



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DETECCIÓN DE SEROTIPOS O26 Y O111 DE *E. coli*
EN MUESTRAS DE AGUA PROVENIENTES DE
LAS INSTALACIONES DE FES-ZARAGOZA Y DE
LOS ESTABLECIMIENTOS ALEDAÑOS
UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA POLIMIXINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:
BLANCA CRUZ CRUZ**

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

ASESOR: Mtra. YOLANDA FLORES CABRERA

MÉXICO, DF., ABRIL 2010

TESIS APOYADA POR PROYECTO PAPIME PE201307





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.

*Los grandes hombres son los
que más sufren durante su
vida pero tienen a la vez las
más grandes compensaciones*

*De mi formación universitaria
he obtenido mis ideales y de
mis profesores la técnica de la
acción*

*Solamente aquel que
contribuye al futuro tiene
derecho a juzgar el pasado*

Agradecimientos

Seria difícil citar a todas las personas que de una u otra manera han contribuido a terminar esta tesis sin embargo tratare de hacerlo.

Agradezco a un ser supremo (Dios) por la creación del hombre y por todos los enigmas que nos da, lo que incita al hombre a convertirse en investigador aunque al final se llegue a la conclusión Dios

*A mi familia por que han sido el centro de operación de todo en especial a los pilares de esta **mis amados padres** (Benito y Feliciano) que con su apoyo y amor hoy ven materializado una de sus sueños.*

A los asesores y revisores de la tesis por que gracias a sus comentarios hoy permiten que este trabajo este lleno de conocimiento:

*Dr. Rubén Marroquín Segura
Mtra. Yolanda Flores Cabrera
Dr. José Luis Mora Guevara
M. en C. Araceli García del Valle
M. en C. Ángel García Sánchez*

A mis amigos por todos sus comentarios por las risas y los chistes por el apoyo en el trabajo y por la ayuda prestada en este.

*Brenda
Lupita
Paco
Caramelo
Elisa
Froy
Eric*

*De igual manera agradezco a aquel que me esperaba por las tardes, que se iba con migo asta que terminaba aquel que siempre me a apoyo y me dio parte de su tiempo
Gracias a ti amor*

CONTENIDO

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	
<i>Escherichia coli</i>	4
Características	5
Estructura antigénica	6
Mecanismo de patogenicidad	9
Clasificación	9
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	
Antecedentes	10
Factores de virulencia	11
Signos y síntomas de ECEH	13
Modo de transmisión	14
Reservorio	14
Brotos causados por Serotipos O26 Y O111 de <i>Escherichia coli</i> Verotoxigenica o Enterohemorrágica.	14
Definición de coliformes y Método de cuantificación	18
ELISA	
Tipos de ELISA	19
Planteamiento del problema	21
Objetivo	21
Hipótesis	22
Diseño metodológico	22
Diagrama de flujo	26
Método	27
Resultados	35
Discusión de resultados	46
Conclusiones	49
Anexos	50
Referencias	72

Resumen

El reporte de la Secretaria de Salud para el periodo 1995-2000 mostró que las enfermedades intestinales son la cuarta causa de mortalidad infantil en menores de 1 año siendo *Escherichia coli* la causante de cuatro mil casos en Mexico. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una técnica de ELISA ligada a polimixina para la detección de lipopolisacáridos (LPS) de los dos serótipos de *Escherichia coli* entero hemorrágica O26 y O111 en muestras de agua. Se cultivo *Escherichia coli* O26 ATCC 11840 y *Escherichia coli* O111 ATCC 33780 en Agar Soya Tripticasa, se extrajo el LPS y se obtuvo el antígeno O de ambos serótipos para la inmunización de un Conejo Nueva Zelanda y así obtener anticuerpos anti LPS, posteriormente se purificaron y se elaboró un conjugado con peroxidasa de rábano. Se muestrearon las instalaciones de FES-Zaragoza tanto Campus I como Campus II al igual que los establecimientos aledaños a estos, se obtuvieron 60 muestras, de estas 24 desarrollaron colonias de *E. coli* a estas 24 muestras se les realizó la técnica de ELISA polimixina para determinar la presencia de LPS para *E. coli* O111 y O26; encontrándose 0 muestras positivas para el serótipo O111 y 13 positivas para el serótipo O26 comprobándose así la eficiencia y especificidad de la técnica así como su utilidad práctica.

Introducción

La SSA/INEGI reporta que cada año *Escherichia coli* mata a cuatro mil niños en México (encuesta epidemiológica del 2000) El reporte de la Secretaria de Salud para el periodo 1995-2000 mostró que las enfermedades intestinales son la cuarta causa de mortalidad infantil en menores de 1 año y la principal causa en niños de 1 a 4 años con una tasa de 4.96/100,000 habitantes.

Escherichia coli (*E. coli*) se encuentra en el agua y en los alimentos contaminados, se aloja en el intestino delgado, puede causar deshidratación y diarrea, *E. coli* es uno de los agentes etiológicos de diarreas que afectan a niños menores de 5 años y adultos, cuando ingieren alimentos o bebidas contaminadas, constituyendo un problema de salud pública en nuestro país. En los últimos 100 años *E. coli* se ha estudiado de manera tal que actualmente es la forma de vida libre más comprendida sobre la tierra. Es una bacteria que figura como una especie predominante entre la flora anaeróbica facultativa del intestino del hombre y animales, donde juega un rol importante en su fisiología

Sin embargo, dentro de la especie se encuentran cepas patógenas que causan distintos síndromes diarreicos. Se les ha clasificado en cinco categorías, de acuerdo a sus propiedades de virulencia, interacción con la mucosa intestinal, cuadro clínico, epidemiología y serotipos O y H:

- E. coli* entero toxigénica (ECET)
- E. coli* entero patogénica (ECEP)
- E. coli* entero hemorrágica (ECEH)
- E. coli* entero invasiva (ECEI)
- E. coli* entero agregativa (ECEA)

El mecanismo por el que *E. coli* actúa como agente patógeno es la producción de diversas enterotoxinas como la termolábil (LT) que es semejante a la toxina

colérica aunque 100 veces menos potente; la termoestable (ST) que se subdivide en Sta (ST-I) que activa la guanilato-ciclasa de las células intestinales y provoca una reacción secretora y la STb (ST-II) cuyo mecanismo de acción se desconoce. También produce citotoxinas llamadas verotoxinas (VT) sobre todo la cepa de *Escherichia coli* 0157:H7.

La relevancia clínica del cuadro diarreico originado por cepas ECEH lo constituye su capacidad de producir síndrome hemolítico urémico (SHU) en un 2 a 7% de los pacientes. Esta enfermedad afecta a niños menores de 5 años, principalmente lactantes (82%), con una letalidad que puede llegar a 10% y un 30% de secuelas graves tales como insuficiencia renal crónica e hipertensión arterial.

Se han desarrollado, muchos métodos para la detección de ECEH en comida enfocados principalmente a la detección de *E. Coli* 0157: H7, como los métodos comerciales EHEC-TEK ELISA y PCR. Hay pocos reportes en la literatura de métodos para la detección de otros serotipos de *E. Coli* como O111 y O26, esto debido a que son de menor prevalencia, sin embargo estos pueden causar una sintomatología muy parecida al O157:H7 o menos agresiva de ahí la importancia de desarrollar un método rápido y específico para su detección y así dar un tratamiento oportuno y adecuado al encontrar el microorganismo causante de los síntomas o de la enfermedad en cuestión.

En este trabajo se utilizó la ELISA.-Ligada a Polimixina (ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos) aprovechando el mecanismo de acción de las polimixinas que consiste en la interacción de su anillo peptídico policatiónico con las moléculas lipopolisacáridas (LPS), para la detección de los serotipos O111 y O26 de ECEH en muestras de agua.

Marco Teórico

El cuerpo recibe agua y nutrientes (ingresos) a través de los líquidos y alimentos. Normalmente, pierde agua y sales (egresos) a través de las heces, la orina y el sudor; cuando el intestino está sano, el agua y las sales pasan del intestino a la sangre.

La diarrea es una enfermedad intestinal generalmente infecciosa, caracterizada por evacuaciones líquidas o de menor consistencia con un contenido de agua del 70% al 95%, frecuentes, casi siempre en número mayor a cuatro en 24 horas. En un proceso de diarrea, el intestino no trabaja en forma normal, absorbe menos agua y sales hacia la sangre, elimina más agua y sales desde la sangre hacia el intestino, es por esto que se pierden en las heces más agua y sales de lo normal. La pérdida abundante de agua y sales del cuerpo resulta, en deshidratación, la cual también puede estar causada por vómitos, que con frecuencia acompañan a la diarrea y sucede más rápidamente en infantes (menores de un año) y niños pequeños, en climas calientes y cuando hay fiebre⁽¹⁾.

A menudo la diarrea se acompaña con dolor y evacuación de urgencia, malestar perianal e incontinencia, dolor abdominal, náuseas, vómitos, espasmos abdominales, comúnmente conocidos como cólicos, fiebre y pérdida del apetito.

Escherichia Coli

Originalmente descrita y nombrada por Theodore Escherich, bacteriólogo alemán en 1885. Fue el primero en describir y aislar a esta bacteria en heces de un niño sano al cual denominó *Bacterium coli commune*. Sin embargo, desde sus primeras observaciones Escherich propuso la posible participación de esta bacteria como un agente productor de diarrea, lo cual no se aceptó. En 1894 demostró su presencia en orina de jóvenes con infecciones del tracto urinario postulándolo como un agente oportunista y en 1895, el nombre de *Bacterium coli commune* cambió por *Escherichia coli* (*E. coli*) en honor a Theodore Escherich.

Características

De acuerdo al manual de Bergey's *E. coli* es miembro de la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro de la tribu *Escherichieae*, la cual incluye a los géneros *Escherichia* y *Shigella*.

E. coli se observa como bacilos Gram negativos, pequeños, alargados, finos; con dimensiones de 0.5 x 1.0 a 3.0 micras y se mueve por medio de flagelos peritricos, además pose apéndices filamentosos de naturaleza protéica frecuentemente portadoras de adhesinas, que presentan la propiedad de combinarse con receptores de naturaleza polisacárida localizados en la superficie de las células epiteliales llamados pilis o fimbrias⁽¹⁾. *E. coli* es poco exigente en sus necesidades nutritivas y relativamente resistente a los agentes externos, algunas cepas pueden tener cápsulas y dar colonias mucoides, la mayoría son fermentadoras de lactosa y de la glucosa, con producción de ácido y desprendimiento de gas, es anaerobio facultativo crece a temperatura desde 2.5-45° C y puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y congelación. El pH óptimo para su crecimiento es de 7.0; esta bacteria crece en medios de cultivos simples y sintéticos, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía⁽²⁾.

En medios sólidos las colonias son circulares y lisas, con bordes bien definidos (Figura1)⁽³⁾ y en algunos medios diferenciales como EMB presentan brillo metálico característico (Figura 2)⁽⁴⁾. Ciertas cepas al crecer en un medio de gelosa sangre producen α o β hemólisis (Figura3)⁽⁵⁾ En medio líquido las cepas lisas producen una turbidez uniforme, mientras que las cepas rugosas se asientan en el fondo formando un depósito granular.

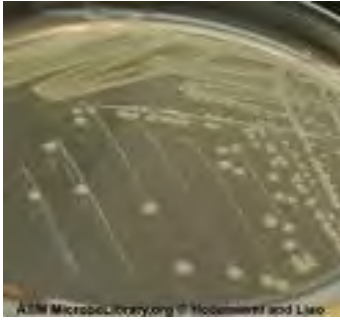


Figura 1



Figura 2



Figura 3

Imágenes que ilustran el crecimiento de *Escherichia coli* en medios sólidos (Figura 1), en medios diferenciales (Figura 2) y en Agar sangre (Figura 3)

Estructura antigénica de *E. coli*

Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes de la superficie de las células de las bacterias Gram negativas. Pueden desarrollar múltiples actividades y roles, dentro de las cuales se tienen: barrera, permeabilidad selectiva y receptor para algunos bacteriófagos. La interacción de LPS con otros sistemas biológicos incluye la toxicidad para muchos organismos superiores, inmunogenicidad y activación del complemento ⁽⁶⁾.

Los LPS son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos, que forman la parte mayoritaria de la capa externa de la pared de bacterias Gram negativas. El lipopolisacárido se denomina endotoxina y es responsable de la toxicidad de las bacterias forman colectivamente, en torno al protocito, una capa protectora hidrófila que no puede ser atravesada por moléculas lipófilas.

El lipopolisacárido consta de varias partes, Lípido A, también llamada región "R" y el Antígeno O. El Lípido A, está formado por un disacárido compuesto por N-acetilglucosamina unidos por enlace β a los carbonos 1 y 6, al que se le unen mediante enlace ester ácidos grasos, los ácidos grasos que se encuentran asociados comúnmente en el lípido A son: ácido caproico, áurico, mirístico, palmítico y esteárico (Figura 4)⁽⁷⁾.

La región R, formada por una serie de azúcares de seis carbonos (hexosas) como [glucosa](#), ramnosa, [galactosa](#) entre otros, y también formado por azúcares poco usuales como los dideoxi azúcares, después hay una serie de cuatro azúcares específicos de cada bacteria que se repiten.

El antígeno "O" se dispone fuera de la célula como una endotoxina, actuando como receptor para muchos bacteriófagos y siendo también este el que desencadena junto con el lípido A, la respuesta inmunológica por parte del individuo infectado.

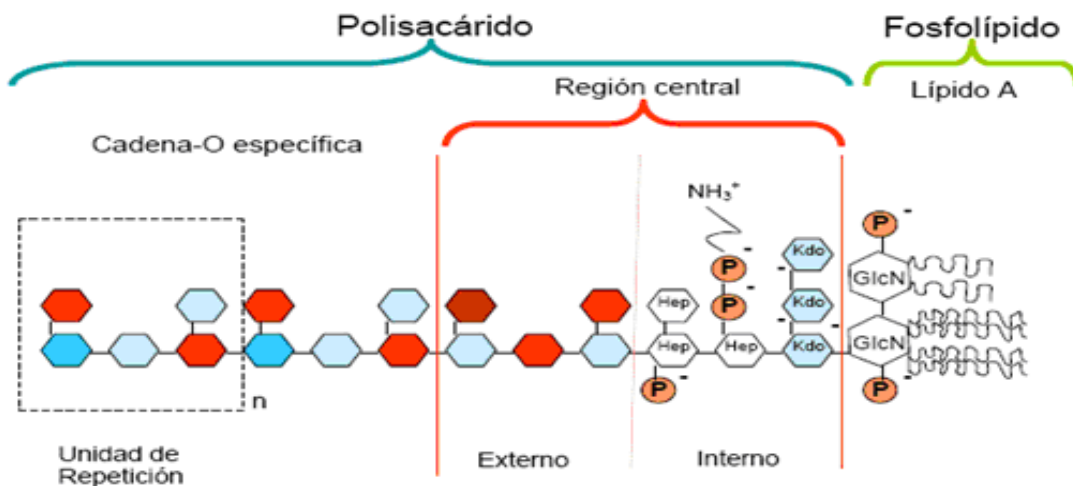
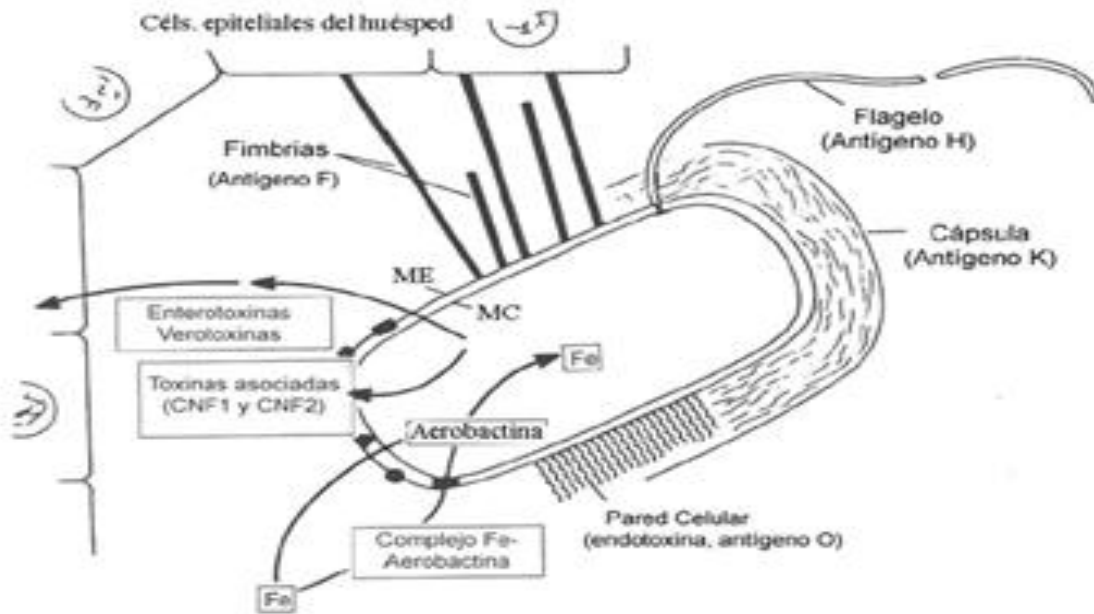


Figura 4 Estructura del Lipopolisacárido (LPS) ⁽⁷⁾.

Kauffman en 1940 desarrollo un esquema de serotipificación que continuamente varia y actualmente presenta 176 antígenos somáticos O (Lipopolisacáridos), 60 capsulares K (polisacáridos) y 112 flagelares H (poseen naturaleza protéica). El antígeno K corresponde al polisacárido capsular que envuelve a la pared celular y enmascara al antígeno O inhibiendo su aglutinación. Existen dos grupos de antígenos K (grupos I y II) que corresponden con las variedades K (A) y K (L). La variedad K(A) que se asocia solamente a cepas de los serogrupos O₈, O₉, O₂₀, y O₁₀₁. Mientras los antígenos flagelares H son termolábiles, (Figura 5) ⁽¹⁾.



Esquema de *Escherichia coli* en el que se presentan los principales antígenos de superficie (O, K, H y F) y algunos factores de superficie
Figura 5⁽¹⁾.

Por último el antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la identificación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular ⁽¹⁾ .

Existen pocos laboratorios estatales que realicen la serotipificación de *E. coli* por el gran número de antisueros que se requieren, por ello se prefiere identificar las cepas mediante sus factores de virulencia empleando ensayos *in vitro*, por ejemplo; adherencia en células Hep-2 y toxigenicidad en células. También se pueden realizar ensayos *in vivo* como asa ligada o la prueba de Sereny, así como inmunológicos y pruebas de biología molecular ⁽¹⁾.

Mecanismo de patogenicidad de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* pueden causar diarrea mediante los siguientes cuatro mecanismos de patogenicidad ⁽¹⁾:

- 1) Propiedades de virulencia que están codificados en plásmidos
- 2) Adhesinas que permiten a la bacteria adherirse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino
- 3) Producción de enterotoxinas (tiene un efecto en la estimulación de secreción de agua y electrolitos) y/o citotoxinas (destrucción celular).
- 4) La invasión donde la bacteria se introduce al citoplasma de las células epiteliales del intestino para posteriormente dividirse y pasar a las células vecinas, evadiendo así los mecanismos de protección del huésped.

Se han descrito paradigmas generales por los cuales *E. coli* puede causar diarrea:

- i) Producción de enterotoxinas (ECET y ECEA)
- ii) Invasión (ECEI)
- iii) Adherencia con mecanismos de señalización de membrana (ECEH, ECEP y ECAD)

Clasificación de cepas de *E. coli* que causan diarrea

E. coli coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera flora normal. Sin embargo, existen cepas patógenas causantes de diarrea que con base, a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ECET), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina vero o toxina semejante a Shiga (ECEH, ECVT o ECTS), enteroinvasiva (ECEI), enteropatógena (ECEP) enteroagregativa (ECEA) y entero adherencia–difusa (ECAD) ⁽¹⁾.

ECET es probablemente el agente etiológico más frecuente de diarreas acuosas de índole bacteriano entre la población infantil en humanos y animales jóvenes, aunque pueden afectar a animales de todas las edades de los países subdesarrollados y el más destacado responsable de la diarrea del viajero. En

países en vías de desarrollo es un importante agente etiológico de diarrea en lactantes ⁽¹⁾.

ECEI manifiesta menor incidencia que las anteriores, se encuentra muy relacionada bioquímica y genéticamente con *Shigella*, al grado que comparte con este género su especial capacidad para invadir el intestino e inducir cuadros disentéricos ⁽¹⁾.

ECEP es una de las principales causas de diarrea infantil en los países en vías de desarrollo aunque también provoca brotes localizados en las guarderías de los países desarrollados en donde, adicionalmente, llega a originar epidemias en adulto ⁽¹⁾.

ECEA se asocia a diarreas persistentes en los niños que habitan en países subdesarrollados, estudios recientes realizados en voluntarios humanos sugieren que también afecta a los adultos y que su distribución geográfica es mundial ⁽¹⁾.

ECAD corresponde a un grupo heterogéneo de microorganismos y los estudios epidemiológicos efectuados hasta ahora han generado grades conflictos y polémicas acerca de su verdadero significado clínico ⁽¹⁾.

ECEH es agente causal de numerosos brotes epidémicos asociados a la ingesta de agua y alimentos contaminados, a partir del cual los individuos afectados padecen de diarreas comunes o sanguinolentas, e inclusive, del síndrome urémico hemolítico que implica diferentes entidades clínicas.

***E. coli* enterohemorrágica, productora de toxina vero o toxina semejante a Shiga (ECEH, ECVT o ECTS)**

En 1983 se presentaron dos brotes; el primero fue reportado por Riley y col., citando dos hallazgos de Colitis hemorrágica (CH) en los estados de Oregon y Michigan en Estados Unidos, los cuales estuvieron asociados a la ingestión de

hamburguesas mal cocidas. Los coprocultivos practicados a los pacientes reportaron el aislamiento de una hasta entonces rara cepa de *E. coli* perteneciente al serótipo O157:H7 no fermentadora de sorbitol. La segunda observación clave fue efectuada por Karmali y col. En ese mismo año, en Canadá, encontraron el serótipo O157:H7 y otros tres serotipos (O26, O111 y O113) ⁽¹⁾.

Por su parte O'brien y col,(1977) describieron filtrados de cultivos líquidos de ciertas cepas de *E. coli* que resultaban citotóxicos para las células del cáncer de cervix (Hela) y que tal actividad podía ser neutralizada por anticuerpos dirigidos contra la toxina de Shiga (Stx), sintetizada por *Shigella dysenteriae* tipo 1: subsecuentemente, el mismo autor informó que varias cepas productoras de cuadros diarreicos liberan una citotoxina muy similar a la Stx (SLT, de Shiga-Like toxin o toxina semejante a Shiga)⁽¹⁾.

O'brien y Colmes en 1987 hicieron notar que la SLT y VT eran en realidad una misma. Que la nomenclatura de VT1 es equivalente a STL-I y VT2 es sinónimo con SLT-II. Posteriormente se propuso el termino de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) por Levine en ese mismo año ⁽¹⁾.

Factores de virulencia, (ECEH, ECTS o ECVT)

- El gen *eea* cromosomal –codifica la proteína intimina₀₁₅₇ que corresponde a una proteína de membrana externa (OMP), que al unirse a sus receptores en la superficie de las células eucariotas, funge como soporte de los filamentos de actina, causando la lesión “Adherencia esfacelamiento”(A/E)
- Enterohemolisina o hemolisina (Hly)- Es una toxina citolítica, se expresa en casi todas las cepas O157:H7 y está ampliamente distribuida entre las cepas de ECEH no-157.
- pO157-es una proteína perteneciente a citocinas formadoras de poros codifica en un plásmido de 60 MDa.

a) Toxina shiga: Es el principal determinante de patogenicidad de ECST, y su síntesis está relacionada con la presencia de un bacteriófago Stx que está insertado en el genoma. La familia de las toxinas Stx contiene dos grupos principales denominados Stx1 y Stx2, inmunológicamente diferentes; una misma cepa puede sintetizar una de ellas o ambas, e inclusive múltiples variantes de Stx2⁽⁸⁾.

La toxina Stx está integrada por dos subunidades: A y B. La subunidad A, puede ser escindida proteolíticamente, produciendo un fragmento A1 de 28 kDa, y otro A2 de 4 kDa, unidos a través de un puente disulfuro. El péptido A1 es el que posee la actividad enzimática, en tanto que el A2, es responsable de la unión de la subunidad A al pentámero que conforma la subunidad B. La subunidad B está constituida por cinco unidades idénticas, que se fijan al receptor de la célula blanco, el glucolípido Gb3 (globotriaosylceramide), presente en las células eucarióticas humanas. La toxina shiga, daña células intestinales, vasculares y renales, es codificada por genes *stx* que son llevados por bacteriófagos lisogénicos y pueden ser adquiridos por genes transferidos horizontalmente. La Stx1 es idéntica a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, excepto en algunos casos, en los que se aprecia un residuo de diferencia.

b) Enterohemolisina: El plásmido de 60 MDa (pO157) encontrado en las cepas de *E. coli* O157:H7 y en otras ECST de origen humano, contiene los genes que codifican para la enterohemolisina Ent-Hly o EHEC-Hly. La enterohemolisina se expresa en muchas de las cepas ECST, y es una proteína perteneciente a la familia de las citolisinas formadoras de poros (RTX) s, siendo el gen que codifica su síntesis, *ehxA*. Esta desempeña un papel, aún no bien explicado, en la lisis de los eritrocitos, a fin de que estos liberen los grupos hemo, moléculas necesarias para mejorar el crecimiento de este patógeno⁽⁸⁾.

c) Intimina: Es una proteína de membrana externa de 97 kDa, la cual es codificada por el gen *eea*, produce extensas lesiones de adhesión y borrado en las células del colon, como resultado de la adherencia íntima del microorganismo a las

células epiteliales. Su interacción con las microvellosidades da lugar a la lesión característica de adherencia íntima con formación de un cáliz, elongación y caída de las microvellosidades conocida como A/E "adherencia y esfacelación".

Aunque el gen *eae* es el principal implicado en la lesión A/E, existen otros genes involucrados en este fenómeno (*esp*, *sep*, *tir*), todos estos se agrupan en una isla de patogenicidad cromosómica LEE "Locus Enterocyte Effacement" (igual a la encontrada en ECEP), éste es un fragmento cromosomal que codifica varias funciones, entre ellas un sistema de secreción tipo III, y la secreción de varias proteínas que inician señales intracelulares. ECST también produce los receptores Tir (translocated intimin receptor) a los que se unirá la intimina. Los receptores Tir son translocados por el sistema de secreción tipo III (complejo oligomérico a modo de anillo con un poro central de unos 20 nm) y en el enterocito son fosforilados y se insertan en la membrana para la unión de la intimina y la posterior formación de la lesión A/E.

Signos y síntomas, ECEH

Desde el punto de vista histopatológico, la infección incluye hemorragia y edema en la lamina propia, una vez que ha atravesado el estomago, ECEH coloniza las regiones terminales del intestino en donde permanece limitada a la superficie de la mucosa (sin invadir de forma sistémica). Dentro del colon, los microorganismos se adhieren a las células epiteliales y se multiplican localmente, causando una clásica lesión estructural en la membrana de las células epiteliales superficiales que consiste en la ocurrencia del fenotipo "adherencia – esfacelamiento" (A/E) que ECEH evidencia sobre la membrana celular del epitelio implicado, involucrando cambios que incluyen la acumulación de actina polimerizada, actina y miosina, por debajo de las bacterias adheridas, la producción de las citotoxinas Stx promueve la inflamación de la mucosa colónica, dando como resultado los exudados purulentos y la presencia de sangre en las heces fecales, el periodo de incubación de las diarreas fluctúa entre 3 y 4 días, aunque existen reportes aislados que citan 1 a 8 días ⁽¹⁾.

Los síntomas iniciales en la diarrea sanguinolenta, pueden ser dolores y calambres abdominales, así como fiebre de corta duración acompañada por vómito, uno o dos días después, el paciente suele experimentar la aparición de sangre en las evacuaciones y un dolor abdominal más intenso; a partir de esa etapa, la patología llega a prolongarse de 4 a 10 días.

Modo de transmisión

- Zoonosis (de animales infectados como son: vacas y borregos al humano).
- Por ingestión de alimentos o bebidas contaminados (carne cruda o mal cocida; leche bronca o agua)
- De persona a persona (por vía oral-fecal) debido a los manipuladores de alimentos.

Reservorio ECEH

ECEH es un agente zoonótico, que tiene un reservorio animal amplio, entre ellos ganado vacuno, borregos, caballos, perros, carne de cerdo, carnero (Nataro), venado (Keene W), pollo, mariscos; constituyendo el ganado bovino el reservorio de mayor impacto epidemiológico. Por esta razón la mayoría de los brotes están asociados al consumo de productos cárnicos contaminados e insuficientemente cocidos, además de agua contaminada y leche bronca.

Brotos causados por Serotipos O26 y O111 de *Escherichia coli* Vero Toxigénica o Entero hemorrágica¹

En los últimos años, *E. coli* O26 se ha convertido en el más frecuentemente aislado no-O157 ECTS asociados con las enfermedades humanas, después de haber sido reportados en Europa, Japón, Asia, EE.UU., Australia, Nueva Zelanda, Argentina y Brasil. El organismo se ha aislado de ganado y los seres humanos y es considerado como patógeno para ambos, *E. coli* O26 recientemente se ha

¹ En este trabajo se maneja *Escherichia coli* entero hemorrágica(ECEH) pero también se conoce como Verotoxigenica (ECVT) y en algunos casos como *Escherichia coli* Productora de Toxina de Shiga(ECTS)

asociado con brotes en Japón y en la República de Irlanda conociéndose así por sobrevivir en heces de bovinos y soportar importantes períodos de estrés ⁽⁹⁾.

Karmali y sus colegas identificaron por primera vez la asociación entre el síndrome urémico hemolítico (SUH) y la infección por la toxina Shiga de producción de *E. coli* O157: H7 en los niños, recientemente, otros organismos especialmente ECTS O26 han surgido como importantes causas de SUH, un estudio de evaluación de la distribución de serotipos de ECTS causantes de SUH en Alemania y Austria determinó que no O157: H7 es de los serotipos más prevalentes en niños de hasta 12 meses de edad; el primer brote gastroentérico causado por la no-O157 ECTS en Irlanda fue descrito por McMaster. Se describe después de los SUH diarreicas asociadas con un grupo de casos causados por ECTS O26 en Irlanda ⁽¹⁰⁾.

La bacteria, *Escherichia coli* O26, se dice que es tan peligrosa como la famosa versión de O157 que pueden causar intoxicación alimentaria mortal en niños y ancianos ⁽¹¹⁾.

Estudios han demostrado que el perfil de virulencia de *E. coli* O26 es la posesión de vtx1 gen (vtx1 +, + EAE, hly +), esto coincide con los datos publicados recientemente sobre la virulencia de los factores no-O157 ECVT en terneros escoceses sin embargo, los genes no VTX VTEC-O157 son conocidos por ser inestables y las condiciones estresantes, cuentos como la exposición de ECVT a una serie de antibióticos y el crecimiento de promoción de los compuestos en los animales pueden influir en la transferencia horizontal de genes entre VTX bacterias ⁽⁹⁾.

Vigilancia de la *E. coli* O26 en Alemania y la República Checa ha establecido que pueden adquirir los genes vtx2 durante un breve espacio de tiempo. Es posible que el gen de la vtx2 pueda conferirle a *E. coli* O26 un mayor potencial patógeno para los seres humanos.

La presencia de ECVT en heces de animales proporciona el potencial para que estos organismos entren en la cadena alimentaria por contaminación fecal de

productos lácteos, contaminación de la carne con contenidos intestinales durante el proceso del sacrificio o contaminación de la fruta y los vegetales por contacto con abono infectado. Las ECVT se transmiten también a través del agua y por contacto directo con personas o con animales infectados ⁽¹²⁾.

La detección de ECVT no-0157 descansa en el análisis directo de colonias sobre placas no selectivas mediante, por ejemplo, inmunomarcaje o sondas de ADN para la producción de verocitotoxinas. Se han descrito numerosas pruebas inmunológicas y de reconocimiento del ácido nucleico para proporcionar un diagnóstico preliminar más rápido de ECVT. Se ha aislado de las heces de algunos animales, fundamentalmente sanos, incluyendo ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, gatos, perros, pollos y aves salvajes.

La incapacidad de las cepas O26 para fermentar ramnosa ha conducido al desarrollo reciente de medios que pueden ser útiles para diferenciar *E. coli* O26 de otros organismos entéricos. El primero es el agar ramnosa-McConkey (RMAC) en el cual la lactosa en el medio MacConkey es reemplazada por 10 g/litro de rhamnosa. Se considera que la adición de 2,5 mg/litro de telurito de potasio y 0,05 mg/litro de cefixima (CT-RMAC) incrementa la especificidad. El segundo es un agar de ramnosa cromogénico incorporando 10 g/litro de ramnosa y 0,02 g/litro de rojo fenol en agar coliforme de ES (un medio indicador para la actividad beta-galactosidasa) al cual se añaden 0,5 mg/litro de telurito potásico y 0,05 mg/litro de cefixima. Sobre este medio, se han descrito colonias de *E. coli* serotipo O26 de color azul marino a negro, mientras otros serotipos de *E. coli* son verdes y otras enterobacterias que no son *E. coli* son verdes, amarillas o incoloras ⁽¹³⁾. Una proporción significativa de cepas no O157 producen enterohemolisina Hly, y pertenecen al subgrupo de ECEH. Estas cepas EHEC-Hly muestran zonas hemolíticas en agar sangre, después de 24 hs de incubación. La producción de EHEC-Hly tiene un alto valor predictivo positivo, pues se ha demostrado que las cepas de *E. coli* enterohemolíticas son a su vez productoras de Stx, mientras que, en las Hly negativas, no se puede predecir si producirá o no Sxt ⁽⁸⁾.

***E. coli* O111**

Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) dicen que *E. coli* O111 puede ser mortal y está ganando la atención de la salud pública. De 1990 a 2007, O111 estaba vinculada a los brotes en EE.UU, de diez muestras, cuatro estaban relacionados a la alimentación, el brote más grande ocurrió en Nueva York en 2004, cuando la sidra de manzana sin pasteurizar enfermó a 212 personas⁽¹⁴⁾.

En EE.UU el Centro de Diagnostico Y Control (CDC) informó que las enfermedades causadas por no-O157: H7 ECTS / ECVT son usualmente menos severas que las causadas por O157 y que sin embargo, algunas son tan graves que pueden causar insuficiencia renal.

La enfermedad causada por ECTS provoca fuertes calambres abdominales (a veces confundidos con apendicitis), diarrea sanguinolenta, y el SUH. *E. coli* O111 fue el segundo microorganismo más aislado (después de *E. coli* O26) de muestras presentadas a la CDC durante 1983 - 1998. ECTS causa un estimado de 110.000 enfermedades cada año en los Estados Unidos, de los cuales mas del 30% puede atribuirse a la no-O157, como los serotipos O111; la carga de morbilidad atribuible a la no-O157 ECTS es desconocida⁽¹⁴⁾.

La mayoría de los brotes de ECTS en América del Norte han sido el resultado de la infección con *E. coli* O157, se han producido brotes en Australia, Europa y Japón.

Escherichia coli O111 se ha aislado de heces fecales de terneros y ganado adulto, debido a la dificultad de detección y la esporádica presencia en humanos provocando enfermedades, no se han realizado estudios extensos en animales este serótipo es semejante a otros *E. coli*, enteróbacterias o *Salmonella*. Ninguno de estos organismos crece a una temperatura menor de 7° C su crecimiento puede ser detenido si se cultiva a un pH por debajo 3.8 y por arriba de 9.5 y a una

concentración de sal del 5-8%, son sensibles al calor y su conducta contaminante es muy similar, aunque no idéntica. Sin embargo, existe evidencia de que este serótipo sobrevive más que otros en alimentos ácidos ⁽¹⁵⁾.

No existen métodos específicos para la detección de este serótipo, aunque actualmente se están desarrollando algunos métodos específicos para su detección como inmunomarcaje o sondas de ADN para la producción de verocitotoxinas.

Muchas cepas de *E. coli* pueden estar presentes en el organismo sin efectos perjudiciales, sin embargo otras como *E. coli* O111 y *E. coli* O157: H7 producen la toxina de Shiga (STX) causando estragos en el sistema digestivo y los riñones; la atención medica inmediata, es fundamental, así como mantener al paciente hidratado y tratar de aliviar el intenso dolor que acompaña a la enfermedad ⁽¹⁵⁾.

E. coli O111 causa daño al humano por medio de organismos vivos que infectan el intestino, una vez ahí produce la toxina. Se han descrito casos de SUH causado por este serótipo en Australia a partir de 1995, por esta razón es necesario que el sistema productivo empleado no solo prevenga el crecimiento de *E. coli* O111, sino que se logre la destrucción de los mismos al máximo, así como seguir los Puntos de Control Critico (PCC) específicos para cada tipo de alimento ⁽¹⁵⁾.

Los antígenos O de *E. coli* pueden estar compuesto por factores que permiten dividir a los serogrupos O en subgrupos. Los factores comunes de estos subgrupos son designados "a" y la no común "b" y "c". Por ejemplo el serogrupo O111 está dividido en los subgrupos O111ab y O111ac ⁽¹²⁾.

Cuantificación de coliformes

La Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa define a los coliformes, como bacilos Gram negativos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que a 35° C fermentan la lactosa con formación de ácido, ocasionando en las

colonias desarrolladas el vire del indicador rojo neutro presente en el medio y la precipitación de las sales biliares.

La presencia de bacterias coliformes en el suministro de agua es un indicio de que puede estar contaminada con aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición. Se pueden hacer pruebas específicamente para coliformes fecales o para el total de bacterias coliformes, entre ellas se tiene el del número más probable y la cuantificación en placa que es el que se utilizará en el presente trabajo.

El método de la NOM 113 permite cuantificar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35° C en aproximadamente 24 hs, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

La técnica **ELISA** (*"Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"* *Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas*) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpo específico marcado con una enzima que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectofotométricamente. Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA a continuación se describen los más comunes⁽¹⁶⁾.

ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas). Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Es necesario incluir controles negativos y positivos.

ELISA indirecto. Las placas ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior, los controles positivos y negativos son los mismos, en el sistema de

detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado, la detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario.

ELISA *sándwich*. (El ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos). En este se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno y después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado.

ELISA POLIMIXINA

El ELISA ligado a polimixina se ofrece como método de detección por utilizar polimixina B que adhiere eficazmente a los lipopolisacáridos presentes en las membranas de las células bacterianas Gram-negativas⁽¹⁷⁾, además de utilizar anticuerpos específicos, traducándose en un procedimiento sensible y capaz de estandarizarse.

Esta técnica es una modificación del ELISA directo, en donde en lugar de utilizar un anticuerpo específico fijado al soporte (la placa de poliestireno irradiada con UV), se utiliza polimixina que adhiere eficazmente a los LPS de manera inespecífica presentes en la muestra; después de realizar los respectivos lavados, se adiciona el anticuerpo específico (IgM-Anti LPS) generado para el agente que se pretende identificar. Los anticuerpos específicos unidos a la peroxidasa se unirán sólo al LPS de interés, sin importar que otros LPS se hayan unido a la placa, una vez hechos los lavados, se adiciona el sustrato y cromógeno que al actuar, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro ^(18, 19).

Planteamiento del Problema

Cada año *E. coli* mata a cuatro mil niños en México. El reporte de la Secretaria de Salud para el periodo 1995-2000 mostró que las enfermedades intestinales son la cuarta causa de mortalidad infantil en menores de un año y la principal causa en niños de uno a cuatro años siendo un problema de salud pública en nuestro país. En la delegación Iztapalapa donde se encuentra la FES-Zaragoza se sabe que la calidad microbiológica del agua potable no es buena como lo demuestran algunos estudios del programa de análisis microbiológico de la misma Facultad, que incluye la cuenta de mesófilos y el número más probable de organismos coliformes (NMP), los análisis bacteriológicos realizados indican gran cantidad de mesófilos aerobios (lo que representa el grado de exposición de la fuente) siendo esta agua no potable. En otros estudios realizados a muestras de agua potable se han aislado *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina por tal motivo siendo *Escherichia coli* uno de los microorganismos más comúnmente contaminante sería de relevancia detectar si existe la presencia de *E. coli* serotipo O26 y O111 ya que son causantes de problemas graves a la salud que van desde cuadros gastrointestinales hasta síndrome hemolítico urémico, por lo que en éste proyecto se pretende desarrollar una técnica de ELISA sándwich específica para detección de lipopolisacrido (LPS) de *Escherichia coli* O26 y O111.

Objetivos

- Cultivar los serotipos de *E. coli* O26 y O111 y obtener los lipopolisacáridos (LPS), por el método de Galanos-Westphal.
- Obtener anticuerpos específicos anti LPS en conejos y conjugarlos a peroxidasa de rábano picante por el método de Voller ⁽²⁰⁾.
- Estandarizar la técnica de ELISA polimixina para la identificación de los serotipos O26 y O111 de *Escherichia coli*.
- Determinar si existe o no la presencia de *E. coli* O26 y O111 en las muestras de agua

- Determinar la carga microbiana presente en las muestras de agua con base en la Norma Oficial Mexicana Nom-113-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa

Hipótesis

Si las muestras de agua contienen a los serótipos de *E. coli* O26 y O111 estos podrán ser identificados y diferenciados de los que no son por la técnica de ELISA-polimixina debido a la presencia de LPS específico para estos microorganismos.

Diseño de Investigación

Tipo de estudio

Observacional

Prospectivo

Transversal

Comparativo

Unidades de análisis

Muestras de agua provenientes de instalaciones de la FES-Zaragoza Campus-I y Campus-II, Clínica Zaragoza y de establecimientos de venta de aguas frescas que se encuentran fuera de la FES-Zaragoza Campus-I y Campus-II.

Criterios de Inclusión

Muestras de agua potable provenientes de instalaciones de FES-Zaragoza de uso común para profesores, alumnos y trabajadores (unidades dentales, laboratorios, baños) así como aguas frescas que se venden afuera de las instalaciones de FES-Zaragoza.

Criterios de exclusión

Muestras de agua potable de las instalaciones de FES-Zaragoza que por su ubicación no tienen libre acceso a ellas los profesores, alumnos y trabajadores, así como aguas frescas que no se vendan en los alrededores de FES-Zaragoza.

Material Biológico

- 2 conejos cepas Nueva Zelanda
- Cepa de *Escherichia coli* O111 ATCC 33780
- Cepa de *Escherichia coli* O26 ATCC 11840

REACTIVOS

- Medio de cultivo AST BIOXON

- Agar EMB BIOXON
- Agua destilada
- Glicerol MERCK México
- Cloruro de sodio (Na Cl) J.T. BAKER S.A. DE C.V. XALOSTOC
- Dextran
- Fenol BAKER S.A. DE C.V. XALOSTOC
- Glucosa MERCK México
- Azul de Kumasi
- BSA (Albúmina sérica bovina) MERCK México
- Reactivos de Lowry
- Glutaraldehído
- Sephadex G-200 SIGMA CHEMICAL COMPANY
- Formaldehído BAKER S.A. DE C.V. XALOSTOC
- Formalina BAKER S.A. DE C.V. XALOSTOC
- Sulfato de polimixina SOPHIA
- Colato de sodio al 5%
- Peroxidasa de rábano
- Ortofenilendiamina SIGMA de México, S.A. de C.V.
- Peroxido de hidrógeno al 30 % SIGMA de México, S.A. de C.V.
- Lisina al 0.2 M
- Agar RVB BIOXON

Material

- Pipetas graduadas de 1, 2,5 y 10 mL Pyrex
- Probeta de 25 mL Pyrex
- Matraz volumétrico de 1L Pyrex
- Vasos de precipitados de 600 mL Pyrex
- Tubos de ensayo de 13X100
- Pipetas Pasteur
- Micro pipeta 40 – 200µL

- Micropipeta de 5-20 μ L
- Micropipeta de 100- 1000 μ L
- Columna para Sephadex
- Garrafón de 4 L
- Frascos de vidrio de 200 mL
- Tubos de 18 X 150 con tapón de rosca Pyrex
- Celda de cuarzo
- Botellas de cultivo de tejido Nuclon Nuncon
- Tubos de amicón estériles de 5 mL
- Placas de poliestireno para ELISA, Costar
- Placa de vidrio
- Soporte Universal
- Termómetro
- Pinza de tres dedos
- Jeringa de 10 mL
- Membrana de celulosa de 12 000 daltons SIGMA DIÁLISIS TUBING
- Asa bacteriológica
- Cajas Petri de vidrio Pyrex
- Tela de asbesto
- Gradilla
- Parafilm“M” 4inX125ft, American National Can
- Mechero Fisher
- Hilo
- Tijeras
- Cinta adhesiva
- Marcador

Equipo

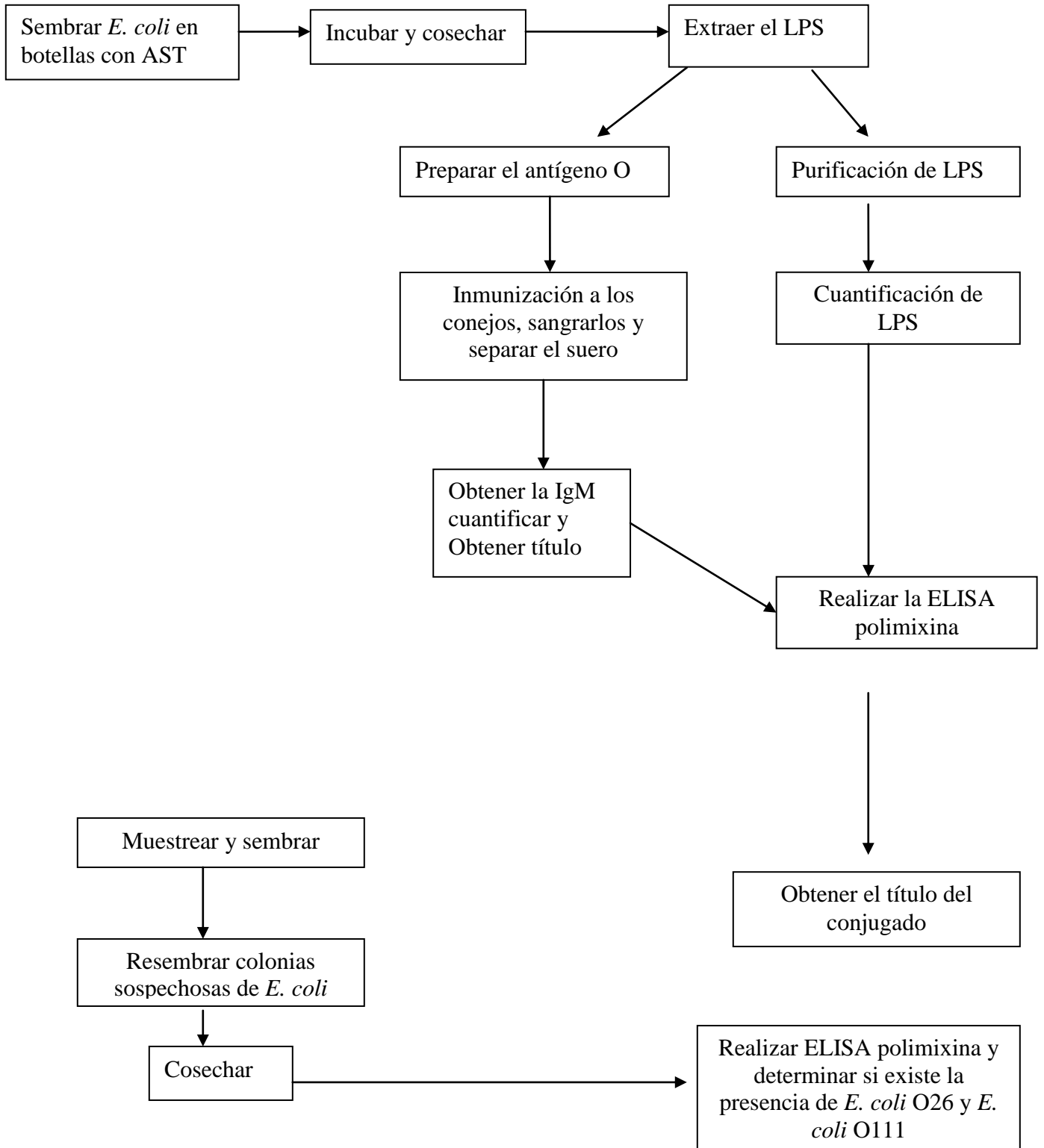
- Centrifuga Damon Iec Division
- Espectrofotómetro UV/Visible, Jenway 6305
- Incubadora UL Listed

- Autoclave
- Microscopio ZEISS
- Refrigerador Whirpool
- Balanza granataria, Ohaus
- Balanza analítica, Ohaus
- Lector de ELISA, Awareness Technology Inc.
- Lámpara UV, UVP, Inc.

Soluciones

- Buffer de fosfato 0.1 M pH 6.8
- Buffer de bicarbonato-carbonato de sodio 1M pH 9.5
- Solución Buffer de Fosfatos (PBS) 0.01 M con 0.85 NaCl
- PBS tween
- Amortiguador de recubrimiento
- PBS

Método



Cultivo de *E. coli* serotipo O111 y O26

Preparar 200 mL de Agar Soya Trypticaseina (marca BIOXON).

Forma de preparación:

1. Pesar 8 g de Soya Trypticaseina (marca BIOXON) y disolver en 200 mL de agua destilada, esterilizar a 121°C / 15 lb/in^2 / por 15 minutos. Dejar enfriar hasta una temperatura de 45°C y verter cerca del mechero en cajas de Petri y cuatro botellas de 250 mL Nunclon, Nunc, Se colocan en forma horizontal, y esperar a que solidifiquen.
2. Sembrar masivamente en placas de Petri de agar Soya Trypticaseina las cepas de *E. coli* O26 y O111 respectivamente e incubar a 37°C en condiciones aerobias durante 24 a 48 hs.
3. A cada caja de Petri sembrada con el cultivo, se agregan 5 mL de solución salina isotónica estéril, resuspendiendo los microorganismos y se recolectan los 5 mL.
4. En cada botella de 250 mL Nunclon Nunc, verter 1 mL de la solución del paso tres, cerca del mechero, cuidando que se distribuya en toda la botella e incubar a 37°C , por 48 hs o hasta obtener una capa gruesa de microorganismos.

Preparación del antígeno O (LPS) ⁽²¹⁾.

Colocar 20 mL de solución salina al 0.85% en las botellas y agitar hasta retirar la capa de bacterias del agar.

1. Realizar otra vez lo mismo pero con 10 mL de solución salina y repetir hasta que el agar se vea transparente o sin indicios de capa de bacterias.
2. Vaciar el líquido de los lavados en una botella que se calibrara con otra para ser centrifugada a 2094.54 g (6000 rpm) por una hora.
3. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón en 100 mL de solución salina al 0.85% así hasta completar cinco lavados.
4. Resuspender el botón con un poco de solución salina al 0.85%.
5. Preparar los tubos de la escala de McFarland.

6. En 2 tubos respectivamente etiquetados (como *E. coli* O111 y *E. coli* O26) colocar 3 mL de solución salina y colocar gota a gota la suspensión de bacterias hasta igualar al tubo uno del nefelómetro de McFarland.
7. Poner los tubos a ebullición por dos horas, dejar enfriar y colocar en el refrigerador.
8. Utilizar las soluciones anteriores para la inmunización.

Esquema de inmunización

Inmunización de conejo Nueva Zelanda Blanco (NZW) con un peso aproximado de 2,500 g, por vía intravenosa con *E. coli enterohemorrágica* igualado al tubo 1 del nefelómetro de McFarland. Siguiendo el siguiente esquema

Esquema de Inmunización	
Día	Volumen(mL)
0	0.25
3	0.25
7	0.3
10	0.3
16	sangrar

Purificación de IgM anti-LPS⁽²²⁾.

1. Montar una columna de Sephadex G 200, calibrar y sacar la IgM después del volumen vacío.
2. Pasar el suero de conejo anti LPS (IgM) y eluir con amortiguador de fosfato 0.1M a pH 6.8, tomando fracciones de 3 mL.
3. Realizar la lectura de las fracciones a 280 nm.
4. El primer pico contiene IgM, 2 macroglobulina y algunas lipoproteínas, los complejos de hemoglobina–haptoglobina a veces están presentes y son detectables fácilmente por un color rojizo.
5. Cuantificar la muestra y ajustar a 5 mg/mL de anticuerpo si es menor concentrar en tubos de Amicon.

Cuantificación de IgM por el método de Lowry

1. Cuantificar la IgM por el método de Lowry.
2. Realizar curva patrón empleando una serie de 10 tubos.
3. Colocar 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 hasta 1.0 mL de un estándar (250 µg/mL ABS) llevar a 1 mL con agua destilada.
4. Agregar a cada tubo 3 mL de Sol C darle 10 minutos de incubación a temperatura ambiente.
5. Adicionar 0.1 mL de Folin e incubar por 30 minutos y leer a 600 nm.
6. Realizar diluciones de las fracciones 1:5 en agua destilada.
7. Tomar 0.1 mL y agregar 0.9 mL de agua destilada colocar 3 mL de solución C.
8. Incubar 10 minutos y adicionar 0.1 mL de Folin esperar por 30 minutos y leer a 600 nm.
9. Realizar las lecturas y hacer la interpolación para saber cuánta IgM se tiene.

Acoplamiento mediante Glutaraldehído

La IgM pura (5 mg/mL) se conjuga a peroxidasa de rábano picante.

1. Disolver 10 mg de peroxidasa de rábano en 0.2 mL de buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8 que contiene 1.25% de glutaraldehído.
2. Se separa el conjugado (eliminar el glutaraldehído) de la enzima libre dializando contra agua destilada o solución salina al 0.85%.
3. Concentrar a 1 mL y adicionar 1 mL de IgM a 5 mg/mL en salina y 0.1 de buffer de bicarbonato de sodio –carbonato de sodio 1M pH 9.5.
4. Agitar suavemente y dejarlo 24 hs a 4° C y adicionar 0.1 mL de lisina al 0.2 M.
5. Dejarlo 2 hs a temperatura ambiente y dializarlo contra PBS a 4° C. El conjugado se separa de la peroxidasa libre por diálisis contra agua destilada en el precipitado.
6. Centrifugar y redissolver en PBS el PP con 0.01 de timerozal o formalina.

Extracción de LPS puro, a partir de las cepas de *Escherichia coli* siguiendo el método de Galenos (fenol-agua⁽²³⁾.)

1. De la preparación del antígeno O (LPS) con la solución del paso 4 es con la que se va a trabajar.
2. Centrifugar nuevamente a 2094.54 g (6000 rpm) por una hora y retirar el sobrenadante.
3. Resuspender el paquete celular de cada botella en 3 mL de PBS.
4. A cada tubo agregar 5 mL de la mezcla fenol- agua (9:1), agitar y dejar en refrigeración por 24 hs.
5. Agitar los tubos e introducirlos en un baño de agua a 70° C por 90 min.
6. Dejar enfriar y centrifugar a 3000 rpm por 30 min.
7. Separar la fase acuosa y reextraer la interfase y la fase fenólica con 3 mL de PBS en el baño de agua a 70° C por 60 min.
8. Reextraer la interfase y la fase fenólica en las mismas condiciones durante 30 min.

Reunir los extractos acuosos y filtrarlos con una membrana estéril.

PURIFICACIÓN DE LPS

Dializar los extractos acuosos en una membrana de celulosa por 3 días con cambios de PBS cada 24 hs.

CUANTIFICACIÓN

1. Cuantificar el LPS por el método de fenol ácido sulfúrico.
2. Realizar curva patrón empleando una serie de 10 tubos.
3. Colocar 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 hasta 1.0 mL de un estándar (0.1 mg/mL) llevar a 2 mL con agua destilada.
4. Llenar con 2 mL de agua destilada el tubo del blanco.
5. Agregar a cada tubo 0.1 mL de fenol al 80% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
6. Realizar diluciones de LPS 1:10, 1: 50 y 1:100 en agua destilada.
7. Tomar 2 mL de cada dilución y agregar 0.1 mL de fenol al 80% y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

8. Dejar reposar los tubos de 20 a 30 min. y leer a 490 nm.

Cuantificación de coliformes en agua Siguiendo la Norma Oficial Mexicana Nom-113-ssa1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

1. Colocar en cajas Petri por duplicado 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.
2. Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.
3. Vertir de 15 a 20 mL del medio RVBA fundido en cajas de Petri de vidrio, mantenido a $45 \pm 1,0^\circ$ C en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 mL del medio.
4. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
5. Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada.
6. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.
7. Preparar una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad.
8. Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 mL del medio RVBA a $45 \pm 1,0^\circ$ C en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.
9. Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35° C, durante 24 ± 2 hs.
10. Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.
11. Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias.

12. Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0,5 a 2,0 mm.

Cuantificación de Coliformes en Agua siguiendo Norma Oficial Mexicana Nom-112-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

1. Agitar la muestra.
2. Transferir volúmenes de 10 mL de muestra a cada uno de 5 tubos con 20 mL de caldo lactosado de mayor concentración.
3. Transferir 1,0 mL y 0,1 mL de muestra a cada uno de los tubos de las series de 5 respectivamente con 10 mL de caldo lactosado de concentración sencilla o caldo lauril sulfato triptosa con púrpura de bromocresol.
4. Incubar los tubos a 35° C. Examinar a las 24 ± 2 hs y observar si hay formación de gas si la formación de gas no se observa en este tiempo, incubar por 48 ± 2 hs.

Obtención del título del conjugado para ELISA

1. Disolver 1 mg de Sulfato de polimixina B en 20 mL PBS (amortiguador de fosfatos 0.01M con 0.85% de cloruro de sodio) para obtener una concentración final de 50 µg/ mL. Colocar 100 µL en cada de pozo de una placa de ELISA irradiada con UV por 1 hora ⁽²⁴⁾.
2. Incubar a 37° C por una hora la placa, lavar 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05% y adicionar 200 µL de bloqueador en cada uno de los pozos, incubarlo a 37° C durante 30 minutos, lavar 4 veces.
3. Adicionar 100 µL por pozo de cada una de las diluciones de LPS, cubrir la placa e incubarla a 37° C por 30 minutos.

4. Lavar 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05%. y adicionar 100 μ L en cada pozo de cada una de las diluciones del conjugado, cubrir la placa e incubar a 37° C por 30 minutos.
5. Lavar 4 veces los pozos con PBS-tween al 0.05%. y colocar 100 μ L por pozo del sustrato y el cromógeno en cada pozo, cubrir la placa e incubar a 37° C de 15 a 30 minutos. Leer la placa en un lector de ELISA Awareness Technology INC, a 450 nm.
6. Realizar la gráfica Absorbancia Vs log de dilución del conjugado, reportar la dilución de LPS y conjugado con la mejor respuesta.
7. Se colocan muestras negativas y con la siguiente fórmula se calcula el corte (cut off). Corte = Media de los valores negativos + 2 desviaciones estándar de la media. De tal manera que todo valor que este por arriba será considerado positivo y lo que sea igual o menor al valor de corte será negativo. Aquellas muestras positivas que estén cercanas al valor de corte se repetirán.

Para la realización de la técnica de ELISA se sigue el método de Blais et al ⁽²⁵⁾, como se describe a continuación:

1. Irradiar una placa de ELISA de marca Nunc Clon por una hora con luz ultravioleta ^(26,27).
2. Disolver 50 μ g/mL de Sulfato de polimixina B en PBS (amortiguador de fosfatos 0.01M con 0.85% de cloruro de sodio) colocar 100 μ L en cada pozo de la placa de ELISA, incubar a 37° C durante 1 hora, posteriormente lavar 4 veces con PBS-tween al 0.05%.
3. Bloquear la placa de ELISA con una solución de albúmina de huevo y leche descremada en proporción (1%:5%) llenar los pozos de la placa con 300 μ L de esta solución y dejar incubar por media hora a 37° C, después lavar 4 veces con PBS-tween.
4. Colocar 100 μ L de la muestra biológica tratada a cada pozo. Incubar a 37° C durante 30 minutos, lavar 4 veces.

5. Adicionar 100 μL del conjugado previamente titulado, incubar 30 minutos a 37° C finalmente adicionar 100 μL de la mezcla del sustrato y el cromógeno, incubar por 20 minutos, leer la placa en un lector de ELISA Awareness Technology INC, a 450 nm.
6. Se colocan muestras negativas y con la siguiente fórmula se calcula el corte (cut off). $\text{Corte} = \text{Media de los valores negativos} + 2 \text{ desviaciones estándar de la media}$. De tal manera que todo valor que esté por arriba será considerado positivo y lo que sea igual o menor al valor de corte será negativo. Aquellas muestras positivas que estén cercanas al valor de corte se repetirán.

RESULTADOS

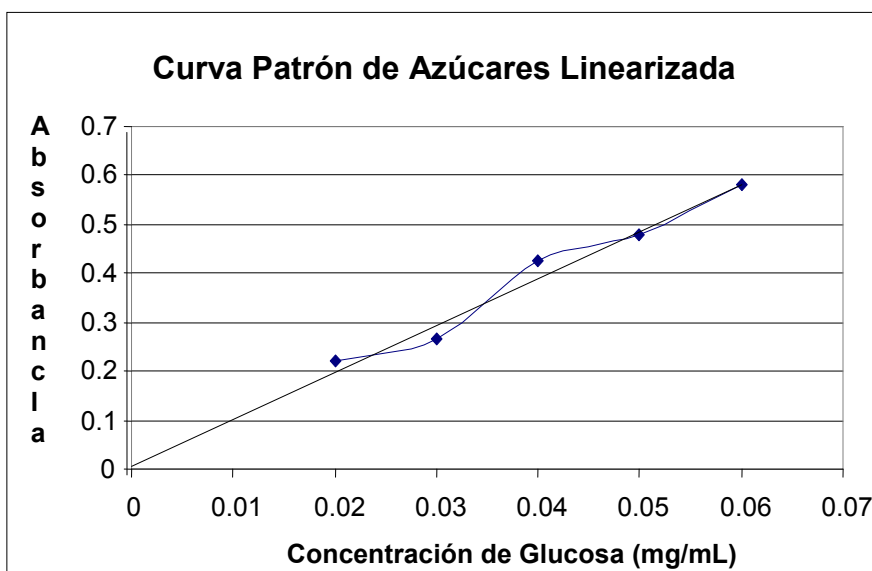
A continuación se presentan los cuadros y gráficas de la cuantificación de LPS de las 2 cepas de *E. coli* extraído por el método de galanos-Westphal

Cuadro 1 Curva patrón de azúcares
(Glucosa)

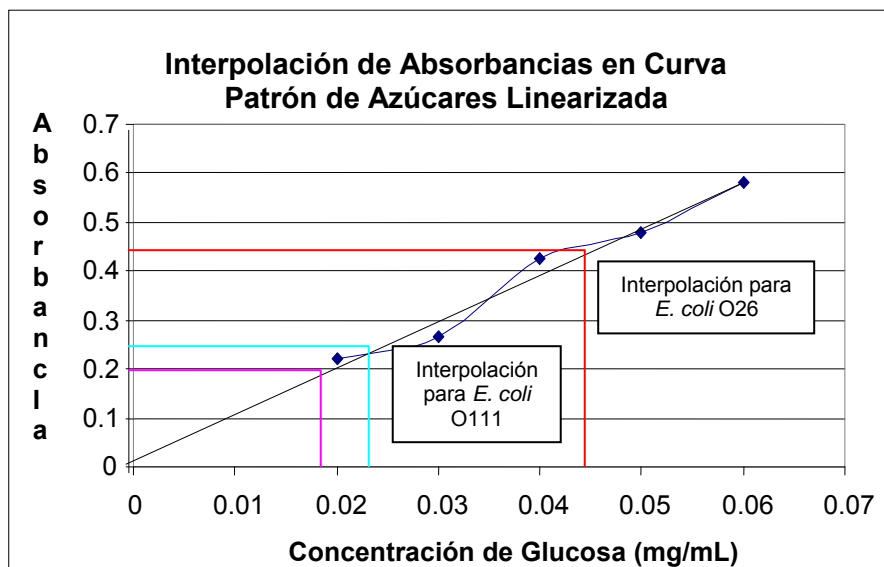
Concentración (mg/mL)	Absorbancia a 490 nm
0.00	0.00
0.01	0.204
0.02	0.22
0.03	0.268
0.04	0.424
0.05	0.48
0.06	0.58
0.07	1.169
0.08	0.982
0.09	0.88
0.1	1.16

Cuadro 2 Linearizando

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0.00	0.00
0.02	0.22
0.03	0.268
0.04	0.424
0.05	0.48
0.06	0.58



Gráfica 1 Muestra la linearización de la curva patrón de azúcares y el trazo de una línea de tendencia para poder realizar una Interpolación de los datos obtenidos de absorbancia de las muestras



Grafica 2 Muestra interpolación de datos para ambos serótipos en rojo la interpolación para el serótipo de *E. coli* O26 a una absorbancia de 0.462 y en azul y rosa la interpolación para el serótipo O111 con absorbancias de 0.246 y 0.204 respectivamente

Cuadro 3 Absorbancia y concentración de LPS para *E. coli* O111

dilución	Absorbancia	concentración mg/mL	FD mg/mL
1:50	0.246	0.0157	0.785
1:100	0.204	0.01	1
Valor de absorbancia y concentración de <i>E. coli</i> O26			
dilución	Absorbancia	concentración mg/mL	FD mg/mL
1:10	0.462	0.044	0.44

La cuantificación de IgM se realizó por el método de Lowry obteniéndose las concentraciones más elevadas en las 2 primeras fracciones de ambos sueros. De igual manera para ver su **especificidad y potencia** se les realizó reacciones de aglutinación obteniéndose los títulos siguientes (cuadro 4):

Cuadro 4 Títulos de las fracciones

Cepa	Tubo / dilución	Dilución Final	Título
O26	1/1:10	1:1,600	1600
O26	2/1:10	1:400	400
O111	1/1:10	1:200	200
O111	2/1:20	1:1,600	1600
O111	3/1:40	1:1,1600	1600

A continuación se muestran en el cuadro correspondiente a los lugares muestreados (cuadro 5) en Campus I (C-I) así como las Unidades Formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) encontradas en las muestras de agua para el conteo en placa según la norma Nom-113-SSA1-1994.

Cuadro 5 Lugares de Muestreo de Campus I (C-I)

Lugar de procedencia de la muestra	UFC/mL
Laboratorio de análisis (tarja)	0
Unidades dental	0
Unidad dental 2	0
Grifo	0
Grifo 2	0
Grifos	0
Baño	0
Microbiología / Inmunología	2000
Microbiología / Hematología	2000
Odontología	1000
Odontología	1000
Bioquímica	0
Bioquímica	1000
Bioquímica	1000
Baños de la Biblioteca	100
Baños de la entrada	0
Baños del centro del C-I	300
Grifo	0
Paletería 1	
Sabores de agua muestreados	
Frutas	Incontable
Piña colada	2080
Jamaica	20
Nuez	1900
fresa	2700
Horchata	4000
Lugar de venta de agua II	
Sabores de agua muestreados	
Melón	Incontable
Limón	400
Naranja	5000
Establecimiento informal de comida	
Sabores de agua muestreados	
Mango	Incontable
Horchata	15700
Jamaica	220

Enseguida se muestra la tabla correspondiente a los lugares muestreados en Campus II (C-II) así como UFC/mL contadas en estas para el conteo en placa según la norma Nom-113-SSA1-1994, comenzando por una comparación de las cafeterías de C-I y C-II, posteriormente los lugares del C-II muestreados.

Cuadro 6 Sabores de Agua Muestreados de las Cafeterías

Lugar de procedencia de la muestra	UFC/mL
Cafetería C-II	
Sabores de agua muestreados	
Uva	90000
Guayaba	30000
Cafetería C-I	
Sabores de agua muestreados	
Jamaica	Incontable
Mango	60000

Cuadro 7 Lugares Muestreados en C-II

Lugar de procedencia de la muestra	UFC/mL
Planta piloto	
Laboratorio de control	0
Laboratorio de control 2	0
Laboratorio de Investigación Farmacéutica	0
Baño	0
Bioterio	
Baño de hombres	0
Baño de mujeres	0
Área de Cirugías	130
Pileta	360
Tinaco	0
Llave de la pileta	0
UIM	
Laboratorio	0
Laboratorio	0
Baño de Hombres	0
Baño de Mujeres	0
Bioterio estéril	
Tinaco	0
Botella Normal	0
Botella de animales	350
Cuarto de ratones CBA/ca	0
Cuarto de ratones BACB/C	10
Cuarto de Ratones para la Dra. Legorreta	0
Cuarto de Ratones para Dra. Rangel	0
Laboratorios de C-II	
L-300 Ciencia básica	30
L-300 Ciencia básica	20
L-400 bromatología	0
L-400 Biología	0
L-300 Química Orgánica	0
Baños Edificios	
Baño de mujeres de los 400	0
Baños de mujeres de los 300	0
Baño de hombres de los 300	30
Cafetería C-II	
Sabores de agua muestreados	
Horchata	140000
Jugo de Naranja	0
Lugar de venta de Esquimos	
Sabores de agua muestreados	

Agua de Fresa	Incontable
Piña	460000
Sandía	210000
Ensaladas	
Jugo de Mandarina	0
Venta de Quesadillas	
Sabores de agua muestreados	
Agua de Jamaica	0
Agua de mandarina	30000
Horchata	60000
Café	90000

Por otra parte, se le realizó simultáneamente una cuantificación en tubo (por el método del número más probable (NMP) siguiendo la Nom-112-SSA1-1994) obteniéndose los siguientes resultados esto sólo para las muestras de aguas frescas tanto para Campus I y Campus II

Muestras de Campus-I

Para el número más probable se obtuvo lo siguiente lectura a las 24 hs

Cuadro 8

Muestra	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	NMP
Nuez	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	501
Fresa	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	510
Horchata	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	500
Sandía	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Piña	X	✓	✓	✓	✓	X	✓	401
Limón	X	X	X	X	X	X	X	000
Naranja	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511

Los X= no hay producción de gas o crecimiento

Los ✓= Producción de gas y crecimiento

Checar la cantidad con lo reportado en la norma 112 Anexo XII de límites Permicibles

Cuadro 9 lecturas a las 48 hs

Muestra	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	NMP
Nuez	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Fresa	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	510
Horchata	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	500
Sandía	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Piña	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	501
Limón	X	X	X	X	X	X	X	000
Naranja	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511

Para aguas frescas de Campus II

Cuadro 10 a las 24 hs

Muestra	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	NMP
Mandarina	✓	✓	✓	✓	✓	X	✓	501
Horchata	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Café	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Piña	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Sandia	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511

Cuadro 11 Para las 48 hs.

Muestra	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	NMP
Mandarina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Horchata	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Café	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Piña	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Sandia	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511

Se comparó las muestras de agua para las cafeterías obteniéndose lo siguiente:

Cuadro 12 a las 24 hs.

Muestra	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	NMP
Jamaica	✓	✓	X	X	X	✓	X	210
Mango	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Uva	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Horchata	✓	✓	X	✓	✓	✓	X	410
Guayaba	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511

Cuadro 13 a las 48 hs

Muestra	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	NMP
Jamaica	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X	510
Mango	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Uva	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Horchata	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511
Guayaba	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	511

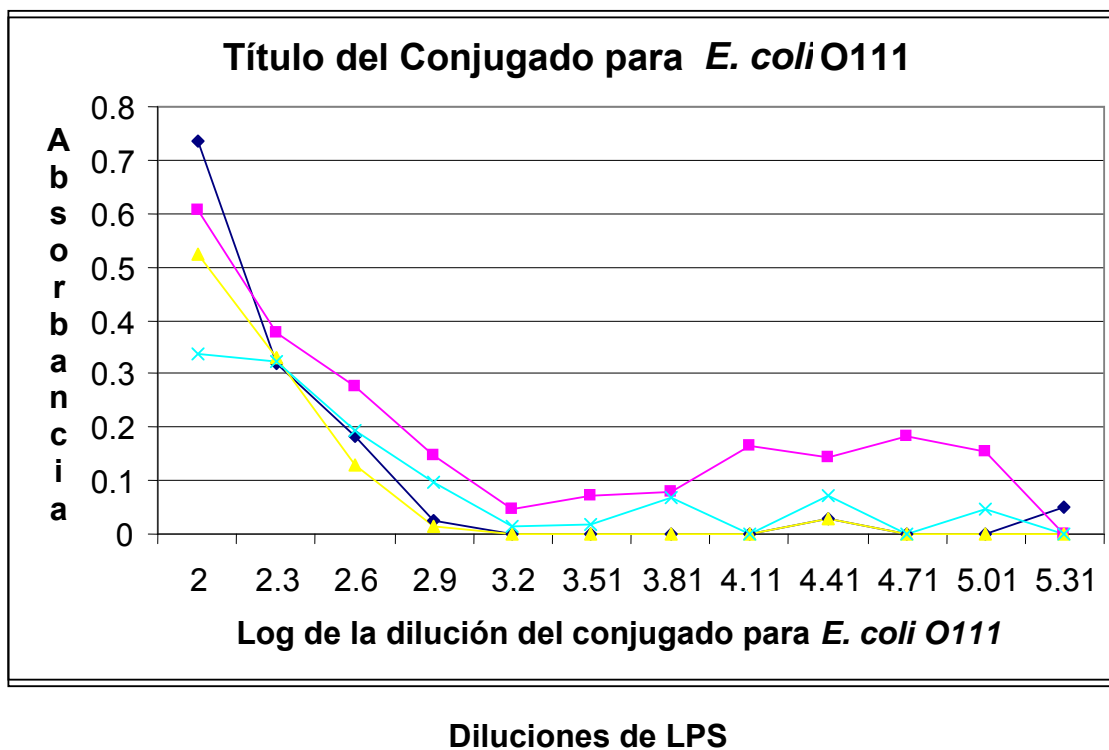
Para mayor información consultar los cuadros de la NOM-112-SSA1-1994

Se presenta a continuación los resultados de las ELISA mostrando primero la titulación del conjugado para ambos serótipos y enseguida los resultados para las muestras, se comenzara con el cuadro de cómo se distribuyeron las diluciones del conjugado y las diluciones de LPS en la placa de ELISA y en seguida la gráfica de este.

Cuadro 14 Obtención del título del conjugado de *E. coli* O111

Distribución de las diluciones del conjugado y de las Diluciones de LPS de <i>E. coli</i> O111												
LPS (mg/mL)	2	2.301	2.602	2.903	3.2041	3.5051	3.8061	4.1072	4.4082	4.7092	5.0102	5.311
64	0.736	0.32	0.183	0.024	0	0	0	0	0.029	0	0	0.049
32	0.607	0.376	0.278	0.147	0.048	0.071	0.08	0.164	0.144	0.184	0.155	0
16	0.524	0.331	0.129	0.014	0	0	0	0	0.027	0	0	0
8	0.339	0.322	0.195	0.098	0.013	0.017	0.069	0	0.072	0	0.046	0

Cuadro 14 muestra en azul los logaritmos de las diluciones del conjugado comenzado con una dilución 1:50 y así sucesivamente en rosa muestras las absorbancias obtenidas tras una lectura a 450 nm y los números en negro nos muestran la concentración de LPS en mg/mL para cada fila.

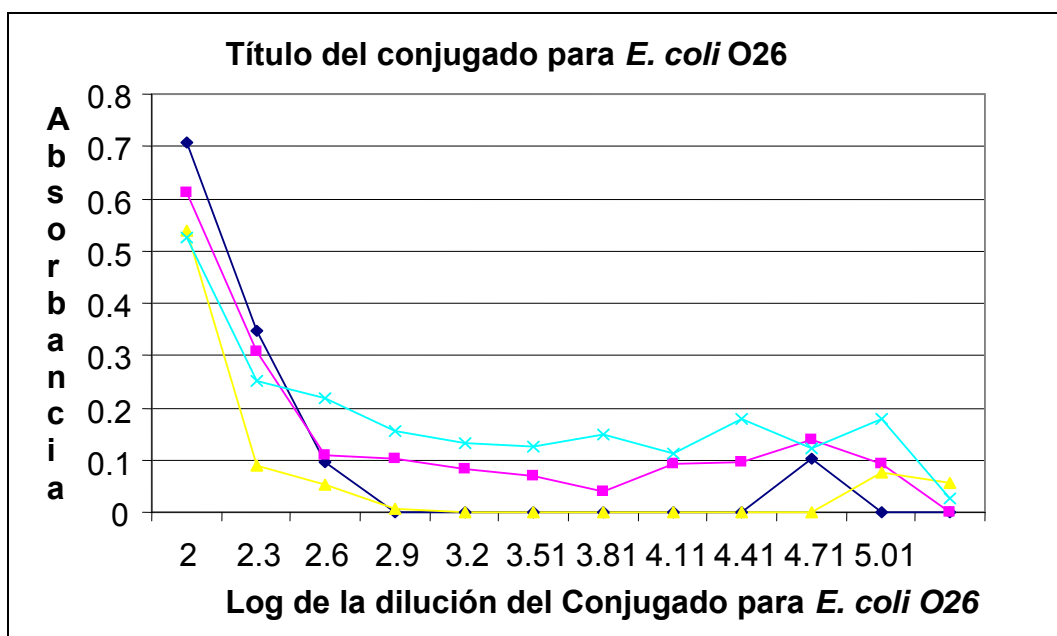


Gráfica 3 En esta se observa que las absorbancias más elevadas se dan en la primera dilución después estos tienden a bajar por lo tanto se utilizara la dilución de 1:50 ya que la línea azul muestra s mayor absorbancia en esta dilución con una concentración de 64 mg/mL de LPS.

Cuadro 15 Obtención del Título del conjugado de *E. coli* O26

Distribución de las diluciones del conjugado y de las Diluciones de LPS de <i>E. coli</i> O26												
LPS (mg/mL)	2	2.301	2.602	2.903	3.2041	3.5051	3.8061	4.1072	4.4082	4.7092	5.0102	5.3113
64	0.709	0.347	0.095	0	0	0	0	0	0	0.102	0	0
32	0.613	0.308	0.11	0.104	0.083	0.068	0.039	0.092	0.097	0.138	0.091	0
16	0.538	0.09	0.052	0.008	0	0	0	0	0	0	0.076	0.056
8	0.525	0.252	0.217	0.155	0.132	0.125	0.148	0.112	0.18	0.121	0.177	0.027

Cuadro 15 muestra en azul los logaritmos de las diluciones del conjugado comenzado con una dilución 1:50 y así sucesivamente en rosa muestras las absorbancias obtenidas tras una lectura a 450 nm y los números en negro nos muestran la concentración de LPS en mg/mL



Diluciones de LPS



Gráfica 4 En esta se observa que las respuestas más elevado se da en la primera dilución después estos tienden a disminuir según la dilución del conjugado por lo tanto se utiliza la dilución de 1:50 ya que la línea azul muestra mayor absorbancia en esta dilución con una concentración de 64 mg/mL de LPS

Para las muestras se realizó una distribución diferente por lo tanto se presenta la siguiente tabla con diferentes colores para poder entender la distribución

Cuadro 16 Corrimiento de las Muestras para el Serótipo O111

Corrimiento de Elisa para el Serótipo <i>E. coli</i> O111												
A	0.297	0.42	0.314	0.253	0.045	0.039	0.029	0.091	0.093	0.039	0.072	0.16
B	0.075	0.068	0.075	0.082	0.053	0.05	0.042	0.082	0.064	0.059	0.076	0.12
C	0.093	0.056	0.128	0.06	0.046	0.031	0.103	0.162	0.068	0.068	0.062	0.145
D	0.175	0.089	0.094	0.022	0.094	0.033	0.094	0.06	0.001	0.091	0.066	0.146
E	0.14	0.09	0.085	0.038	0.073	0.086	0.141	0.136	0.05	0.08	0.106	0.162
F	0.351	0.095	0.086	0.072	0.051	0.037	0.063	0.048	0.021	0.03	0.031	0.151
G	0.213	0.142	0.071	0.074	0.139	0.126	0.18	0.18	0.134	0.064	0.033	0.146
H	0.239	0.124	0.125	0.122	0.112	0.134	0.13	0.295	0.112	0.085	0.1	0.143

	Control positivo
	Control negativo
	Muestra dilución 1:50
	Muestra dilución 1:100
	Control

Posterior a esto se hizo el cálculo del valor de corte con la siguiente fórmula

Valor de corte = media + 2 desviaciones estándar

Valor de corte = .088450 + 2(0.04608)

Valor de corte = 0.1806

Con este valor todas las muestras por arriba de 0.1806 son positivas y todas las muestras con valores inferiores a 0.1806 se consideran negativas ninguna de las muestras corresponde al serótipo de *E. coli* O111 por lo tanto muestras **positivas para el serótipo de *E. coli* O111 = 0**

Para el serótipo de *E. coli* O26 se realizó la misma distribución que para *E. coli* O111 como se puede observar en el cuadro siguiente (cuadro 17):

Cuadro 17 Corrimiento de las Muestras para el Serótipo de *E. coli* O26

Corrimiento de ELISA para el Serótipo de <i>E. coli</i> O26												
A	0.21	0.249	0.248	0.226	0.267	0.1	0.123	0.096	0.088	0.124	0.066	0.067
B	0.105	0.153	0.145	0.261	0.101	0.084	0.047	0.057	0.065	0.033	0.092	0.055
C	0.133	0.119	0.169	0.134	0.115	0.073	0.053	0.038	0.038	0.007	0.017	0.049
D	0.039	0.081	0.106	0.089	0.055	0.035	0.033	0.025	0.013	0.006	0.041	0.008
E	0.045	0.09	0.072	0.059	0.079	0.02	-0.002	0.003	0	0	0.007	0.044
F	0.09	0.096	0.06	0.067	0.016	0.022	0.023	0.012	0.015	0.023	0.01	-0.002
G	0.038	0.068	0.049	0.04	0.034	0.02	0.01	0.043	0.01	0.004	0.009	0.005
H	0.087	0.061	0.043	0.032	0.03	0.032	0.03	0.067	0.05	0.031	0.03	0.023

	Control positivo
	Control negativo
	Muestra dilución 1:50
	Muestra dilución 1:100
	Control

Se hace el cálculo con la misma fórmula

Valor de corte = media + 2 desviación estándar

Valor de corte = 0.030515 + 2(0.0195418)

Valor de corte = 0.069595

El valor de corte obtenido se comparó con los valores de las muestras y aquellas que estuvieron por arriba de 0.069595 fueron consideradas positivas y las que estuvieran por debajo de 0.069595 son negativas obteniendo así para el serótipo de *E. coli* O26 lo siguiente:

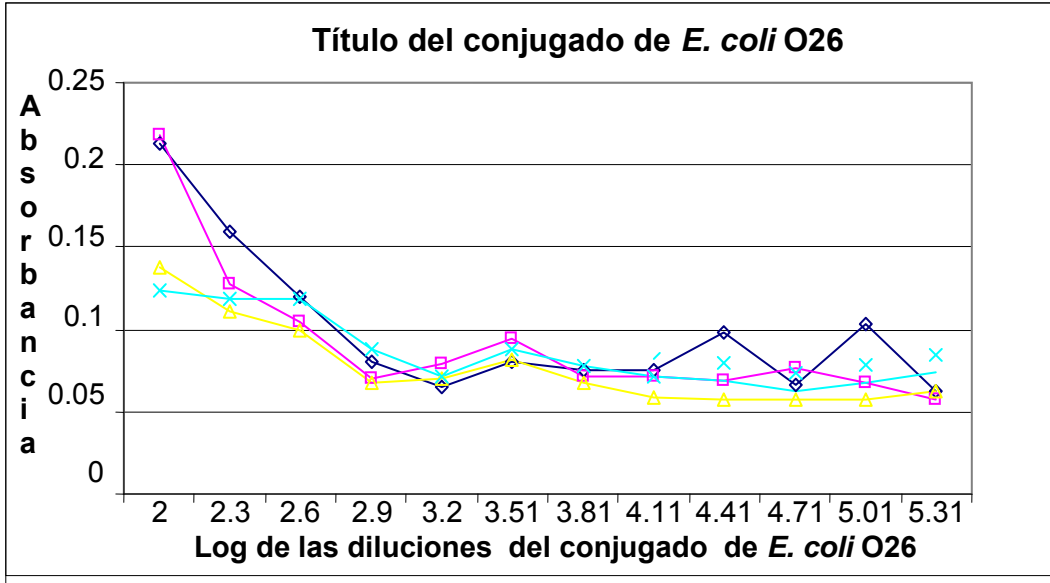
- **Con dilución 1:50 fueron 13 positivas**
- **Con dilución 1:100 fueron 6 positivas**

Se preparó un segundo conjugado para el serótipo de *E. coli* O26 por lo tanto se tuvo que titular este conjugado a continuación se muestra la distribución de este en la placa.

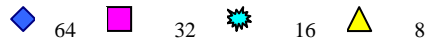
Cuadro 18 Obtención del Título del conjugado de *E. coli* O26

Distribución de las diluciones del conjugado y de las Diluciones de LPS de <i>E. coli</i> O26												
LPS (mg/mL)	2	2.301	2.602	2.903	3.2041	3.5051	3.8061	4.1072	4.4082	4.7092	5.0102	5.3113
64	0.213	0.159	0.12	0.08	0.065	0.08	0.075	0.075	0.098	0.066	0.103	0.063
32	0.218	0.127	0.105	0.07	0.079	0.094	0.072	0.072	0.069	0.077	0.068	0.057
16	0.138	0.111	0.099	0.068	0.07	0.081	0.067	0.059	0.057	0.057	0.057	0.062
8	0.124	0.118	0.119	0.088	0.071	0.088	0.078	0.071	0.069	0.062	0.067	0.074

Cuadro 18 Muestra en azul los logaritmos de las diluciones del conjugado comenzado con una dilución 1:50 y así sucesivamente en rosa muestras las absorbancias obtenidas tras una lectura a 450 nm y los números en negro nos muestran la concentración de LPS en mg/mL.



Diluciones de LPS



Gráfica 5 En esta se observa que las absorbancias más elevadas se dan en la primera dilución del conjugado y de LPS después estos tienden a bajar por lo tanto se utilizara la dilución de 1:50 ya que la línea rosa muestra mayor respuesta en esta dilución con una concentración de 64 mg/mL de LPS.

Discusión de resultados

La concentración obtenida de LPS fue de 1 mg/mL para el LPS de *E. coli* O111 y de 0.44 mg/mL para O26, entonces la extracción y purificación es recomendable sin embargo para poder obtener 12 mL aproximadamente de LPS puro se requiere mucha muestra (3 botellas de Roux sembradas masivamente) por lo tanto nuestro rendimiento es bajo como de 5.4 %. Ahora bien parte de este LPS lo requerimos para la inmunización de los conejos por eso es importante obtener una cantidad mayor.

El anticuerpo (IgM) obtenido a partir del suero de conejo fue cuantificado por el método de Lowry para ver qué cantidad se tenía de este, de igual manera se le realizó pruebas de aglutinación pasiva para ver que fracción contenía la mayor **potencia** hacia el antígeno; para *E. coli* O111 fue la fracción 2 con un título de 1600 y para el serotipo O26 fue la fracción 1 con un título de 1600 esto se puede observar en la Cuadro 4. Todo lo anterior permitió disminuir la cantidad de IgM a utilizar en la preparación del conjugado.

Se sabe que la calidad microbiológica del agua de la delegación Iztapalapa no es buena como lo demuestran algunos estudios⁽²⁸⁾ incluso algunos mencionan la presencia de *Aeromonas*⁽²⁹⁾ por ello se consideró pertinente reportar el crecimiento que hubo para el conteo en placa que se realizó en las instalaciones de FES-Zaragoza, como se esperaba la presencia de coliformes en este caso de *E. coli* en las muestras proveniente de las instalaciones de ambos campus fue nula ya que la morfología colonial que mostraba la placa no era de *E. coli* posiblemente era de otro microorganismo esto se puede observar en el Cuadro 5 y 7 respectivamente donde se reporta crecimiento pero no es de *E. coli*; esto se le puede atribuir a la potabilización del agua (probablemente proceso de cloración) que impide el desarrollo de microorganismos ya que esta debe cumplir con lo establecido en la NOM-127-SSA1-1994 que maneja:

- para coliformes totales 2 NMP/100mL y 2 UFC/100mL

En contraste las aguas frescas como se observa en los cuadros 5,6 y 7 para conteo en placa y en los correspondientes a los del NMP del cuadro 8 al 13 la cantidad de UFC/mL son bastante elevadas de hecho algunas son incontables como es el caso del agua de fresa y de Jamaica que están reportadas en el cuadro 6 y 7 respectivamente, puede decirse que la mayoría de aguas frescas muestreadas por no decir que la todas salen de los límites permitidos para el consumo de agua; esto posiblemente debido a la manipulación humana que conlleva prepararlas (como el lavar la fruta y picarla o pelarla etc.) y al poco cuidado que se tiene de el recipiente o lugar de almacenamiento del agua ya que muchos de los establecimientos muestreados almacenan el agua en tambos los cuales no están debidamente lavados, tapados o en un lugar adecuado e incluso el mismo no está en óptimas condiciones ya que puede estar roto o con fisuras etc.

De todos los lugares mencionados anteriormente que aparecen en los cuadros 5,6 y 7 sólo se obtuvieron 24 crecimientos correspondientes a *E. coli* de los cuales 23 provienen de las muestras de aguas frescas y una de ellas de un laboratorio de Campus I.

La estandarización de la técnica es dependiente del título del conjugado, ya que finalmente este determina la presencia o ausencia de LPS de *E. coli* serótipo O111 y O26. En este caso la dilución óptima a la cual se debe trabajar ambos conjugados es de 1:50 ya que se observa mayor respuesta en esta dilución esto se ve en la gráfica 3 y 4.

El saber acomodar las muestras es de vital importancia como se muestra en el cuadro 16 y 17, en donde se colocan en la parte superior los controles positivos (Fila A) en las siguientes filas lo que serian las diluciones de las muestras respectivamente (Fila B hasta la E) y finalmente lo que es el control negativo con PBS (Fila F, G y H) esto es recomendable por las siguientes razones:

- Para evitar contaminar los pozos de una muestra negativa con los restos de una muestra positiva, por ello se deja hasta arriba las positivas así al momento del lavado aunque hubiera escurrimientos, no hay problema ya que los pozos finales son positivos.
- El motivo de dejar los blancos en esas filas es para que al momento de lavar no hubiera contaminación por parte de los controles positivos ya que cuando se lava la placa esta se invierte y se comienza a lavar desde la fila H, lo único que podría escurrir a las muestras seria PBS y de igual manera no causaría interferencia por ello se recomienda esta distribución.

Para el serótipo *E. coli* O111 se determinó un valor de corte de **0.251**, el cual se recalculó ya que las lecturas de los blancos estaban por arriba, de usarlo así se tendría que los valores de los blancos serían positivos lo que seria incorrecto, para recalcular este se eliminan los datos por arriba de 0.251 y se determina nuevamente la media y la desviación estándar, en el siguiente cálculo se obtuvo un valor de corte de **0.2038** de igual manera se eliminaron los datos de los blancos que estuvieran por arriba de éste y se recalculó la media y la desviación estándar, finalmente se obtuvo un valor **de 0.1806** con este valor de corte se encontró que las lecturas de las muestras fueron negativas ya que están por debajo de éste lo que indica que si bien las muestra tienen *E. coli* estas no son del serótipo *E. coli* O111 enterohemorrágica posiblemente esto se deba a que este serótipo es el tercero en prevalencia y es un microorganismo más exigente por ello es más frecuente su presencia en alimentos que en agua.

Para el serótipo de *E coli* O26 se obtuvo un valor de corte de **0.069** con este valor se encontraron 13 muestras positivas para este serótipo empleando una dilución 1:50 y 6 muestras positivas con una dilución 1:100.

El hecho de encontrar muestras positivas al serótipo de *E. coli* O26 coincide con lo reportado en la teoría en donde se indica que este es el segundo serótipo en prevalencia, pudiéndose encontrar en muestras de comida como en muestras de agua y que su transmisión puede ser de una persona a otra o por animales contaminados^(9,12).

Con respecto al método es importante determinar la cantidad de muestra a utilizar para no caer en el fenómeno de zona o prozona ya que se podría tener falsos positivos o negativos.⁽³⁰⁾

Los resultados muestran que de las 24 muestras positivas para *E. coli* 13 corresponden al serótipo O26, 12 de estas trece provienen de muestras de aguas frescas y una de las instalaciones de la facultad por lo que se puede considerar que el serótipo *E. coli* O26 es más común encontrarlo en agua esto debido a que es un microorganismo menos exigente en sus requerimientos nutricionales y de mayor prevalencia que el serótipo de *E. coli* O111⁽¹²⁾.

El hecho de haber encontrado muestras positivas para *E. coli* es una invitación para realizar más estudios y ver si este microorganismo es o no responsable del malestar que manifiestan algunos alumnos ya que es de conocimiento popular que muchos de los estudiantes que consumen alimentos y aguas frescas en estos establecimientos por primera vez llegan a manifestar síntomas de diarrea, dolor abdominal, fiebre etc.

Cabe mencionar que los conjugados fueron absorbidos con paquete de bacterias⁽³¹⁾ del serótipo opuesto al de el ya que al hacer los primeros corrimiento de la placa de ELISA fue inespecífico ya que se obtenía reacción para ambos serótipes y con la absorción se asegura que sólo reaccionara con lo que es el LPS que se desee y no con toda la estructura bacteriana de las *E. coli*.

Conclusiones

Se obtuvo para ambos serótipos de *E. coli* entero hemorrágica sus correspondientes LPS puros de igual manera sus anticuerpos específicos lo que permitió adecuar la técnica de ELISA-polimixina para su identificación.

Se determinó la carga microbiana del agua de las instalaciones de FES-Zaragoza así como de los establecimientos aledaños a esta, sin embargo también fue posible aislar de ellas *E. coli* y determinar si pertenecían a los serotipos O26 u O111 para los cuales se había estandarizado la técnica.

Se estandarizó la técnica de ELISA-Polimixina de tal modo que permitió identificar al serótipo O26 presente en algunas muestras de agua, de igual modo para el serótipo O111 aunque no se detectó presencia de este en las muestras.

Se logró tener una técnica barata, rápida y específica para la detección de *E. coli* O26 y *E. coli* O111.

Esta técnica podría ser probada para la identificación de estos microorganismos no sólo en agua si no en algunos alimentos donde se reporta que tienen mayor presencia, para su control, además de que puede realizar en cualquier laboratorio.

Esta técnica podría ser modificada para la identificación de otros microorganismos que son causantes de una variedad de enfermedades dando resultados confiables y rápidos.

ANEXO I. Escala de McFarland

Tubo	BaCl ₂ al 1% (mL)	H ₂ SO ₄ al 1% (mL)	Bacterias / mL
1	0.1	9.9	3.0 X 10 ⁸
2	0.2	9.8	6.0 X 10 ⁸
3	0.3	9.7	9.0 X 10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2 X 10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5 X 10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8 X 10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1 X 10 ⁹
8	0.8	9.2	2.4 X 10 ⁹
9	0.9	9.1	2.7 X 10 ⁹
10	1.0	9.0	3.0 X 10 ⁹

Se preparan las soluciones de BaCl₂ y H₂ SO₄ respectivamente y en una gradilla se enumeran tubos con tapón de rosca del 1 al 10 y con una pipeta de 1 mL se colocan las cantidades indicadas de BaCl₂ en la tabla y a continuación con una pipeta volumétrica de 10 mL de deja caer por las paredes del tubo lentamente H₂ SO₄, finalmente se tapan y se mezclan en el vortex ya tapados esta escala puede durar varios días ya que después de unos cuantos el sulfato de bario se precipita y se va al fondo basta con mezclar de nuevo para poder observar la turbidez del tubo correspondiente.

Anexo II Obtención de la sangre de conejo inmunizado

- Obtener sangre por punción cardiaca en la fecha programada de la inmunización.
- Rasurar la zona a puncionar y sanitizar con alcohol yodo 2%
- Puncionar con jeringas estériles desechables de 20 mL.
- La sangre obtenida se colecta en tubos estériles junto al mechero, se deja coagular. Separar el suero en tubos limpios y etiquetados.

Realizar el procedimiento para cada una de las cepas a trabajar

Anexo III Preparación del LPS para la prueba de aglutinación activa

- Medir 2 mL de solución salina o PBS en un tubo de 13 X 100 con tapa. Tomar una asada del botón bacteriano reservado en el refrigerador.
- Ajustar los 2 mL de solución salina fisiológica (SSF) al tubo número 3 del nefelómetro de McFarland. Colocar el tubo etiquetado sin tapar, con la

suspensión bacteriana ajustada, en un baño de agua en ebullición por 120 minutos, sin cerrar el tubo pero con la tapa puesta.

- Retirar el tubo después de 120 minutos, enfriar a temperatura ambiente y agregar formaldehído para obtener una concentración de 0.3% de formaldehído.
- Tapar el tubo y mezclar, abrir y agregar una pizca de azul brillante con el asa micológica, homogenizar, reservar en refrigeración hasta su uso.
- Realizar la operación para cada una de las cepas a trabajar.

Anexo IV Determinar el título del anticuerpo mediante aglutinación activa

Realizar aglutinación del Antígeno "O" de *Escherichia coli* O26 y O111 contra su respectiva IgM anti-LPS sobre una placa de vidrio y mezclar con aplicador de madera, agitar por 30 segundos para verificar la potencia del anticuerpo.

Reacción de aglutinación activa con antígeno O (LPS) y anticuerpos (IgM)

Correspondencia de Vol.	Vol. de las diferentes Fracciones	Antígeno "O" (LPS)
1:20	80 µL	Una gota
1:40	40 µL	Una gota
1:80	20 µL	Una gota
1:160	10 µL	Una gota
1:320	5 µL	Una gota

En caso de ser positivo en todas las concentraciones, realizar diluciones 1/10. 1/20. 1/40, etc., con PBS y efectuar nuevamente la prueba con los mismos volúmenes.

Utilizar el antígeno y el anticuerpo a temperatura ambiente para observar notoriamente la aglutinación.

Anexo V Para la cuantificación de proteínas por método de Lowry curva patrón

tubo	mL de STD	mL de H ₂ O	Solución C		Folin	
1	.1	.9	3 mL		0.1	
2	.2	.8	3 mL		0.1	
3	.3	.7	3 mL	Esperar 10	0.1	
4	.4	.6	3 mL	minutos de	0.1	Esperar
5	.5	.5	3 mL	incubación a	0.1	30
6	.6	.4	3 mL	temperatura	0.1	minutos y
7	.7	.3	3 mL	ambiente y	0.1	leer a
8	.8	.2	3 mL	adicionar	0.1	600 nm
9	.9	.1	3 mL		0.1	
10	1	--	3 mL		0.1	

Para el blanco se coloca 1.0 mL de H₂O más 3 mL de solución C

Anexo VI Preparación de las fracciones

Se utilizo una dilución 1: 5

Tomar 0.1 mL de muestra y colocar 0.4 H₂O mL de de esta tomar 0.1 mL y colocar 0.9 mL de H₂O para obtener 1 mL y agregar a este los 3 mL de Sol C y así para todas las fracciones.

Anexo VII Reactivos de Lowry

- Sol. A : 2.0 g de bicarbonato de sodio en 100 mL de NaOH al 0.4%
- Sol. B : 1.0 g de tartrato de sodio y potasio en 50 mL de agua
- Sol. B₂ : 5 g de Sulfato de cobre en 50 mL de agua
- Sol. de trabajo C : 50 mL de sol A + 0.5 mL de sol B y 0.5 mL de sol B₂

Anexo VIII Diluciones de LPS utilizadas para su cuantificación en el método de fenol ácido sulfúrico

Realizar diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 del LPS purificado en agua destilada, Preparación de las diluciones:

➤ *Dilución 1:10*

Tomar 0.5 mL de LPS + 4.5 mL de agua destilada (A)

➤ *Dilución 1:50*

Tomar de A 1 mL + 4 mL de agua destilada (B)

➤ *Dilución 1:100*

Tomar de B 2 mL + 2 mL de agua destilada.

Anexo IX Tratamiento de la muestra

Tomar 450 µL de muestra y agregar 50 µL de colato de sodio al 5%, calentar por 10 minutos a 100° C. Dejar enfriar a temperatura ambiente y centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Separar el sobrenadante claro y reservar hasta su uso.

Anexo X Preparación de soluciones

Solución acuosa de fenol al 90%

Fenol	9 g
Agua destilada	1 mL

Disolver en un vaso de precipitado agitando con mucho cuidado. Utilizar guantes durante todo el proceso.

Buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8

Fosfato dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	3.58 g
Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	1.38 g
Agua destilada	100 mL

Buffer de carbonato-bicarbonato 1M pH 9.5

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	10.59 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	8.4 g

Agua destilada 100 mL

Buffer salina fosfatos (PBS)

Cloruro de sodio NaCl 8.0 g
Cloruro de potasio KCl 0.2 g
Fosfato dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.2 g
Agua destilada 1000 mL

Buffer de salina fosfatos / NaCl 0.85% para ELISA

Cloruro de sodio NaCl 8.5 g
Cloruro de potasio KCl 0.2 g
Fosfato dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.2 g
Agua destilada 1000 mL

Buffer de salina fosfatos / NaCl 0.85% / Tween 20 al 0.05% para ELISA.

Cloruro de sodio NaCl 8.5 g
Cloruro de potasio KCl 0.2 g
Fosfato dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.9 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 0.2 g
Tween 20 0.5 mL
Agua destilada 1000 mL

Bloqueador para ELISA

Leche descremada en polvo 5 g
Albúmina de huevo 1 g
Agua destilada 100 mL

Amortiguador de Sustrato

Solución A

Fosfato dibásico dodecahidratado de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	1.4196 g
Agua destilada	50 mL

Solución B

Ácido cítrico	1.0507 g
Agua destilada	50 mL

Solución de trabajo C

Mezclar

25.7 mL de la solución A

24.3 mL de la solución B

Sustrato - Cromógeno

Solución de trabajo C	100 mL
O-Fenilendiamina	40 mg (proteger de la luz)
Peroxido de hidrogeno al 30%	40 μL

Agregar en el orden anotado. Utilizar inmediatamente después de preparada.

Anexo XI Absorción de los conjugados de *E. coli* O26 y O111

Cultivo de *E. coli* serótipo O111 y O26

Preparación de 200 mL de Agar Soya Trypticaseina (marca BIOXON).

Forma de preparación:

1. Pesar 8 g de Soya Trypticaseina (marca BIOXON) y disolver en 200 mL de agua destilada, y esterilizar a $121^\circ \text{C} / 15 \text{ lb/in}^2$ / por 15 minutos. dejar enfriar hasta una temperatura de 45°C y verter cerca de un mechero en seis botellas de 250 mL Nunclon, Nunc, colocarlas en forma horizontal, y esperar a que solidifique.
2. Sembrar masivamente en las botellas con agar Soya Trypticaseina las cepas de *E. coli* O26 y O111 respectivamente e incubar a 37°C en

condiciones aerobias durante 24 a 48 hs. La siembra se puede hacer con una asa bacteriológica o se puede hacer una suspensión la cual se dejara caer en la botella, se distribuirá uniformemente con movimientos de la botella de arriba abajo de derecha a izquierda y de adelante hacia atrás.

3. Transcurrido el tiempo se observa una capa densa o blanquecina sobre el agar, entonces se procede a cosechar agregando a cada botella sembrada con cultivo, 5 mL de solución salina isotónica estéril, re suspendiendo los microorganismos y recolectándose los 5 mL o los que sean necesarios hasta que el agar en las botellas se vea completamente transparente o sin rastro de microorganismos.

Lavado de biomasa bacteriana y Absorción

4. El liquido recolectado se coloca en tubos con una capacidad de 15 mL o en tubos que se tengan disponibles para centrifugar, estos tubos se centrifugaron a 3000 rpm por una hora, se retiró el sobrenadante y el paquete se resuspendió nuevamente en solución salina, realizando estos lavados 3 veces.
5. En el último lavado se procuró dejar la menor cantidad de solución salina ya que al obtener el botón final de microorganismos (biomasa) este se dejó en la estufa a 37° C por 24 hs aproximadamente para que se seque o se elimine la mayor cantidad de agua.
6. Finalmente ya con la biomasa seca, esta se pasó con mucho cuidado con la ayuda de una espátula al conjugado del microorganismo opuesto es decir: la biomasa de bacterias de *E. coli* O26 se coloca en el conjugado contra *E. coli* O111 y la biomasa de bacterias de *E. coli* O111 se coloca en el conjugado contra *E. coli* O26.
7. Una vez teniendo el botón en los conjugados estos son mezclados perfectamente y se dejan reposar a temperatura ambiente por 2 hs.
8. Después de haber transcurrido las 2 horas se centrifugarón los tubos a 3000 rpm de 15 a 30 minutos, los tubos se sacan con mucho cuidado ya que la biomasa se ha ido al fondo y hay que tener cuidado de que no se

mezclen, con ayuda de una pipeta Pasteur se retiró el sobrenadante y se coloca en un tubo etiquetado con el nombre del conjugado correspondiente y lo mismo para el otro conjugado.

9. Y nuestro conjugado está listo para ser utilizado y probado.

Corrimiento de ELISA para los serotipos *E. coli* O111 Y *E. coli* O26 con conjugados no absorbidos

Cuando se probaron los conjugados sin haberles hecho todo el proceso del anexo XI fue una sorpresa ya que al realizar un primer corrimiento con los conjugados de *E. coli* O111 y O26 y se tuvo reacción positiva para ambos serótipos, lo cual no podía ser posible ya que o se tiene reacción para uno o para otro no para ambos.

A continuación se muestran en los cuadros siguientes las lecturas registradas para las corridas de las muestras con estos conjugados no absorbidos y como se aprecia da reacción para ambos serótipos; cabe mencionar que cuando se hizo este corrimiento se realizó una distribución diferente.

Cuadro 19 corrimiento de las muestras con el conjugado de *E. coli* O111 no absorbido

Corrimiento de ELISA para el Serótipo de <i>E. coli</i> O111												
A	0.297	0.420	0.314	0.253	0.045	0.039	0.029	0.091	0.093	0.039	0.072	0.160
B	0.075	0.068	0.075	0.082	0.053	0.050	0.042	0.082	0.064	0.059	0.076	0.120
C	0.093	0.056	0.128	0.060	0.046	0.031	0.103	0.162	0.068	0.068	0.062	0.145
D	0.175	0.089	0.094	0.022	0.094	0.033	0.094	0.060	-0.001	0.091	0.066	0.146
E	0.140	0.090	0.085	0.038	0.073	0.086	0.141	0.136	0.050	0.080	0.106	0.162
F	0.351	0.095	0.086	0.072	0.051	0.037	0.063	0.048	0.021	0.030	0.031	0.151
G	0.213	0.142	0.071	0.074	0.139	0.126	0.180	0.180	0.134	0.064	0.033	0.146
H	0.239	0.124	0.125	0.122	0.112	0.134	0.130	0.295	0.112	0.085	0.100	0.143

Cuadro 19 Muestra la distribución en la placa; se colocó de lo que es la fila de A hasta el F lo que son las diluciones de la muestra en este caso se manejaron diluciones de 1:20 (se muestran en rojo), 1:50 (se muestra en azul) y 1:100 (se muestra en morado), en lo que es la fila G se colocó el control positivo y en la fila H el control negativo solo PBS

	Control positivo
	Control negativo
	Muestra dilución 1:20
	Muestra dilución 1:50
	Muestra dilución 1:100
	Control

Se hace el cálculo con la misma fórmula
 Valor de corte = media + 2 desviaciones estándar
 Valor de corte = 0.088450 + 2(0.04608)
 Valor de corte = 0.1806

Para una dilución 1: 20 fueron tres muestras positivas
 Para una dilución 1:50 fueron una muestra positiva
 Para una dilución 1:100 fueron una muestra positiva

.Cuadro 20 corrimiento de las muestras con el conjugado de *E. coli* O26 no absorbido

corrimiento de elisa para serotipo de e. coli o26												
A	0.222	0.140	0.085	0.061	0.174	0.046	0.067	0.049	0.060	0.065	0.082	0.072
B	0.105	0.047	0.043	0.051	0.049	0.038	0.118	0.062	0.035	0.072	0.019	0.042
C	0.059	0.092	0.066	0.072	0.083	0.122	0.131	0.134	0.131	0.127	0.098	0.069
D	0.972	0.114	0.083	0.142	0.164	0.166	0.151	0.142	0.144	0.068	0.060	0.134
E	0.281	0.072	0.047	0.063	0.074	0.069	0.055	0.069	0.084	0.081	0.072	0.038
F	0.065	0.055	0.049	0.068	0.068	0.068	0.069	0.050	0.032	0.028	0.066	0.021
G	0.062	0.040	0.018	0.044	0.050	0.052	0.030	0.042	0.012	0.017	0.034	0.058
H	0.048	0.025	0.023	0.000	0.029	0.109	0.092	0.078	0.027	0.191	0.035	0.067

Cuadro 20 En esta distribución se colocó de la fila de A hasta la F lo que son las diluciones de la muestra en este caso se manejaron diluciones de 1:20 (se muestran en rojo), 1:50 (se muestra en azul) y 1:100 (se muestra en morado), en lo que es la fila G se colocó el control positivo y en la fila H el control negativo solo PBS.

	Control positivo
	Control negativo
	Muestra dilución 1:20
	Muestra dilución 1:50
	Muestra dilución 1:100
	Control

Se hace el cálculo con la misma fórmula
 Valor de corte = media + 2 desviaciones estándar
 Valor de corte = 0.038888+ 2(0.01944)
 Valor de corte = 0.084064

Para una dilución 1: 20 fueron nueve muestras positivas
 Para una dilución 1:50 fueron nueve muestras positivas
 Para una dilución 1:100 fueron 7 muestras positivas

Para evitar reacciones cruzadas en los anticuerpos anti-LPS, se realizó una adsorción con el LPS heterólogo, usando bacterias tratadas con formaldehído de la misma manera como se preparan los antígenos O, se dejó adsorber y se centrifugaron, los LPS se detectaron usando los conjugados adsorbidos. Lo anterior se realizó con los 2 conjugados.

Anexo XII Cuadros del 4 al 7 de la Norma 112-SSA1-1994 para la determinación de bacterias

La técnica de NMP puede admitir gran cantidad de variaciones, los resultados obtenidos con esta técnica deben ser utilizados con precaución, los límites de confianza están representados en los cuadros 4 al 7. Por ejemplo, para una muestra sólida con un NMP de 70 coliformes por gramo, los límites de confianza en el 95% de los casos variarán de 10 a 230 coliformes por gramo (ejemplo 3 del cuadro 3) y en un producto con 24 de NMP de coliformes por gramo, los límites de confianza son de 3,6 a 130 coliformes por gramo (ejemplo 2 cuadro 3).

CUADRO 3.- Ejemplos de la selección de resultados positivos para el cálculo del NMP.

		Número de tubos positivos obtenidos de tres					NMPb	
E	tubos incubados, para las siguientes cantidades							
J	de muestra inoculada por tubo							
E	Producto							
M	líquido(ml)	10	1	10-1	10-2	10-3	Producto	Otros
P								
L	Otros							
O	productos (g)	1	10-1	10-2	10-3	10-4	líquido	
	productos							
Mayor dilución = menor concentración								
	MI-1	g-1						
1	3	3	2	1	0	15	(5)*	150 (6)*

2	3	3	3	0		24	(5)*	240	(6)*
3	2	2	1	1	0	7	(6)*	70	(7)*
4	3	3	0	0	0	2,4	(4)*	24	(5)*
5	2	2	0	1	0	0,21	(4)*	2,1	(5)*

CUADRO 4. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 10, 1,0 y 0,1 g)

3 tubos por dilución 5 tubos por dilución

Combinación de positivos	índice 95% Límites de confianza			índice 95% Límites de confianza		
	del NMP	por g	bajo	del NMP	por g	bajo
0-0-0	<0,03	<0,005	<0,09	<0,02	<0,005	<0,07
0-0-1	0,03	<0,005	<0,09	0,02	<0,005	0,07
0-1-0	0,03	<0,005	0,13	0,02	<0,005	0,07
0-2-0	--	--	0,04	<0,005		0,11
1-0-0	0,04	<0,005	0,20	0,02	<0,005	0,07
1-0-1	0,07	0,01	0,21	0,04	<0,005	0,11
1-1-0	0,07	0,01	0,23	0,04	<0,005	0,11
1-1-1	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
1-2-0	0,11	0,03	0,36	0,06	<0,005	0,15
2-0-0	0,09	0,01	0,36	0,05	<0,005	0,13
2-0-1	0,14	0,03	0,37	0,07	0,01	0,17
2-1-0	0,15	0,03	0,44	0,07	0,01	0,17
2-1-1	0,20	0,07	0,89	0,09	0,02	0,21

2-2-0	0,21	0,04	0,47	0,09	0,02	0,21
2-2-1	0,28	0,10	1,50	--	--	--
2-3-0	--	--	--	0,12	0,03	0,28
3-0-0	0,23	0,04	1,20	0,08	0,01	0,19
3-0-1	0,39	0,07	1,3	0,11	0,02	0,25
3-0-2	0,64	0,15	3,80	--	--	--
3-1-0	0,43	0,07	2,1	0,11	0,02	0,25
3-1-1	0,75	0,14	2,3	0,14	0,04	0,34
3-1-2	1,20	0,30	3,8	--	--	--
3-2-0	0,93	0,15	3,80	0,14	0,04	0,34
3-2-1	1,50	0,30	4,40	0,17	0,05	0,46
3-2-2	2,10	0,35	4,70	--	--	--
3-3-0	2,40	0,36	13,0	--	--	--
3-3-1	4,60	0,71	24,0	--	--	--
3-3-2	11,0	1,50	48,0	--	--	--
3-3-3	>11,0	>1,50	>48,0	--	--	--
4-0-0	--	--	--	0,13	0,03	0,31
4-0-1	--	--	--	0,17	0,05	0,46
4-1-0	--	--	--	0,17	0,05	0,46
4-1-1	--	--	--	0,21	0,07	0,63
4-1-2	--	--	--	0,26	0,09	0,78
4-2-0	--	--	--	0,22	0,07	0,67
4-2-1	--	--	--	0,26	0,09	0,78
4-3-0	--	--	--	0,27	0,09	0,80

4-3-1 --	0,33	0,11	0,93
4-4-0 --	0,34	0,12	0,93
5-0-0 --	0,23	0,07	0,70
5-0-1 --	0,31	0,11	0,89
5-0-2 --	0,43	0,15	1,14
5-1-0 --	0,33	0,11	0,93
5-1-1 --	0,46	0,16	1,2
5-1-2 --	0,63	0,21	1,5
5-2-0 --	0,49	0,17	1,3
5-2-1 --	0,70	0,23	1,70
5-2-2 --	0,94	0,28	2,2
5-3-0 --	0,79	0,25	1,9
5-3-1 --	1,10	0,31	2,5
5-3-2 --	1,4	0,37	3,4
5-3-3 --	1,80	0,44	5,0
5-4-0 --	1,30	0,35	3,0
5-4-1 --	1,70	0,43	4,9
5-4-2 --	2,20	0,57	7,0
5-4-3 --	2,80	0,90	8,5
5-4-4 --	3,50	1,20	10,0
5-5-0 --	2,40	0,68	7,5
5-5-1 --	3,50	1,60	10,0
5-5-2 --	5,40	1,80	14,0

5-5-3 --	9,20	3,0	32,0
5-5-4 --	16,09	6,40	58,0
5-5-5 --	--	--	--

CUADRO 5. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 1,0, 0,1 y 0,01 g) a

3 tubos por dilución 5 tubos por dilución

Combinación de positivos	índice 95% Límites de confianza			índice 95% Límites de confianza		
	del NMP por g	bajo	alto	del NMP por g	bajo	alto
0-0-0	<0,3	<0,05	<0,9	<0,2	<0,05	<0,7
0-0-1	0,3	<0,05	<0,9	0,2	<0,05	0,7
0-1-0	0,3	<0,05	1,3	0,2	<0,05	0,7
0-2-0	--	--	--	0,4	<0,05	0,11
1-0-0	0,4	<0,05	2,0	0,2	<0,05	0,7
1-0-1	0,7	0,1	2,0	0,4	<0,05	1,1
1-1-0	0,7	0,1	2,3	0,4	<0,05	1,1
1-1-1	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
1-2-0	1,1	0,3	3,6	0,6	<0,05	1,5
2-0-0	0,9	0,1	3,6	0,5	<0,05	1,3
2-0-1	1,4	0,3	3,7	0,7	0,1	1,7
2-1-0	1,5	0,3	4,4	0,7	0,1	1,7
2-1-1	2,0	0,7	8,9	0,9	0,2	2,1
2-2-0	2,1	0,4	4,7	0,9	0,2	2,1
2-2-1	2,8	1,0	15,0	--	--	--

2-3-0	--	--	--	1,2	0,3	2,8
3-0-0	2,3	0,4	12,0	0,8	0,1	1,9
3-0-1	3,9	0,7	13,0	1,1	0,2	2,5
3-0-2	6,4	1,5	38,0	--	--	--
3-1-0	4,3	0,7	21,0	1,1	0,2	2,5
3-1-1	7,5	1,4	23,0	1,4	0,4	3,4
3-1-2	12,0	3,0	38,0	--	--	--
3-2-0	9,3	1,5	38,0	1,4	0,4	3,4
3-2-1	15,0	3,0	44,0	1,7	0,5	4,6
3-2-2	21,0	3,5	47,0	--	--	--
3-3-0	24,0	3,6	130,0	--	--	--
3-3-1	46,0	7,1	240,0	--	--	--
3-3-2	110,0	15,0	480,0	--	--	--
3-3-3	>110,0	>15,0	>480,0	--	--	--
4-0-0	--	--	--	1,3	0,3	3,1
4-0-1	--	--	--	1,7	0,5	4,6
4-1-0	--	--	--	1,7	0,5	4,6
4-1-1	--	--	--	2,1	0,7	6,3
4-1-2	--	--	--	2,6	0,9	7,8
4-2-0	--	--	--	2,2	0,7	6,7
4-2-1	--	--	--	2,6	0,9	7,8
4-3-0	--	--	--	2,7	0,9	8,0
4-3-1	--	--	--	3,3	1,1	9,3

4-4-0 --	3,4	1,2	9,3
5-0-0 --	2,3	0,7	7,0
5-0-1 --	3,1	1,1	8,9
5-0-2 --	4,3	1,5	11,4
5-1-0 --	3,3	1,1	9,3
5-1-1 --	4,6	1,6	12,0
5-1-2 --	6,3	2,1	15,0
5-2-0 --	4,9	1,7	13,0
5-2-1 --	7,0	2,3	17,0
5-2-2 --	9,4	2,8	22,0
5-3-0 --	7,9	2,5	19,0
5-3-1 --	11,0	3,1	25,0
5-3-2 --	14,0	3,7	34,0
5-3-3 --	18,0	4,4	50,0
5-4-0 --	13,0	3,5	30,0
5-4-1 --	17,0	4,3	49,0
5-4-2 --	22,0	5,7	70,0
5-4-3 --	28,0	9,0	85,0
5-4-4 --	35,0	12,0	100,0
5-5-0 --	24,0	6,8	75,0
5-5-1 --	35,0	12,0	100,0
5-5-2 --	54,0	18,0	140,0
5-5-3 --	92,0	30,0	320,0
5-5-4 --	161,0	64,0	580,0

5-5-5 -- >161,0 >64,0 >580,0

CUADRO 6. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,1, 0,01 y 0,001 g) a

3 tubos por dilución 5 tubos por dilución

Combinación de positivos	Índice del NMP	Límites de confianza 95%		Índice del NMP	Límites de confianza 95%	
		bajo	alto		bajo	alto
0-0-0	<3	<0,5	<9	<2	<0,5	<7
0-0-1	3	<0,5	9	2	<0,5	7
0-1-0	3	<0,5	13	2	<0,5	7
0-2-0	--	--	--	4	<0,5	11
1-0-0	4	<0,5	20	2	<0,5	7
1-0-1	7	1	21	4	<0,5	11
1-1-0	7	1	23	4	<0,5	11
1-1-1	11	3	36	6	<0,5	15
1-2-0	11	3	36	6	<0,5	15
2-0-0	9	1	36	5	<0,5	13
2-0-1	14	3	37	7	1,0	17
2-1-0	15	3	44	7	1,0	17
2-1-1	20	7	89	9	2,0	21
2-2-0	21	4	47	9	2,0	21
2-2-1	28	10	150	--	--	--
2-3-0	--	--	--	12	3,0	28

3-0-0	23	4	120	8	1,0	19
3-0-1	39	7	13	11	2,0	25
3-0-2	64	15	380	--	--	--
3-1-0	43	7	210	11	2,0	25
3-1-1	75	14	230	14	4,0	34
3-1-2	120	30	380	--	--	--
3-2-0	93	15	380	14	4,0	34
3-2-1	150	30	440	17	5,0	46
3-2-2	210	35	470	--	--	--
3-3-0	240	36	130	--	--	--
3-3-1	460	71	240	--	--	--
3-3-2	1100	150	480	--	--	--
3-3-3	>1100	>150	>480	--	--	--
4-0-0	--	--	--	13	3,0	31
4-0-1	--	--	--	17	5,0	46
4-1-0	--	--	--	17	5,0	46
4-1-1	--	--	--	21	7,0	63
4-1-2	--	--	--	26	9,0	78
4-2-0	--	--	--	22	7,0	67
4-2-1	--	--	--	26	9,0	78
4-3-0	--	--	--	27	9,0	80
4-3-1	--	--	--	33	11,0	93
4-4-0	--	--	--	34	12,0	93
5-0-0	--	--	--	23	7,0	70

5-0-1	--	31	11,0	89
5-0-2	--	43	15,0	114
5-1-0	--	33	11,0	93
5-1-1	--	46	16,0	120
5-1-2	--	63	21,0	150
5-2-0	--	49	17,0	130
5-2-1	--	70	23,0	170
5-2-2	--	94	28,0	220
5-3-0	--	79	25,0	190
5-3-1	--	110	31,0	250
5-3-2	--	140	37,0	340
5-3-3	--	180	44,0	500
5-4-0	--	130	35,0	300
5-4-1	--	170	43,0	490
5-4-2	--	220	57,0	700
5-4-3	--	280	90,0	850
5-4-4	--	350	120,0	1000
5-5-0	--	240	68,0	750
5-5-1	--	350	120,0	1000
5-5-2	--	540	180,0	1400
5-5-3	--	920	300,0	3200
5-5-4	--	1600	640,0	5800
5-5-5	--	>1600	>640,0	>5800

CUADRO 7. Índice del NMP y límites de confianza 95% para varias combinaciones de resultados positivos cuando son usados varios números de tubos. (Diluciones 0,01, 0,001 y 0,0001 g) a

		3 tubos por dilución			5 tubos por dilución		
Combinación de	del NMP	índice 95% de confianza	Límites de	índice 95% de confianza	Límites de		
positivos	por g	bajo	alto	bajo	alto		
0-0-0	<30	<5	<90	<20	<5	<70	
0-0-1	30	<5	<90	20	<5	70	
0-1-0	30	<5	130	20	<5	70	
0-2-0	--	--	--	40	<5	110	
1-0-0	40	<5	200	20	<5	70	
1-0-1	70	10	210	40	<5	110	
1-1-0	70	10	230	40	<5	110	
1-1-1	110	30	360	60	<5	150	
1-2-0	110	30	360	60	<5	150	
2-0-0	90	10	360	50	<5	130	
2-0-1	140	30	370	70	10	170	
2-1-0	150	30	440	70	10	170	
2-1-1	200	70	890	90	20	210	
2-2-0	210	40	470	90	20	210	
2-2-1	280	100	1500	--	--	--	
2-3-0	--	--	--	120	30	280	
3-0-0	230	40	1200	80	10	190	
3-0-1	390	70	1300	110	20	250	

3-0-2	640	150	3800	--	--	--
3-1-0	430	70	2100	110	20	250
3-1-1	750	140	2300	140	40	340
3-1-2	1200	300	3800	--	--	--
3-2-0	930	150	3800	140	40	340
3-2-1	1500	300	4400	170	50	460
3-2-2	2100	350	4700	--	--	--
3-3-0	2400	360	13000	--	--	--
3-3-1	4600	710	24000	--	--	--
3-3-2	11000	1500	48000	--	--	--
3-3-3	>11000		>1500>48000	--	--	--
4-0-0	--			130	30	310
4-0-1	--			170	50	460
4-1-0	--			170	50	460
4-1-1	--			210	70	630
4-1-2	--			260	90	780
4-2-0	--			220	70	670
4-2-1	--			260	90	780
4-3-0	--			270	90	800
4-3-1	--			330	110	930
4-4-0	--			340	120	930
5-0-0	--			230	70	700
5-0-1	--			310	110	890

5-0-2	--	430	150	1140
5-1-0	--	330	110	930
5-1-1	--	460	160	1200
5-1-2	--	630	210	1500
5-2-0	--	490	170	1300
5-2-1	--	700	230	1700
5-2-2	--	940	280	2200
5-3-0	--	790	250	1900
5-3-1	--	1100	310	2500
5-3-2	--	1400	370	3400
5-3-3	--	1800	440	5000
5-4-0	--	1300	350	3000
5-4-1	--	1700	430	4900
5-4-2	--	2200	570	7000
5-4-3	--	2800	900	8500
5-4-4	--	3500	1200	10000
5-5-0	--	2400	680	7500
5-5-1	--	3500	1200	10000
5-5-2	--	5400	1800	14000
5-5-3	--	9200	3000	32000
5-5-4	--	16000	6400	58000
5-5-5	--	>16000	>6400	>58000

Referencias

1. Peña NC. Investigación hemerobibliográfica de aspectos más recientes de la producción de diarrea por los diferentes patotipos de *Escherichia coli* en México, haciendo énfasis en ETEC y EHEC. [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo] Cuatlilán Estado de México; 2006.
2. Monografías. Estructura de los Gram negativos. [on line] [Consultada 15 de Abril del 2008] disponible en: [http://www.monografias.com/trabajos/fision celular.html](http://www.monografias.com/trabajos/fision%20celular.html)
3. Licia M.K, Williams Mac. Luria Broth and Luria Agar Media an Therruses: *Escherichia coli*, Publication. [on line] septiembre del 2006[consultada 18 de Septiembre del 2008] disponible en: <http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files>
4. Kaisers G. *Escherichia coli* Growing on EMB Agar. [Microbiology Home page]. [on line] Jul 2002 [consultada 18 de Septiembre del 2008] disponible en: Student.ccbcmd.edu/.../lab3/imagenes/embec.JPG
5. Enciclopedia Britanica Online Student Edition. [on line] [Consultada 18 de Septiembre del 2008] disponible en: [cahe.eb.com/eb/imagen?id=76304&rendTyped=4>](http://cahe.eb.com/eb/imagen?id=76304&rendTyped=4)
6. Wikipedia the Freee enciclopedia. [on line] [Consultada el 13 de Mayo 2008] disponible en: [http://wikipedia.org/w/index.php?title=palm%\(3%Adticofaction=edit](http://wikipedia.org/w/index.php?title=palm%283%Adticofaction=edit)
7. Margni AR. Inmunología e inmuoquímica. Fundamentos. 5a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1996.
8. Hannaoui R, E Villalobos LB, Martínez NE. *Escherichia coli* Shigatoxigénica; Patogénesis, Diagnóstico y Tratamiento. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología V29 [on line] Junio 2009 [consultada el 15 de Mayo] disponible en:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100004&lng=es&nrm=iso

9. Food Standards Agency Report Repository .Comparison of Human and Cattle *E. coli* O26 Isolates by Pulsed Field Gel These included four apparently unrelated strains of *E. coli* O26 isolated over. [on line].2004 [Consultada 21 Noviembre del 2008] disponible en: <http://www.foodbase.org.uk/resultsph>

10. Sayers G, McCarthy T, O'connell M , O'leary M, O'Brien D Cafferkey M, McNamara E. Hemolytic uremic syndrome associated with interfamilial spread of *E. coli* O26:H11.[on line] 2005. [Consultada 21 de noviembre del 2008] disponible en: [http://Journals.cambridge.org/download\[d.php](http://Journals.cambridge.org/download[d.php)

11. *E coli* O26 outbreak reported in Ireland : The Lancet . *E coli* O26 outbreak reported in Ireland. [On line] [Consultada 21 de noviembre del 2008] disponible en: <http://www.thelancet.com/journals/lancet/article>

12. Campos L F, Trabulsi R M. Diarrheagenic *Escherichia coli* entre las categorías tradicionales de enteropatógenos *E. coli* serogrupos O – un examen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.99 no.6 Río de Janeiro. [on line] octubre 2004. [Consultada 21 de noviembre del 2008] disponible en: <http://traslate.google.com.mx/traslate/cielo.br/sciel>

13. **c a p í t u l o 2 1 0 1 3** *Escherichia coliverocitotoxigénica*. Resumen [on line] [consultada 21 de noviembre] disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.13_Escherichia_coli_verocitotoxigenica_ruth.pdf.

14. Rare *E. coli* O111 May Be Tested in Meat.8. [on line]Oct 2008. [Consultada el 21 de Noviembre del 2008] disponible en <http://translate.google.com.mx/translate>

15. Sandoval MS. *Escherichia coli* Y sus serotipos Enteropatogenos. [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo]. 2000 México. D.F. Escuela de Ciencias Químicas Incorporada a la UNAM Universidad de la SALLE.
16. Wikipedia the Free encyclopedia. [On line] [Consultada 23 de octubre del 2008] disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/ELISA>
17. Bertram G Katzung. Farmacología básica y clínica. 4^a ed México DF: El manual moderno S.A. de C.V., 1991: 555, 582- 583.
18. Blais BW, Leggate J, Bosley J, Martinez-Perez A. Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of *Escherichia coli* O157 by a novel polymyxin-based ELISA. *Lett Appl Microbiol.* 2004, 39:516-522.
19. Blais BW, Bosley J, Martínez A, Popela M. Polymyxin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Escherichia coli* O111 and O26. *J Microbiol Methods* 2006; 65:468-75
20. Voller A, Dwell D, Bartlell A. Manual Of clinical Immunology: Rose Priedmin 1980.
21. Campbell DH, Garbey JS, Cremer NE, Sussdorf DH. *Methods in Immunology*, 2nd Ed New York: WA Benjamin; 1970.
22. Hudson L, Hay FC. *Practical immunology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980
23. Hashimoto M, Asai Y, Ogawa T. Separation and structural analysis of lipoprotein in a lipopolysaccharide preparation from *Porphyromonas gingivalis*. *Int Immunol* 2004;16: 1431-1437

24. Boudet F, Thèze J, Zouali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *Journal of Immunological Methods*. 1991;142: 73-82
25. Blais BW, Bosley J, Martinez-Perez A, Popela M. Polymixin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Escherichia coli* O111 and O26. *J Microbiol Methods* 2006;65:468-475
- 26 Gibbs J. Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules. ELISA Technical Bulletin - No. 2 Corning Incorporated [on line] Julio 2001 [citado 17 Mayo 2009]. Disponible en: URL: http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/ELISA_tapizado.pdf
- 27 García MD. Poliestireno expandido y acetona. Club Científico Bezmiliana. [on line] Abr 2007 [citado 27 Junio 2009]. Disponible en: URL: <http://www.ciencias.ies-bezmiliana.org/blog/quimica/poliestireno-expandido-y-acetona/>
- 28 Stephan-Otto E. El agua en la cuenca de México sus problemas históricos y perspectivas de solución. Patronato del parque ecológico de Xochimilco 2003;1:303-317
- 29 Tequianes L, Pérez AD, González Ma, Flores M, Marroquin R. Aislamiento de *Aeromonas* productoras de aerolisina y enterotoxina, en muestras de agua potable en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y otras dependencias de la Universidad Nacional Autónoma de México. *Bioquímica*, 2005; 30:23-29
- 30 Stites DP, Stobo JD, Fudenberg HH, Weiss JV. *Inmunología Básica y Clínica*. 5 ed. México D.F.: Editorial El Manual Moderno; 1985. p.
- 31 Kabat E. *Experimental Immunohistochemistry*. Publisher, Springfield Illinois .U.S.A.

