



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Relación clonal de cepas de *Escherichia coli* comensal,
procedentes del intestino de un neonato.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

VÍCTOR MANUEL LÓPEZ HERRERA



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE**

VOCAL: **Profesor: GLORIA DÍAZ RUIZ**

SECRETARIO: **Profesor: MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MARTHA GILES GÓMEZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: NORMA ANGELICA CAMACHO DE LA ROSA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE GENÓMICA BACTERIANA, DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA EN LA FACULTAD DE MEDICINA EN LA UNAM.

UBICADO EN EL 5TO PISO DEL EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

GABRIELA DELGADO SAPIÉN _____

SUSTENTANTE (S):

VICTOR MANUEL LÓPEZ HERRERA _____

Agradecimientos:

Índice:

	<u>Página</u>
Índice:.....	5
Índice de tablas	7
Índice de Figuras	7
Lista de Abreviaturas:	8
Resumen	10
Introducción.....	11
Neonato:	11
La familia Enterobacteriaceae	11
Patotipos Intestinales de Escherichia coli.....	14
Escherichia coli enteropatógena (EPEC)	14
Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)	15
Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)	15
Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)	16
Escherichia coli enteroagregativa (EAEC)	16
Escherichia coli adherente difusa (DAEC)	16
Caracterización Bioquímica de Escherichia coli.....	19
Sistema API 20E.....	19
Distribución filogenética de E. coli:	20
Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE):.....	21
Antecedentes importantes para el desarrollo del presente trabajo	23
Objetivo General	24
Objetivos Particulares	24

Hipótesis	25
Metodología	26
Aislamiento e identificación de cepas de Escherichia coli.....	26
Protocolo de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) para bacterias patógenas.º.....	27
Formación de bloques de agarosa de PFGE.....	27
Lisis celular en bloques de agarosa.	28
Desproteización de bloques de agarosa	28
Lavados de bloques de agarosa con Buffer TE.....	28
Restricción del DNA bacteriano en los bloques de agarosa con la enzima	28
Elaboración del gel de agarosa para el corrimiento electroforético.....	29
Condiciones de la electroforesis:	29
Teñido del gel de PFGE y captura de imagen.	30
Resultados	31
Análisis de resultados.....	37
Discusión de los resultados:	39
Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	42
Apéndice 1: preparación de medios de cultivo.	48
Apéndice 2: preparación de soluciones para PFGE.....	54
Apéndice 3: Técnica de PFGE por el CHEF Mapper de Bio Rad.....	58
Apéndice 4: Análisis de la técnica de PFGE.....	62

Índice de tablas

	<u>Página</u>
Tabla 1. Características de los grupos Diarrogénicos de <i>Escherichia coli</i>	17
Tabla 2. Resultados de pruebas bioquímicas para <i>Escherichia coli</i>	19
Tabla 3. Cuadro de reacciones bioquímicas para <i>Escherichia coli</i>	20
Tabla 4. Enzimas de restricción usadas para <i>Escherichia coli</i>	22
Tabla 5. Condiciones de electroforesis	30
Tabla 6. Resultados de pruebas bioquímicas a cepas en estudio.....	32
Tabla 7. Proporción del buffer H en función del número de bloques a utilizar.....	60
Tabla 8. Proporción del buffer H y enzima de restricción en función a bloques a utilizar.....	60
Tabla 9. Proporción de reactivos para la elaboración del TBE 0.5X.....	61

Índice de Figuras

	<u>Página</u>
Figura 1. Esquema de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> diarrogénica	18
Figura 2. Sistema de numeración de la tira API 20E	19
Figura 3. Lectura de tira API 20E	34
Figura 4. Dendograma de niño control.....	35
Figura 5. Dendograma de niño con episodio de diarrea.....	36

Lista de Abreviaturas:

°C	Grados Celsius
µL	micro litros
µm	Micrometros
A/E	Adherencia y borrado
Abreviatura:	Significado:
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CDC	Centro para el Control de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention)
CFA	Factor de colonización antigénica
CH	Colitis hemorrágica
Cit	Utilización de citrato como fuente de carbono.
DAEC	Escherichia coli de Adherencia Difusa
DNA	Acido Desoxirribonucleico
E. coli	Escherichia coli
EAEC	Escherichia coli Enteroagregativa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EHEC	Escherichia coli Enterohemorrágica
EIEC	Escherichia coli Entero Invasiva
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
EPEC	Escherichia coli Enteropatógena
ETA	Enfermedades de transmisión alimentaria
ETEC	Escherichia coli Enterotoxigénica
G	Gramos
Gas	Gas producido en la fermentación CO ₂
Glu	Fermentación de Glucosa
Gluco	Prueba bioquímica de Gluconato.
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
H ₂ S	Producción de Ácido sulfhídrico.
IMViC	Pruebas bioquímicas: Indol, Movilidad, Voges Proskauer, Citrato
Kb	Kilobases
KCN	Cianuro de potasio
Lac.	Fermentación de Lactosa
LEE	Locus of enterocyte affacement (Locus borrado de enterocitos)
LT	Toxina Termolábil
M Da	Mega Daltons
Malo	Prueba bioquímica de Malonato

Mg	Miligramos
mL	Mililitro
Mov	Movilidad por flagelos.
O.D.	Densidad óptica
ONPG	orto- nitrofenilgalactopiranósido
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de campos pulsados)
Phe	Prueba bioquímica de Fenilalanina
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (DNA polimórfico amplificado aleatoriamente).
RFLP	Restricción Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción).
RM	Prueba bioquímica de Rojo de Metileno.
RM-VP	Pruebas bioquímicas: Rojo de Metilo - Voges Proskauer.
Rpm	revoluciones por minuto
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
SIM	Pruebas bioquímicas: Sulfhídrico, Indol, Movilidad.
ST	Toxina Termoestable
TGI	Tracto Gastro Intestinal
UFC	Unidad Formadora de Colonia
VP	Prueba bioquímica de Voges Proskauer.
VT	Verotoxina

Resumen

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil, no esporulado, que en la mayoría de los casos constituye parte normal de la flora del tracto intestinal de los seres humanos y de animales de sangre caliente.

El intestino delgado de un infante es estéril hasta el momento del nacimiento; pero cuando nace inicia la colonización con la flora vaginal e intestinal de la madre. Después entran por el tubo digestivo del neonato una gran variedad de microorganismos ambientales. A partir de los cuales se establece la flora normal del tracto gastrointestinal (TGI). Así, en los primeros dos días aparecen *Enterococcus* y *Escherichia coli*, tanto de los lactantes que son alimentados con leche materna como en los que reciben fórmulas lácteas.

El objetivo de este estudio fue determinar si existe relación clonal entre las cepas de *E. coli* aisladas del intestino en un neonato durante un estudio previo (1985-1987); en el que la colonización del intestino por patógenos fue seguida longitudinalmente en niños durante sus dos primeros años, realizando cultivos de heces periódicamente y además diariamente cada vez que un niño presentaba diarrea. Para establecer dicha relación se usó la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE por sus siglas en inglés: Pulsed Field Gel Electrophoresis).

Típicamente la caracterización fenotípica de *E. coli* se realiza mediante la selección de series de medios de cultivo con sustratos que permiten elaborar un perfil bioquímico. Por lo general *E. coli* genera reacciones positivas para indol, lisina descarboxilasa y fermentación de manitol, lactosa y glucosa.

Actualmente la epidemiología molecular es una disciplina que ha permitido caracterizar a diversos agentes infecciosos, lo que ha facilitado su diagnóstico, su distribución y en su caso un mejor tratamiento.

La caracterización genotípica de las bacterias por medio de PFGE, comparado con otros métodos más sofisticados (secuenciación) o más simples (RAPD), nos permite obtener un perfil representativo del genoma bacteriano, en la identificación de clones o sub clones de *E. coli* en las cepas estudiadas.

Introducción

Neonato:

Una vez acontecido el nacimiento, comienza el periodo neonatal.

La lactancia aporta beneficios significativos para el neonato y su madre, al ser alimentado del seno materno, se limita la exposición del niño a patógenos ambientales que podrían introducirse a través de alimentos, líquidos o utensilios contaminados para la alimentación.⁷

El intestino delgado de un niño es estéril hasta el momento del nacimiento, pero cuando nace es colonizado con la flora vaginal e intestinal de su madre. Después entra en el tubo digestivo del neonato una gran variedad de microorganismos ambientales. A partir de ellos se establece la flora normal del TGI. Así, a partir de los primeros dos días se aíslan *Enterococcus* y *E. coli* de las heces, tanto de los neonatos que son alimentados con leche materna como en los que reciben fórmulas lácteas. Más aún, en los bebés alimentados de leche materna aparecen en gran número especies de *Bifidobacterium* y en menor nivel especies de *E. coli* y *Enterococcus*. En contraste, en los recién nacidos que toman fórmula láctea, predominan *E. coli* y *Enterococcus*, junto con *Clostridium* y *Bacteroides*.⁴

La familia de *Enterobacteriaceae* está formada por más de 20 géneros bacterianos, 120 especies entre ellas se encuentra *E. coli* y miles de serotipos.⁵

En los lactantes alimentados con leche materna se evita la infección gastrointestinal y se reduce su gravedad, con efectos específicos contra los patógenos entéricos como rotavirus, *Giardia*, *Shigella*, *Campylobacter* y *E.coli* enterotoxigénica.⁸

El sistema digestivo humano contiene más de 10^{14} microorganismos, muchos más que el número total de células en nuestro cuerpo. Se calcula que el TGI alberga 1000 especies de bacterias pero de ellas solo 30 o 40 constituyen el 95% de esta población.³⁷

La familia *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae* está formada por más de veinte géneros bacterianos, aproximadamente ciento veinte especies y miles de serotipos. Se caracterizan por ser capaces de presentar metabolismo tanto en condiciones de anaerobiosis en el interior del intestino como aeróbicamente en el ambiente exterior, por lo que se definen como microorganismos facultativos. Algunos de los géneros reconocidos como patógenos en el humano son los 6 patotipos de

Escherichia, de *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella*, y las enterobacterias oportunistas que son *Klebsiella*, *Serratia* y *Proteus*, *Enterobacter* y *Cronobacter*.⁵

Normalmente, el nivel microbiano en el intestino delgado (en particular en yeyuno e íleon) es de casi 10^{6-7} /g y en el intestino grueso (colon) de 10^{9-10} /g de contenido. Los tipos más predominantes en el intestino delgado corresponden a distintas especies de *Lactobacillus* y *Enterococcus*, y en el grueso hay diferentes géneros de *Enterobacteriaceae*, diversas especies de *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacterium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.³⁸

La microbiota intestinal humana constituye un ecosistema complejo que ahora es reconocido por su impacto en la salud humana. Contribuye a la maduración del sistema inmune y proporciona una barrera directa contra la colonización por patógenos, así como su posible implicación en las nuevas enfermedades. Estas incluyen alergias, enfermedades inflamatorias del intestino y trastornos metabólicos y posiblemente degenerativos. Así mismo el huésped desarrolla una tolerancia hacia las bacterias no patógenas que colonizan las superficies de mucosas y la piel; y a cambio, las bacterias controlan el desarrollo y el mantenimiento de las funciones esenciales del metabolismo. La microbiota intestinal contribuye a la bioconversión de los compuestos no absorbidos de los alimentos en las partes superiores del tracto digestivo. Además de que la colonización por microorganismos comensales es una clave para el desarrollo del sistema inmunológico.⁵¹

Las cepas de *E. coli* que persisten en la flora intestinal de un individuo durante un cierto periodo se les llama cepas comensales o residentes. Estas cepas presentan ciertas características que le permiten resistir como flora intestinal; por ejemplo, la expresión de fimbrias P y la capacidad para adherirse a las células epiteliales del colon.⁵³

Las bacterias comensales se encuentran distribuidas a todo lo largo del tubo digestivo en cantidades que se relacionan con su capacidad para adaptarse al ambiente que lo circunda y, una vez establecidas, sus poblaciones son estables y no necesitan de reintroducciones periódicas de bacterias cuando logran que su reproducción iguale o supere la velocidad de eliminación del organismo que las alberga.⁵²

Del género *Escherichia* se incluyen siete especies las cuales son: *E. adecarboxylata*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E. vulneris*; de las cuales *E. coli* es la mejor conocida.

E. coli fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, quien le denominó *Bacterium coli commune* por ser aislada de las heces de individuos

sanos y enfermos. Junto con otras bacterias ayudan al funcionamiento del proceso digestivo y a la producción de vitaminas B y K.⁵

Los miembros de esta especie tienen forma de bacilo de tamaño promedio de 0.5µm de ancho por 3µm de largo; son Gram negativos, anaerobios facultativos, que se mueven por acción de flagelos peritricos; no producen esporas, fermentan la glucosa y la lactosa, son catalasa positivos, oxidasa negativos y reducen nitratos a nitritos; constituyen parte normal de la flora residente del tracto intestinal de los seres humanos, animales de sangre caliente y aves.

El análisis ribosomal (16 rRNA), muestra que pertenece a la subclase de γ -proteobacterias α , β y δ ,—que se encuentra relacionada tanto con las proteobacterias como con las cianobacterias.

Las cepas de *E. coli*, desde un punto de vista bioquímico, se diferencian de otros coliformes por la producción de índoles (I) a partir de triptona, la Movilidad (M) debido a la presencia de flagelo bacteriano, una reacción negativa para Voges-Proskauer (Vi: producción de acetilmetil-carbinol a partir de glucosa), y por no poder utilizar citrato como fuente de carbono (C); a este conjunto de pruebas se les conoce como IMViC; las cuales se realizan a partir de una unidad formadora de colonia (UFC); aislada de un medio de cultivo sólido.⁴

Cuando el neonato nace por cesárea, la colonización se realiza más lentamente, sin embargo, a la cuarta semana se alcanzan los mismos niveles de concentración de microorganismos (10^8 /mL) que presentan los niños que nacen por la ruta natural.

E. coli alcanza una densidad muy alta (superior a 10^9 UFC por gramo de heces) después de los dos años de edad, la densidad se estabiliza y se mantiene alrededor de 10^8 UFC por gramo de heces y disminuye gradualmente en la edad adulta.⁴⁷

Estas bacterias residen en la capa del moco que cubren las células epiteliales de todo el TGI; definido como un nicho ecológico nutricional al que el metabolismo de *E. coli* se ha adaptado.⁴⁶

Este nicho de *E. coli* comensal se encuentra en la capa mucosa del colon perteneciente a todo el tracto digestivo, donde su capacidad para utilizar gluconato es más eficiente que otras especies residentes, permitiendo de ese modo que ocupe un nicho metabólicamente específico.²⁴

Dentro de las cepas de *E. coli* patógenas que infectan a los seres humanos, se han descrito dos clases: Los que causan infecciones intestinales y los que producen infecciones extraintestinales. Utilizando el procedimiento de tipificación

por sueros, se mostró que algunas variedades antigénicas de *E. coli* estaban involucradas en brotes de diarrea en niños albergados en cuneros.⁵

La relación entre *E. coli* y el huésped, está definida por el comensalismo, y algunos de sus beneficios es evitar la colonización por patógenos; a través de mecanismos como la producción de bacteriocinas.⁴⁶

E. coli es un organismo modelo, pues es utilizado para analizar los procesos involucrados en la evolución del genoma bacteriano, comprendiendo el tipo de cepa: las variantes patógenas y comensales. Cepas de *E. coli* patógenas y no patógenas difieren en la presencia y ausencia de elementos en DNA adicionales que contribuyen a los rasgos de virulencia específicos.⁵⁵

Hay varias cepas de *E. coli* que han adquirido atributos específicos de virulencia que les confieren una mayor capacidad para adaptarse a los nuevos nichos y les permite causar un amplio espectro de enfermedades. Estos atributos de virulencia están codificados con frecuencia en los elementos genéticos extracromosómicos que pueden ser movilizados en diferentes cepas para crear nuevas combinaciones de factores de virulencia, o en elementos genéticos que forman casetes en el genoma.²⁴

Patotipos Intestinales de *Escherichia coli*.

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se han agrupado en seis diferentes tipos cada uno definido por sus propiedades de virulencia. Los grupos son: *E. coli* enteropatógena (EPEC por sus siglas en inglés), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Cada uno de estos grupos presenta características distintas relacionadas a su epidemiología, patogénesis, manifestaciones clínicas y tratamiento.

***Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

EPEC es asociada con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad; seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, su fenotipo ha sido denominado adherencia y borrado (A/E Attaching and Effacing).²⁰

En EPEC todos los determinantes genéticos para la producción de las lesiones de tipo A/E se encuentran en el locus de borrado de Enterocitos (por sus siglas en inglés locus of enterocyte effacement, LEE) presente en el plásmido EAF (Factor de adherencia de EPEC). Contiene los genes que codifican para la proteína de

membrana externa denominada intimina (Eae), los genes *esp* (por *E. coli* secreted proteins), el gen que codifica para el receptor translocado de intimina (*tir*) (translocated intimin receptor) y los genes para la síntesis del sistema de secreción tipo III.¹⁷

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

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (factor de colonización antigénico o por sus siglas en inglés colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones. Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de AMPc y GMPc respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua e-iones.²²

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

El grupo enterohemorrágico, propuesto por Levine, incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7 que es considerado como prototipo del grupo. A diferencia de otras *E. coli*, en general no fermentan sorbitol ni tienen actividad glucuronidasa. EHEC se ha asociado con la etiopatogenia de colitis hemorrágica sin fiebre (CH), síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopenica.⁵

Estas cepas tienen la capacidad de elaborar una o más citotoxinas, originalmente llamadas verotoxinas (VT) o Shiga-like.

Otra propiedad de virulencia observada en este grupo de microorganismos es el daño celular conocido como adherencia y borrado (A/E), en este evento participan tanto genes cromosomales como plasmídicos que inducen y/o regulan la expresión de factores de virulencia de la bacteria. Estos genes se encuentran insertados en LEE.⁵

Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 MDa (92kb), que codifica para la enterohemolisina.²¹ Este pO157 codifica para una serie de determinantes de virulencia, entre ellos: *ehxA* (enterohemolisina A), *etpC* to *etpO* (Ruta secretora general), *espP* (serina Proteasa), *katP* (Catalasa-peroxidasa), *toxB* (Potencial de adherencia), *ecf* (Fragmentos conservados de genes), y *stcE* (Inhibidor de estereasas). Sin embargo; el papel de este plásmido

no se entiende completamente y solo 19 genes entre los 100 marcos de lectura abierta se han caracterizado.⁵⁶

El grupo entero hemorrágico incluye diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7; entre los serogrupos involucrados más comunes son: O26, O111, O121, O145.⁵

***Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)**

El mecanismo de patogenicidad de cepas EIEC es la capacidad de invadir y reproducirse dentro del citoplasma, destruyendo las células hospederas.⁵

El grupo EIEC y *Shigella spp.* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes.²⁹

La información genética para este mecanismo está en loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado plnv, que codifica para proteínas, como por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis.²¹

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea. En el plásmido de 60 MDa de EAEC también se encuentran los genes que codifican para la toxina EASTI.²¹

***Escherichia coli* adherente difusa (DAEC)**

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2.²⁰

Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como *F1845*, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa.³³

En la siguiente tabla se resumen las características principales de los principales patotipos de *E. coli*.

Tabla 1: Características de los grupos Diarrogénicos de *Escherichia coli*. (Tay Zavala, 2012)⁵

Grupo	Factores de virulencia	Tipo de diarrea	Epidemiología
EPEC	Adherencia localizada. Borrado. Adherencia íntima.	Secretora.	Distribución mundial, principalmente niños menores de 2 años.
ETEC	Enterotoxinas termolábil y/o termoestable. Factores antigénicos de colonización.	Secretora.	Mundial.
EAEC	Adherencia agregativa. Exotoxinas Pet y Pic. Adhesinas. Sideróforos.	Persistente y Aguda.	Mundial.
EHEC	Citotoxinas similares a Shiga.	Inflamatoria.	Mundial.
EIEC	Invasividad.	Inflamatoria.	Países en vía de desarrollo.

En la figura 1 se resume el mecanismo de acción de los seis patotipos reconocidos de *E. coli* diarrogénica, tiene distintas características únicas en su interacción con las células eucariotas. Estas inducen daño celular en las microvellosidades de las células epiteliales mediante los diversos mecanismos de patogenicidad.

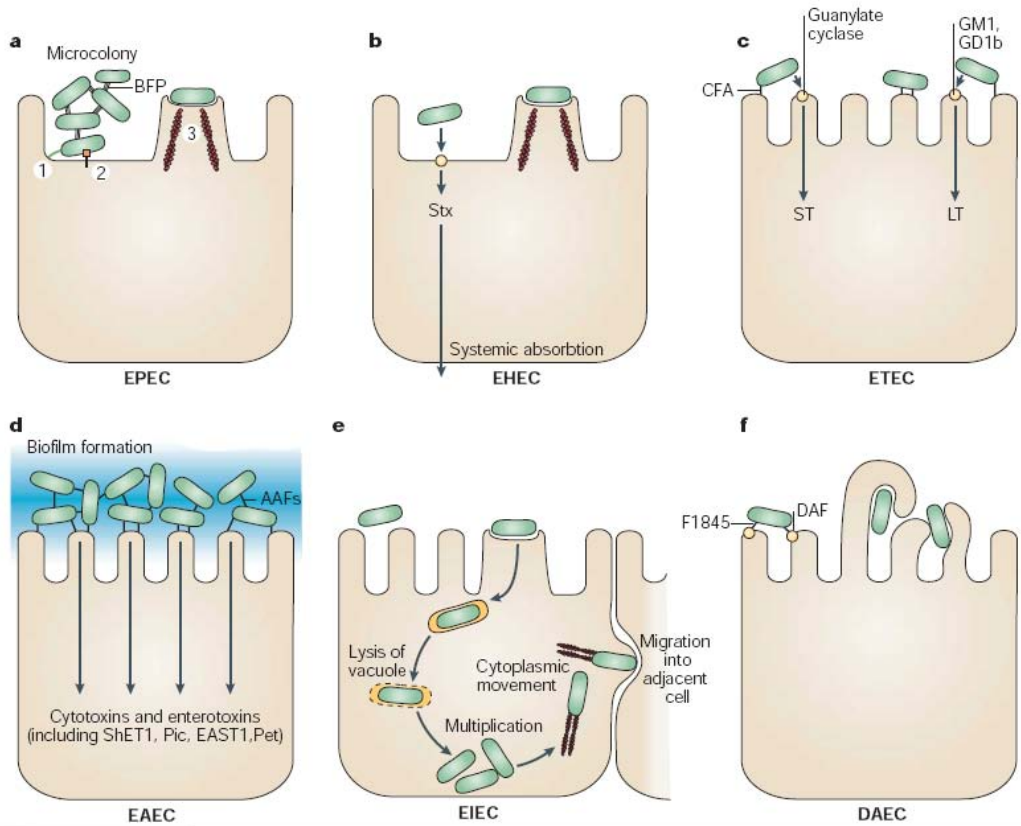


Figura 1: Esquema de patogenicidad de *Escherichia coli* diarrogénica²⁴. (Kaper, 1998)

La interacción de cada categoría con una célula típica está esquemáticamente representada en cada figura. **a)** EPEC se adhieren a enterocitos intestinales, pero destruye la arquitectura normal de la microvellocidad, induciendo el fenotipo característico. Alteraciones del citoesqueleto se acompañan de una respuesta inflamatoria y diarrea. 1. Adherencia inicial, 2. Translocación de proteínas según el tipo de secreción III, 3. Formación de pedestal. **b)** EHEC también inducen la fijación y lesión modesta, pero en el colon. La característica distintiva de EHEC es la elaboración de la toxina Stx y su absorción sistémica de la cual conduce a complicaciones potencialmente mortales. **c)** Del mismo modo, ETEC se adhieren a enterocitos del intestino e inducen diarrea acuosa por la secreción de las enterotoxinas: LT y ST. **d)** EAEC se adhiere al epitelio intestinal en un biofilm de espesor y elabora enterotoxinas y citotoxinas secretoras. **e)** EIEC invade la célula epitelial del colon, lisa el fagosoma y se mueve a través de la célula por nucleación por microfilamentos de actina. **f)** DAEC provoca un efecto de transducción de señal característica en el intestino delgado y los enterocitos se manifiestan con el crecimiento de las proyecciones celulares largas en forma de dedo, que se envuelven alrededor de la bacteria.²⁴

Caracterización Bioquímica de *Escherichia coli*.

En 1905, MacConkey describió por primera vez un medio selectivo diferencial que el usó para aislar bacilos entéricos Gram negativos de muestras que contenían mezclas de especies bacterianas. En 1916 Holt-Harris y Teague diseñaron un medio (agar EMB) con eosina y azul de metileno como indicador para diferenciar entre las colonias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa.

La identificación preliminar de Enterobacteriaceae se basa posiblemente en las características de las colonias y las reacciones bioquímicas en medios de aislamiento primarios, otras técnicas de identificación de especies requieren la determinación de características fenotípicas adicionales que reflejan el código genético y la identidad única de los microorganismos que se prueban (tabla 2).¹¹

Tabla 2. Resultados de pruebas bioquímicas para *Escherichia coli* según la biografía consultada.^[11]

Bacteria	Lac	Indol	Gas	H ₂ S	Cit	RM	VP	Mov.	Gluco	Malo	Phe
<i>Escherichia coli</i>	±	+	±	-	-	+	-	+	-	-	.

**Lac: Lactosa, Glu: Glucosa, Gas: gas producido en la fermentación CO₂, H₂S: ácido sulfhídrico, Cit: Citrato de Simmons, RM: Rojo de Metilo, VP: Voges Proskauer, Mov: movilidad, Gluco: Gluconato, Malo: malonato, Phe: Fenilalanina.

Sistema API 20E.

La identificación de Enterobacteriaceae y de muchas otras familias y grupos de bacterias ha sido facilitada por el uso de equipos automatizados y comerciales, mediante los cuales los microorganismos son identificados con códigos numéricos asistidos por computadora (Figura 2).

Figura 2. Sistema de numeración de la tira API 20E para la identificación de bacterias del genero Enterobacteriaceae.

VAL OR ASIG - NAD O ^a	ONP	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
	1 ↘	2 ↓	4 ↙	1 ↘	2 ↓	4 ↙	1 ↘	2 ↓	4 ↙	1 ↘	2 ↓	4 ↙	1 ↘	2 ↓	4 ↙	1 ↘	2 ↓	4 ↙	1 ↘	2 ↓	4 ↙
	sumar valores			sumar valores			sumar valores			sumar valores			sumar valores			sumar valores					

^a Se le asigna este número si el resultado de la prueba fue positivo; si el resultado fue negativo el valor asignado es cero.

El sistema de identificación API 20E (bioMerieux Voitek, Inc., Hazelwood MO) determina 21 características bioquímicas (tabla 3), lo cual hace que sea un gran dispositivo de prueba para la identificación bioquímica que son comerciales.

Tabla 3. Cuadro de reacciones bioquímicas de *Escherichia coli*:

Pruebas bioquímicas para <i>Escherichia coli</i>			
Producción de indol	98	Fermentación de L-arabinosa	99
Rojo de Metilo	99	Fermentación de rafinosa	50
Voges – Proskauer	0	Fermentación de L-ramnosa	80
Citrato de Simmons	1	Fermentación de maltosa	95
H₂S	1	Fermentación de D-xilosa	95
Hidrólisis de urea	1	Fermentación de trehalosa	98
Fenilalanina desaminasa	0	Fermentación de celobiosa	2
Lisina descarboxilasa	90	Fermentación de α-metil-D-glucósido	0
Arginina dihidrolasa	17	Fermentación de eritritol	0
Ornitina descarboxilasa	65	Hidrólisis de esculina	35
Movilidad (36°C)	95	Fermentación de melibiosa	75
Hidrólisis de gelatina (22°C)	0	Fermentación de D-arabinol	5
Crecimiento en KCN	3	Fermentación de glicerol	75
Utilización de malonato	0	Fermentación mucato	95
D-Glucosa, ácido	100	Tartrato de Jordan	95
D-Glucosa, gas	95	Utilización de acetato	90
Fermentación de lactosa	95	Lipasa (aceite de maíz)	0
Fermentación de la sacarosa	50	DNAsa (25°C)	0
Fermentación de D-manitol	98	Nitrato a nitrito	100
Fermentación del dulcitol	60	Oxidasa, Kovacs	0
Fermentación de salicina	40	Prueba de ONPG	95
Fermentación de adonitol	5	Pigmento amarillo	0
Fermentación de mio-inositol	1	Fermentación de D-manosa	98
Fermentación de D-sorbitol	94		

Cada número da el porcentaje de reacciones positivas después de dos días de incubación a 36°C (a menos que se indique una temperatura diferente).

Distribución filogenética de *E. coli*:

Diferentes modelos sobre la evolución de bacterias proponen que la diversidad en la patogenicidad de los microorganismos, es el resultado de la adquisición de genes llamados de virulencia a través de la transferencia horizontal de los mismos. La gran diversidad de cepas patógenas en *E. coli*, es el resultado de la adquisición constante de diferentes genes que codifican para factores de virulencia, mismos que se encuentran presentes en plásmidos, islas de patogenicidad y en fagos, éstos elementos genéticos son intercambiados a una frecuencia alta entre diferentes cepas de bacterias, proceso que se ha definido como transferencia horizontal de genes.⁵

Los análisis genómicos han demostrado que *E. coli* obtuvo al menos una parte de su genoma por transferencia horizontal a partir de otros organismos. Los genes

transferidos horizontalmente se pueden detectar con frecuencia porque tienen porcentajes de Guanina-Citosina (GC) significativamente diferentes o una distribución de codones diferente de la del organismo hospedador.¹

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE):

Durante la última década; los métodos tradicionales como la tipificación de bacteriófago o serotipificación en la caracterización de cepas bacterianas se han complementado o sustituido en muchos laboratorios con los nuevos métodos moleculares.⁴⁸

La utilización de métodos de tipificación molecular se inició en 1980 con el desarrollo de métodos simples de aislamiento de DNA bacteriano y el uso de enzimas de restricción. La separación de los fragmentos generados en base al tamaño “Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis” (RFLP), por electroforesis en gel de agarosa, da lugar a patrones de restricción de DNA característicos para un subtipo particular. Estos métodos tienen mayor poder discriminatorio que los convencionales y han sido empleados con éxito en investigaciones epidemiológicas de brotes de enfermedades de transmisión Alimentaria (ETA), originados por consumo de alimentos contaminados con patógenos como *E. coli* 0157:H7, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. La técnica PFGE es considerada actualmente el “Gold standard” de los métodos de tipificación molecular.⁴²

PFGE es un método que cada vez más se emplea en la caracterización de cepas de origen hospitalario (estudios epidemiológicos) debido a que separan largos fragmentos de DNA que se obtienen al digerir el DNA genómico con enzimas de restricción que realizan cortes poco frecuentes. Los patrones de bandas generados por PFGE se han usado en el análisis de innumerables microorganismos como *Pseudomonas* spp, *Mycobacterium* spp, *Campylobacter* spp., *E. coli*, entre otras; provenientes de casos aislados o brotes, para establecer o descartar su posible relación clonal.³⁹

En 1996 se creó en EEUU la Red Nacional de Subtipificación Molecular de Patógenos Transmitidos por Alimentos, PulseNet, la cual emplea la técnica PFGE. PulseNet no es un sistema de vigilancia como tal, pero sí propone un método de subtipificación recomendado por el Centro de Control y Prevención de enfermedades, (Centers for Disease Control and Prevention o CDC) de Atlanta para los programas de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos que permite establecer a través de las bases de datos de los patrones de PFGE una rápida comparación entre los perfiles de DNA de los diferentes laboratorios en cualquiera de las redes, logrando identificar los grupos clonales asociados con

brotos a nivel local, nacional y regional. PulseNet cuenta con redes en EEUU, Canadá, Europa, Asia y América Latina.⁴¹

La PFGE ha demostrado ser una técnica altamente discriminadora y por esto es utilizada en estudios epidemiológicos de brotes causados por microorganismos. La técnica se ha empleado para reconocer brotes de infección, detectar transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, identificar la fuente de infección, reconocer las cepas particularmente virulentas y para el seguimiento de los programas de vacunación entre otros. Mediante el análisis de los patrones de PFGE, ya sea de manera visual o utilizando un software, se han podido determinar las similitudes genéticas entre los aislamientos, lo que permite inferir si dos aislamientos aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva.⁵⁷

La caracterización de cepas para el control de infecciones se basa en varios supuestos para su caracterización.⁴⁸

1. Los aislamientos representan el mismo precursor en el brote epidemiológico.
2. Las cepas tienen el mismo genotipo.
3. Los aislamientos están no relacionados epidemiológicamente y tienen distinto genotipo.

Las enzimas de restricción que han demostrado ser útiles para el análisis de PFGE para *Escherichia coli* se enumeran en la tabla 4, y se indica el número de fragmentos típicamente resueltos.

Tabla 4. Enzimas de restricción usadas para *E. coli*.⁴⁸

Microorganismo	Enzima de restricción	Numero de fragmentos aproximados	Rango en tamaños de fragmentos (kb)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Xba I</i>	Aprox. 20	10-500
<i>Escherichia coli</i>	<i>Not I</i>	12-15	10-1000
<i>Escherichia coli</i>	<i>Sfi I</i>	15-20	10-700

El DNA de *Salmonella* entérica serovar. Branderup, digerida con *XbaI*, es usada como el estándar universal de peso molecular para normalizar los patrones de bandas del PFGE en una base de datos de patógenos bacterianos, tales como *Salmonella* y *E. coli*.⁵⁸

Antecedentes importantes para el desarrollo del presente trabajo

En un estudio previo, realizado por el Dr. Alejandro Cravioto en una zona rural de México; ubicada en el estado de Morelos denominada Tierra Blanca; se estudió a un grupo de niños nacidos entre agosto de 1985 y febrero de 1987. El objetivo principal del estudio fue determinar la colonización del intestino por virus, bacterias y parásitos patógenos durante los primeros dos años de vida, así como en los episodios de diarrea.⁴³

En México, Cravioto determinó que las cepas de ETEC eran el grupo de bacterias de origen intestinal que se aislaban con mayor frecuencia durante los primeros años de vida.⁵

Se reportó que existía una estrecha asociación entre el aislamiento de cepas EAEC y la presencia de diarrea persistente en niños de 2 años o menos.⁵

Estudios epidemiológicos realizados en México por Cravioto, muestran que las cepas EIEC son poco frecuentes como agentes causales de diarrea, identificándose preferentemente después del sexto mes de vida.⁵

Durante el tiempo de estudio se tomaron muestras de heces cada 7 días para sus cultivos, aumentando su frecuencia a diario, cada vez que el niño tenía un episodio de diarrea.^{43,45} De cada cultivo, se seleccionaron varias colonias fermentadoras de lactosa y todas las colonias que no fermentaban lactosa, las cuales fueron trabajadas por separado haciéndoles pruebas bioquímicas hasta su identificación. En ese entonces todos los aislamientos perfectamente caracterizados e identificados y los aislamientos con bioquímicas atípicas fueron almacenados en tubos con agar inclinado a temperatura ambiente.

En el presente estudio se seleccionaron dos niños: el primero, que durante el primer mes no presentó episodios diarreicos, por lo que sus condiciones de salud eran buenas; y el segundo, que presentó escasos episodios diarreicos durante su primer mes de vida; todas las cepas aisladas fueron caracterizadas para determinar si hubo diferencias entre las cepas comensales y aquellas que son definidas como patógenas y causan un episodio diarreico.

Objetivo General

Determinar la multi-colonización de cepas de *E. coli* en el intestino de neonatos por medio de su perfil cromosómico, utilizando la técnica de electroforesis en gel de campos pulsados.

Objetivos Particulares

- ✓ Estandarizar la técnica de Campos Pulsados en cepas de *E. coli*
- ✓ Determinar los diferentes genotipos de las cepas de *E. coli* por la técnica de Campos Pulsados
- ✓ Determinar la clonalidad o grupos clonales de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de dos neonatos, con base en el análisis de sus perfiles cromosómicos.

Hipótesis

La colonización de un neonato inicia inmediatamente después de su nacimiento y ésta va aumentando y estableciéndose conforme el tiempo, se sabe que las cepas de *Escherichia coli* del intestino son subpoblaciones que guardan una cierta relación clonal, las cuales comparten características fenotípicas y genéticas. Sin embargo, en procesos diarreicos asociados a cepas de *E. coli* se espera que el niño adquiera por medio de alimentos o agua contaminada cepas de algún patotipo de *E. coli* como ETEC, EPEC u otro, que presente características fenotípicas y genéticas diferentes a las subpoblaciones de *E. coli* consideradas comensales.

La caracterización genética con base a los perfiles de restricción del cromosoma (utilizando la técnica de electroforesis de campos pulsados) de un grupo de cepas de *E. coli* aisladas durante el primer mes de vida de un neonato, nos permitirá establecer si existe relación clonal entre ellas y que la presencia de un perfil completamente diferente se asocia a la presencia de una cepa de *E. coli* caracterizada como patógena, lo cual nos permitirá suponer que es una cepa independiente a las previas que colonizan el intestino del niño, adquirida a través de una fuente de transmisión y la responsable de un evento diarreico.

Metodología

Aislamiento e identificación de cepas de *Escherichia coli*

Se trabajó con 45 cepas de *E. coli* aisladas de heces durante el primer mes de vida de dos neonatos. La colección de cepas se encontraba guardada en medio de conservación en el cepario propiedad de la Facultad de Medicina de la UNAM, ubicado en el laboratorio de Referencia de Patógenos Entéricos, ubicado en el tercer piso de la torre de Investigación de la Facultad de Medicina; a cargo del Dr. Armando Navarro.

Las cepas corresponden al primer mes de vida de dos neonatos: 22 cepas fueron aisladas del niño uno (sin episodio de diarrea) y 23 cepas del niño dos que presentó un episodio diarreico a los 15 días de nacido en el cual se aislaron seis cepas durante este episodio diarreico.

Del niño uno se realizaron dos coprocultivos, el primero a los dos días de nacido, obteniendo 3 cepas de *E. coli*; el segundo al mes de nacido, obteniendo 19 cepas para trabajar.

Del segundo niño se realizaron tres coprocultivos: el primero, al primer día de nacido y se obtuvieron diez cepas; el segundo se realizó a los 15 días de nacido, que fue cuando presentó el episodio diarreico aislando seis cepas; y el tercero a los 29 días de nacido sin episodio de diarrea, obteniendo siete cepas.

Las cepas fueron recuperadas en cajas de Agar Sangre (AS) y Agar MacConkey (McK) por la técnica de cuadrante radial o agotamiento, para comprobar la viabilidad y pureza de la cepa.

Una vez que se realizó la siembra y se observó el crecimiento, se seleccionó una colonia completamente aislada y se transfirió a dos tubos con Agar gelosa especial, y a un vial que se empleó para mantener una copia de trabajo y el otro para guardarla nuevamente en el cepario.

En algunos casos, a partir del primer aislamiento se observaron distintas morfologías coloniales en ambas cajas de cultivo; por lo cual se seleccionaron los

distintos tipos de colonia para ser trabajadas individualmente, en estos casos se rotularon las cepas conservando la clasificación original agregando solo un orden numérico.

Posteriormente, se sembraron las pruebas bioquímicas del tubo de conservación para corroborar que las cepas aisladas correspondían al género y especie *E. coli*. Debido a que algunas de las cepas presentaron resultados diferentes o dudosos con algunos marcadores bioquímicos, que no concordaron con las pruebas bioquímicas ideales se procedió a realizar pruebas bioquímicas completas con el sistema API 20E.

Las pruebas bioquímicas se realizaron de acuerdo a lo establecido en el libro “Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica de Jean. F. MacFaddin (2003); las pruebas aplicadas fueron:

- ♣ Agar SIM
- ♣ Prueba RM-VP
- ♣ Prueba Malonato-Fenilalanina
- ♣ Agar Hierro de Kligler
- ♣ Prueba de Gluconato
- ♣ Agar Citrato de Simmons

Una vez corroborado la identificación de *E. coli*, se procedió a realizar la PFGE.

Protocolo de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) para bacterias patógenas.⁹

La técnica de PFGE fue modificada de acuerdo a lo descrito en el CDC, esta se lleva a cabo por etapas:

Formación de bloques de agarosa de PFGE

Se inoculó la cepa de *E. coli* en un tubo con caldo Luria, y se incubo de 14-18 horas a 37°C con agitación a 150 rpm.

Posteriormente el crecimiento bacteriano obtenido en el caldo luria se centrifugo a 13000 rpm por 2 min en micro tubos, para obtener la pastilla de las células

bacterianas. Una vez obtenido el precipitado bacteriano, este fue re suspendido con Buffer PIV, con la finalidad de efectuar los lavados de estas células.

Se ajustó la densidad óptica del crecimiento bacteriano a 5 (5 O. D.), el cual fue embebido en bloques de agarosa.

NOTA: La explicación del ajuste de densidad óptica así como la preparación de los reactivos utilizados se describe en el apéndice 3.

Lisis celular en bloques de agarosa.

Los paquetes bacterianos embebidos en bloques de agarosa fueron depositados en un tubo Falcón de 15mL, se agregó a cada tubo buffer EC de Lisis y se colocaron en Baño María a 37°C por 3 horas para dejar actuar la lisozima junto con el EDTA, este último paso de lisis es con la finalidad de provocar el rompimiento de la envoltura bacteriana y recuperar el DNA bacteriano integro dentro del bloque de agarosa.

Desproteización de bloques de agarosa

Para la desproteización se agregó solución de Buffer ES/ Proteinasa K (50µL), a cada tubo Falcon conteniendo los bloques de agarosa con el DNA desnudo, incubándolos a 52°C por un día.

Esto se lleva a cabo una segunda vez.

Lavados de bloques de agarosa con Buffer TE.

Se retiró del baño María los tubos Falcon con los bloques de agarosa y DNA, se desechó la solución de desproteización; y se agregó buffer TE, los tubos Falcon fueron colocados sobre la plataforma de un agitador horizontal a una velocidad baja, por una hora, el buffer TE se cambió cada hora, hasta cumplir con los 9 lavados. Al termino de los lavados, los tubos Falcon con los bloques de agarosa conteniendo el DNA fueron almacenados con buffer TE en refrigeración (4°C), donde permanecieron hasta la restricción del DNA.

Restricción del DNA bacteriano en los bloques de agarosa con la enzima de restricción *Xba*I.

Los bloques de agarosa con el DNA desnudo fueron extraídos del tubo Falcon con ayuda de una asa bacteriológica, cada bloque fue cortado transversalmente con

ayuda de un cubre objetos desinfectado, tomando aproximadamente un 1/3 de su tamaño, el fragmento fue colocado en un micro tubo, donde se agregó una solución de buffer H en proporción 1:10 con agua desionizada (para PCR); los micro tubos con el fragmento fueron colocados en baño María a 37°C por 30 minutos.

Después de la incubación, se removió el buffer H cuya concentración es 0.1X; agregando nuevamente buffer H fresco en solución 0.1X donde se adicionó 30 unidades de la enzima de restricción *Xba*I. Los micro tubos fueron incubados en un baño María a 37°C toda la noche, para dejar que la enzima actuara.

Elaboración del gel de agarosa para el corrimiento electroforético.

Se pesó 1 g de SeaKem® Gold agarosa en un frasco con rosca y se agregó 100mL de buffer TBE 0.5x, la agarosa fue fundida en un horno de microondas. Cada bloque de agarosa con el DNA desnudo de las cepas fue colocado en la punta del diente del peine (colocando el control de *Salmonella* Braenderup [preparado de igual manera en bloques de agarosa que las cepas a trabajar], en los dientes 1, 5, 10 y 15). El peine con los bloques en las puntas fue colocado en la charola y embebido con la agarosa fundida, se permitió que la agarosa solidificara y se retiró el peine, se agregó una capa delgada de agarosa fundida sobre el gel formado para sellar los pozos.

La charola con el gel conteniendo los bloques de agarosa y el DNA fue colocada en la cámara de electroforesis, se agregó en la cámara 2.3 L de buffer TBE 0.5x; el módulo de refrigeración del equipo “CHEF MAPPER” (Bio-Rad) fue encendido para que el buffer se enfriara a 12°C.

Condiciones de la electroforesis:

Para llevar a cabo la electroforesis de campos pulsados se utilizó el equipo CHEF MAPPER de la empresa Bio-Rad, utilizando el programa con las siguientes condiciones:

Tabla 5. Condiciones de electroforesis.

(Switch)	2.16s
Corriente inicial	
(Switch)	54.17s
Corriente final	
Tiempo	18 horas
Volts	30 kb low MW 600 kb MW
Temperatura	12±2°C

Teñido del gel de PFGE y captura de imagen.

Después de transcurridas 18 horas de corrida se retiró el gel del equipo y fue colocado en un contenedor con 300mL de buffer TE o agua des ionizada agregando 100µL de una solución de bromuro de etidio (1mg/mL) para su tinción, manteniendo el gel en agitación a 100 rpm por 30 minutos.

Transcurrido el tiempo de tinción el gel fue retirado del bromuro de etidio y fue observado bajo luz UV, el gel fue envuelto en papel aluminio y almacenado por 24 horas para posteriormente tomarse una fotografía en un equipo de procesador de imágenes con el programa KODAK Sistema de lógica para Gel 100 (Gel Logic 100 System).

Para el análisis de los perfiles de restricción de los cromosomas de las cepas obtenidos con la enzima *XbaI*, se utilizó el Software Bio-Numerics versión 6.0 analizando la agrupación con la matriz UPGMA y el coeficiente de similitud con el algoritmo DICE.

Resultados

Las 45 cepas (22 del niño uno y 23 del niño dos) con las que se trabajó fueron sembradas en Agar Sangre y Agar MacConKey para corroborar su pureza, así como para reactivar su metabolismo de las condiciones de estrés en las que se tenían.

Del agar MacConkey se obtuvieron principalmente las siguientes morfologías:

- ★ Colonias puntiformes, con borde entero, elevación convexa, textura viscosa, color rosa.
- ★ Colonias circulares, con borde entero, elevación convexa, textura viscosa, color rosa.

Las pruebas bioquímicas fueron inoculadas con colonias únicas de las diferentes morfologías. Los perfiles bioquímicos que presentaron las 45 cepas se pueden observar en la tabla 6.

Una vez analizadas las pruebas bioquímicas, se encontraron irregularidades en algunas pruebas para el patrón de *E. coli*; 7 pruebas positivas a Citrato y una prueba positiva a Gluconato, por lo cual se tomaron estas 7 cepas y se inocularon en la tira API 20E, corroborando que se trataba de *E. coli*.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura numero 2; en los 8 casos se obtuvo el mismo código.

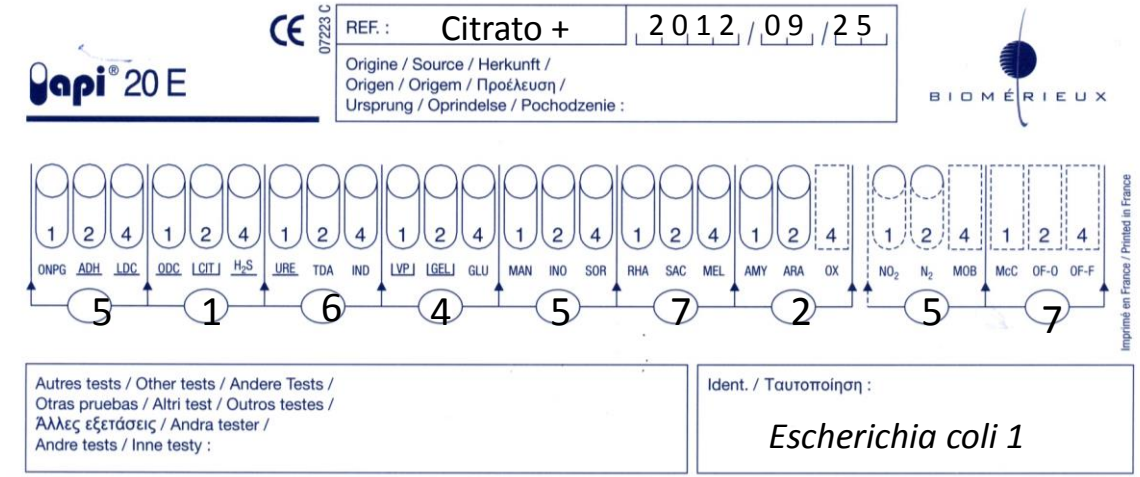
Tabla 6. Resultado de Pruebas bioquímicas a cepas en estudio

Prueba Bioquímica.	Kligler (KIA)				Citrato de Simmons	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Gluconato	Malonato / Phe	SIM			Interpretación
	Cepa:	Lactosa	Glucosa	H ₂ S						Gas	H ₂ S	Indol	
29093	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29094	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29095	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29679	+	+	-	+	-	+	-	+	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29680	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29682	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29682/1	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29683	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29685	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29685/1	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29685/2	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29686	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29686/1	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29687	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29687/1	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29688	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29689	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29691	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29691/1	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29692	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29693	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29694	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29429	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>

Tabla 6 (Continuación). Resultado de Pruebas bioquímicas a cepas en estudio

Prueba Bioquímica. Cepa:	Kligler (KIA)				Citrato de Simmons	Rojo de metilo	Voges Proskauer	Gluconato	Malonato / Phe	SIM			Interpretación
	Lactosa	Glucosa	H ₂ S	Gas						H ₂ S	Indol	Movilidad	
29429/1	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29430	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29430/1	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29432	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29433	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29434	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29435	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29436	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	-	<i>Escherichia coli</i>
294336/1	+	+	-	-	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29726	+	+	-	+	+	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29727	+	+	-	+	+	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29728	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29729	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29730	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
29731	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
30035	-	+	-	+	+	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
30036	+	+	-	+	+	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
30037	+	+	-	+	+	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
30038	+	+	-	-	+	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
30039	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
30040	+	+	-	+	+	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>
30041	+	+	-	+	-	+	-	-	- / -	-	+	+	<i>Escherichia coli</i>

Figura 3: Lectura de tira API 20E.



Una vez que se tenían las 45 cepas identificadas como *E. coli* se procedió a realizar la técnica de PFGE utilizando las cepas aisladas de dos niños. El niño control y el niño que presentó un episodio diarreico.

La estandarización de la técnica de campos pulsados para las cepas consideradas como *E. coli* comensal de este estudio fue necesaria, ya que empleándola como estaba originalmente descrita se presentaron algunos problemas técnicos, por ejemplo, el DNA obtenido en los bloques de agarosa se degradaba. Se cambió del buffer de la suspensión celular, CSB por PIV (que difiere en su composición por tener cloruro de sodio en lugar de EDTA). Se modificó el paso de lisis agregando una solución de desoxicolato de sodio y lisozima en lugar de α -sarkosil para efectuar este paso y poder lograr romper la pared celular de la bacteria; el desoxicolato de sodio ayuda al aislamiento de proteínas asociadas a la pared celular, además de RNasa; que ayuda a la purificación del DNA. Así mismo, se probó distinta concentración de enzima XbaI (enzima estandarizada por la red de PulsNet)⁹ y se modificó el tamaño del bloque de agarosa para la restricción; observándose que un 1/3 de bloque de agarosa tenía una concentración de DNA adecuada para que con 35 unidades de enzima se realizará una restricción completa del DNA.

La corrida de PFGE se realizó con las condiciones similares a las descritas en PulsNet; excepto por la temperatura de corrida⁹. Estas están presentes en el apéndice 3.

Los Dendrogramas obtenidos por PFGE se muestran en las Figura 4 y Figura 5, a continuación.

Niño control.

Perfil cromosomal obtenido por enzima Xbal:

Fecha de
aislamiento

Cepa
correspondi
ente a perfil:

Presentación
de diarrea:

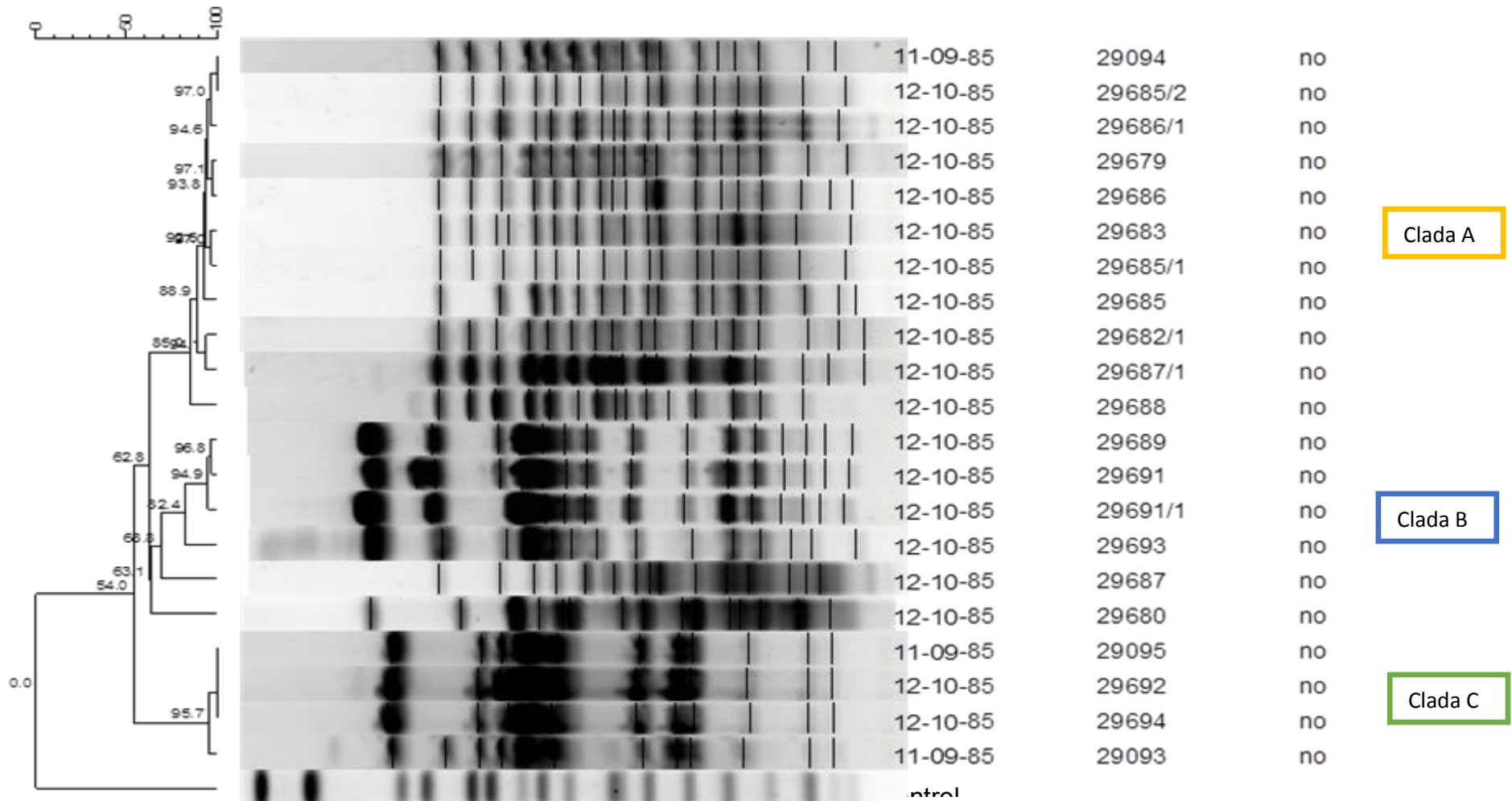


Figura 4. Perfiles cromosómicos de 21 cepas de *Escherichia coli* obtenidos con la enzima Xbal. Se muestra el dendrograma construido el algoritmos de coeficiente de similitud de DICE y el programa de agrupamiento UPGMA de 21 cepas aisladas de un niño sin diarrea en su primer mes de vida. Se aprecian claramente la agrupación de las cepas en tres cladas principales.

Figura 5: Dendograma de niño con episodio de diarrea.

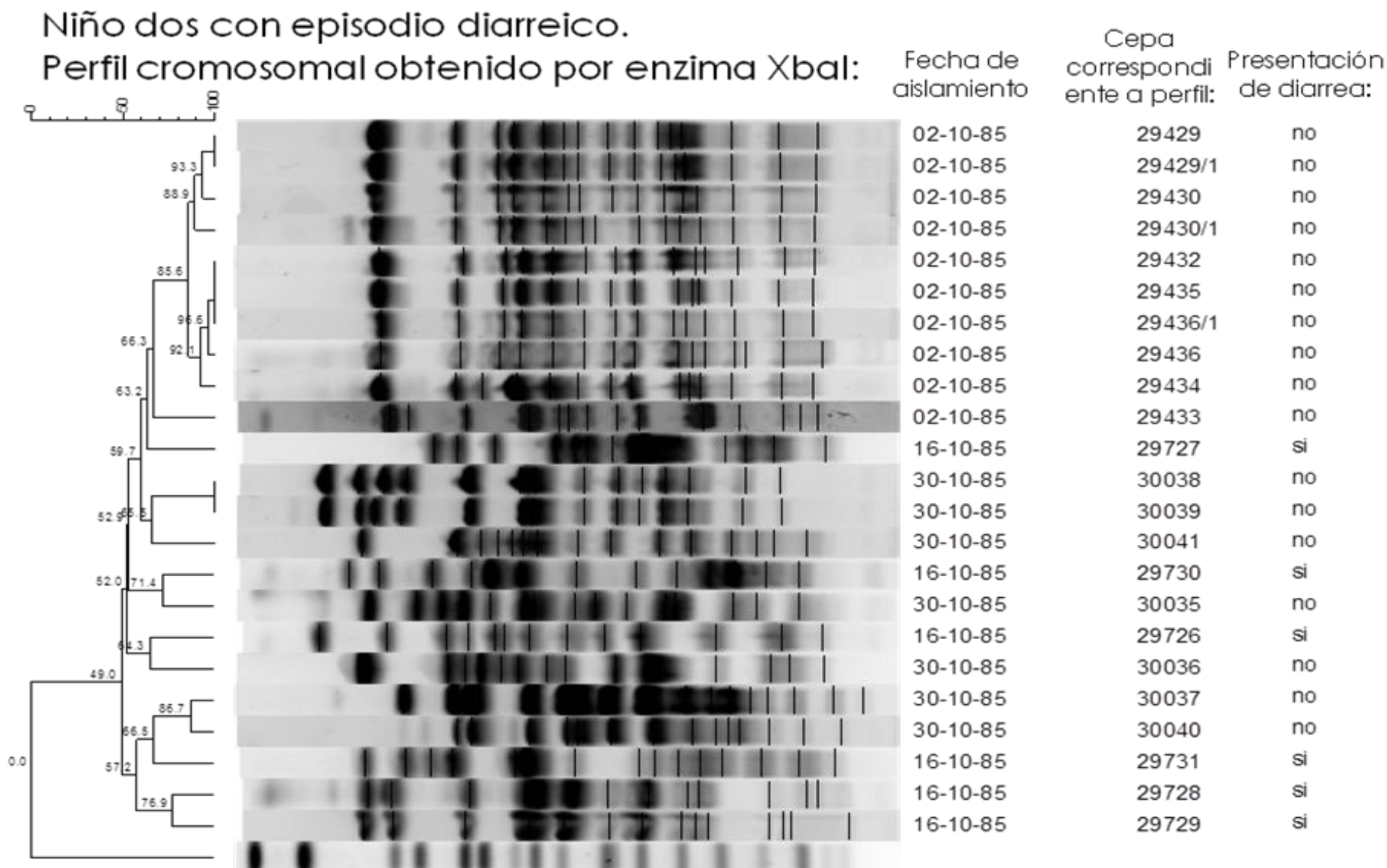


Figura 5. Perfiles cromosómicos de 23 cepas de *Escherichia coli* obtenidos con la enzima XbaI. Se muestra el dendograma construido con el algoritmo de coeficiente de similitud de DICE y el programa de agrupamiento UPGMA de 23 cepas aisladas de un niño que presentó un episodio de diarrea durante su primer mes de vida. En este dendograma no se puede ver un agrupamiento de cladas, pues tienen muy diferente perfil cromosómico.

Análisis de resultados

Para la realización de este estudio se caracterizaron fenotípica y genotípicamente cepas de *E. coli* aisladas del intestino de dos neonatos incluidos en un estudio previo realizado por el Dr. A. Cravioto.

Del niño control, solo se aislaron 3 colonias de *E. coli* a partir de la primera muestra de heces durante el segundo día de nacido (11-09-1985). La caracterización de los perfiles cromosómicos de las cepas por PFGE mostró tres tipos diferentes de patrones, dos de ellos estrechamente relacionados con una identidad de 95.7% que al parecer nos habla de que son subclonas y el otro completamente diferente, mostrándonos que el pequeño ya tenía tres cepas diferentes de *E. coli* a los dos días de nacido (Figura 4). Al mes de nacido (12-10-1985) se aislaron 18 cepas, el análisis de los perfiles cromosómicos de las cepas mostró que hubo una mayor diversidad en los patrones de restricción, observándose hasta 6 subtipos, compartiendo entre si un número significativo de bandas lo que sugiere que son derivadas de un ancestro común (Figura 4). La construcción del dendograma utilizando el programa Bio-numerics con los patrones de restricción de las 21 cepas aisladas en ambos periodos de tiempo, muestra que las cepas se agruparon en tres (A, B y C) principales ramas: La rama A comprende 11 cepas aisladas en su mayoría al mes de nacido y solo una de la primera muestra (11-09-1985); mientras que en la rama B y C se agruparon 4 cepas (29689, 29691, 29691/1, 29693) respectivamente que muestran ser subclonas derivadas de dos cepa en común. Además, entre las cepas agrupadas en la rama B y C hay dos cepas (29687 y 29680) que presentan perfiles únicos, mostrando ser aislamientos completamente independientes. En general, podemos apreciar en el dendograma que hasta el mes de edad se detectaron solo 5 tipos de cepas de *E. coli* colonizando el intestino del niño sin diarrea, las cuales guardan alguna relación clonal entre ellas.

Las cepas de la rama A, comparten entre sí un perfil cromosómico de 15 a 18 bandas; con un porcentaje de similitud entre ellas de 85.9% a 97%. La diferencia está entre una hasta tres bandas en los perfiles cromosómicos de las cepas, que según los criterios de Tenover⁴⁸ indican que son cepas con una relación clonal estrecha y la diferencia entre el número de bandas puede ocurrir por cambios en la secuencia de nucleótidos del cromosoma, resultado de un suceso genético único como una mutación puntual en la secuencia de nucleótidos que reconoce la enzima de restricción y por lo tanto se modifique el número de cortes en el cromosoma, o bien por inserciones de fragmentos de DNA o deleciones de base en la secuencia del DNA.

Las cepas que se agrupan en la rama B presentan un porcentaje de similitud entre ellas del 82 al 94% y las cepas de la rama C de 95.7%, en este último grupo se encuentran cepas aisladas del día 11-09-1985 y cepas aisladas un mes después (12-10-85), el alto porcentaje de similitud entre estas cepas nos sugiere fuertemente que han permanecido colonizando el intestino del niño sin sufrir algún evento genético que modifique el tamaño del cromosoma, por lo menos durante el primer mes de vida del niño. Será de gran interés y utilidad determinar por cuanto tiempo estas cepas permanecen sin cambios genéticos aparentes.

El análisis de los patrones cromosómicos de las cepas aisladas del segundo niño (Figura 5), muestra que los aislamientos hechos en el segundo día de nacido (02-10-85) son de dos tipos; de las 10 cepas aisladas 9 tienen relación clonal con una similitud del 85.6%. Sin embargo, esta relación clonal se pierde a partir del día 16-10-85, cuando 14 días después el niño presentó un cuadro diarreico, los 6 aislamientos de *E. coli* que se hicieron mostraron patrones de restricción completamente diferentes entre ellos y a las cepas del día 2-10-85; la diferencia tan marcada entre los perfiles de restricción entre ambos grupos de cepas sugiere que las cepas del día 16-10-85 fueron adquiridas del exterior y son probablemente la causa de la diarrea, ya que no presentan relación clonal con las cepas detectadas en los primeros días de colonización (segundo día del nacimiento). Como consecuencia las cepas aisladas el día 30-10-85 presentan perfiles diferentes, muy probablemente por un proceso de recombinación entre las poblaciones existentes en el intestino, lo que aumenta la variabilidad cromosómica entre las cepas observada en todos estos patrones.

La cepa de referencia que fue tomada fue la *Salmonella* Braenderup, la cual al someterse a restricción por la enzima XbaI muestra un perfil cromosómico de 15 patrones de bandas, separadas entre si.

La cepa de *Salmonella* serotipo Braenderup H9812 fue seleccionada de acuerdo a los criterios establecidos en la red de PulseNet⁹; pues al ser digerida con la enzima de restricción XbaI, tiene 18 bandas lo cual es un número óptimo ya que están distribuidas en una amplia gama de tamaños. Esta cepa ayudo a normalizar la variación en la migración del gel y determinar con precisión el tamaño de las bandas de las muestras (de 20.5 a 1 135 Kb).

Discusión de los resultados:

La estandarización de la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) para cepas de *Escherichia coli* fue llevada a cabo siguiendo la metodología descrita por la red de PulseNet^{®9}, con algunas modificaciones (para detalles ver apéndice).

La Electroforesis de Campos pulsados (PFGE) es una técnica que permite la separación de fragmentos de DNA de alto peso molecular (10 Kb a 10 Mb) y tiene varias utilidades. En el campo de la investigación nos permite caracterizar a un microorganismo con base a su perfil de restricción; nos permite determinar el tamaño aproximado de un cromosoma; acompañado de otras técnicas como protocolos de hibridación con genes marcadores, nos sugiere la organización cromosómica de una cepa con respecto a un patrón cromosómico conocido. En el campo de la Epidemiología nos permite descartar o confirmar a un microorganismo o grupo de microorganismos como responsable (s) de brotes de origen clonal, dentro de un hospital, una región geográfica (epidemia), o continente. La determinación de clones de las bacterias involucradas en un brote es importante desde el punto de vista epidemiológico, pues permite la detección de fuentes de infección, y establecer la relación entre casos clínicos para de esta manera, controlar nuevos brotes epidemiológicos; así como conocer la evolución en dichos nichos bacterianos.

La transferencia horizontal de genes y la reducción de genes representan dos mecanismos que contribuyen a la evolución de los genomas en procariontes. Por lo tanto, la adquisición de plásmidos y fagos, así como regiones grandes de ADN llamadas "islas genómicas," juegan un papel importante en el desarrollo de nuevas especies, subespecies, y patotipos. *E. coli* representa un excelente modelo para estudiar la evolución de los genomas en procariontes a detalle pues es un ejemplo ideal para estos estudios, debido a los numerosos ecotipos, adaptados a los intestinos de humanos y diversos animales.

El empleo de esta técnica en la caracterización de cepas de *E. coli* aisladas de dos niños, nos permitió determinar la relación clonal entre las cepas, además, determinamos el número de cepas que iniciaron la colonización en los primeros días de nacidos y se pudo discriminar de acuerdo a los patrones si persistió la colonización por las mismas cepas hasta un mes después.

La zona de estudio es un pueblo del estado de Morelos; por lo cual las condiciones de higiene en la comunidad pueden afectar la colonización del intestino de los bebés, al contraer diferentes tipos de bacterias ambientales o patógenas se va a favorecer la recombinación homóloga entre fragmentos de DNA donde intervienen diferentes moléculas de DNA o se va a ver favorecido la

transferencia horizontal de genes entre bacterias, que va a contribuir a una mayor diversidad genética entre las bacterias que se encuentran presentes en particulares nichos, como lo podemos apreciar entre las cepas que colonizaron al niño 2.

La determinación de los clones de las bacterias involucradas en un brote es importante desde el punto de vista epidemiológico, pues permite la detección de la fuente de infección, establecer la relación entre casos clínicos y con estos resultados tomar medidas que eviten la dispersión de los patógenos y, de esta manera, controlar nuevos brotes.

Conclusiones

Se logró la estandarización de la técnica de tipificación por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE) para cepas de *Escherichia coli* aisladas del intestino de Dos neonatos, así como la caracterización fenotípica y genotípica de dichas cepas determinando si existe relación clonal entre ellas con ayuda de la enzima *XbaI* por PFGE.

Esa técnica nos permitió discriminar con base a los perfiles de restricción cromosómica las cepas comensales que iniciaron la colonización del intestino y las cepas que fueron adquiridas posteriormente (muy probablemente del ambiente) y como en la última cepa hubo una mayor diversidad genética.

La colonización del intestino del niño control fue llevada a cabo por tres principales grupos de *E. coli* comensal; los cuales perduraron a lo largo de un mes.

La colonización del intestino del niño con diarrea fue muy variado; no se observó un perfil cromosómico similar al de las cepas de *E. coli* comensales encontradas al segundo día de nacido; por lo cual su colonización fue guiada por otro tipo de poblaciones con distinto genoma a las primeras comensales.

Bibliografía

1. Madigan M. T.,(2003) "Brock: Biología de los microorganismos" 10ª edición. Editorial Prentice Hall Pearson España.
2. "A new specific endonuclease from *Xanthomonas badrii*." *Journal of molecular biology* 115.2 (1977): 249-255.
3. Sudger, B., DeTroy, B., Roberts, R. J. & Sambrook, J. (1975). *Anal. Biochem.* 68, 36-46.
4. Ray, B. (2010) Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. Edit. Mc Graw Hill. México. Pp: 113-121, 211-213, 229-231, 248.
5. Tay-Zavala J. (2012) Microbiología y Parasitología Médicas. 4ª edición editorial México: Méndez Editores; México. Pag: 105-112.
6. Scariati PD, Grummer-Strawn LM, Fein SB. (1997). A longitudinal analysis of infant morbidity and the extent of breastfeeding in the United States. *Pediatrics.* 99:e5.
7. Ips S, Chung M, Raman G, (2007). Breastfeeding and Maternal and Infant Health Outcomes in Developed Countries. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.
8. Ramírez-Gama, R.M., B Luna Millán, O. 2006. Manual de Practicas de Microbiología General. 5 Edición. Facultad de Química, UNAM. México. Pp.182, 190-191
9. Centro para el Control de Enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention); Protocolo de Pulsed Field Gel Electrophoresis. Fecha de consulta: 12 de Marzo del 2013. Última visita: 22 de Diciembre del 2014. Disponible en: <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
10. Mac Faddin, Jean F. (2003) "Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica." Tercera edición. *México: Médica Panamericana.* Pp. 92-97
11. Koneman, Elmer, Stephen Allen. (1 999) *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color; Diagnostic microbiological: text and atlas color.* 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Pag. 177-201
12. Casrillo CB, Bruckner DA: Comparative evaluation of the Eiken and API 20E systems and conventional methods for identification of members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 1984; 20:754-757.

13. Bale MJ, McLaws SM, Fenn JO et al: Use of and cost saving with morphologic criteria and the spot indole test as a routine means of identification of *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1984; 2: 187-191.
14. Palomero, G. (1998) Lecciones de Embriología. 1ª. Edición. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo. España. pag. 12.
15. Marín, A. (2008) Manual de pediatría ambulatoria. 21ª edición, Editorial Medica Panamericana. Colombia.. Pag. 450
16. Brinkley C, Burland V, Keller R, Rose DJ, Boutin AT, Klink SA, et al. Nucleotide sequence analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid pMAR7. *Infect Immun* 2006; 74: 5408-13.
17. Elliott S J, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 1998; 28:1-4
18. Varela, Gustavo, et al. "Escherichia coli enteropatógeno clásico (EPEC) asociado a casos de diarrea en niños usuarios del Hospital Pereira Rossell. Aspectos clínicos y características de las cepas involucradas." *Revista Médica del Uruguay* 23.3 (2007): 153-163.
19. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 508-13.
20. Eslava C, Mateo J, Cravioto A. 1994 Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. En: diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JL. Secretaria de Salud. México, 251.
21. Rodríguez-Angeles, G. (2002) "[Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*]." *Salud pública de México* 44.5: 464.
22. Gutiérrez-Cázares Z, Qadri F, Albert MJ, Giron JA. (2000) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* harboring longus type IV pilus gene by DNA amplification. *J Clin Microbiol*;38:1767-1771.
23. Goldwater PN, Bettelheim KA. New perspectives on the role of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *E. coli* serotypes in human disease. *J Med Microbiol* 1998; 47(12): 1039-45.
24. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.

25. Schmidt H, Beutin L, Karch H. (1995) Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain 933. *Infect Immun*;63:1055-1063.
26. Preston MA, Johnsonson W, Khakhria, Borczyk A. (2000) Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*; 38:2366-2368.
27. Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
28. Osek, j. (2001) Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains, 2001- J. Vet Diagn Invest 13: 308-311
29. Rico-Martínez MG. (1995) Biología molecular en la patogenia de *Shigella* sp y *Escherichia coli* enteroinvasiva. *Rev Latinoam Microbiol* 1995;37:367-385.
30. Wood LV, Morris JG, Small PL, Sethabutr O, Toledo MR, Trabulsi L (1986). Comparison of DNA probes and the Sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 1986;24:498-500.
31. Snyder JD, Wells JG, Yashuk J, Puhr N, Blake PA. Outbreak of invasive *Escherichia coli* gastroenteritis on a cruise ship. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33:281-284.
32. Bilge SS, Clausen CR, Lau W, Moseley SL. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *J Bacteriol* 1989;171:4281-4289.
33. Vial PA, Robins R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP (1988). Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli* a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* 1988;158:70-79.
34. Czeczulin JR, Balepur S, Hicks S, Philips A, Hall R, Kothary MH (1997). Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1997;65:4135-4145
35. Henderson Ir, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1999;67:5587-5596
36. Schmidt H, Knop C, Franke S, Aleksic S, Heeseman J, Karch H. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1995;33:701-705.

37. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66, 365, 1989
38. Darsar BS, Barrow PA. *Intestinal microbiology*. Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1985.
39. Arbeit RD, Arthur M, DunnR, Kim C, Selander RK, Goldstein R. Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages: The application of pulsed field electrophoresis to molecular epidemiology. *J Infect Dis* 161:230-235.
40. Liu, S. L., & Sanderson, K. E. (1992). A physical map of the *Salmonella typhimurium* LT2 genome made by using XbaI analysis. *Journal of bacteriology*, 174(5), 1662-1672.
41. Muñoz, N., Realpe, M. E., Castañeda, E., & Agudelo, C. I. (2006). Characterization by pulsed-field gel electrophoresis of *Salmonella typhimurium* isolates recovered in the acute diarrheal disease surveillance program in Colombia, 1997-2004. *Biomedica*, 26(3), 397-407.
42. Toro, E. S., O Miró, A., Ugarte, C. I., & Larrea, F. J. (2010). Electroforesis de campo eléctrico pulsado en la tipificación molecular de cepas aisladas de un brote de Salmonelosis ocasionado por consumo de queso contaminado con *Salmonella Javiana*; Pulse Field Gel Electrophoresis in molecular typification of strains isolated from a Salmonellosis outbreak caused by consumption of *Salmonella Javiana* contaminated cheese. *Rev. Inst. Nac. Hig*, 41(2), 22-26.
43. Cravioto, Alejandro, (1988). "Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life." *Epidemiology and infection*. London, New York NY 101.1: 123-134.
44. Feachem, R., Burns, E., Cairncross, S., Cronin, A., Cross, P., Curtis, D., Khan, M. K., Lamb, D. & Southhall, H. (1978). *Water, Health and Development: An Interdisciplinary Evaluation*. London: Tri-Med Books.
45. Cravioto, Alejandro, (1990). "Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens." *American journal of epidemiology* 131.5 886-904.

46. Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207-217.
47. Bettelheim, K., & Lennox-King, S. (1976). The acquisition of *Escherichia coli* by new-born babies. *Infection*, 4(3), 174-179.
48. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2233.
49. Vílchez, G., & Alonso, G. (2011). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 6-12.
50. Muñoz, N., Realpe, M. E., Castañeda, E., & Agudelo, C. I. (2006). Characterization by pulsed-field gel electrophoresis of *Salmonella typhimurium* isolates recovered in the acute diarrheal disease surveillance program in Colombia, 1997-2004. *Biomedica*, 26(3), 397-407.
51. Doré, J., & Corthier, G. (2010). The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie clinique et biologique*, 34, S7-S15.
52. Chagoyan, O. T., Lozano, J. M., & Hernández, A. G. (2004). La microbiota intestinal en el niño y la influencia de la dieta sobre su composición. *ALIMENTACION NUTRICION Y SALUD*, 11(2), 37-48.
53. Nowrouzian, F., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegård, I. L., Åberg, N., Wold, A. E., & Adlerberth, I. (2003). *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatric research*, 54(1), 8-14.
54. Adlerberth, I., Jalil, F., Carlsson, B., Mellander, L., Hanson, L. Å., Larsson, P., Wold, A. E. (1998). High turnover rate of *Escherichia coli* strains in the intestinal flora of infants in Pakistan. *Epidemiology and infection*, 121(03), 587-598.
55. Dobrindt, Ulrich, et al. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *Journal of bacteriology*, 2003, vol. 185, no 6, p. 1831-1840.
56. Lim, J. Y., La, H. J., Sheng, H., Forney, L. J., & Hovde, C. J. (2010). Influence of plasmid pO157 on *Escherichia coli* O157: H7 Sakai biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 76(3), 963-966.

57. Cardozo-Bernal, Á. M., Ramón, L. F., Poutou-Piñales, R. A., Carrascal-Camacho, A. K., & Zambrano, D. C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 203-222.
58. Foley S.L., Lynne A.M. & Nayak R. 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations for Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infectology Genetic Evolution* 9(4):430-440.
59. Kmiliauskis, M. A., Palmeira, P., Arslanian, C., Pontes, G. N., Costa-Carvalho, B. T., Jacob, C. M., & Carneiro-Sampaio, M. M. S. (2005). Salivary lysozyme levels in patients with primary immunodeficiencies. *Allergologia et immunopathologia*, 33(2), 65-68.
60. Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens & Disease*, 3(1), 59-67.

Apéndice 1: preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo para el aislamiento y conservación de las cepas de *Escherichia coli* se realizaron de acuerdo a lo descrito por el proveedor de cada medio de cultivo deshidratado.

★ Agar sangre:

Composición:

Infusión de Músculo de Corazón 2.0g

Extracto de Levadura 5.0g

Cloruro de Sodio 5.0g

Agar Bacteriológico 15.0g

Digerido Pancreático de Caseína 13.0g

pH 7.3 ± 0.2

Proveedor: BD Bioxon®.

- a. Suspender 40 g de polvo en un litro de agua destilada; calentar hasta que hierva para poder disolver la agarosa.
- b. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.
- c. Para la preparación de placas con sangre, enfriar la base a 45-50°C y adicionar 5% de sangre estéril desfibrinada.
- d. Vaciar en cajas petri estériles y dejar solidificar. Conservar a 4° C.

★ Agar MacConkey

Composición:

Digerido Pancreático de Gelatina 17.0g

Digerido Pancreático de Caseína 1.5g

Digerido Péptico de Tejido Animal 1.5g

Sales Biliares 1.5g

Cloruro de Sodio 5.0g

Cristal Violeta 0.001g

Lactosa 10.0g

Agar Bacteriológico 13.5g

Rojo Neutro 0.03g

pH 7.1 ± 0.2

Proveedor: BD Bioxon®.

- a. Suspender 50 g de polvo en un litro de agua destilada; calentar hasta que hierva para poder disolver la agarosa.
- b. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.
- c. Vaciar en cajas petri estériles y dejar solidificar. Conservar a 4° C.

★ **Agar Gelosa Especial**

Composición:

Base Agar Sangre 20g

Agar bacteriológico 15g

Extracto de carne 1.5

pH 7.2

- a. Suspender en un litro de agua destilada; y ajustar el pH del medio.
- b. Calentar hasta que hierva para poder disolver la agarosa.
- c. Vaciar 4mL para vial o tubo.
- d. Esterilizar en autoclave por 20 min/121° C o 15 lb.
- e. Inclinar el vial o tubo y dejar que solidifique el agar, guardar en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

★ **Caldo Luria:** Luria Broth Base

Proveedor: BD Difco®.

- a. Suspender 25g en 1 litro de agua destilada.
- b. Vaciar 4mL para vial o tubo.
- c. Esterilizar en autoclave por 20 min/121° C o 15 lb.

- d. Inclinar el vial o tubo y dejar que solidifique el agar, guardar en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

Medios de cultivo para las pruebas bioquímicas, así como reactivos utilizados para su lectura.

★ **Agar Hierro de Kligler**

Composición:

Extracto de carne 3.0 g/L
Extracto de levadura 3.0 g/L
Peptona de caseína 15.0 g/L
Peptona de carne 5.0 g/L
Lactosa 10.0 g/L
D (+) Glucosa 1.0 g/L
Citrato de Amonio y Hierro III 0.5 g/L
Cloruro de Sodio 5.0 g/L
Tiosulfato de Sodio 0.5 g/L
Rojo de Fenol 0.024 g/L
Agar 12.0 g/L
pH 7.4 ± 0.1

Proveedor: DIBICO®.

- a. Suspender 55g en un litro de agua destilada; calentar hasta que hierva para poder disolver la agarosa.
- b. Vaciar 4mL para cada tubo de 13x 100.
- c. Esterilizar en autoclave por 20 min/121° C o 15 lb.
- d. Inclinar los tubos y dejar que solidifique el agar, guardar en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

★ **Agar SIM**

Composición:

Peptona de caseína 20g/L

Peptona de carne 6.6g/L

Citrato de Amonio y Hierro III 0.2 g/L

Tiosulfato de sodio 0.2 g/L

Agar 3.0 g/L

pH 7.3 ± 0.1

Proveedor: BD Bioxon®.

- a. Suspender 30g en un litro de agua destilada; calentar hasta que hierva para poder disolver la agarosa.
- b. Vaciar 3mL para cada tubo de 13x 100.
- c. Esterilizar en autoclave por 20 min/121° C o 15 lb.
- d. Dejar que solidifique el agar, guardar en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

★ **Agar Citrato de Simmons**

Composición:

Fosfato Dihidrogenado de Amonio 1.0 g/L

Fosfato Dipotásico 1.0 g/L

Cloruro de Sodio 5.0 g/L

Citrato de Sodio 2.0 g/L

Sulfato de Magnesio 0.20 g/L

Agar 15.0 g/L

Azul de Bromotimol 0.08 g/L

pH 6.9 ± 0.1

Proveedor: BD Difco®.

- a. Suspender 55g en un litro de agua destilada; calentar hasta que hierva para poder disolver la agarosa.
- b. Vaciar 4mL para cada tubo de 13x 100.
- c. Esterilizar en autoclave por 20 min/121° C o 15 lb.
- d. Inclinar los tubos y dejar que solidifique el agar, guardar en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

★ **Prueba RM-VP**

Composición:

Polipeptona o peptona tamponada 7.0 g/L

Dextrosa (Glucosa) 5.0 g/L

Buffer fosfato dipotásico 5.0 g/L

pH 6.9 ± 0.1

Proveedor: BD Bioxon®.

- a. Suspender en un litro de agua destilada y ajustar el pH del medio.
- b. Vaciar 4mL para cada tubo.
- c. Esterilizar en autoclave por 20 min/121° C o 15 lb.
- d. Dejar en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

★ **Prueba de Gluconato**

Composición:

Peptona 1.5 g/L

Extracto de levadura 1.0 g/L

Fosfato de potasio 1.0 g/L

Gluconato de potasio 40.0 g/L

pH 7.0 ± 0.1

- e. Suspender en un litro de agua destilada y ajustar el pH del medio.
- f. Vaciar 2mL para cada tubo.

- g. Esterilizar en autoclave por 20 min/121° C o 15 lb.
- h. Dejar en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

★ **Prueba de Malonato- Fenilalanina**

Caldo para Malonato con Fenilalanina, que es el medio de Shaw y Clarke.

Composición:

Malonato de sodio 3.0 g/L

DL-fenilalanina 2.0 g/L

Cloruro de sodio 2.0 g/L

Sulfato de Amonio 2.0 g/L

Extracto de levadura 1.0 g/L

Fosfato dipotásico 0.6 g/L

Fosfato monopotásico 0.4 g/L

Glucosa (dextrosa) 0.25 g/L

Azul de bromotimol 0.025 g/L

pH 6,7 ± 0.2

Proveedor: BD Difco®.

- a. Suspender en un litro de agua destilada y ajustar el pH del medio.
- b. Vaciar 3mL para cada tubo.
- c. Esterilizar en autoclave por 20 min/121° C o 15 lb.
- d. Dejar en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

Apéndice 2: preparación de soluciones para PFGE.

Las soluciones fueron preparadas por lo descrito en la CDC, para la técnica de PFGE (*Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* no-O157 (STEC), *Salmonella* spp., *Shigella sonnei* y *Shigella flexneri*; así como *Clostridium botulinum*).

★ Tris HCl pH 7.5 y pH 8

Composición:

Tris Base 121.1g

Agua 800mL

- d. Solubilizar en agua destilada.
- e. Ajustar el pH deseado con HCl.
- f. Llevar al aforo a 1000 mL.
- g. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.

★ EDTA 0.5M pH 8

Composición:

EDTA 186.1g

Agua 800mL

- a. Solubilizar en agua destilada.
- b. Ajustar el pH deseado con NaOH.
- c. Llevar al aforo a 1000 mL.
- d. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.

★ Buffer PIV

Composición:

NaCl 29.22 g

Tris HCl pH 8 5mL

- a. Solubilizar en agua destilada.
- b. Llevar al aforo a 500 mL.
- c. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.

★ Agarosa para bloques

Composición:

Agarosa SeaPlaque GTG 0.075g

Buffer PIV 5mL

- a. Solubilizar la agarosa calentando directamente en mechero.

★ EC

Composición:

Tris HCl pH 8 5mL

NaCl 29.2g

EDTA 0.5M pH 8 100mL

Desoxicolato de Sodio 1g

Laurilsarcosilato de Sodio 2.5g

- a. Solubilizar en agua destilada.
- b. Llevar al aforo a 500 mL.
- c. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.

★ EC lisis

Composición:

EC 2mL/cepa

RNasa (10mg/mL) 10μL/cepa

Lisozima (10mg/mL) 20μL/cepa

★ ES

Composición:

EDTA 93.1 g

Agua bidestilada 400mL

- a. Solubilizar en agua destilada.
- b. Ajustar el pH de 9 con NaOH.
- c. Agregar 0.5g de Sarcosil.
- d. Llevar al aforo a 500 mL.
- e. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.

★ ESP

Composición:

ES 2mL/cepa

Proteinasa k 50µL/cepa

★ TE

Composición:

Tris HCl pb 7.5 10mL

EDTA 0.5M pH 8 2mL

- a. Llevar al aforo a 1000 mL.
- b. Esterilizar en autoclave por 15 min/121° C o 15 lb.

★ TBE 10x

Composición:

Tris Base 108g

Ac. Borico 55g

EDTA 0.5M pH 8 10mL

- a. Llevar al aforo a 1000 mL.

★ Lisozima 10mg/mL

Composición:

Lisozima 100 mg

Agua de PCR 10 mL

- a. Solubilizar en el agua de PCR.
- b. Alícuotar en micro tubos y guardar en el congelador (-20°C).

★ RNasa 10mg/mL

Composición:

RNasa 30mg

Agua para PCR 3mL

- a. Solubilizar en el agua de PCR.
- b. Hervir a 100°C por 15min.
- c. Alícuotar en micro tubos y guardar en el congelador (-20°C).

Apéndice 3: Técnica de PFGE por el CHEF Mapper de Bio Rad.

La técnica se basa en lo descrito por la CDC:

Formación de bloques de agarosa.

- a. Colocar en celdas de plástico 1 mL de buffer PIV y 5 μ L de cada cultivo bacteriano del paso 4. Utilizar una celda por cultivo y agitar la celda.
 - b. Posteriormente en una placa para ELISA, colocar en cada pozo 200 μ L de la preparación de la celda de plástico; dejando el primer pozo con solo el buffer de PIV como blanco.
 - c. Meter la placa en el espectrofotómetro para la lectura óptica, con ayuda del programa Magellan 4.
2. Una vez obtenida la lectura se hace un ajuste para que la densidad óptica final sea de 5 (5 O. D.); por medio de la siguiente fórmula:
- $$\text{Volumen de buffer PIV} = \text{Lectura a D.O.} \times 40 \times 210 - 210 = \mu\text{L de buffer añadidos}$$
3. Añadir los μ L calculados a cada micro tubo del paso 4, para tener el ajuste final de 5 O.D.
 4. Pasar a un nuevo micro tubo 300 μ L de la suspensión bacteriana del paso 7, la cual es de 5 O.D. para la formación de los bloques de agarosa.
 5. Colocar cinta transparente por abajo a los moldes de bloques de PFGE y etiquetarlos para cada cepa bacteriana. Posteriormente colocarlos sobre un vidrio e irradiarlos con luz UV por 5 minutos.
 6. Agregar al nuevo micro tubo con 300 μ L de la suspensión 5 O.D. 300 μ L de la agarosa SeaPlaque GTG 1% y mezclar con la micropipeta.
 7. Verter inmediatamente esta mezcla en los pozos de bloques con ayuda de la micropipeta, evitando la formación de burbujas a la hora del vaciado. Preparar 5 bloques por cada mezcla de suspensión bacteriana.
 8. Una vez que todas las cepas se han colocado en los moldes meter el vidrio con los moldes en refrigeración (4°C) por 5 min.

Lisis celular de bloques de agarosa.

1. Verter los 5 bloques de agarosa en un tubo Falcon de 15 mL; previamente etiquetados con el número de cultivo. Para sacar los bloques se retira la cinta colocada en la parte de debajo de los molde y con ayuda de una espátula se empujan por arriba del molde para poder sacarlos íntegramente.
2. Agregar a los tubos Falcon 2 mL de buffer EC de Lisis a cada uno y colocarlos en una gradilla. Una vez en la gradilla prender el Baño María a 37°C y colocarlos a incubar por 3 horas.

Una vez utilizados las celdas, la placa de ELISA, los moldes de bloques de agarosa y la espátula se colocan en una solución de Cloro al 10% por más de una hora para su desinfección y posterior lavado.

Lavados de bloques de agarosa:

1. Preparar buffer TE para la realización de 9 lavados de cada cepa.
2. Retirar del baño de agua los tubos, y verter la segunda solución de desproteización con ayuda de una gasa.
3. Verter en el tubo Falcon el buffer TE (aproximadamente 12mL de este o que el tubo tenga $\frac{3}{4}$ del tubo en el buffer); y colocarlos en el balancín a una velocidad de 5 por una hora.
4. Transcurrida la hora de lavado, vaciar el buffer TE con ayuda de una gasa y repetir el paso 3; por 8 ocasiones más.

Nota: Si los 9 lavados no se pueden realizar el mismo día, vaciar el buffer TE del último lavado y añadir TE nuevo a cada tubo, posteriormente refrigerarlos a 4° C. Cuando se continúen los lavados, poner al balancín 30min los tubos Falcon, y ya que se transcurrió el tiempo vaciar el buffer TE, y añadir a cada tubo TE nuevamente para continuar con el siguiente lavado.

5. Decantar el ultimo lavado y dejarlos en buffer TE, después almacenarlos en refrigeración (4°C), hasta que se coloque la restricción del DNA.

Restricción del DNA bacteriano en los bloques de agarosa con la enzima de restricción XbaI

- a. Diluir el buffer para enzima de restricción H 10X (Roche Molecular Biochemicals) de acuerdo con la siguiente tabla.

Tabla 7. Proporción de buffer H en función del número de bloques a utilizar.

Reactivo:	µL/ trozo de bloque	µL/ 15 bloques
Buffer H	10	150
Agua para PCR	90	1350
Volumen final:	100	1500

- a. Diluir el buffer para enzima de restricción H 10X (Roche Molecular Biochemicals) como en el paso 3 inciso a.
- b. Añadir al buffer H la enzima de restricción XbaI de la siguiente manera:

Tabla 8. Proporción de Buffer H y enzima de restricción en función a bloques a utilizar.

Reactivo:	µL/ trozo de bloque	µL/ 15 bloques
Buffer H	10	150
Agua para PCR	87	1305
Enzima XbaI (10U/µL)	3	45
Volumen final:	100	1500

Nota: Mantener el vial con la enzima de restricción en hielo todo el tiempo, y almacenarla a -20° C.

Elaboración del gel de agarosa.

1. Desinfectar el material para la formación de geles de PFGE con etanol al 70%.
2. Preparar 2500mL de buffer Tris-Borato/EDTA (TBE) al 0.5x a partir de uno de concentración 5x, este será necesario para colocarlo en la cámara para electroforesis celular de PFGE y en la elaboración del gel.

Tabla 9. Proporción de reactivos para la elaboración del TBE 0.5x.

Reactivo	Volumen en mL
TBE 5x	250
Agua estéril y des ionizada.	2250
Volumen total.	2500

Apéndice 4: Análisis de la técnica de PFGE

La estandarización de la técnica de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE) para cepas comensales de *Escherichia coli*; aisladas del intestino de un neonato; es un protocolo que nos permite aplicar los conocimientos en biología molecular, así como en el área de microbiología para poder realizar un gran perfil de bandas pertenecientes a bandas del genoma bacteriano realizado por medio de la enzima *XbaI* que realiza los cortes en el cromosoma de las *Escherichia coli*. En esta técnica se propone la modificación de la metodología descrita por la red de PulseNet® para tener una mejor resolución en la técnica; se modificó principalmente el método por el cual se lleva a cabo la lisis bacteriana para poder evitar la interferencia del SDS en la restricción del bloque de agarosa. Este fue un problema que se presentó durante los primeros ensayos experimentales.

Las modificaciones a la técnica de PulseNet® fueron en la preparación de los bloques de agarosa, durante la lisis bacteriana, los lavados de dichos bloques, así como en la cantidad de bloque de agarosa en relación con la cantidad de enzima de restricción *XbaI* y la temperatura de corrida del buffer TBE en el CHE MAPPER®.

Durante la preparación de los bloques de agarosa se modificó la técnica para los primeros lavados del pellet bacteriano; se cambió el buffer CBS por el buffer PIV; el cual se modifica el EDTA del primero por el cloruro de sodio en el segundo. Esto nos ayuda para facilitar el rompimiento de la pared celular a la inestabilidad ciertas proteínas dependientes de algún metal. Así mismo, la concentración bacteriana en los bloques de agarosa es de 5 O.D.; mientras que en la metodología de PulseNet® se hace un reajuste de 1.45 O.D. y durante la formación de estos no se agregó la proteinasa K que nos servía para degradar las histonas; que son aquellas proteínas que envuelven el DNA.

Para facilitar la lisis bacteriana se utilizó una mezcla de reactivos de buffer tris HCl base, EDTA, cloruro de sodio; laurilsarcosinato de sodio, desoxicolato de sodio con lisozima y ribonucleasa (RNAsa) en lugar del buffer que contenía solo sarcosil (SDS), tris HCl base, EDTA y proteinasa K. Esto nos ayudó a favorecer el rompimiento de la pared celular para la liberación del DNA; pues las sales de sodio ayudan a atacar la membrana citoplasmática así como a la pared celular de la bacteria para poder formar poros en estas y que el material intracelular pueda salir. Además el uso de la lisozima es una enzima que nos ayuda en la desnaturalización de la pared celular al hidrolizar los enlaces del peptidoglucano (N-acetil glucosamina y N-acetilmurámico); junto con la enzima RNAsa ayuda a proteger el DNA durante la extracción de este.⁵⁹

Una vez realizada la lisis, en esta nueva metodología se agregaron dos desproteinizaciones de los bloques de agarosa con buffer con solución amortiguadora, así como con proteinasa K y una menor cantidad de sarcosil para ayudar a remover las proteínas.

Otra ventaja que se vio durante este tipo de lisis fue en la acción del SDS como detergente; a pesar de ser usado como detergente iónico para la desnaturalización de proteínas y purificación de ácidos nucleicos nos afectaba a la hora de utilizar la enzima de restricción, pues al ser un detergente este inhibía la enzima y no dejaba efectuar los cortes de restricción poco frecuentes; por lo cual no existían cortes y solo se veía la corrida del DNA. Esto se vio al modificar los lavados de los bloques de agarosa.

Los lavados de agarosa fueron modificados, pues se modificaron a nueve lavados con buffer TE que ayudaban a eliminar los restos de material no genético; como son las proteínas de membrana así como los restos de peptidoglucano generados en la lisis bacteriana. No se calentó el buffer de TE pues durante la lisis no se utilizó el SDS; motivo por el cual se calentaba el buffer, para poder disolver el detergente y eliminarlo de la solución con bloques de agarosa.

La cantidad de bloque de agarosa sometida a restricción fue de 1/3 de bloque; pues se tenía una mayor cantidad de células a comparación con la metodología de PulseNet®; razón por la cual se utilizó una menor cantidad de bloque de agarosa pero una triple concentración de unidades de la enzima de restricción *XbaI* (30 Unidades). La utilización del buffer TE en frío; así como el almacenamiento final de los bloques de agarosa ayudando en la inactivación de restos de enzimas que pudieran quedar presentes en la solución.

La modificación de la temperatura del buffer TBE durante la corrida fue de 2°C más bajo; es decir en la metodología de PulseNet® se dice que la corrida debe de ser de 14°C; la disminución de esta temperatura fue para compensar el incremento en el calor generado durante el corrimiento y la duración del pulso; disipando así el calor generado por dicho pulso evitando también la saturación o el traslape de bandas en el gel y la pérdida de bandas de bajo peso molecular.⁶⁰

De manera general la PFGE es una técnica que permite la separación de fragmentos de DNA de alto peso molecular (10 Kb a 10 Mb) y tiene varias utilidades en el rastreo e investigación de los brotes de origen alimentario, también como la detección temprana de estos por el aumento de la incidencia de alguno de los subtipos usualmente implicados en brotes.⁵⁷

El patrón de restricción estándar de PulseNet® por la enzima *XbaI* es la *Salmonella entérica* serovar Branderup H2812 con un excelente rango de

referencia de 20.5 kb a 1,135 kb usado en los protocolos de PulseNet®. Además los fragmentos de macrorestricción derivados de las bacterias tienen la ventaja añadida de la asimetría generada por los patrones que facilitan la orientación específica del tamaño del gel.⁶⁰