de similitud,  $n_{xy}$  es el número de bandas que comparten el individuo x y el y, en este caso entre una cepa y otra,  $n_x$  es el número de bandas del individuo x, y  $n_y$  es el número de bandas que comparte el individuo y.

Como medida de distancia o disimilitud se obtuvo el complemento de F, el cual se calcula de la siguiente manera:

$$D = 1 - F$$

Finalmente, se obtuvieron los dendrogramas, o representación esquemática de la organización de los aislados, en grupos de similitud de cada uno de los patrones de bandas, para lo cual se empleó la metodología de UPGMA en el módulo de Neighbor del programa phylip (Felsestein, 1984).

## 7. RESULTADOS

### Identificación de *E. coli*.

Se utilizaron 189 cepas, aisladas en una planta de tratamiento de aguas en dos épocas del año, a partir de muestras del aire y agua (Tabla No. 5).

Tabla No. 5: Número de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de agua y aire en una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de México.

EPOCA	No. DE AISLAMIENTOS		
	AGUA	AIRE	TOTAL
	No.	No.	
Lluvias	29	63	92
Secas	52	45	97
Total	81	108	189

Las cepas fueron analizadas de acuerdo a su perfil de resistencia a antibióticos en el laboratorio de Aerobiología (Tabla No. 6).

Tabla No. 6: Porcentaje de resistencia a los antimicrobianos de cepas de *E. coli* aisladas del aire y agua en dos épocas del año.

	Antimicrobiano	Muestras			
		Agua (%)	Aire (%)	Secas (%)	Lluvias (%)
1	Trimetoprim/Sulfametoxasol	11.9	16.32	16.49	4.7
2	Nitrofurantoina	2.38	2.04	2.06	1.17
3	Ciprofloxacina	3.57	0	2.06	0
4	Ampicilina	15.47	24.48	16.49	15.29
5	Ticarcilina	14.28	17.34	16.49	7.05
6	Piperacilina	8.3	23.46	15.46	14.11
7	Cefazolina	0	7.14	7.21	5.88
8	Cefoxitin	0	1.02	1.03	0
9	Cefotaxima	0	0	0	0
10	Ceftazidima	1.19	6.12	1.05	7.05
11	Amikacina	1.19	1.02	2.06	0
12	Gentamicina	0	2.04	1.03	1.17
13	Tobramicina	1.19	2.04	2.06	1.17
14	Imipenem	1.19	4.08	5.15	0
15	Cloramfenicol	9.52	3.06	10.3	0.11

n del aire= 98; n del agua= 84; n de la época de secas= 97; n de la época de

lluvias=85

Tabla No. 7: Serotipos de *E. coli* aislados del aire y agua en una planta de tratamiento de aguas residuales de la Ciudad de México

Agua (frecuencia: No. Cepas)	Aire (frecuencia: No. cepas)
OR:NM (3)	OR:NM (9)
OR:H20 (2)	O?:NM (7)
O?:NM (12)	O?:H10 (2)
O?:H10 (2)	O7:H4 (2)
O?:H30 (3)	O18ac:H14 (2)
O18:H14 (2)	O20:NM (2)
O73:H30 (2)	O113:NM (2)

Tabla No. 8: Serotipos de *E. coli* aislados del aire y agua asociados a cepas patógenas previamente reportados.

Agua (frecuencia: No. Cepas)	Aire (frecuencia: No. cepas)
O8:NM (1)	O4:NM (1)
O26:H3 (1)	O8:NM (1)
O91:NM (1)	O8:H9 (1)
	O18:NM (1)
	O20:NM (2)
	O75:H5 (2)
	O91:H21 (1)
	O105:H18 (1)
	O117:H4 (1)
	O141:NM (1)

Las cepas se identificaron utilizando el método API 20E (sistema de identificación para *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos; bioMérieux, Francia) y se tipificaron por serología, empleando 175 sueros contra el antígeno somático y 56 contra el antígeno flagelar (Tabla No. 7 y 8). Se identificaron 76 serogrupos diferentes de los cuales los más comunes fueron O? en 44 cepas (23%), OR en 24 (13%) y O9 en 8 (4%) (Tabla No. 9).

Tabla No. 9: Serogrupos identificados en las cepas de *E. coli* aisladas del aire y agua.

Somático	Total de cepas
O?	44
OR	24
O9	8
O175	5
O73, O7	8
O18, O18ac, O83, O148, O155, O6, O8, O21, O77, O88, O91	33
O101, O64, O32, O100, O20, O159, O86, O1, O113, O51, O102, O168,	24
O63, O135, O10, O4, O125ac, O50, O15, O27, O, O149, O69, O130, O117, O95, O12, O82, O166, O129, O110, O141, O87, O80, O53, O60, O3, O170, O29, O18, O17, O22, O157, O105, O23, O138, O2, O25, O92, O140, O132, O150, O11, O16, O24, O25, O40, O165, O171	47

\*Número de cepas que mostraron el mismo serogrupo

O? No tipificable con los 176 sueros anti O

OR Antígeno rugoso

### Hibridación mediante “*colony blot*”

Las 189 cepas se analizaron mediante hibridación en colonia (Fig. No. 1) para determinar la presencia de genes asociados con virulencia. Esta fue obtenida mediante el análisis densitométrico de la señal de hibridación (mancha) en las membranas (Tabla No. 10). En este ensayo se encontró que 16 de las 108 cepas (15%) aisladas del aire reaccionaron con alguna de las sondas para los grupos patógenos, dos de estas cepas hibridaron con más de una sonda. De las 81 cepas de agua, 4 (5%) hibridaron con alguna de las sondas utilizadas, dos de las cuales también hibridaron con dos sondas (Tabla No. 11).

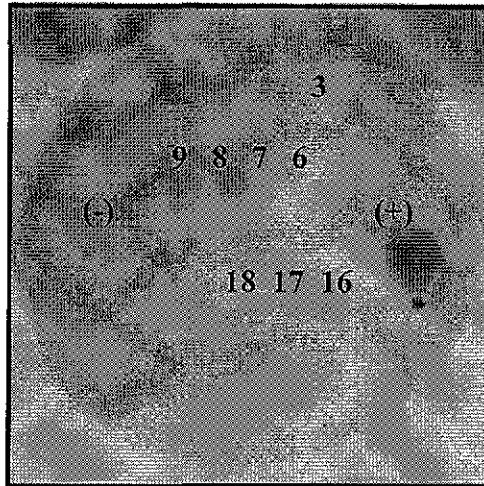


Fig1: Autorradiografía de un filtro Whatman 541 con colonias de *E. coli*, después de la hibridación mediante *colony blot* con la sonda de DNA STH  $^{32}\text{P}$ . Las colonias 8 y 9 fueron positivas.

Tabla No. 10: Análisis densitométrico de una autorradiografía de la hibridación, mediante *colony blot* con la sonda de DNA STH  $^{32}\text{P}$ .

Mancha	Densidad	Interpretación
Control (+)	17574	+
Control (-)	4540	-
3	3410	-
6	2983	-
7	2117	-
8	8792	+
9	5417	+
16	3004	-
17	4417	-
18	3937	-

Al realizar la correlación entre la presencia de algunos genes de virulencia y la época del año, se encontró que en el período de secas, y principalmente del aire, se aisló el mayor número de bacterias que hibridaron con alguna de las sondas.

Tabla No. 11: Grupos de *E. coli* enteropatógenos

**SEROTIPOS**

Sonda	Agua	Aire
<b>ETEC</b> <b>(12)</b>	OR:H27 <sup>1</sup> O100:H1 O148:H8 <sup>2</sup>	OR:H- O?:H- O8:H- O9:H11 O25:H4 O88:H30 O148:H- O148:H? O155:H4 <sup>3</sup>
<b>EIEC</b> <b>(8)</b>		OR:H-(2) O?:H- <sup>4</sup> O12:H21 O23:H25 O29:H18 O155:H4 <sup>3</sup> O170:H-
<b>EAEC</b> <b>(2)</b>		O?:H- <sup>4</sup> O155:H4 <sup>3</sup>
<b>EPEC</b> <b>(3)</b>	OR:H27 <sup>1</sup> O6:H10 O148:H8 <sup>2</sup>	

1, 2, 3, 4, 5= Cepas que hibridaron con más de una sonda durante los ensayos de Colony Blot

**Perfil de Plásmidos.**

El tamaño molecular de los plásmidos identificados osciló entre 1-23 Kb, siendo los más comunes los que se encontraron entre 1-3 Kb (Tabla No. 12). El número de plásmidos por cepa varía entre uno y más de 5; sin embargo, en el 40% de las cepas no se observó DNA de origen plasmídico (Tabla No. 13).



Tabla No. 12: Tamaño de los plásmidos observados en cepas *E. coli* aisladas del aire y agua

<b>Plásmidos</b>	<b>Aire</b>	<b>Agua</b>
Tamaño molecular de las bandas (Kb)		
<1-3	50	9
3-9	39	1
9-15	4	0
15-21	6	0
21-	5	3

Tabla No. 13: Número de plásmidos que presentaron los diferentes aislamientos de *E. coli*.

<b>Plásmidos</b>	<b>Aire</b>	<b>Agua</b>
No. de bandas		
0	17	5
1-2	14	6
3-5	6	0
>5	5	1

Al realizar el análisis del perfil de plásmidos y su asociación con el grupo patogénico de *E. coli*, se observaron diferencias importantes. Con relación a éste, se observó que las cepas que hibridaron con la sonda para ETEC presentaban entre 1 y 20 bandas de plásmidos, con pesos entre 1-23 kb (Fig. 2).

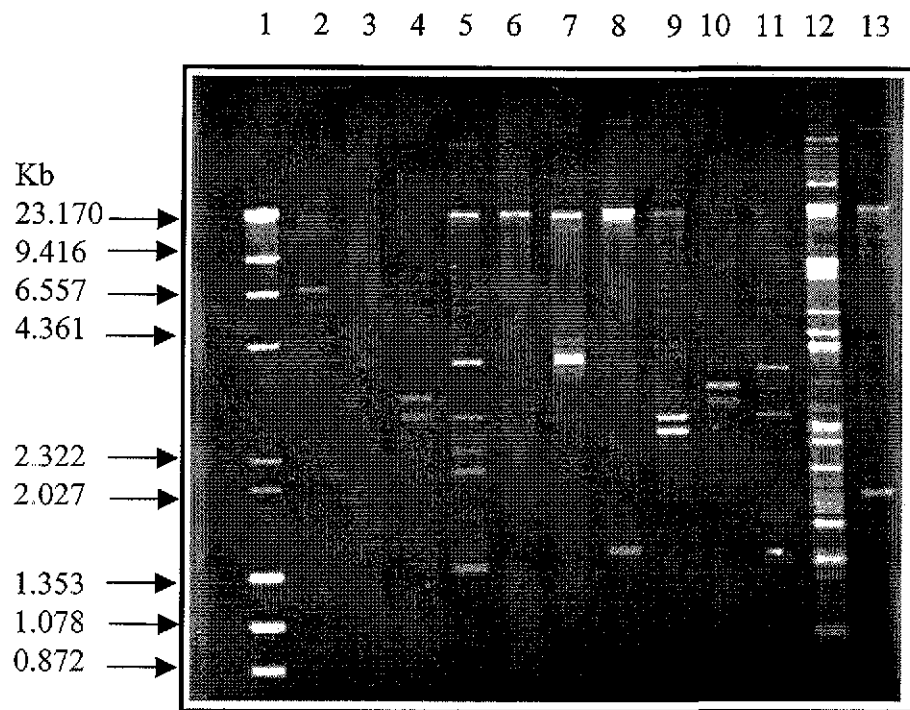


Fig. No. 2: Patrón de bandas de plásmidos de cepas ETEC obtenidas en una planta de tratamiento de la Ciudad de México. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII- $\phi$ X174/HaeIII (Stratagene, USA); en los carriles 2, 5-9 se muestran los perfiles de plásmidos de ETEC aisladas en la época de secas; y en 3-4 y 10-13 los perfiles de plásmidos de ETEC aisladas en la época de lluvias. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de agarosa al 1.2% con amortiguador TAE 1X, a 70 volts durante 2 horas y finalmente fue teñido con bromuro de etidio y visualizado empleando luz UV.

Con respecto a los perfiles obtenidos en las cepas que hibridaron con las sondas EIEC y EPEC (Fig. No. 3), éstos fueron diferentes a los anteriores mostrando menor número de bandas (1-11) y menor tamaño (1-23 kb).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

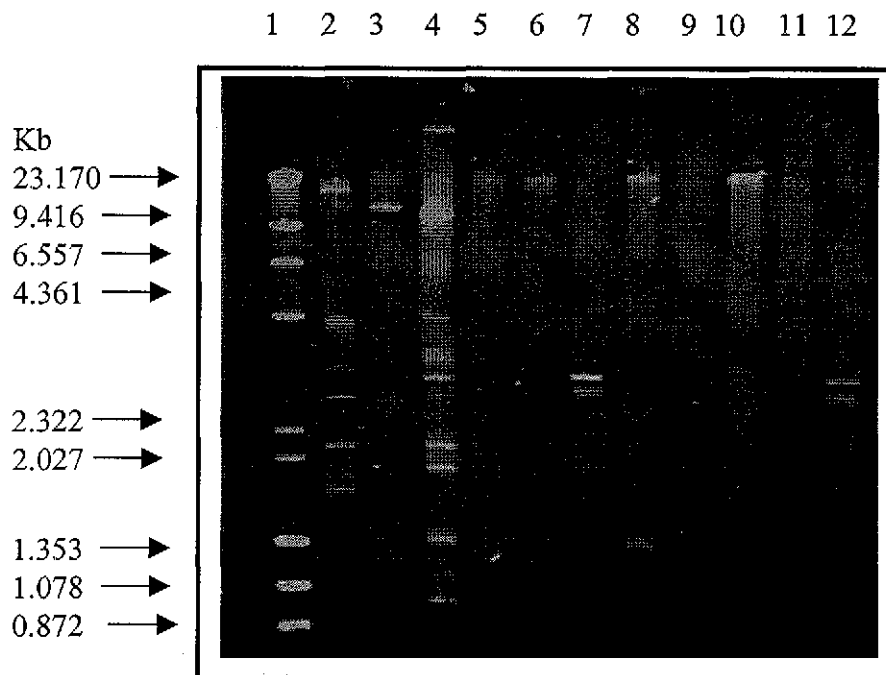


Fig. No. 3: Patrón de bandas de plásmidos de cepas EIEC y EPEC obtenidas en una planta de tratamiento de la Ciudad de México. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular  $\lambda$ HindIII- $\phi$ X174/HaeIII (Stratagene, USA); en los carriles 2-10 se muestran los perfiles de plásmidos de EIEC aisladas en la época de secas; y en 11-12 los perfiles de plásmidos de EPEC también aisladas en la época de secas. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de agarosa al 1.2% con amortiguador TAE 1X a 70 volts durante 2 horas y finalmente fue teñido con bromuro de etidio 0.5 $\mu$ g/ml y visualizado empleando luz UV.

Con el programa SPSS para Windows, se realizó un análisis para conocer si existía relación entre los plásmidos observados y el grupo patogénico determinado por hibridación. Los resultados obtenidos mostraron asociación únicamente en el grupo de cepas que no presentan plásmidos, en el cual, se incluyen bacterias que pertenecen a tres diferentes grupos patogénicos (EIEC, EPEC y ETEC) (Fig. No. 5).



### Análisis genotípico de las cepas de *Escherichia coli* aisladas.

De las 189 cepas de *E. coli* incluidas en el estudio, se analizaron 177, mediante el ensayo de RAPD-PCR empleando los iniciadores L1 y ER4. Con esto, se obtuvieron 67 patrones, los que se establecieron considerando el peso molecular de las bandas de amplificación (Tabla No. 14) y considerando también el índice de similitud entre las cepas. Los patrones de amplificación obtenidos, analizados de manera general, no permitieron establecer diferencias entre los grupos patogénicos de *E. coli* determinados por el ensayo de hibridación (Figs. No. 6-8). Sin embargo, resultó interesante observar que las cepas de referencia de los grupos EPEC, ETEC, EHEC y EIEC presentaron un patrón único definido como RAPD v1 (Tabla No. 14). Al respecto, también se observó que otra de las cepas ETEC de referencia presentó el patrón v4 (Fig. No. 8).

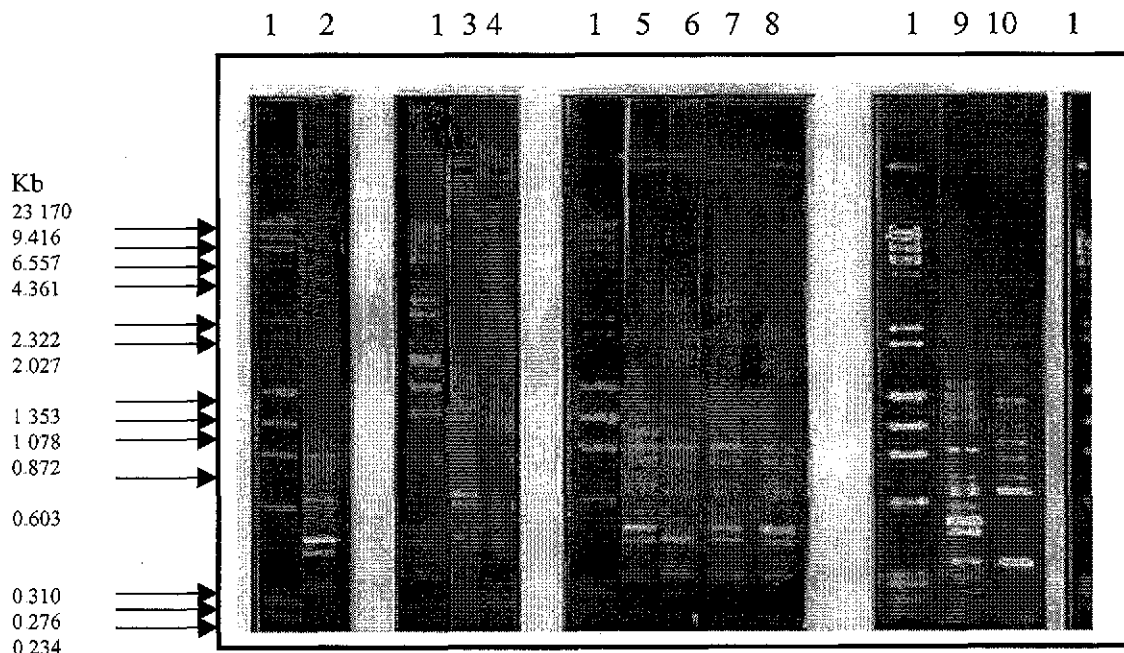


Fig. No. 6: Análisis de los patrones de amplificación por RAPD-PCR de cepas ETEC obtenidas en el agua y en el ambiente de una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de México. En los carriles número 1 se muestran los marcadores de peso molecular  $\lambda$ HindIII- $\phi$ X174/HaeIII (Stratagene, USA); en los carriles restantes, se muestran los perfiles de RAPD-PCR de 10 ETEC. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X, a 70 volts durante 2 horas y finalmente fue teñido con bromuro de etidio y visualizado empleando luz UV.

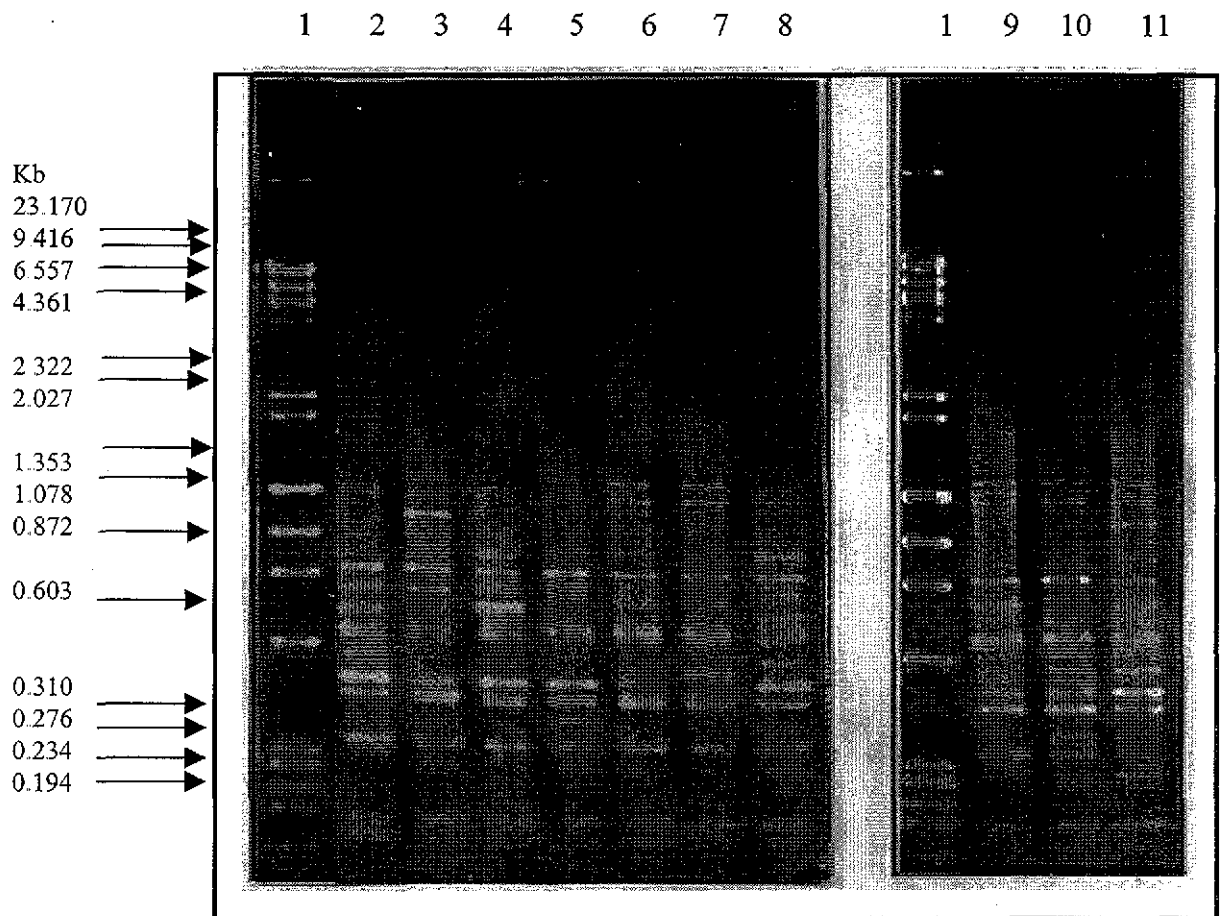


Fig No. 7: Análisis de los patrones de amplificación por RAPD-PCR de cepas EIEC obtenidas en el agua y aire en la planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de México. En los carriles número 1 se muestran los marcadores de peso molecular  $\lambda$ /Hind III- $\phi$ X174/Hae III (Stratagene, USA); en los carriles restantes, se muestran los perfiles de RAPD-PCR de 10 EIEC. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X a 70 volts durante 2 horas y finalmente fue teñido con bromuro de etidio y visualizado empleando luz

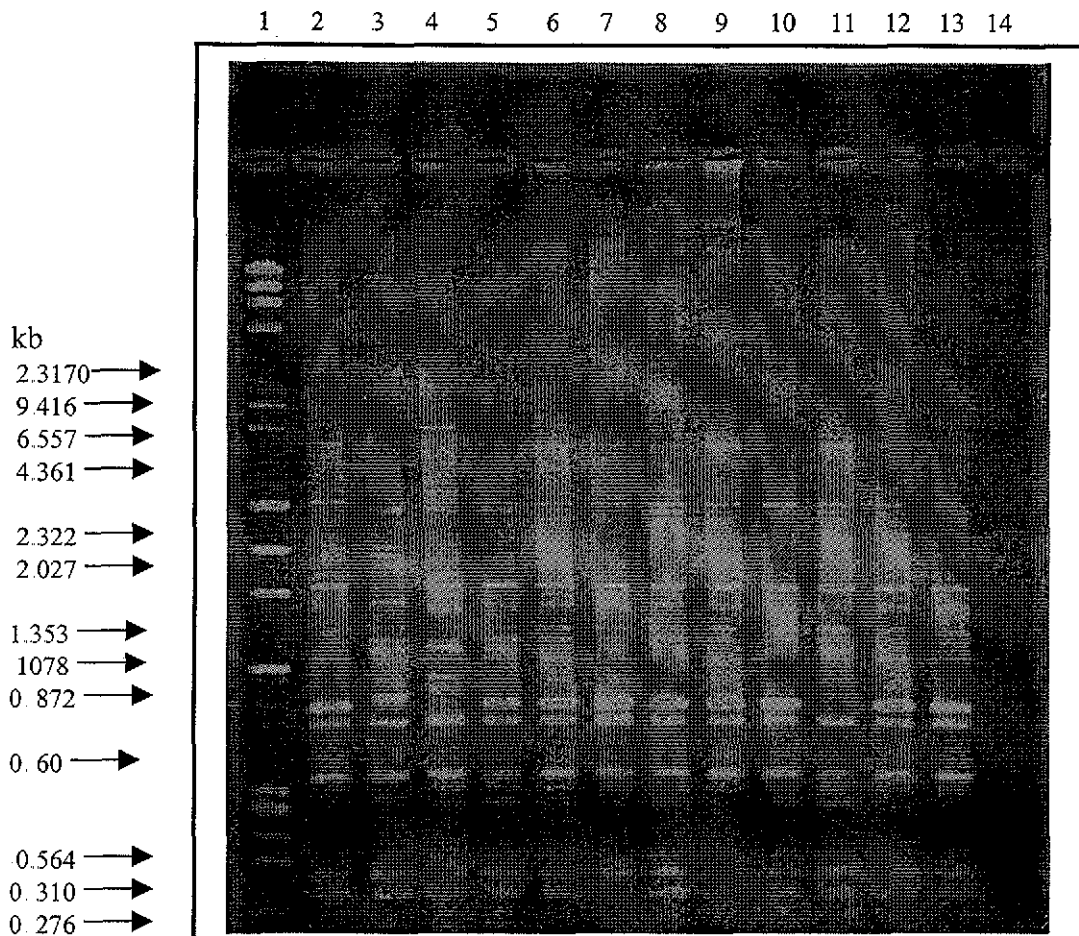


Fig. No. 8: Análisis de los patrones de amplificación por RAPD-PCR de diferentes cepas de referencia de *E. coli*. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular  $\lambda$ /Hind III- $\phi$ X174/Hae III (Stratagene, USA); en los carriles 2, 5-8 se muestran los perfiles de RAPD-PCR de 5 cepas EPEC; en 3 y 4 de EaggEC; en 11 y 12 los de ETEC; en el 10 EIEC; en 9 el patrón de EHEC; en el carril 13 el perfil de RAPD-PCR de la cepa K12 y finalmente en el carril 14 un testigo sin DNA. El corrimiento electroforético se realizó en un gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X a 70 volts durante 2 horas y finalmente fue teñido con bromuro de etidio y visualizado empleando luz UV.

De 69 patrones obtenidos, el designado como v17 fue el más frecuente, observándose en 23 cepas (13%). Los patrones v1 y v7 (11 cepas), v35, v14 y v49 (7 cepas) fueron los que siguieron en orden de frecuencia (Tabla No. 14).

Tabla No. 14: Patrones de bandas obtenidos mediante RAPD de las diferentes *E. coli* aisladas del aire y agua de una planta de tratamiento de aguas residuales de la ciudad de México.

Patrón	Cepas	Total (%)
v1	LTH, CDT, EAE, EAE, BFP, SLT1, IPA, STH, K12, 355, 349	11 (6)
v7	321, 322, 325, 354, 356, 357, 358, 548, 535, 536, 544	11 (6)
v10	359, 361, 366, 522, 523	5 (3)
v14	365, 347, 545, 582, 379, 385	6 (3)
v17	474, 475, 476, 479, 471, 550, 552, 553, 555, 591, 595, 569, 597, 604, 605, 585, 581, 386, 580, 581, 570, 571, 574	23 (13)
v19	485, 486, 348	3 (2)
v22	526, 349, 313	3 (2)
v29	538, 539, 556, 557, 562, 600, 601, 383, 589, 590	10 (5.6)
v35	547, 603, 378, 380, 388, 461, 462	7 (4)
v36	549, 566, 564	3 (2)
v49	388, 314, 335, 336, 341, 577, 579	7 (4)
v50	389, 315, 316	3 (2)
v63	463, 464, 465	3 (2)

V= Patrón de RAPD

Cepas de referencia= LTH (ETEC), CDT (EPEC), EAE (EPEC), EAE (EPEC), BFP (EPEC), SLT1 (EHEC), IPA (BIEC), STH (ETEC).

Cepa carente de marcadores de patogenicidad= K12.

De las 23 cepas que tuvieron el patrón de RAPD v17, 15 (65%) fueron aisladas del agua y 8 (35%) del aire. Algunos patrones de RAPD se observaron únicamente en cepas aisladas del aire (v9, v10, v19, v22, v36) y otros, sólo en cepas aisladas del agua (v 63). Sin embargo, predominaron los patrones que contenían cepas aisladas tanto del agua como del aire (v 4, V14, v17, v29, v35, v49, v50).



Con el programa Phyllip, USA, se elaboró un dendrograma de asociación para conocer la posible relación entre las cepas estudiadas (Fig. No. 9). En éste se puede observar que el conjunto de cepas constituye 4 grupos principales. El grupo I, es el más diverso con 26 diferentes patrones de RAPD; el II, (18); el III, (8) y el IV, (17); el grupo que incluyó un mayor número de cepas fue el IV, en el cual se ubicaron 11 de las 12 cepas de referencia. En este grupo además se integraron 11 de las 20 cepas que por *colony blot* se incluyeron en algunos de los grupos patogénicos de *E. coli* (Tabla No. 15).

Tabla No. 15: Asociación entre hibridación con sondas específicas para los grupos patógenos de *E. coli* con el perfil de bandas de RAPD.

GRUPOS ENTEROPATÓGENOS POR RAPD								
NUMERO DE CEPAS								
Grupo patogénico	Referencia				Planta			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
EPEC	0	0	0	4	0	0	0	3
ETEC	0	0	0	3	1	1	1	6
EIEC	0	0	0	1	2	4	0	1
EAEC	0	0	0	1	0	0	0	1
EHEC	0	0	0	1	0	0	0	0
K12	0	0	0	1				

El segundo grupo en importancia por el número de cepas (50 cepas) fue el II. En este se integran cepas que hibridaron con las sondas EIEC(4) y ETEC (1). En este grupo también se ubica el patrón de RAPD v17 que fue el que se observó en un número importante de cepas.

El grupo I incluyó 48 cepas; 4 de éstas presentaron hibridación positiva con EIEC (2), ETEC. En este se encuentran los patrones v49 y v29 con 7 y 10 cepas, respectivamente.

El grupo con menor número de cepas fue el III, con 9 cepas; en él se encuentra una que hibridó con la sonda ETEC.

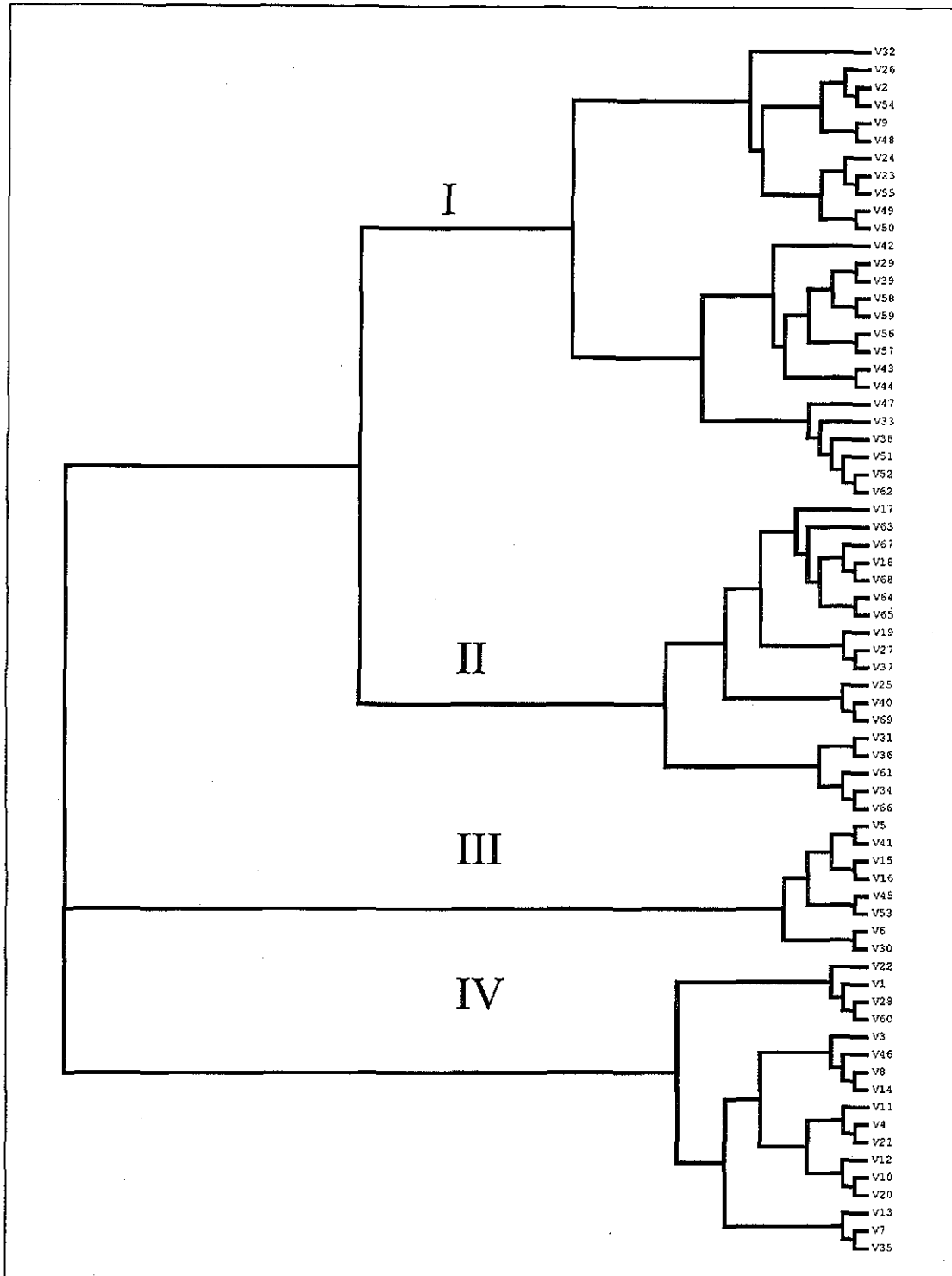


Fig No. 9: Dendrograma de la asociación de diferentes aislados de *Escherichia coli* obtenidos de muestras aisladas del aire y agua en una planta de tratamiento de aguas residuales de la Ciudad de México. Las líneas representan el grado de agrupación entre los diferentes aislados y en la parte derecha del diagrama se muestra el número del patrón de bandas de los perfiles de RAPD.

La caracterización de cepas por RAPD permitió establecer la existencia de 44 diferentes clonas de las 177 cepas estudiadas (Tabla No. 17). Al menos 4 características fueron compartidas en estas cepas, lo que permitió proponer un origen común. En cinco de los grupos de cepas (Tabla No. 17) que presentaron características compartidas ( 4, 5, 14, 16 y 18), se observaron incluso las mismas características antigénicas, lo cual apoya su identidad.

Tabla No. 16: Clonalidad en cepas de *E. coli* observadas por sus características de tipificación compartidas.

No. de Cepas	Somático	Flagelar	Tipo de muestreo	No. de muestreo	RAPD	Grupos de cepas
2		H-	AIRE	1	v49	1
2		H51	AGUA	4	v49	2
2	O20		AIRE	1	v50	3
4	OR	H-	AIRE	3	v29	4
2	O?	H-	AGUA	4	v29	5
2	OR	H-	AIRE	4	v44, v33	6
2	O?	H-	AGUA	1	v47, v51	7
2		H-	AGUA	2	v17	8
3		H-	AIRE	3	v17	9
2	O?		AGUA	2	v17	10
2	O?	H10	AGUA	1	v17	11
2		H-	AIRE	2	v19	12
2	O?	H10	AGUA	4	v28, v60	13
5	O?	H-	AGUA	1	v46	14
2	O?	H-	AIRE	1	v8	15
2	OR	H-	AIRE	3	v10	16
4		H-	AIRE	1	v7	17
2	O51	H10	AGUA	1	v35	18

Denotación del número de muestreo: (1= Muestreo Uno, 2= Muestreo dos, 3= Muestreo tres, 4= Muestreo cuatro).

Algunas cepas aisladas tanto del agua como del aire, mostraron dicha identidad clonal (Tabla No. 18) observándose además que éstas se aislaron en los diferentes muestreos realizados.

Tabla No. 17: Hallazgo de clonas con características de tipificación iguales o similares en el agua y aire de la planta de tratamiento de aguas de la ciudad de México.

Cepa		Serotipo	No. de Muestras		RAPD
Agua	Aire		Agua	aire	
1	1	H11	1	1	v49
1	1	O?:H-	4	3	v29
2	3	H-	2	3	v17
4	1	O?	2	3	v17
3	1	O?	4	1	v14

## 8. DISCUSION

Este estudio muestra resultados de la caracterización de cepas de *Escherichia coli* aisladas en la planta de tratamiento de aguas residuales "Cerro de la Estrella", ubicada en Iztapalapa en la Ciudad de México, durante los meses de septiembre y noviembre de 1997 y abril y julio de 1998.

Debido a la gran importancia que tiene la contaminación de origen biológico, resulta interesante analizar los microorganismos presentes en el ambiente. Reportes previos de muestreos ambientales realizados en la Ciudad de México (Rosas *et al.*, 1994) y en Bolivia (Ohno *et al.*, 1997) señalan que *Escherichia coli* es una de las bacterias más frecuentemente aisladas en el ambiente. Por otro lado, estudios realizados en plantas de tratamiento de aguas residuales, así como en las aguas tratadas empleadas para la irrigación, muestran como éstas liberan a la atmósfera grandes cantidades de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias potencialmente patógenas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* (Randall *et al.*, 1966; Hickey *et al.*, 1975; Fedorak *et al.*, 1980; Willeke *et al.*, 1987).

En total se trabajó con 189 cepas de *E. coli*: 81 aislamientos se obtuvieron del agua y 108 del aire. Aunque no se realizó un análisis para determinar su frecuencia de aislamiento, el total de cepas seleccionadas permitió cumplir los objetivos del estudio.

La resistencia a los antimicrobianos constituye un problema importante para el manejo y control de las enfermedades. En general las bacterias aisladas de ambientes intrahospitalarios presentan un perfil de multiresistencia a los antimicrobianos, principalmente por la selección de mutantes resistentes. En general, se podría suponer que fuera de estos ambientes, las bacterias aisladas de otras fuentes presentarían mayor susceptibilidad a los antimicrobianos de uso común. Este estudio de sensibilidad a antibióticos realizados a las 189 cepas de *E. coli* analizadas, mostró que 1.2% de cepas fueron multiresistentes (resistencia a más de un antibiótico). Del total, 38% de la resistencia fue a Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMZ), 40% para ampicilina, 32% a ticarcilina y 32% a piperacilina. Resultó interesante observar que los porcentajes más altos de resistencia se presentaron en las cepas aisladas del aire. Los resultados obtenidos, no obstante que se trata de bacterias aisladas del ambiente, coinciden con los

reportados en la literatura para aislados clínicos. Lo antes referido pudiera estar relacionado con el uso indiscriminado por automedicamento de antibióticos para el tratamiento de infecciones (Shoemaker *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1992). En México, en un estudio de cepas aisladas de pacientes pediátricos durante 1960-1980, muestran que la resistencia a ampicilina se incrementó en éstas de 35 a 80%, para la tetraciclina se mantuvo en más del 90%, para el cloranfenicol, aumentó de 57 a 68%, y para el TMP/SMZ se incrementó, de 52 a 72%. (Solórzano *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que las cepas analizadas en este estudio, provienen del entorno (muy cerca del tanque de lodos activados) de una planta de tratamiento de aguas, donde la heterogeneidad de las cepas obtenidas es muy variada, y puede incluir cepas humanas, de ganado o animales domésticos.

Se realizó la tipificación serológica de las bacterias identificadas; los serotipos más comúnmente identificados incluyeron OR:NM, O?:NM, O?:H10, O170:NM, O117:H4 relacionados algunos con la inducción de enfermedades. Estos serotipos, además, presentaron multiresistencia a 5 y hasta 7 de los antibióticos probados (trimertropim/sulfametoxazol, ampicilina, ticarciclina, piperacilina, cloramfenicol, nitrofurantoina, y tobramicina). Resulta importante mencionar que este patrón de resistencia, también ha sido observado en muestras de polvos en casas (Rosas *et al.*, 1997) hecho que sugiere su dispersión a través del aire.

Sin embargo, la mayoría de los serotipos de las clonas de este estudio son característicos de la microbiota autóctona del intestino humano sin rasgos patogénicos, aunque también se aislaron cepas de serotipos considerados patógenos, incluyendo los grupos enterotoxigénicos, tales como O8:H9, O8:NM, O20:NM, o enterohemorrágicos, O4:NM, O18:NM, O26:H32, O75:H5, O91:H21, O91:NM, O105:H18, O117:H4, O141:NM (Murray *et al.*, 1985). Los serotipos O?:NM, OR:NM, O?:H30, O?:H10 y otros, que se presentaron con menor frecuencia, presentaron serotipos exclusivos de cepas ambientales, tanto de aire como agua, y no existen reportes de su existencia en aislados clínicos. El hecho de encontrar los serotipos O?:H30, O18:H14, O73:H30, OR:H20 sólo en las cepas aisladas del agua y los serotipos O7:H4, O20:NM, O113:NM,

O18ac:H14, sólo en las cepas aisladas del aire, podría sugerir que estos serotipos son particulares del ambiente. Con excepción de los dos últimos, estos serotipos son identificados por primera vez en muestras ambientales. Uno de los serotipos que se encontró con más frecuencia (Tabla No. 11) fue el O?:H10, éste ha sido reportado en estudios previos realizados por Sainz Espuñes (1998) en muestras de pozol (bebida ácida que se obtiene de la fermentación espontánea de la masa de maíz) y en muestras de alimentos causantes de un brote importante de diarrea. La mayoría de los serotipos aislados en este estudio, concuerdan con serotipos previamente aislados para muestras de polvo intramuros (en interiores de casas); lo cual puede representar un problema serio, debido a que estas cepas reconocieron marcadores de patogenicidad para ETEC, EIEC, EAEC y EPEC.

En los últimos 50 años se ha descubierto una amplia variedad de factores de virulencia en *E. coli* lo que ha permitido su clasificación en varios grupos. No obstante, es claro que existen cepas de *E. coli* asociadas con enfermedades diarreicas, que no han sido reconocidas

En este estudio, de las 108 cepas aisladas del aire, 16 (15%) se consideraron como patógenas mediante el ensayo de *colony blot*. Éstas pertenecen a los grupos ETEC, EIEC y EAEC. Por el contrario de las 81 cepas de *E. coli* aisladas del agua, sólo se obtuvieron cuatro cepas que hibridaron con alguna de las sondas (5%), y éstas pertenecen a los grupos ETEC y el EPEC. Tanto en las cepas obtenidas del aire como del agua, existieron cepas que hibridaron con más de una sonda empleada en el ensayo de hibridación; esto podría estar asociado a problemas técnicos como puede ser contaminación del cultivo o de la sonda empleada en la hibridación. A pesar de los porcentajes bajos de cepas patógenas en el ambiente, *E. coli*, siempre debe ser considerada como un agente potencial causante de enfermedad, incluso cuando la caracterización detallada de los factores de virulencia no permitan clasificar fácilmente la cepa sospechosa. Esto fundamentado por la plasticidad genética de las bacterias, puede favorecer el surgimiento bajo ciertas condiciones de una cepa que combine factores de virulencia, y esta cepa pueda ser diferente a las que se conocen en la actualidad (Hedberg *et al.*, 1997). Al respecto, una cepa que no presentó motilidad y

además carece de toxinas LT y ST características de ETEC, presentó otros factores de virulencia inusuales (Hedberg *et al.*, 1997).

La caracterización de cepas de *E. coli* con base en sus perfiles de plásmidos, es un sistema básico de genotipificación. Sin embargo, no es un método muy eficiente, cuando se considera el poder discriminatorio en cepas que carecen de plásmidos o poseen sólo uno o dos, y lo que es peor aún, el sitio de aislamiento de éstas cepas las hace más susceptibles a la pérdida de ellos. Por la diversidad de las muestras, no fue posible establecer una correlación clara entre el hallazgo de plásmidos y la patogenicidad de las cepas analizadas en este estudio. Aunque la mayoría de la información genética para los factores de patogenicidad en *E. coli* está codificada a nivel de plásmidos, gran parte de ellos son fácilmente degradados o perdidos, si las cepas son almacenadas por períodos largos; tal es el caso del plásmido *pinv* de las cepas EIEC (Nataro *et al.*, 1998). Además, éstas bacterias han sido expuestas a estrés osmótico y de radiaciones la cual, las hace más susceptibles para perder o ganar plásmidos.

En un estudio previo, Rosas *et al.* (1997), analizaron los plásmidos presentes en cepas de *E. coli* aisladas del polvo y aire en casas de la ciudad de México. En éste, se observó una mayor tendencia en el número de plásmidos en cepas resistentes a antibióticos con respecto a las cepas sensibles. En este estudio, no se encontró una correlación precisa entre los marcadores de patogenicidad y la resistencia a antibióticos. Probablemente, las diferencias entre el origen de las muestras juegue un papel primordial, ya que las cepas fueron aisladas tanto de los contenedores de lodos activados en la planta de tratamiento, como del aire dentro de la misma planta, donde sabemos que la complejidad en los desechos no sólo domésticos sino industriales, de agricultura, ganadería y demás, puedan contribuir en la diversidad de plásmidos observados, ya que encontramos cepas con un gran número plásmidos (24), pero también una gran cantidad que no presentaron ninguno (23).

No se encontró una correlación entre los grupos patogénicos EIEC y EPEC previamente determinados por “*colony blot*”, y la presencia de plásmidos. En general, la similitud de las cepas de *E. coli* patógenas es baja considerando el contenido de



plásmidos, lo cual refleja que este método no fue bueno para establecer una relación entre el plásmido encontrado y la patogenicidad de la cepa; porque esta puede presentarse en megaplásmidos y la técnica empleada fue poco útil para ello. Es probable que las cepas ambientales pierdan algunos o todos sus plásmidos cuando se someten a estrés, ya sea dentro de los contenedores de lodos en la planta de tratamiento, o simplemente durante su almacenamiento y pases en el laboratorio, como es el caso del plásmido de EIEC p<sub>inv</sub> (Girón y Kaper, 1998).

El uso de RAPD como herramienta epidemiológica, ha sido ampliamente demostrada, en la caracterización de un gran número de cepas de *E. coli*. (Maurer *et al.*, 1998; Bando *et al.*, 1998; Mitsuda *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 2000; Atienzar *et al.*, 2000; Hopkins *et al.*, 2001; Chansiripornchai *et al.*, 2001; Radu *et al.*, 2001). No obstante, la identificación de un iniciador o juego de iniciadores que proporcionen un perfil de bandas adecuado, que pueda proporcionar suficiente poder discriminatorio entre las diferentes cepas es incierta, ya que algunos autores encuentran que el uso de más de dos *primers*, no incrementa el poder de diferenciación (Hopkins *et al.*, 2001). Además, en algunas ocasiones los resultados carecen de reproducibilidad. Sin embargo, empleando una optimización sistemática de las condiciones de reacción y seleccionando los iniciadores apropiados, se pueden obtener patrones de bandas reproducibles y discriminatorios (Hopkins *et al.*, 2001). Chansiripornchai *et al.*, (2001) analizaron 55 cepas de *E. coli* de aves y obtuvieron patrones altamente reproducibles, con una gran capacidad discriminatoria. En general el método de RAPD tiene una alta capacidad discriminatoria para la tipificación de *E. coli* (Maurer *et al.*, 1998; Bando *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 2000).

Recientemente, algunas técnicas moleculares, como la electroforesis de enzimas multilocus, ribotipificación y electroforesis de campos pulsados (PFGE) (Grif *et al.*, 1998; Radu *et al.*, 2001), se han empleado en investigaciones epidemiológicas; pero todas estas técnicas presentan dificultades en cuanto al tiempo de realización y además requieren equipo específico. Para completar el análisis molecular de *E. coli*, se empleó la amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD), ya que el RAPD-PCR es una de las técnicas de elección cuando se quiere distinguir entre cepas diferentes (Shangkuan *et al.*,

1998). Esto es evidente, sobre todo cuando se compara con otros métodos, como la tipificación por bacteriófagos, ya que ésta resulta técnicamente difícil y sólo se realiza en laboratorios de referencia.

En este estudio, la técnica de RAPD permitió, distinguir 67 patrones de RAPD, los cuales se agruparon en 4 grupos bien definidos, lo que representa una alta diversidad en las cepas. Este resultado es lógico, debido al origen multivariado de cepas de *E. coli* encontradas en el agua y que posteriormente son dispersadas al aire. En general, los patrones de bandas de DNA que se obtuvieron empleando los iniciadores L1: 5' GTGCAATGAG 3' y ER4: Y5'GGTCGACGCG 3' permitieron la agrupación de las cepas y, de manera importante, se aprecia que el grupo IV contiene a la mayoría de las cepas de referencia (11/12) y también a casi el 50% de las cepas que hibridaron con algún marcador de patogenicidad en los ensayos de hibridación (11/20). También a través del análisis de RAPD fue posible establecer la existencia de cepas idénticas tanto en el agua como en el aire, debido al hallazgo de características de tipificación compartidas, e incluso a través de características antigénicas iguales. Esto definitivamente indica identidad clonal, lo cual pudiera sugerir que las bacterias presentes en el agua de la planta de tratamiento, son liberadas a la atmósfera a través del aire y por qué no pensar que éstas mismas, sean desplazadas a sitios habitacionales próximos donde pudieran ser una fuente importante de infección.

Es importante mencionar que éste es uno de los primeros estudios realizados hasta ahora, donde se analiza o caracteriza las cepas de *E. coli* presentes en el ambiente, sugiriendo la existencia de diferentes cepas pertenecientes a este grupo. La caracterización microbiológica de las cepas ambientales de *E. coli* es de gran importancia, sin embargo es necesario realizar estudios genéticos, para conocer el impacto que éstas presentan sobre las poblaciones cercanas a ésta y a otras plantas de tratamiento, las cuales incluyan a personas altamente expuestas como los trabajadores de las plantas y vecinos cercanos a las mismas. Pero no sólo es importante considerar el efecto que las bacterias puedan tener sobre la población por sí solas, sino los mecanismos que éstas desarrollan para permanecer y seguir conservando sus propiedades de virulencia bajo condiciones adversas.

## 9. CONCLUSIONES

- 1.- Se logró aislar *E. coli* presentes en el agua y en el aire de la planta de tratamiento de aguas residuales.
2. Las cepas aisladas presentaron altos niveles de resistencia a los antibióticos de uso frecuente en la clínica como Ampicilina, Ticarciclina, Piperacilina, Trimetropim/sulfametoxazol
- 3.- Se identificaron en las cepas aisladas 4 de los seis grupos de *E. coli* enteropatógenos o causantes de diarrea, entre los que se encuentran EIEC, ETEC, EHEC y EAEC.
- 4.- Las cepas aisladas poseen un alto grado de clonalidad, empleando el método de RAPD.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- American Public Health Association.** 1985. Standard methods for the examination of water and wastewater. 16a ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
- Andersen, Sampler Inc.** 1984. Operating manual for Andersen Sampler. Atlanta.
- Atienzar, F, A. Evenden, A. Jha, D. Savva y M. Depledge.** 2000. Optimized RAPD analysis generates high-quality genomic DNA profiles at high annealing temperature. *Biotechniques* **28**(1):52-4.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y Struhl K.** 1989. Current protocols in molecular biology. Greene publishing associates and wiley-interscience. United States of America
- Baldwin, T.J., S. Knutton, L. Sellers, H.A. Manjares-Hernández, A. Aitken y P. H. Williams.** 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains secrete a heat labile toxin antigenically related to *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **60**:2092-2095.
- Bando, S.Y., G.R. do Valle, M.B. Martinez, L.R. Trabulsi y C.A. Moreira-Filho.** 1998. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and Shigella strains by RAPD analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**(1):159-65.
- Baqi, A.H. S.R. Bradley, R.E. Black, K. Haider, A. Hossain, A.A.R.M. Abdul, M. Yunus, H.R., Chowdhury y A.K. Siddique.** 1992. Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladesh in children < 5 years of age. *J. Infect. Dis.* **166**:792-796.
- Benjamin, P., M. Federman y C.A. Wanke.** 1995. Characterization of an invasive phenotype associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:3417-3421.
- Bhan, M.K., P. Raj, M.M. Levine, J.B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar y S. Sazawal.** 1989. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.* **159**:1061-1064.
- Cassels, F.J. y M.K. Wolf.** 1995. Colonization factors of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and their intestinal receptors. *J. Ind. Microbiol.* **15**:214-226.
- Chansiripornchai, N., P. Ramasoota, J. Sasipreeyajan y S.B. Svenson.** 2001. Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Vet. Microbiol.* **80**(1):75-83.
- Chart, H., S.M. Scotland, y B. Rowe.** 1989. Serum antibodies to *Escherichia coli* serotype O157:H7 in patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **27**:285-290.
- Chart, H., H. Smith, S.M. Scotland, B. Rowe, D. Milford y C. Taylor.** 1991. Serological identification of *Escherichia coli* O157:H7 infections in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **337**:138-40.

- Chart, H. y C. Jenkins.** 1999. The serodiagnosis of infections caused by Verotoxin-producing *Escherchia coli*. J. Appl. Microbiol. **86**:731-740.
- Craun, G.F.,** 1988. Surface waters supplies and health. J. Am. Water Assoc. **80**: 40-52.
- Cravioto, A., R.J. Gross, S.M. Scotland y B. Rowe.** 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherchia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. **3**:95-99.
- Cravioto, A., R.E. Reyes y R. Ortega.** 1988. Prospective study of diarrhoea disease in a cohort of rural Mexican children; incidence and isolated pathogens during the first two years of life. Epidemiol. Infect. **101**:123-134.
- Cravioto, A., R. E. Reyes, F. Trujillo, F. Uribe, A. Navarro, J. M. de la Roca, J. M. Hernandez, G. Pérez, y V. Vazquez.** 1990. Risk of diarrhea during the first year of the associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am. J. Epidemiol. **131**:886-904.
- Cravioto, A., A. Tello y J. Navarro.** 1991-1. Association of *Escherchia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet **337**:262.
- Cravioto, A., A. Tello y H. Villafán.** 1991-2. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherchia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrums and breast milk. J. Infect. Dis. **163**:1247-1255.
- Cronholm, Louis S.** 1980. Potential Health Hazards from Microbial Aerosols in Densely populated Urban Regions. Applied. and Enviromental Microbiology **39**(1): 6-12.
- Czczulin, J.R., S. Balepur, S. Hicks y J.P. Nataro.** 1997. Aggregative adherence fimbrial II, a second fimbrial antigen mediated enteroaggregative *Escherichia ncoli* aggregative adherence fimbriae I biogenesis. J. Bacteriol. **176**:4135-4145.
- Dedroy, C., J. Yealy, R.A. Wilson, M.K. Bhan y R. Kumar.** 1995. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherchia coli*. Infect. Immun. **63**:2873-2879.
- Donneberg, M.S. y J.B. Kaper** 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *c Escherchia coli* by using a positive selection suicide vector. Infect. Immun. **59**:4310-4317.
- Donnenberg, M. S. y J.P. Nataro.** 1995. Methods for studing adhesion of diarrheagenic *Escherchia coli*. Methods Enzymol. **253**:324-336.
- Ebel, K.G., C. Deibel, A.U. Kresse, C.A. Guzman y T. Chakraborty.** 1996. Temperature and medium dependent secretion fo protein by Shiga toxin producing *Escherchia coli*. Infect. Immun. **64**:4472-4479.
- Eslava, C., H. Zepeda, M.P. Herrera y S. Giono.** (1990). Phage detection of cytotoxic *Escherchia coli* strains. Rev. Lat. Amer. Microbiol. **32**:95-97.
- Eslava, C., J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro y A. Cravioto.** 1993-1. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherchia coli*, abstr. B105. In: Abstracts of the 93 rd General Meeting og the American Society for Microbiology 1993. Am. Soc. Microbiol. Washington, DC.

- Eslava, C., J.M. Villaseca y A. Cravioto.** 1993-2. Cepas de *E. coli* relacionadas con diarrea. En capítulo III-6 de Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales editado por Giono Cerezo S, Escobar Gutiérrez A, Valdespino Gómez JL Instituto Nacional de diagnóstico y referencia epidemiológicas (INDRE; Secretaria de Salud).
- Eslava, C., G. Navarro-García, J.R. Czeczulin, I.R. Henderson y A. Cravioto.** 1998. Pet, an autotransporter enterotoxins from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. **66**:3149-3154.
- Ezcurra, E., y M. Mazari-Hiriart.** 1996. Are megacities viable? A cautionary tale from Mexico City: Environment. **38**:6-35.
- Farmer, III, J.J.** Escherichia, Salmonella, Shigella and Yersinia. In Murray, Patrick R.; Baron, Ellen Jo; Tenover; Fred C; Pfaller, Michael A. And Tenover, Robert H. Manual of clinical microbiology. 6 edition, editorial ASM Press. 1995, pp. 438-49.
- Fedorak, P.M., y D.W.S. Westlake.** 1980. Airborne bacterial densities at an activated sludge treatment, plant. J. Water Pollut. Control Fed. **52**(8):2185-2192.
- Felsenstein, J.** 1984. Distance methods for interfering phylogenies: a justification. Evolution. **38**:16-24.
- Fogarty, J., L. Thornton, C. Hayes, M. Laffoy, D. O'Flanagan, J. Devlin y R. Corcoran.** 1995. Illness in a community associated with an episode of water contamination with sewage. Epidemiol. Infect. **114**:289-295.
- Fujii, Y., Y. Kondo y K. Okamoto.** 1995. Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory activity of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. FEMS. Microbiol. Lett. **130**:259-266.
- Gauthier, M. y D. Rudulier.** 1990. "Survival in seawater of *Escherichia coli* cells grown in marine sediments containing glycine betaine". Applied Environmental Microbiol. **56**: 2915-2918.
- Gholl, M., T. Bernard y M. Cormier.** 1990. Evidencia that *Escherichia coli* accumulates glycine betaine de marine sediments. Applied and Environmental Microbiol. **56**(2): 551-554.
- Giron, J. A., A. S. Ho y G. K. Schoolnik.** 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. Science. **254**: 710-713.
- Giron, J. A. M.M. Levine y J. B. Kaper.** 1994. Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **12**: 71-82.
- Godish, D., T. Godish, B. Hooper, C. Panter, M. Cole, y M. Hooper.** 1993. Airborne mold and bacteria levels in selected houses in the Latrobe Valley, Victoria, Australia, p. 171-175. En indoor Air'93, Helsinki, Finlandia.
- Greathouse, J. y G. Thorne.** 1994. Humoral immune response to Shiga-Like Toxin and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in hemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. J. Clin. Microbiol. **32** (5):1172-1178.
- Grif, K., H. Karch, C. Schneider, F.D. Daschner, L. Beutin, T. Cheasty, H. Smith, B. Rowe, M.P. Dierich y F. Allerberger.** 1998. Comparative study of five different techniques for epidemiological typing of *Escherichia coli* O157. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **32**(3):165-76.

- Hedberg, C.W., S.J. Savarino, J.M. Besser, C.J. Paulus, V.M. Thelen, L.J. Myers, D.N. Cameron, T.J. Barrett, J.B. Kaper y M.T. Osterholm.** 1997. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherchia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.* **176**:1625-1628.
- Henderson, I.R., J. Czczulin, C. Eslava, F. Noriega y J.P. Nataro.** 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherchia coli*. *Infect. Immun.* **66**: 5587-5596.
- Hickey, J.L.S. y P.C. Reist.** 1975. Health significance of airborne microorganisms from wastewater treatment process. *J. Water Pollut. Control Fed.* **47**:2741-2773.
- Hicks, S., D.C.K. Candy y A.D. Philips.** 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherchia coli* to pediatric intestinal mucosa *in vitro*. *Infect. Immun.* **64**:4751-4760.
- Hill, W.E. y W.L. Payne.** 1984. Genetic Methods for the detection of microbial pathogens. Identification of enterotoxigenic *Escherchia coli* by DNA hibridizacion: collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists.* **67**:801-807.
- Hitotsubashi, S., Y. Fujii, H. Yamanaka y K. Okamoto.** 1992. Some properties of purified *Escherchia coli* heat-stable enterotoxin II *Infect. Immun.* **60**:4468-4474.
- Hopkins, K.L. y A.C. Hilton.** 2001. Use of multiple primers in RAPD analysis of clonal organisms provides limited improvement in discrimination. *Biotechniques* **30**(6):1262-4, 1266-7.
- Hunter, C.A, A.V. Hull, D. Highman, y C. Grimes.** 1995. The abundance of bacteria in homes in the Avon Area of the U. K., 71-74. *En* L. Morawska, N.D. Bofinger y M Maroni (ed), *Indoor Air, An Integrated Approach.* Elsevier Science, Ltd. Reino Unido.
- Itoh, Y, I. Nagano, M. Kunishima y T. Ezaki.** 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherchia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2546-2550.
- Jarvis, K.G. y J.B. Kapel.** 1996. Secretion of extracellular protein by enterohemorrhagic *Escherchia coli* via a putative III secretion system. *Infect. Immun.* **64**:4826-4829.
- Jerse, A.E., J. Yu, B.D. Tall y J.B. Kaper.** 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherchia coli* necessary for the production of attachin and effacing lesion on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA,* **87**:7839-7843.
- Jerse, A.E. y J.B. Kaper.** 1991-1. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherchia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* **59**:4302-4309.
- Jerse, A.E., K.G. Gicquelais y J.B. Kaper.** 1991-2. Plasmid and chromosomal elements involves in the pathogenesis of attaching and effacing *c Escherchia coli*. *Infect. Immun.* **59**:3869-2875.

- Knutton, S., D.R. Lloyd y A.S. McNeish.** 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherchia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* **55**:69-77.
- Knutton, S., R.K. Shaw, M.K. Bhan, H.R. Smith, M.M. McConnell, T. Cheasty, P.H. Williams y T.J. Baldwin.** 1992. Ability of Enteroaggregative *Escherchia coli* strains to adhere in vitro to human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* **60**:2083-2091.
- Koya, G., N. Kosakai y Y. Fukawara.** 1954. Supplementary studies on the multiplication of *Escherchia coli*-B4 in the intestinal tract of adult volunteers and its relation to manifestation of coli enteritis. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **7**: 655-661.
- Kramer, M.H., B.L. Hermaltdt, G.F. Craun, R.L. Calderon y D.D. Juranek.** 1996. Surveillance for waterborne-disease outbreaks United States, 1993-1994. *MMWR CDC Surveill. Summ.* **45**:1-33.
- Lacey, J.** 1989. The detection Division, Institute of Arable Crops Research, Rothamsted Experimental Station.
- Laney, D.W. Jr y M.B. Cohen.** 1993. Approach to the pediatric patient with diarrhea. *Gastroenterol Clin North Am*, **22**:499-516.
- Law, D.** 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherchia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**:152-173.
- Levine, M.M., E.J. Bergquist y D.R. Nalin.** 1978. *Escherchia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**:1119-1122.
- Levine, M.M. y R. Edelman.** 1984. Enteropathogenic *Escherchia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenic. *Epidemiol. Rev.* **6**:31-51.
- Levine, M.M.** 1987. *Escherchia coli* That cause diarrhea: enterotoxingenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:377-389.
- Long, K.Z., J.W. Wood, G.E. Vasquez, K.M. Weiss, J.J. Mathewson, F.J. de la Cabada, H.L. Dupont y R.A. Wilson.** 1994. Proportional hazards analysis of diarrhea due enterotoxigenic *Escherchia coli* and breast feeding in a cohort of human Mexican children. *Am. J. Epidemiol.* **139**:193-205.
- Loureiro, I., G. Frankel, J. Adu-Bobie, G. Dougan, L.R. Trabulsi y C.M. Samparo.** 1998. Human calostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherchia coli*-virulence-associated proteins: Intimin, BfpA, and Esp and EspB. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **27**:166-171.
- Manjarrez H.A., P.S. Gavilanes, M.A. Chávez, L.J. Molina y A. Cravioto.** 1997. Binding of diarrheagenic *Escherilla coli* to 32-to 33 kilodalton human intestinal brush border protein. *Infect. Immun.* **65**:4494-4401.
- Manjarrez H.A., P.S. Gavilanes, B.E. Chavez, O.A. Navarro y A. Cravioto.** 2000. Antigen detection in enteropathogenic *Escherchia coli* using secretory immunoglobulin A antibodies isolated from human breast milk. *Infect. Immun.* **68**:5030-5036.



- Margall, N., A. Domínguez, G. Prats y L. Salleras. 1997. *Escherchia coli* Enterohemorrágica. Rev. Esp. Salud Pública. 71:437-443.
- Marthi, B., V.P. Fieland, M. Walter y R.J. Seidler. 1990. Survival of Bacteria during Aerosolization. Applied and Environmental Microbiology. 56(11):3463-3467.
- Mathewson, J.J., R.A. Oberhelman, H.L. Dupont, F.J. De la Cabada y E.V. Garybay. 1987. Enteroadherent *Escherchia coli* as a cause of diarrhea among children in México. J. Clin. Microbiol. 25:1917-1919.
- Maurer, J.J., M.D. Lee, C. Lobsinger, T. Brown, M. Maier y S.G. Thayer. 1998. Molecular typing of avian *Escherchia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. Avian Dis., 42(3):431-51.
- McDaniel, T.K., K.G. Jarvis, M.S. Donnenberg y J.B. Kaper. 1995. A genetic locus of effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:1664-1668.
- Mitsuda, T., T. Muto, M. Yamada, N. Kobayashi, M. Toba, Y. Aihara, A. Ito y S. Yokota. 1998. Epidemiological study of a food-borne outbreak of enterotoxigenic *Escherchia coli* O25:NM by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 36(3):652-6.
- Murray, P.R., E.Jo. Baron, F.C. Tenover, M.A. Ptaller, y R.H. Tenover. 1995. Manual of clinical microbiology. 6 edition, editorial ASM Press. 1995, pp 438-49.
- Nataro, J.P., I.C.A. Scaletsky, J.B. Kaper, M.M. Levine y L.R. Trabulsi. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherchia coli*. Infect. Immun. 48:378-383.
- Nataro, J.P., J.B. Kaper, B.R. Robins, V. Prado, P.A. Vial, y M.M. Levine. 1987-1. Patterns of adherence of diarrheogenic *Escherchia coli* to HEp-2 cells. J. Ped. Infect. Dis. 6:829-831.
- Nataro, J.P., K.O. Maher, P. Mackie y J.B. Kaper. 1987-2. Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherchia coli*. Infection Immunity. 55:2370-2377.
- Nataro, J.P., D. Yikang, J.A. Giron, S.J. Savarino, M.H. Kothary y R. Hall. 1993. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherchia coli* requires two unlinked plasmid regions. Infection Immunity. 61:1126-1131.
- Nataro, J.P., y J.B. Kaper. 1998. Diarrheogenic *Escherchia coli*. Clin. Microbiol. Reviews 11(1):142-201.
- Navarro G.F., C. Eslava, J.M. Villaseca, R. Lopez, J.R. Czezulín, S. Srinivas, J.P. Nataro y A. Cravioto. 1998. In vitro effects of a high-molecular weight heat-labile enterotoxins from enteroaggregative *Escherchia coli*. Infect. Immun. 66:3149-3154.
- Navarro, A. 2000. Respuesta humoral en humanos a la colonización por *Escherichia coli* 0157:H7. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias UNAM.
- Neter, E. y C. Shumway. 1950. *Escherchia coli* D433: occurrence in intestinal and respiratory tracts. Cultural characteristics, pathogenicity, sensitivity to antibiotics. Proco. Soc. Exp. Biol. Med. 504-507.

- O'Brien, A., J.W. Newland, S.F. Miller, R.K. Holmes, H.W. Smith y S.B. Formal. 1984. Shiga-like toxin converting phages from *Escherchia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226:694-696.
- Ohno, A., A. Marui, C.E. Sanzetenea, R.A. Benitez, E.D. Calvo, H. Kasitani, Y. Ishii y K. Yamaguchi. 1997. Enteropathogenic bacteria in the la paz river of Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57(4):438-444.
- Pierard, D., L.L. Huyghens, S. Lauwers y H. Lior. 1991 Diarrhoeae associated with *Escherchia coli* producing porcine oedema disease verotoxin. *Lancet* 338-762.
- Quintino, C.M. Tesis de Licenciatura. 1995. Alimentos de consumo crudo, vehículos importantes en la transmisión de bacterias causantes de diarrea en humanos. Facultad de Química, UNAM.
- Radu, S., O.W. Ling, G. Rusul, M.I. Karim, M. Nishibuchi, S. Radu, G. Rusul, M.I. Karim y M. Nishibuchi. 2001. Detection of *Escherchia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *J. Microbiol. Methods* 46(2):131-9.
- Randall, C.W. y J.O. Ledbetter. 1966. Bacterial air pollution from activated sludge units. *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.* 27:506-519.
- Riley, L.W., R.S. Remis, S.D. Helgerson, H.B. McGee, J.G. Wells, J.G. Wells, B.R. David, R.J. Hebert, E.S. Olcott, L.M. Johnson, N.T. Hargrett, Blake y M.L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherchia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308:681-685.
- Rosas, I., A. Yela, E. Calva. 1994. Bacterias entéricas en la atmósfera. *Ciencia y desarrollo*. p. 52-57.
- Rosas, I., C. Calderon, E. Salinas y J. Lacey. 1996. Airborne microorganisms in a domestic waste transfer station. p. 89-98. En Müilenberg, M. y H. Burge (ed). *Aerobiology: Proceedings of the Pan-American Aerobiology Association*. CRS, Lewis Publisher. EUA.
- Rosas, I., E. Salinas, A. Yela, E. Calva C. Eslava y A. Cravioto. 1997. *Escherchia coli* in settled-dust and air samples collected in residential environments in Mexico city. *Applied and Enviromental Microbiology*. 63(10):4093-4095.
- Sainz, E.T., 1998. Tesis de maestría: Estudio de la presencia y sobrevivencia de enterobacterias patógenos en el pozol. 1998. México DF. UNAM.
- Salinas, C. M. E. 1998. Tesis de Maestría: Caracterización de aerobacterias entericas enambientes intra y extramuros de la Ciudad de México. 25-26. México.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T. Maniatis. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Boston: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 2 Ed. vol I, pp. 2.4.1-2.42.
- Savarino, S.J., A. Fasano, D.C. Robertson y M.M. Levine. 1991. Enteroaggregative *Escherchia coli* elaborate a heat-stable enterotoxins demonstrable in an in vivo rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* 87:1450-1455.
- Savarino, S.J., A. Fasano, J. Whatson, B.M. Martin, M.M. Levine, S. Guandalini y P. Guerry. 1993. Enteroaggregative *Escherchia coli* heat-stable enterotoxins 1 represents another subfamily of *Escherchia coli* heat -stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3093-3097.

- Saxena, K., A.D. O'Brien y E. Ackerman.** 1989. Shiga-like toxin variants, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xohopys* oocytes. *J. Biol. Chem.* **264**:596-601.
- Scotland, S.M., H.R. Smith, G.A. Willshaw y B. Rowe.** 1983. Verotoxin production in strains of *Escherchia coli* is determined by genes carried on a bacteriophage. *Lancet* **11**:216.
- Scotland, S.M., H.R. Smith y B. Rowe.** 1985. Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherchia coli* 0157. *Lancet* **11**:885-888.
- Scotland, S.M., H.R. Smith, B. Said, G.A. Willshaw, T. Cheasty y B. Rowe.** 1991. Identification of enteropathogenic *Escherchia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching-and effacing *Escherchia coli* not hybridizing with the EPEC adherence-factor probe. *J. Med. Microbiol.* **35**:278-283.
- Schoolnik, G.K.** PCR detection of shigella species and enteroinvasive *Escherchia coli*. *En* Persing, David H.; Smith, Thomas F; Tenover, Fred C.; White, Thomas J. Diagnostic Molecular Microbiology principles and applications. American Society For Microbiology, Washigton, D. C. 1993, pp. 277-81.
- Shangkuan, Y.H. y H.C. Lin.** 1998. Application of Random Amplified Polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. **85**:693-702.
- Shoemaker, N.B., G. Wang y A.A. Salyers.** 1992. Evidence for natural transfer of a tetracycline resistance gene between bacteria from the human colon and bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1313-1320.
- Singh, K.V., R.R. Reves, L.K. Pickering y B.E. Murray.** 1992. Identification by DNA sequence analysis of a new plasmid-encoded trimethoprim resistance gene in fecal *Escherchia coli* isolated from children in day-care centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1720-1726.
- Smith, H.R., N.P. Day, S.M. Scotland, R.J. Gross y B. Rowe.** 1984. Phage-determined production of verocytotoxin in strains of *Escherchia coli* of O157. *Lancet* **I**:1242-1243.
- Smith, H.R., S.M. Scotland, G.A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto y C. Eslava** 1994. Isolates of *Escherchia coli* 044:H18 of diverse origen are enteroaggregative. *J. Infect. Dis.* **170**:1610-1613.
- Snyder, J.D. y M.H. Merson.** 1982. The magnitede of the gobal problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bill World Health Organ* **60**: 605-613.
- Sohel, I., J.L. Puente y W.J. Murray.** 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pili gene of enteropathogenic *Escherchia coli* and its distribution in *Salmonella serotypes*. *Mol. Microbiol.* **7**:563-575.
- Solorzano S.F. y N.M. Miranda.** 1998. Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. **40(6)**:510-516.

- Sprangler B. D., 1992.** Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* **56**: 622-630.
- Stein, P., Boodhoo, G. Tyrrell, J. Brunton y R. Read.** 1992. Crystal Structure of the Cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *Escherichia coli*: *Nature* **355**:748-750.
- Tacket, C.O. y M.M. Levine.** 1997. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. II. Live oral vaccines and subunit (purified fimbriae and toxin subunit) vaccines p 875-883. *In* M. M. Levine, G. C. Cobon (ed), *New generation Vaccines*, 2N ed Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Takeda, Y.** 1997. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *World Health Stat. Q.* **50**:74-80.
- Utsunomiya, A., D.E. Calvo, A.A.B. Reyes, E.S. Castro, E. Rodrigues, C. Tress, J.I.Z. Corzo, E. Hannover, A. Kai, K. Tamura y N. Higa.** 1995. Major enteropathogenic bacteria isolated from diarrheal patients in Bolivia: hospital-based study. *Microbiol. Immunol.* **39**:845-851.
- Vial, P.A., B.R. Robins, H. Lior, V. Prado, J.B. Kaper, J.P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed y M.M. Levine.** 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infec. Dis.* **158**:70-79.
- Vogel, L., O.E. Van, H.M. Maas, B. Minderhoud y L.V. Dijkshoorn.** 2000. Epidemiologic typing of *Escherichia coli* using RAPD analysis, ribotyping and serotyping. *Clin. Microbiol. Infect.* **6**(2):82-7.
- Wai, S.N., A. Takade y K. Amako.** 1996. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:17:22.
- Willeke, K., P.A. Baron.** 1987. The size distribution of whirlpool-generated droplets, their ability to contain bacteria and their deposition potential in the human respiratory tract, p.361-364. *In* *Advances in Aerobiology*. Birkhauser Verlag Basel.
- Wolf, M.** 1997. Occurrence, distribution, and association of O and H serogroups, colonization factors antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbil. Rev.* **10**:569-584.