



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**DETERMINACIÓN DE GRUPO FILOGENÉTICO EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*
COMENSALES AISLADAS DE NIÑOS DURANTE SUS DOS PRIMEROS MESES DE
VIDA**

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

PRESENTA

Jessica Patricia Briseño Monges

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María del Rosario Morales Espinosa



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Raúl Garza Velasco
VOCAL: Patricia Arzate Barbosa
SECRETARIO: María del Rosario Morales Espinosa
1er. SUPLENTE: Tanya Plett Torres
2° SUPLENTE: Norma Angélica Castellanos Chávez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM. NUEVA TORRE DE INVESTIGACIÓN, LABORATORIO DE GENÓMICA BACTERIANA

ASESOR DEL TEMA:

Dra. María del Rosario Morales Espinosa

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Gabriela Delgado Sapién

SUSTENTANTE (S):

Jessica Patricia Briseño Monges

Tabla de contenido

Resumen	iv
Introducción.....	1
Microbiota humana.....	1
<i>Escherichia coli</i>	2
Clasificación de acuerdo a los criterios de Clermont.....	7
Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)	10
Antecedentes del presente estudio	12
Determinación de genes de virulencia	12
Objetivos	15
Objetivo General	15
Objetivos Particulares	15
Hipótesis.....	16
Procedimiento experimental.....	17
Resultados	25
Niño sin diarreas	25
Niño con diarreas.....	29
Discusión.....	33
Conclusiones.....	43
Bibliografía	45
Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones.....	53
Anexo 2: Técnicas empleadas	56

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Filogenia de una selección de secuencias completas de <i>E. coli</i> basadas en un alineamiento de genoma completo.....	9
Tabla 1. Genes de virulencia empleados en la membrana y sus respectivas funciones	13
Figura 2. Metodología empleada	17
Tabla 2. Resultado de pruebas bioquímicas para identificar <i>E. coli</i>	18
Tabla 3. Genes, secuencia de los iniciadores y peso de los productos obtenidos mediante PCR usando el método de Clermont.	20
Tabla 4. Posibles resultados a obtener a partir de la amplificación de genes por el método de Clermont.....	21
Figura 3. Dibujos esquemáticos de la instrumentación usada en PFGE	23
Figura 4. Dendograma obtenido a partir de las cepas aisladas del niño sin episodios diarreicos.....	25
Tabla 5. Resultados generales de la determinación de grupo filogenético en el niño sin diarreas	28
Figura 5. Dendograma obtenido a partir de las cepas aisladas del niño con episodios diarreicos.....	29
Tabla 6. Resultados generales de la determinación de grupo filogenético en el niño con episodios diarreicos	32
Figura 6. Dendograma obtenido a partir de las cepas del niño sin episodios diarreicos con los resultados de presencia y ausencia de genes de virulencia.....	35
Figura 7. Dendograma obtenido a partir de las cepas del niño con episodios diarreicos con los resultados de presencia y ausencia de genes de virulencia.....	36
Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción para la amplificación de los genes del cuádruplex.	57
Tabla 8. Preparación de la mezcla de reacción para la determinación de grupo A o C.....	57
Tabla 9. Preparación de la mezcla de reacción para la determinación de grupo D o E	58
Tabla 10. Programa de amplificación por PCR de los genes.....	58
Tabla 11. Programa de electroforesis empleado	63

Resumen

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, móvil y no esporulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Este microorganismo es considerado un residente del tracto gastrointestinal y típicamente coloniza al hospedero desde las primeras horas de vida. Usualmente, *E. coli* y su hospedero coexisten en forma mutuamente benéfica, sin embargo, existen cepas de *E. coli* que adquieren, por un mecanismo de transferencia horizontal de genes, material genético externo que codifica factores de virulencia que pueden producir daño a la célula hospedera, lo que se traduce en una amplia variedad de enfermedades al humano. Con base en su contenido genético, a las cepas de *E. coli* se les divide en dos grandes grupos: las cepas comensales y las cepas virulentas.

El objetivo de este estudio fue determinar el grupo filogenético y la relación clonal de un grupo de cepas de *E. coli* aisladas del intestino de dos niños durante sus primeros meses de vida. Los dos niños son parte de una población de 72 niños estudiados en un pueblo de Morelos en 1982; uno de ellos presentó 5 episodios de diarrea durante un periodo de 6 meses, mientras que el otro no presentó episodio de diarrea alguno en el mismo periodo. Parte del estudio se llevó a cabo recolectando muestras de heces de cada niño a partir del primer día de nacido y cada quince días hasta los dos años de edad, obteniendo otra muestra en caso de que el niño presentara diarrea; cada una de ellas fue procesada para identificar parásitos, bacterias y virus. De cada muestra de heces se aisló un número variable de colonias con base en las diferencias morfológicas que presentaban; las colonias fueron identificadas como *E. coli* u otro tipo de enterobacteria. Estas cepas pertenecen a la gran colección con la que cuenta el cepario de la Facultad de Medicina, ubicado en el tercer piso del Edificio de Investigación.

El criterio utilizado para caracterizar el grupo filogenético de las bacterias fue el propuesto por Olivier Clermont y su grupo de investigadores; es un método que, mediante una sencilla reacción de PCR y con juegos de iniciadores específicos, amplifica un grupo de genes que permiten la determinación del grupo filogenético de *E. coli*. En 2013 se publicó una actualización del método, que mejoraba la

especificidad y detección de nuevos filogrupos. Esta metodología permite incluir las cepas de *E. coli* en uno de los siete filogrupos (A, B1, B2, C, D, E o F) realizando una reacción de PCR cuádruplex y observando el patrón de bandas que produce en una electroforesis. La finalidad es observar si las cepas de *E. coli* mantienen una relación de acuerdo a su grupo filogenético, ya que se propone que las cepas de *E. coli* no están distribuidas aleatoriamente.

Otro método utilizado para la caracterización de las cepas es la electroforesis de campos pulsados (PFGE). A diferencia de la electroforesis horizontal en agarosa, que es comúnmente usada para visualizar fragmentos de DNA de bajo peso molecular obtenidos mediante PCR o para separar fragmentos de DNA de diferente tamaño y determinar perfiles de restricción o de amplificación, la electroforesis de campos pulsados es un método de tipificación en el cual el genoma bacteriano es digerido utilizando enzimas de restricción de corte poco frecuente, lo que produce un número limitado de fragmentos de DNA que varían entre 20 kb y 10,000 kb y que, al ser separados utilizando técnicas especializadas de electroforesis, permiten realizar una comparativa entre los perfiles genéticos de las cepas en estudio. Este método permite obtener el perfil cromosómico de las bacterias y observar la forma en la que se relacionan genéticamente, para determinar si existe o no clonalidad entre ellas.

Introducción

Microbiota humana

La microbiota humana se describe como el conjunto de microorganismos que colonizan habitualmente las mucosas y la piel del cuerpo humano; es una comunidad de poblaciones que conviven en un determinado nicho, aportando beneficios a nivel metabólico, nutricional e inmunológico en el hospedero y que, por lo tanto, está relacionada con el estado de salud y enfermedad (Berrington, Stewart, Cummings, & Embleton, 2014; Gritz & Bhandari, 2015).

El establecimiento de la microbiota comienza con la exposición de los infantes a la microbiota materna y este proceso, a diferencia de lo que se creía anteriormente, comienza desde el útero, pues se ha encontrado la presencia de microorganismos tanto en la placenta como en el meconio, lo que sugiere que el proceso de colonización del infante comienza desde antes de su nacimiento (Aagaard et al., 2014). En un hospedero sano, el microbioma evoluciona en respuesta a factores internos, como el sistema inmune, y a externos, como la dieta o el uso de medicamentos (Gritz & Bhandari, 2015). Uno de los puntos más importantes de estudio es la microbiota intestinal, puesto que muchos de estos microorganismos ayudan en el metabolismo de nutrientes, como algunos carbohidratos, la síntesis de algunas vitaminas y cofactores, y el desarrollo del sistema inmune, entre otras cosas. El tracto gastrointestinal se encuentra abundantemente poblado de microorganismos (se calculan aproximadamente 10^{12} células bacterianas por gramo de contenido en el intestino (Guarner & Malagelada, 2003)) y la mayoría de estos son anaerobios; aunque se conocen más de 1000 especies capaces de colonizar el intestino, la microbiota encontrada en cada individuo sólo contiene alrededor del 15% de éstas, lo que provoca que exista una gran variabilidad entre la microbiota intestinal de los individuos (Gritz & Bhandari, 2015). Las bacterias que es posible encontrar en el tracto gastrointestinal se dividen en 6 clases: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia; en la clase de Proteobacteria se ubican las

Gammaproteobacterias y, dentro de éstas, se localiza al género *Escherichia* (Candela, Biagi, Maccaferri, Turroni, & Brigidi, 2012; Gritz & Bhandari, 2015).

Escherichia coli

Escherichia coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos miembros se caracterizan por ser bacilos Gram negativos que no forman esporas; tiene movilidad, fermenta la D-glucosa y otros azúcares y es capaz de crecer en condiciones tanto aerobias como anaerobias. El género *Escherichia* está conformado por seis especies: *E. albertii*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* y *E. vulneris*; si bien *E. coli* es la especie que usualmente es aislada de muestras humanas, lo cual la convierte en un marcador biológico de contaminación fecal (Brooks, Carrol, Butel, Morse, & Mietzner, 2008; Gillespie & Hawkey, 2006; Tenailon, Skurnik, Picard, & Denamur, 2010).

E. coli es una de las primeras especies bacterianas en colonizar el intestino humano, siendo posible observar su aparición en las heces de los neonatos apenas unos días después del nacimiento; esta colonización puede deberse a una contaminación con las cepas de la flora fecal materna o la propagación por medio del personal de enfermería que atiende el área de maternidad. Debido al implemento de mejores medidas de higiene en los hospitales y por parte de la familia al entrar en contacto con los neonatos, actualmente es menos común que la contaminación por *E. coli* produzca infecciones en los recién nacidos, pero aún es fácilmente encontrada en sus heces (Nowrouzian et al., 2003).

E. coli se caracteriza utilizando métodos serológicos por la identificación de tres tipos de antígenos de superficie (O:K:H, o somático: capsular: flagelar); se conocen al menos 164 antígenos del grupo O, 100 del grupo K y 55 del grupo H, lo que se traduce en un número casi infinito de combinaciones posibles; sin embargo se ha encontrado que son un porcentaje relativamente bajo de serotipos O:H de *E. coli* los causantes de enfermedades humanas (Brooks et al., 2008).

Cuando recién fue descubierto este microorganismo, se le designó *Bacterium coli commune*, es decir, “bacteria común del colon”, nombre que resulta bastante acertado, ya que es el no anaerobio más predominante en el tracto gastrointestinal humano y el de muchos otros animales. *E. coli* es considerado un organismo comensal; lo que significa que establece una coexistencia armónica con su hospedero, formando una relación simbiótica en la que *E. coli* es capaz de sintetizar compuestos útiles para su hospedero y lo protege de la colonización por otros microorganismos que pudieran resultarle dañinos. En el tracto gastrointestinal, a *E. coli* se le encuentra localizado en el intestino grueso; reside en la capa mucosa que cubre a las células epiteliales y cuando ésta se degrada, la bacteria es eliminada en conjunto con ella en las heces (Leimbach, Hacker, & Dobrindt, 2013; Tenaillon et al., 2010).

E. coli es una especie excepcionalmente versátil: además de estar adecuadamente equipada para vivir en el siempre cambiante ambiente del tracto gastrointestinal, es capaz de sobrevivir en muchos diferentes hábitats, entre los cuales se incluye el suelo, el agua, el sedimento y la comida (Leimbach et al., 2013). Sus capacidades metabólicas y regulatorias facilitan la colonización de diferentes nichos ecológicos, así como la supervivencia durante largos periodos sin crecimiento. Es esta capacidad adaptativa lo que hace que la línea divisoria entre aquellas cepas de *E. coli* que se ubican como comensales y las patógenas no sea tan clara como se deseara (Escobar-Páramo et al., 2004; Leimbach et al., 2013).

Las cepas de *E. coli* capaces de producir enfermedades se clasifican en patotipos, cuya denominación obedece principalmente a la presencia de factores de virulencia asociados a enfermedad (Leimbach et al., 2013). Estos patotipos presentan dos grandes divisiones:

1. ExPEC: incluye a aquellas cepas de *E. coli* asociadas a infecciones en diferentes aparatos y sistemas fuera del tubo digestivo. Se destacan:
 - a. *E. coli* uropatógena (UPEC)
 - b. *E. coli* asociada a meningitis (NMEC)
 - c. *E. coli* patógeno aviar (APEC)

- d. *E. coli* asociada a septicemia (SEPEC)
2. *E. coli* causantes de diarrea. Éstas se clasifican en 6 patotipos según sus factores de virulencia y el mecanismo mediante el cual producen enfermedad:
- a. *E. coli* enteropatógena (EPEC). Contiene una isla de patogenicidad (PAI) llamada *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) la cual codifica la intimina, una proteína de membrana externa que media la adherencia de las cepas EPEC con las células epiteliales, así como un sistema de secreción tipo III y el receptor para la intimina. También cuenta con el plásmido EAF (Factor de Adherencia de EPEC). El resultado histopatológico de la lesión en el enterocito inicia con la unión de la bacteria a las microvellosidades, seguido por el borramiento de la microvellosidad y la formación de una estructura en forma de pedestal. Clínicamente, esto se traduce en una diarrea acuosa de tipo osmótico.
 - b. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), también conocida como *E. coli* productora de toxina Shiga. Se caracteriza por la producción de dos potentes citotoxinas denominadas Toxinas tipo Shiga 1 y 2 (Stx1 y Stx2 respectivamente); éstas cuentan con cinco subunidades B, responsables de la unión a la superficie celular, y una subunidad A, que corta al RNA ribosomal provocando el cese de la síntesis de proteínas. Estas cepas también suelen contener la isla LEE de patogenicidad. La diarrea producida por estas cepas presenta sangre y moco y una complicación importante de la *E. coli* O157:H7, serotipo clásico de este grupo de cepas, es el Síndrome Urémico Hemolítico.
 - c. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Tiene propiedades bioquímicas, fisiológicas y genéticas similares a las de *Shigella*, por lo que invade

a las células epiteliales del colon, donde prolifera y causa necrosis del tejido. Su patogénesis consiste en invadir las células M y ser fagocitada por los macrófagos, en los cuales induce la apoptosis y se libera para invadir el enterocito por la superficie basolateral. Los genes que permiten este movimiento están presentes en un gran plásmido de virulencia que comparte con *Shigella*. Esta infección produce una diarrea sanguinolenta y los pacientes presentan un cuadro agudo con manifestaciones abdominales severas.

- d. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Su colonización está mediada por CFs (factores de colonización fimbriales) y se caracterizan por la producción de una enterotoxina termolábil (LT) o alguna de las dos enterotoxinas termoestables (STa y STb) La acción de la LT resulta en una activación permanente de la adenilato ciclasa, lo que eventualmente activa los canales de cloro de las células y provoca la diarrea. La ST estimula la actividad de la guanilato ciclasa, lo que también resulta en un aumento en la secreción, dando como resultado una diarrea de tipo acuosa.
- e. *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Presenta un patrón de adherencia que se caracteriza por una autoaglutinación a la que se denomina Adherencia Agregativa. Estas cepas se adhieren a las células y mucosa intestinal mediante estructuras fimbriales llamadas Fimbrias de Adherencia Agregativa (AAFs). Una vez unidas a las células, las cepas secretan enterotoxinas y citotoxinas. El tipo de diarrea que producen es de tipo acuosa y persistente.
- f. *E. coli* adherente-difusa (DAEC). Se caracteriza por su capacidad para adherirse a las células HEp-2 en un patrón no localizado. Estas cepas se unen a las células mediante una familia de adhesinas llamadas Dr e inducen un efecto citopático que se caracteriza por el desarrollo de

extensiones celulares que envuelven a la bacteria. La unión mediante las adhesinas Dr también activa la señalización de cascadas de transducción dentro de la célula. Aunque existe controversia respecto a su etiología, parece estar mayormente asociada a diarrea acuosa aguda en niños (Croxen & Finlay, 2009; Donnenberg & Kaper, 1992; Kaper, Nataro, & Mobley, 2004; Nataro & Kaper, 1998).

En general, las características patogénicas de un microorganismo están codificadas por genes presentes en su genoma o en algún elemento móvil. El genoma de una especie puede ser clasificado en dos categorías: el genoma central o *core* y el genoma accesorio. El genoma central está compuesto por aquellos genes que están presentes en todas las cepas de una misma especie bacteriana y codifican para funciones de metabolismo básico, como la replicación, transcripción y traducción, mientras tanto el genoma accesorio se compone de genes presentes en diferentes elementos móviles (plásmidos, bacteriófagos, secuencias de inserción, transposones, etcétera) y pueden ser transferidos horizontalmente entre bacterias de la misma o diferente especie (Dobrindt, 2005; Leimbach et al., 2013; Tenaillon et al., 2010). Los análisis han mostrado que el genoma promedio de *E. coli* contiene aproximadamente 4700 genes, de los cuales alrededor de 2000 son los que conforman el genoma central, mientras el resto forman al genoma accesorio (Leimbach et al., 2013; Tenaillon et al., 2010). En 2010 el catálogo de genes a elegir para el genoma accesorio ascendía a más de 8,000 genes y este número continúa en aumento con cada cepa que se estudia (Tenaillon et al., 2010). En el contexto de la patogenicidad, estos genes son los que codifican para factores de virulencia y adaptación, que les aportan a las bacterias el potencial para colonizar a su hospedero y causarle enfermedades. Al final, la barrera que divide en comensalismo y virulencia a las cepas resulta de un complejo balance entre el estado general del hospedero y la presencia y expresión de factores de virulencia en la bacteria.

El dinamismo de la estructura genómica de *E. coli* se debe principalmente a la adquisición de genes mediante un fenómeno llamado Transferencia Horizontal, el

cual sucede cuando hay intercambio de material genético de una bacteria a otra. Los cromosomas bacterianos están altamente organizados, así que la inserción o delección de regiones de DNA puede romper este equilibrio, por lo que la mayoría de estas modificaciones ocurren en zonas particulares del cromosoma llamadas *Hotspots*; éstas son regiones altamente susceptibles a los eventos de recombinación, debido a inserciones o delecciones anteriores que forman las llamadas Islas Genómicas y, específicamente debido a los genes que contienen, las Islas de Patogenicidad. Éstas pueden almacenar en forma accesible para la bacteria una amplia variedad de genes para adaptación y supervivencia, permitiéndole transmitir después estos mismos genes de forma vertical a su descendencia (Dobrindt, 2005; Leimbach et al., 2013; Tenaillon et al., 2010).

Clasificación de acuerdo a los criterios de Clermont

En 1984, Ochman y Selander establecieron la colección de referencia de *Escherichia coli*, la cual se compone por 72 cepas aisladas a partir de hospederos humanos y otros mamíferos provenientes de una gran variedad de locaciones geográficas (principalmente Suecia y los Estados Unidos de América); dichas cepas fueron elegidas para representar el rango de variación genotípica en la especie. La colección fue clasificada mediante el uso de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE por sus siglas en inglés), en cuatro linajes filogenéticos: A, B1, B2 y D (Herzer, Inouye, Inouye, & Whittam, 1990). Estos resultados fueron confirmados mediante varias técnicas, como la secuenciación multilocus (MLST por sus siglas en inglés), lo que además permitió determinar, algunos años después, la existencia de tres grupos filogenéticos más: el C, E y F (Escobar-Páramo et al., 2004; Jauregui et al., 2008; Tenaillon et al., 2010). Esta clasificación es posible debido a que, si bien la naturaleza del genoma de *E. coli* es extremadamente dinámica, la estructura de su genoma central es estable y se encuentran pocos rearrreglos en él, lo que permite obtener una señal filogenética que se utiliza para agrupar a las cepas

(Leimbach et al., 2013; Tenailon et al., 2010). Por un largo tiempo, los investigadores han tratado de relacionar el grupo filogenético con la clasificación por patotipos de las cepas de *E. coli* y, aunque existe un consenso respecto a la clasificación de las cepas ExPEC en el grupo filogenético B2 y, en una menor medida, en el grupo D (Clermont, Christenson, Denamur, & Gordon, 2013; Jaureguy et al., 2008; Leimbach et al., 2013), no hay un acuerdo en relación a la clasificación de cepas comensales y patógenos intestinales: Jaureguy et al (2008) menciona que las cepas comensales y menos virulentas se encuentran en los grupos A y B1; en el artículo de Leimbach et al (2013) se señala que en el grupo A se encuentran las cepas comensales, en el grupo B1 se encuentra una mezcla de comensales y varios patotipos, en el grupo D se encuentran los patotipos UPEC y EAEC y, en el grupo E, se encuentran los patotipos EHEC y EPEC; por otro lado, en el artículo de Escobar-Páramo et al (2004) afirman que las cepas del patotipo EPEC suelen agruparse en los filogrupos B1 y B2, las EHEC se distribuyen en los grupos A y B1, (aunque las del serotipo O157:H7 pertenecen al grupo E), y las del patotipo ETEC se ubican en los grupos A, B1 y C, mientras las de los patotipos EAEC y DAEC se encuentran distribuidas en todos los grupos con excepción del E. Esta distribución de patotipos a lo largo de los grupos filogenéticos sugiere, en conjunto con otros estudios como el alineamiento de genoma completo de varias cepas de *E. coli*, que no existe una correlación entre el patotipo y el grupo filogenético, pues se ha encontrado que los patotipos han surgido en múltiples ocasiones como resultado de una evolución paralela y la transferencia horizontal de genes de virulencia, lo que hace que no compartan un linaje filogenético (Leimbach et al., 2013).

Figura 1. Filogenia de una selección de secuencias completas de *E. coli* basadas en un alineamiento de genoma completo.

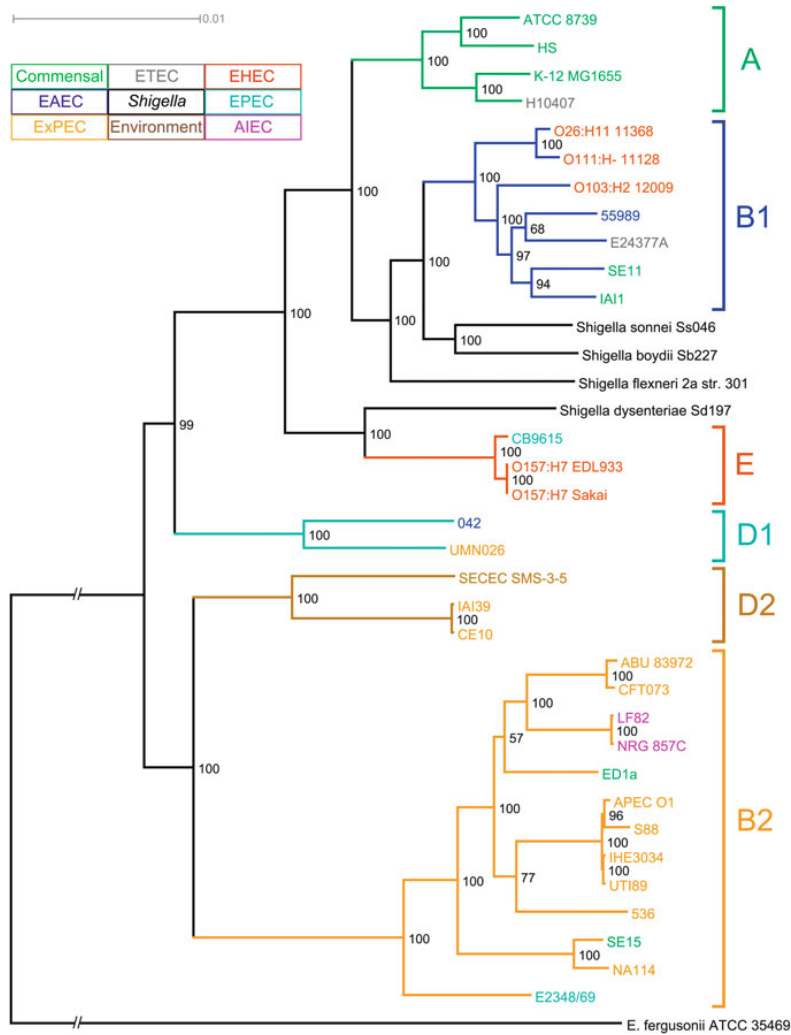


Imagen tomada de Leimbach et al., 2013.

En el año 2000, Olivier Clermont y su grupo de investigadores de la Universidad Denis-Diderot en Paris, propusieron un método rápido y sencillo para la determinación del grupo filogenético de *E. coli*. Éste consistía en la realización de una reacción de PCR triplex para amplificar dos genes (*chuA*, el gen que codifica el receptor para el grupo Hemo de la membrana externa, y *yjaA*, que codifica para una proteína aún no caracterizada), más un fragmento anónimo que ha sido identificado recientemente como parte del gen de una lipasa-esterasa putativa (TspE4.C2). De esta manera se producía un patrón de bandas en la electroforesis que permitía clasificar a las cepas de forma simple y rápida en cuatro grupos (A, B1, B2 o D), reportando un porcentaje de exactitud del 99% comparado contra el método de referencia (MLEE) (Clermont, Bonacorsi, & Bingen, 2000). Debido al aumento de la información disponible y al reconocimiento de nuevos grupos filogenéticos (C, E y F), en 2013 fue publicada una mejora al método: las secuencias de los iniciadores para la amplificación de *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2 fueron modificadas para evitar polimorfismos y excluir la amplificación de este último en cepas no pertenecientes a *E. coli*; también se agregó un cuarto gen, *arpA* (*Ankyrin repeat protein A*) como un control interno de la calidad del DNA y para diferenciar a las cepas pertenecientes al grupo F del grupo D (Clermont et al., 2013). La inclusión de este gen hace de la técnica una detección cuádruple. Finalmente, se diseñaron dos pares de iniciadores adicionales, específicos para ciertos alelos, que permitieran identificar adecuadamente a las cepas pertenecientes a los grupos C y E. La exactitud de este método está reportada como superior al 95% (Clermont et al., 2000, 2013; Gordon, Clermont, Tolley, & Denamur, 2008; Leimbach et al., 2013).

Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)

La caracterización bacteriana es un procedimiento obligado en la Microbiología Clínica, que requiere determinar la relación existente entre ciertos aislados de la misma especie; para esto existen varios métodos, como la serotipificación, la

ribotipificación y los métodos basados en PCR pero, dado que se requiere un método que pueda ser utilizado para tipificar una amplia gama de especies bacterianas, la técnica que más se acerca a satisfacer esta condición, y por lo cual es denominada el “estándar de oro”, es la Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE por sus siglas en inglés)(Tenover et al., 1995).

Este método emplea enzimas de restricción de corte poco frecuente para obtener un número bajo de fragmentos de DNA que puedan ser analizados; sin embargo, al ser fragmentos de DNA de un alto peso molecular (de 20 kb a 10,000 kb) (Magdeldin, 2012), la electroforesis convencional no permite que las bandas se separen adecuadamente; por tal motivo se emplea un método que reorienta periódicamente la posición del campo eléctrico en la cámara de electroforesis, lo que permite que las moléculas más pequeñas se separen adecuadamente de las de mayor tamaño.

La preparación de muestras para PFGE requiere que los organismos sean embebidos en agarosa, llevando a cabo la lisis *in situ* y realizando cortes en el DNA cromosómico, usando una enzima de restricción de corte poco frecuente, como *AclI*, *NotI*, *SpeI* o *XbaI*. Pequeñas porciones de agarosa con el DNA cromosómico son insertadas en los pozos de un gel de agarosa y los fragmentos de restricción son resueltos en un patrón de bandas en el gel. Los patrones de bandas son entonces comparados entre sí para determinar su relación (Goering, 2000; Tenover et al., 1995).

Antecedentes del presente estudio

En el año 1982, el grupo de investigación del Dr. Alejandro Cravioto llevó a cabo un estudio longitudinal durante dos años, donde caracterizaron la colonización intestinal de un grupo de 72 niños nacidos en el periodo de dos años (1981-1982), en una comunidad rural del estado de Morelos. El objetivo de su investigación fue determinar la presencia de patógenos en las heces de los niños durante periodos de salud y enfermedad; durante el estudio se recolectaron heces de cada niño cada dos semanas a partir de 24-48 horas de su nacimiento; en caso de que el niño tuviera un episodio de diarrea, se recolectaba una muestra en el momento del episodio diarreico. Este estudio buscó identificar la presencia de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, así como rotavirus, parásitos y protozoarios que pudieran encontrarse en el intestino de los infantes. Para llevar a cabo la identificación de las bacterias, las muestras fueron procesadas vía su cultivo bacteriológico, coproparasitoscópico y el uso de placa de ELISA para rotavirus.

Todas las cepas de *E. coli* y demás géneros y especies obtenidas en este estudio pertenecen a la gran colección de cepas del cepario de la Facultad de Medicina, UNAM. Para el desarrollo de la presente tesis se eligieron todas las cepas de *E. coli* aisladas durante los primeros meses de vida de dos niños. Uno de ellos presentó 4 episodios de diarrea, mientras que el otro se mantuvo aparentemente sano (Cravioto et al., 1988, 1990)

Determinación de genes de virulencia

En el año 2017 el Químico de Alimentos Luis Roberto Serrano García reportó la presencia y ausencia de genes de virulencia en estas cepas de *E. coli* en la tesis “*Determinación de genes de virulencia en una población de Escherichia coli comensal aislada de dos niños durante sus dos primeros meses de vida*”. En los resultados obtenidos puede observarse que, aunque sólo uno de los bebés estudiados presentó cuadros diarreicos durante el periodo de estudio, en las cepas

obtenidas de ambos niños se encontró la presencia de genes de virulencia de diversos patotipos de *E. coli*, las cuales fueron detectadas en los bebés en las primeras 48 horas de vida, por lo que se concluyó que la presencia de los genes de virulencia no es suficiente para determinar si una cepa es causante de estos cuadros diarreicos.

Estos resultados se obtuvieron mediante un proceso de hibridación en un macroarreglo en membrana de nylon sobre la cual se imprimieron los productos de PCR de los genes de virulencia elegidos (Tabla 1) usando un robot Virtek®. El procedimiento detallado se encuentra en la tesis mencionada.

Tabla 1. Factores de virulencia empleados en la membrana y sus respectivas funciones

Patotipo	Factor de virulencia	Función
ETEC	<i>est1A</i>	Toxina termoestable porcina
	<i>est1B</i>	Toxina termoestable humana
	<i>eltA</i>	Toxina termolábil
	<i>cfal</i>	Factores de colonización del grupo CFA
	CS1	
	CS3	
EPEC	<i>eaeA</i>	Intimina de unión con el enterocito
	EAF	Factor de adherencia de EPEC. Plásmido que contiene los genes <i>perA</i> , <i>perB</i> y <i>perC</i>

	<i>bfpA</i>	Pilus formadora de paquetes para colonización
EHEC	<i>stx1</i>	Toxinas tipo Shiga causantes del síndrome urémico hemolítico
	<i>stx2</i>	
	<i>etpD</i>	Proteína de secreción tipo II
EIEC	<i>senB</i>	Enterotoxina TieB
EAEC	<i>aggR</i>	Regulador de expresión de las fimbrias de adherencia agregativa
	<i>astA</i>	Toxina termoestable

Objetivos

Objetivo General

Determinar el grupo filogenético y la relación clonal de un grupo de cepas de *Escherichia coli* aisladas de dos niños durante sus primeros dos meses de vida.

Objetivos Particulares

- Determinar la clonalidad de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de un mismo niño, con base en los perfiles cromosómicos obtenidos mediante PFGE
- Obtener los grupos filogenéticos de las cepas de *Escherichia coli* utilizando el esquema de Clermont.
- Determinar que las cepas comensales de *E. coli* aisladas de cada niño, durante sus primeros dos meses de vida, mantienen una relación clonal de acuerdo a su perfil cromosómico y a los criterios de Clermont.

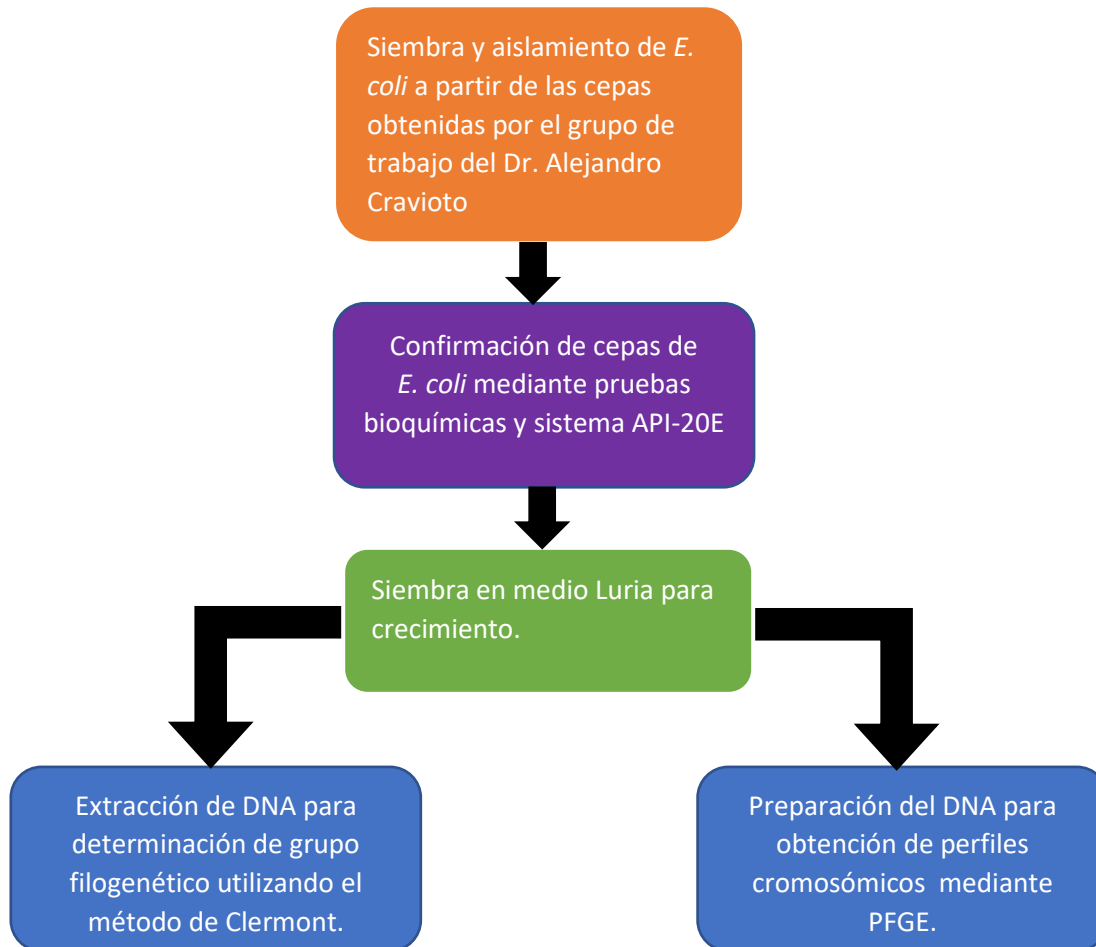
Hipótesis

Utilizando los métodos de caracterización, se espera agrupar a las cepas comensales en grupos definidos de Clermont y poder diferenciarlas de las cepas asociadas a diarrea.

Se espera que el análisis de los perfiles cromosómicos de las cepas obtenidos por campos pulsados muestre una relación clonal entre las cepas del mismo niño, revelando alguna relación entre las cepas de la primera colonización con cepas aisladas posteriormente.

Procedimiento experimental

Figura 2. Metodología empleada



Aislamiento e identificación de cepas de *Escherichia coli*

Se utilizaron un total de 115 cepas de *E. coli*: 49 aisladas del niño 1, el cual no presentó ningún episodio de diarrea durante sus dos primeros meses de vida, y 66 aisladas del niño 2, el cual padeció 4 episodios de diarrea durante sus dos primeros meses de vida.

Las cepas se encontraban almacenadas y fueron proporcionadas por el cepario de la Facultad de Medicina de la UNAM. Una vez elegidas las cepas para el presente estudio, fueron sembradas en agar sangre y agar MacConkey, para comprobar su pureza y viabilidad; después fueron re-estriadas para obtener colonias únicas. A cada colonia se le realizó la batería de pruebas Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato (IMVIC) para comprobar su identificación como *E. coli* (tabla 2); en caso de requerir una confirmación más certera de su identidad como *Escherichia coli* se utilizó el sistema API-20E® de Biomerieux®.

Tabla 2. Resultado de pruebas bioquímicas para identificar a *E. coli*

Prueba	Resultado esperado
Indol	+
Rojo de Metilo	+
Voges-Proskauer	-
Citrato	-

+ Positivo

- Negativo

Todas las cepas, una vez comprobado que se trataba de *E. coli*, fueron sembradas en caldo luria, para obtener un paquete celular suficiente para realizar la extracción de DNA. El DNA fue extraído utilizando el kit DNEasy Blood and Tissue (la técnica detallada se describe en el Apéndice 2).

Método de Clermont

La clasificación con base en los criterios de Clermont se basa en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), localizando fragmentos específicos del genoma bacteriano y amplificándolos de forma que puedan ser detectados mediante una electroforesis en gel de agarosa. Para llevar a cabo la amplificación se utiliza una polimerasa con resistencia a altas temperaturas (Taq polimerasa I) y la repetición de un ciclo de temperaturas que permite que las cadenas del DNA se separen (desnaturalización, alrededor de 90°C), que los iniciadores se unan a las cadenas simples (alineamiento, alrededor de 50°C) y que la polimerasa pueda amplificar una determinada sección del DNA (amplificación o elongación, alrededor de 70°C). Para efectuar el método de Clermont se utilizaron iniciadores para 3 genes y un fragmento anónimo de DNA; la información de éstos, su secuencia y el gen que amplifican se encuentran en la tabla 3.

Tabla 3. Genes, secuencia de los iniciadores y peso de los productos obtenidos mediante PCR usando el método de Clermont.

Reacción	ID del iniciador	Gen diana	Proteína que codifica	Secuencia	Peso del producto (bp)
Cuádruplex	chuA.1b	<i>chuA</i>	Proteína de membrana externa responsable de la utilización del grupo hemo	5'-ATGGTACCGGACGAAACCAAC-3'	288
	chuA.2			5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	
	yjaA.1b	<i>yjaA</i>	Proteína no caracterizada inducida por estrés	5'-CAAACGTGAAGTGTCCAGGAG-3'	211
	yjaA.2b			5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	
	TspE4C2.1b	TspE4.C2	Fragmento que forma parte de una lipasa-esterasa putativa	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3'	152
	TspE4C2.2b			5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'	
	AceK.f	<i>arpA</i>	Proteína reguladora tipo Ankirina	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3'	400
	ArpA1.r			5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3'	
Grupo E	ArpAgpE.f	<i>arpA</i>	Ankirina	5'-GATTCCATCTTGTCAAATATGCC-3'	301
	ArpAgpE.r			5'-GAAAAGAAAAAGAATCCCAAGAG-3'	
Grupo C	trpAgpC.1	<i>trpA</i>	Subunidad alfa de la triptófano sintasa	5'-AGTTTTATGCCAGTGCGAG-3'	219
	trpAgpC.2			5'-TCTGCGCCGGTCACGCC-3'	
Control interno	trpBA.f	<i>trpA</i>	sintasa	5'-CGGCGATAAAGACATCTTAC-3'	489
	trpBA.r			5'-GCAACGCGCCTGGCGGAAG-3'	

Los productos obtenidos deben ser resueltos mediante electroforesis usando geles de agarosa al 2% para los productos del cuádruplex y 1.5% para los productos de AoC y DoE. La interpretación de resultados del cuádruplex se realiza con base en la tabla 4.

Tabla 4. Posibles resultados a obtener a partir de la amplificación de genes por el método de Clermont

<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	Grupo Filogenético
+	-	-	-	A
+	-	-	+	B1
-	+	-	-	F
-	+	+	-	B2
-	+	+	+	B2
-	+	-	+	B2
+	-	+	-	A o C
+	+	-	-	D o E
+	+	-	+	D o E
+	+	+	-	E o I
-	-	+	-	I o II
-	476*	-	-	III, IV o V
-	-	-	+	U
-	-	+	+	U
+	-	+	+	U
+	+	+	+	U
-	-	-	-	U

A, B1, B2, C, D, E y F corresponden a los grupos filogenéticos; I, II, III, IV y V corresponden a los clados crípticos de *E. coli* y U corresponde a los genotipos aún desconocidos. *La reacción que identifica a los clados III, IV y V produce una banda de 476 pb amplificada a partir de los iniciadores del gen *chuA* (Clermont et al., 2013)

Como controles se utilizaron las cepas de *E. coli* K12 y una cepa UPEC para el cuádruplex, ECOR 70 para determinación de grupo A o C y ATCC 7009 27 (O157:H7) para determinación del grupo D o E.

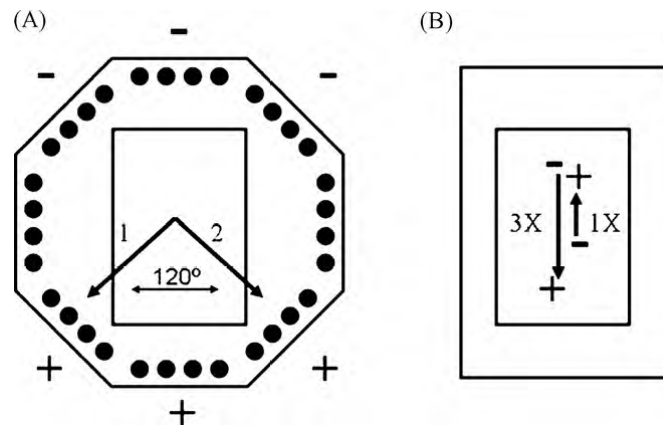
Electroforesis de Campos Pulsados

La preparación de muestras para PFGE requiere que los organismos sean embebidos en agarosa, llevando a cabo la lisis *in situ* y digiriendo el DNA cromosómico usando las ya mencionadas enzimas de restricción de corte poco frecuente. Pequeñas porciones de agarosa con el DNA cromosómico son insertadas en los pozos de un gel de agarosa y los fragmentos de restricción son resueltos en un patrón de bandas en el gel. Los patrones de bandas son entonces comparados entre sí para determinar su relación.

Las alternativas instrumentales empleadas para este método son varias: electroforesis de campo ortogonal, electroforesis de campo alternante transverso, electroforesis de inversión de campo (FIGE) y electroforesis de campo eléctrico homogéneo con contorno cerrado (CHEF). Las más comúnmente empleadas son las dos últimas, por lo que ambas se describen a continuación:

- CHEF: El instrumento utiliza un arreglo de 24 electrodos que producen un gradiente eléctrico altamente uniforme, que causa que las moléculas se reorienten de forma alternada a un ángulo de $\pm 120^\circ$ en intervalos de tiempo crecientes. Esta configuración permite que el DNA migre equidistantemente a la derecha y a la izquierda por lo que produce carriles verticales con las muestras. Los parámetros estándar para su utilización son: agarosa 1%, Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5x, con un campo eléctrico de 6 V/cm. Éste instrumento fue el que se empleó en el estudio.
- FIGE: Es una alternativa más rápida que el CHEF pero menos discriminatoria. No requiere una cámara de electroforesis especial puesto que la corriente eléctrica se alterna a un ángulo de 180° . Su versión óptima es la electroforesis de campo cero integrado (ZIFE) donde los tiempos de pulso se encuentran típicamente a una proporción 3 a 1 avance-retroceso, y pueden ser proporcionados a diferentes voltajes.

Figura 3. Dibujos esquemáticos de la instrumentación usada en PFGE



(A) muestra el esquema empleado en CHEF, (B) muestra el esquema empleado en FIGE

En este experimento se trabajó con muestras de heces obtenidas en diversas fechas, de cada muestra se aislaron diferentes números de colonias bacterianas y el número de colonias se obtuvo observando las diferencias fenotípicas coloniales en cada uno de los cultivos, seleccionándose todas las colonias con diferente morfología. Una vez extraído, el DNA fue sometido a una restricción usando la enzima *Xba*I y se resolvió mediante una electroforesis de campos pulsados para obtener los perfiles cromosómicos de esta población; con estos se construyó un dendograma empleando el programa BioEdit mediante un algoritmo de DICE para analizar los perfiles cromosómicos. Como control se utilizó DNA de *Salmonella enterica* ser. Braenderup.

El primer niño nació el 9 de septiembre de 1985 y de él se analizaron 49 cepas de *E. coli* aisladas de 4 muestras durante sus primeros 2 meses de vida, en los cuales no presentó ningún episodio diarreico. Las fechas de obtención de muestras fueron: 11 de septiembre de 1985 (3 cepas), 12 de octubre de 1985 (18 cepas), 9 de noviembre de 1985 (13 cepas) y 26 de noviembre de 1985 (15 cepas).

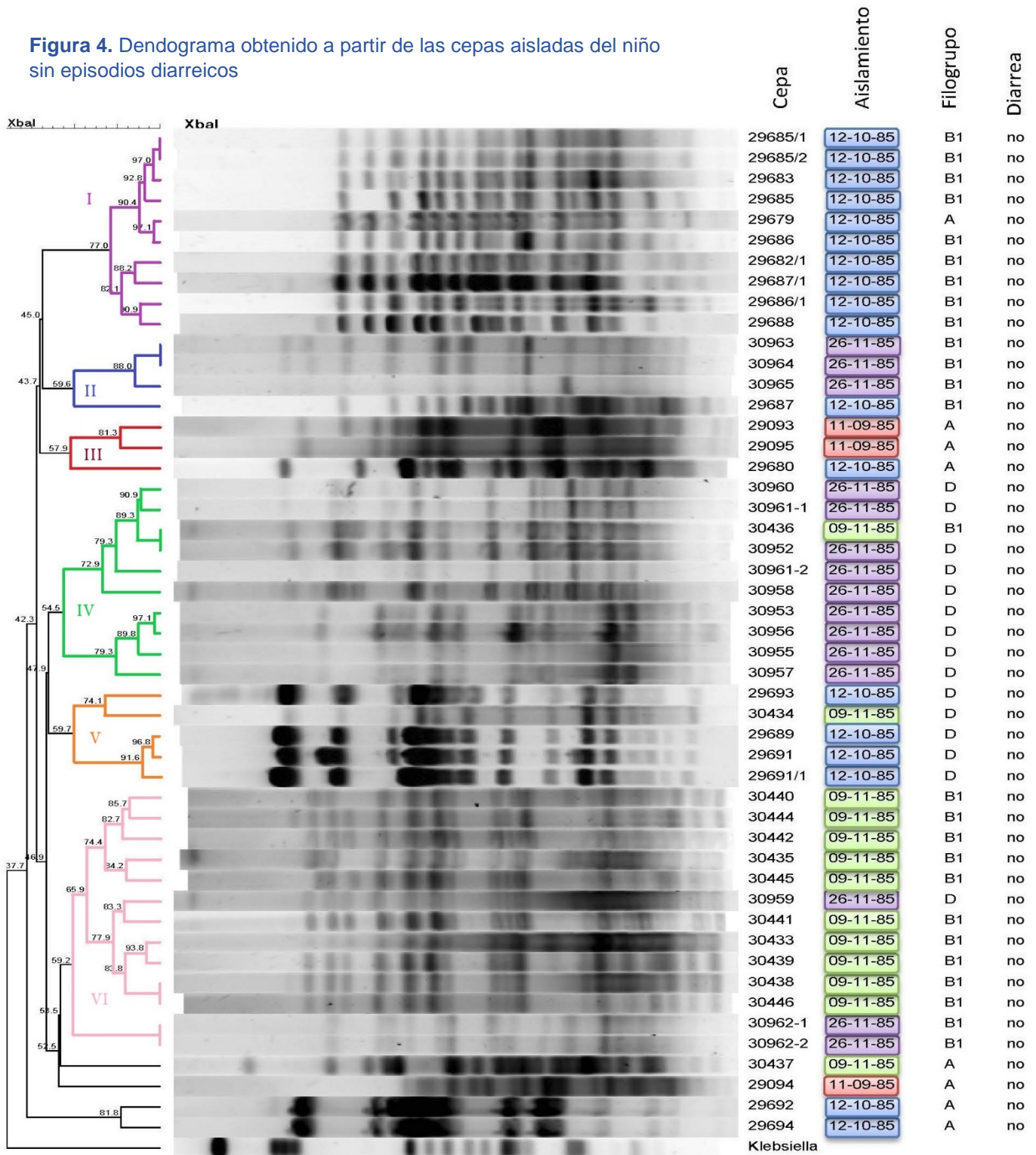
Del segundo niño, nacido el 1 de octubre de 1985, se analizaron 66 cepas de *E. coli* aisladas también durante sus dos primeros meses de vida. Se obtuvieron 6

muestras, de las cuales 4 pertenecen a episodios de diarrea. Las fechas de obtención de las muestras fueron: 2 de octubre de 1985 (9 cepas), 16 de octubre de 1985 (4 cepas), 30 de octubre de 1985 (7 cepas), 15 de noviembre de 1985 (11 cepas), 27 de noviembre de 1985 (12 cepas) y 2 de diciembre de 1985 (23 cepas).

Resultados

Niño sin diarreas

Figura 4. Dendograma obtenido a partir de las cepas aisladas del niño sin episodios diarreicos



La figura muestra en orden: el perfil cromosómico de las cepas, la fecha de su aislamiento y su grupo filogenético. Las fechas de aislamiento se encuentran coloreadas para facilitar su lectura: 11-09-85=rojo, 12-10-85=azul, 9-11-85=verde y 26-11-85=morado.

El análisis de los perfiles obtenidos nos mostró que las cepas se distribuyen en 6 grupos principales (I-VI) de acuerdo a su similitud, más cuatro cepas que no muestran una agrupación aparente.

El perfil I, indicado en color morado en la figura 4, está conformado de 10 cepas que se agrupan con un 77% de similitud y que visiblemente comparten una alta cantidad de bandas en sus perfiles cromosómicos. De las 10 cepas que forman el perfil, 9 pertenecen al filogrupo B1 y la restante al filogrupo A.

El perfil II, indicado en color azul, contiene 4 cepas agrupadas con un 59.6% de similitud y las cuales pertenecen todas al filogrupo B1.

El perfil III, indicado en color rojo, está formado de 3 cepas que, aunque muestran visibles diferencias en sus perfiles cromosómicos, presentan un 57.9% de similitud y todas ellas pertenecen al filogrupo A.

El perfil IV, indicado en color verde, contiene 10 cepas, las cuales presentan un 54.5% de similitud, aunque visiblemente se ramifican en dos subgrupos con más de 70% de similitud cada uno. De las 10 cepas 9 pertenecen al filogrupo D y la restante al filogrupo B1.

El perfil V, indicado en color naranja, se conforma de 5 cepas con un 59.7% de similitud, aunque las bandas compartidas entre ellas son fácilmente visibles. De este grupo todas las cepas pertenecen al filogrupo D.

El perfil VI, indicado en color rosa, se conforma de 13 cepas con un 59.2% de similitud y cuyas bandas compartidas son fácilmente observables. De las 13 cepas del grupo, 12 pertenecen al filogrupo B1 y 1 al filogrupo D.

Las 4 cepas restantes no presentan una agrupación aparente y pertenecen todas al filogrupo A.

Con relación a la clonalidad de las cepas, podemos ver que las cepas (3) del primer aislamiento presentaron dos patrones cromosómicos diferentes y solo un tipo de filogrupo (A), indicando que el inicio de la colonización fue por más de una población de *E. coli*. Las cepas de *E. coli* del segundo aislamiento presentaron 6

patrones cromosómicos diferentes y tres filogrupos (A, B1, D). Sin embargo, se puede apreciar que una cepa de este grupo comparte bandas con cepas del primer aislamiento, sugiriendo probablemente que esta cepa es derivada (sub clona) de alguna de las cepas anteriores. Las cepas del tercer aislamiento presentaron 4 patrones cromosómicos y tres filogrupos (A, B1 y D); una de las cepas de este aislamiento compartió perfiles cromosómicos hasta en un 74.1% con una cepa del aislamiento anterior, indicando que esta cepa es subclona derivada de una cepa de la población anterior. Las cepas del último aislamiento presentaron 4 patrones cromosómicos y solo dos grupos filogenéticos (B1 y D); dentro de la población de este grupo se puede apreciar claramente que una cepa presenta el mismo perfil cromosómico de una cepa del aislamiento anterior, pero de diferente filogrupo. En general podemos observar que los grupos que se observan en el dendograma están constituidos en su mayoría por cepas de un mismo aislamiento, pero también se muestra una clara relación entre cepas de diferentes aislamientos, indicando la persistencia de poblaciones clonales a través del tiempo, ya que podemos observar subclonas que se han ido derivando de poblaciones previamente establecidas. Sin embargo, el aumento en el número de patrones cromosómicos detectados entre las cepas conforme al transcurso del tiempo nos habla también de un evento dinámico entre cepas del intestino que da origen a nuevas cepas.

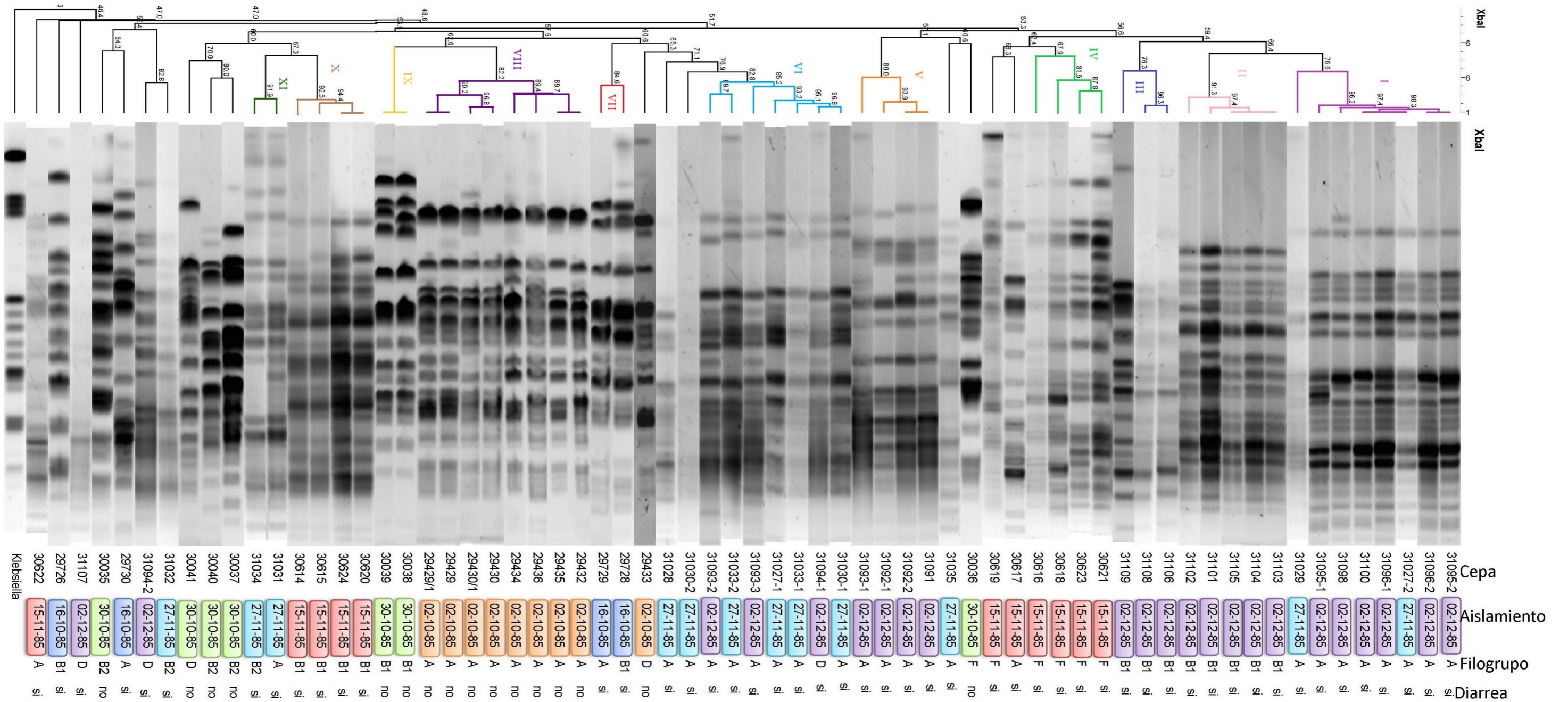
Aunque hay cepas que muestran patrones únicos en los diferentes aislamientos, éstos no se repiten en aislamientos posteriores, sugiriendo que son poblaciones transitorias que desaparecen en periodos cortos y subsecuentes, muy probablemente sujetos a los cambios que va teniendo el intestino del niño conforme va creciendo. Contrario a lo que se esperaba y lo reportado por Clermont, que dice que cepas de *Escherichia coli* comensales se agrupan en el grupo filogenético A, el grupo predominante entre la población de los diferentes aislamientos fue el filogrupo B1, seguido de filogrupo D (tabla 5), y, contrario a lo esperado, aunque podemos observar que en general las cepas pertenecientes a un mismo aislamiento y a un mismo filogrupo se encuentran agrupadas, los filogrupos por sí mismos se encuentran distribuidos en el dendograma de forma aleatoria.

Tabla 5. Resultados generales de la determinación de grupo filogenético en el niño sin diarreas

Grupo filogenético	Número de cepas	Porcentaje de la población
A	8	16.3
B1	26	53.1
D	15	30.6

Figura 5. Dendograma obtenido a partir de las cepas aisladas del niño con episodios diarreicos

Niño con diarreas



La figura muestra en orden: el perfil cromosómico de las cepas, la fecha de su aislamiento, su grupo filogenético y si el niño presentó diarrea. Las fechas de aislamiento se encuentran coloreadas para facilitar su lectura: 2-10-85=naranja, 16-10-85 =azul oscuro, 30-10-85=verde, 15-11-85=rojo, 27-11-85=azul claro y 2-12-85= morado.

El análisis de las cepas mostró una agrupación en 11 perfiles (I-XII) principales con respecto a la similitud de sus perfiles cromosómicos y 17 cepas presentaron patrones únicos.

El perfil I, indicado en color morado en la figura 5, está formado por 8 cepas que se agrupan con un 76.6% de similitud y pertenecen todas al filogrupo A.

El perfil II, indicado en color rosa, se compone de 5 cepas con un 91.3% de similitud, las cuales pertenecen al filogrupo B1.

El perfil III, indicado en color azul, se conforma de 3 cepas agrupadas con un 76.3% de similitud y que pertenecen al filogrupo B1.

El perfil IV, indicado en color verde, está formado por 4 cepas, las cuales presentan un 67.9% de similitud y todas pertenecen al filogrupo F.

El perfil V, indicado en color naranja, se compone de 4 cepas agrupadas con un 80.0% de similitud y las cepas pertenecen todas al filogrupo A.

El perfil VI, indicado en color azul claro, se compone de 7 cepas que presentan una similitud del 82.8%, donde 6 de las cepas pertenecen al filogrupo A y la restante al filogrupo D.

El perfil VII, indicado en color rojo en la figura, está conformado de 2 cepas que presentan un 84.6% de similitud entre sus perfiles cromosómicos y donde una pertenece al filogrupo A mientras la otra pertenece al B1.

El perfil VIII, indicado en color púrpura en la imagen, contiene 8 cepas con un 82.2% de similitud y donde todas las cepas pertenecen al filogrupo A.

El perfil IX, indicado en color amarillo, se conforma de 2 cepas con un 100% de identidad que pertenecen al filogrupo B1.

El perfil X, indicado en color café, está formado de 4 cepas que presentan un 92.5% de similitud y las cuales pertenecen al filogrupo B1.

El perfil XI, indicado en color verde oscuro en la figura, contiene dos cepas con un 91.9% de similitud y de las cuales una pertenece al filogrupo A y la otra al filogrupo B2.

Las 17 cepas restantes se encuentran distribuidas en el dendograma y, aunque el programa las ubica cerca a los grupos ya mencionados, es posible observar que presentan perfiles cromosómicos muy distintos. De estas cepas 6 pertenecen al filogrupo A, una al filogrupo B1, 4 al filogrupo B2, 4 al filogrupo D y dos al filogrupo F.

Respecto a la clonalidad, se observa que las cepas (9) del primer aislamiento (2-10-85, indicado en naranja en la figura y en el cual no se presentó diarrea) muestran dos patrones cromosómicos distintos y 2 filogrupos, donde 8 de las cepas pertenecen al filogrupo A y sólo una corresponde al filogrupo D; esto sugiere una colonización inicial llevada a cabo, al menos, por dos poblaciones de *E. coli*. Las cepas (4) del segundo aislamiento (16-10-85, indicado en azul oscuro en la figura), obtenido de un episodio de diarrea, presentan 3 patrones distintos, de las cuales 2 cepas forman el perfil VII, sin embargo, cada cepa presenta un filogrupo distinto (A y B1); las dos cepas restantes de esta muestra presentan patrones únicos; también presentan dos filogrupos: A y B1. Las cepas (7) del tercer aislamiento (30-10-85, indicado en verde en la figura y en el cual no se presentó diarrea) muestran 6 patrones cromosómicos distintos y 4 filogrupos (B1, B2, D y F). Las cepas (11) del cuarto aislamiento (15-11-85, indicado en rojo en la figura y el cual se obtuvo de un episodio de diarrea) muestran 5 patrones cromosómicos y pertenecen a 3 filogrupos (A, B1 y F), donde la mayoría de las cepas se encuentran formando los perfiles IV (4) y X (4). Las cepas (13) del quinto aislamiento (27-11-85, indicado en azul claro en la figura y obtenido de un episodio de diarrea) muestran 8 patrones cromosómicos distintos, donde 2 cepas se ubican en el perfil I, 4 en el perfil VI y 2 en el grupo XI; 11 de las cepas pertenecen al filogrupo A y las 2 restantes al filogrupo B2. Las cepas (23) del sexto aislamiento (02-12-85, indicado en morado en la figura y también obtenido de un episodio de diarrea) muestran 7 patrones cromosómicos diferentes, compartiendo principalmente patrones con cepas de los perfiles I-VI

pertenecientes al aislamiento anterior. Estas cepas pertenecen a los filogrupos A (12), B1(8) y D (3).

Si bien en las cepas analizadas es posible observar una cierta relación entre los perfiles cromosómicos obtenidos a través del tiempo, encontramos que hay una alta variación cromosómica entre ellos y que no hay una relación muy clara que las una como poblaciones de subclonas derivadas de una primera colonización, lo que puede significar que no hay una población que se haya establecido en el intestino y que se encuentra una importante cantidad de cepas transitorias pasando a través de él. El grupo filogenético predominante en la población es el filogrupo A, presente en un 52% de las cepas (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados generales de la determinación de grupo filogenético en el niño con episodios diarreicos

Grupo filogenético	Número de cepas	Porcentaje de la población
A	35	52.2
B1	16	23.8
B2	5	7.4
D	5	7.4
F	6	8.9

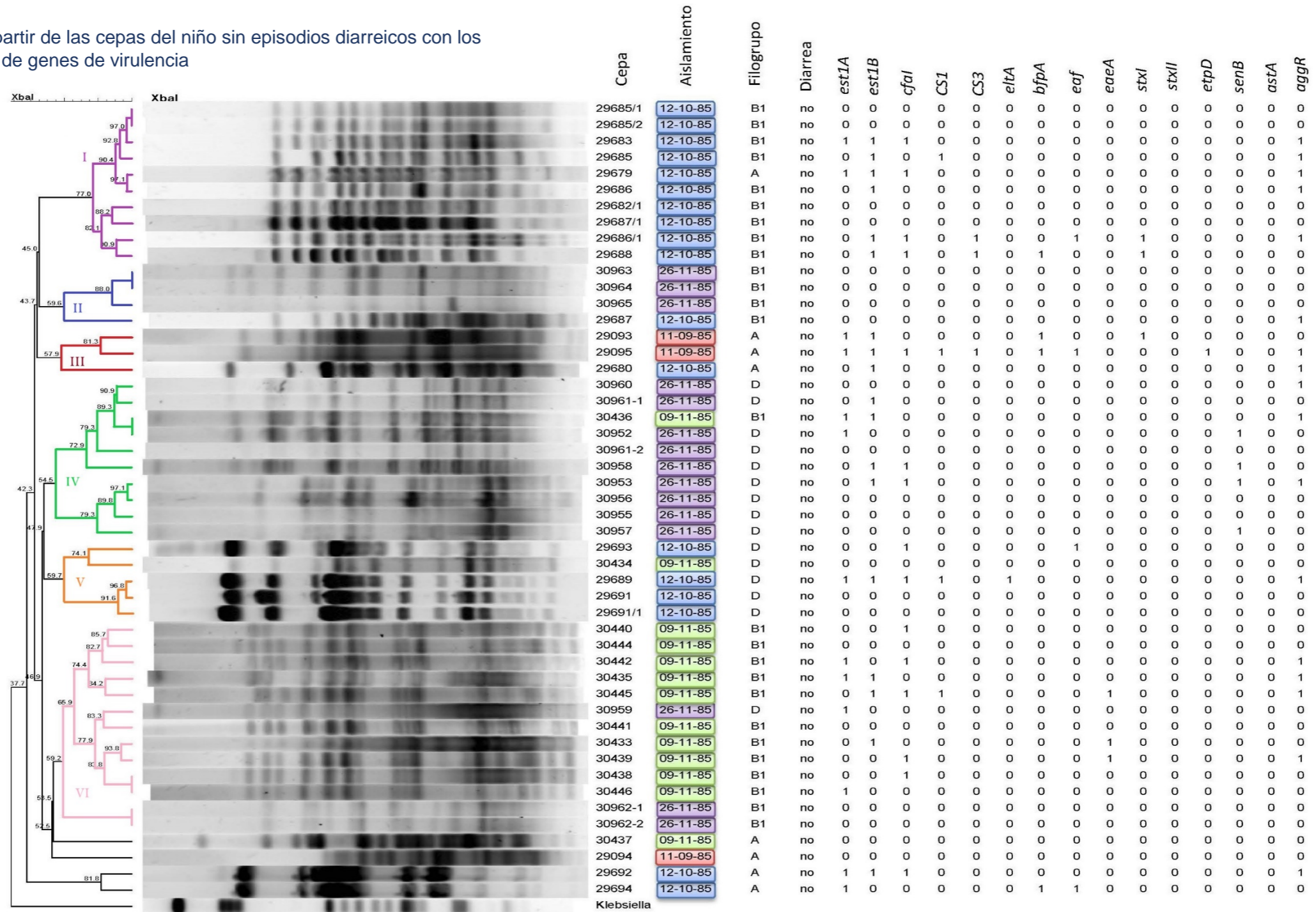
Discusión

Podemos observar que, en el niño que no presentó episodios diarreicos, los perfiles cromosómicos mantienen una similitud de forma bastante visible a lo largo del dendograma (figura 4) donde se puede observar bandas conservadas entre las distintas cepas, lo que nos sugiere que son cepas ya establecidas en el intestino derivadas de las primeras que colonizaron al infante. Los grupos filogenéticos detectados en estas cepas sólo fueron A, B1 y D, lo cual no es una sorpresa, pues concuerda con lo reportado por Clermont (Clermont et al., 2000), donde se menciona que las cepas comensales pertenecen, en su mayoría, a los filogrupos A y B1, los cuales son los que se observan predominantemente en este grupo de cepas. Sin embargo, aunque se esperaría que las cepas pertenecientes a un mismo grupo filogenético se agruparan, no es eso lo que se observa en el dendograma, donde estos están dispersos a lo largo de la figura.

Con respecto a las cepas obtenidas del niño con episodios diarreicos (figura 5), podemos ver que hay una gran diferencia, puesto que en este caso es posible observar que existe una alta variabilidad entre los perfiles cromosómicos de las cepas y cuyos cambios en general coinciden con las fechas de aislamientos, lo que nos sugiere que, de forma contraria a la del niño anterior, la población de *E. coli* en el intestino no consigue mantenerse estable, lo que podría ser una de las causas de los episodios diarreicos. En estas cepas también encontramos que se detectaron una mayor variedad de grupos filogenéticos: A, B1, B2, D y F, lo cual concuerda con lo observado en la variabilidad de perfiles cromosómicos, sin embargo, al igual que en el caso anterior, no se observa una agrupación de las cepas de acuerdo a su grupo filogenético.

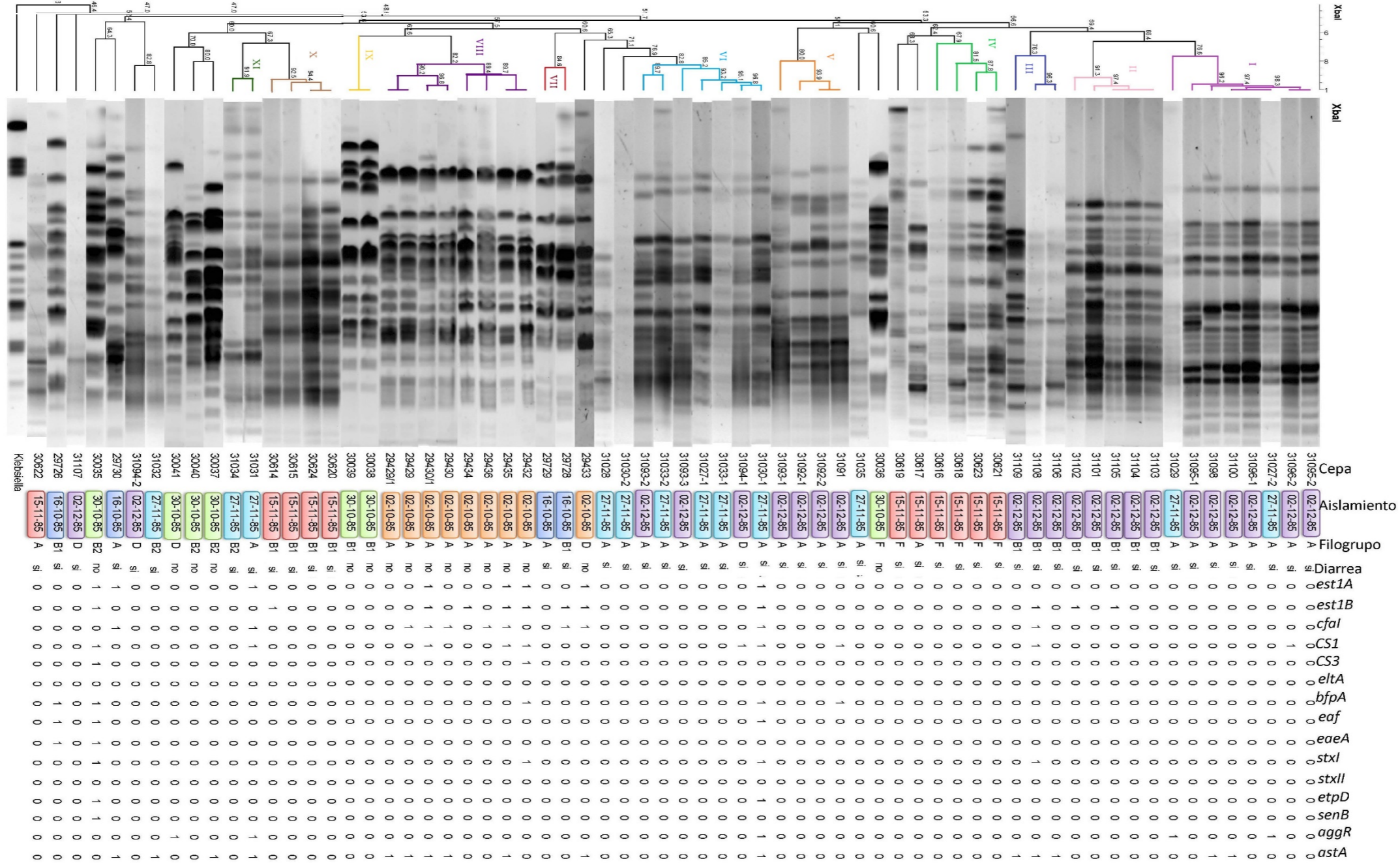
Buscando realizar un análisis más completo de las cepas en estudio, se decidió agregar los resultados obtenidos en la tesis del Químico en Alimentos Luis Roberto Serrano García “*Determinación de genes de virulencia en una población de Escherichia coli comensal aislada de dos niños durante sus dos primeros meses de vida*” para observar si se encontraba una relación entre los perfiles cromosómicos, grupo filogenético y presencia o ausencia de genes de virulencia en las cepas. Para esto se adicionaron estos datos a los dendogramas ya existentes (Figuras 6 y 7).

Figura 6. Dendograma obtenido a partir de las cepas del niño sin episodios diarreicos con los resultados de presencia y ausencia de genes de virulencia



La figura muestra en orden: el perfil cromosómico de las cepas, la fecha de su aislamiento, su grupo filogenético, si el niño presentó diarrea y la presencia o ausencia de los genes de virulencia analizados (donde 0= ausente y 1= presente). Las fechas de aislamiento se encuentran coloreadas para facilitar su lectura: 11-09-85=rojo, 12-10-85=azul, 9-11-85=verde y 26-11-85=morado.

Figura 7. Dendrograma obtenido a partir de las cepas del niño con episodios diarreicos con los resultados de presencia y ausencia de genes de virulencia



La figura muestra en orden: el perfil cromosómico de las cepas, la fecha de su aislamiento, su grupo filogenético, si el niño presentó diarrea, la presencia o ausencia de los genes de virulencia analizados, donde 0= ausente y 1= presente y el número de patrón asignado para su análisis. Las fechas de aislamiento se encuentran coloreadas para facilitar su lectura: 2-10-85=naranja, 16-10-85 =azul oscuro, 30-10-85=verde, 15-11-85=rojo, 27-11-85=azul claro y 2-12-85= morado.

En las cepas estudiadas se encontró que pueden presentar los genes de virulencia de más de un patotipo y en los dos niños estudiados se encontraron tanto cepas sin genes de virulencia como cepas con varios de ellos.

En el niño sin episodios diarreicos sólo se encontraron cepas pertenecientes a los grupos A, B1 y D, de las cuales:

- Las cepas sin genes de virulencia (18) pertenecen a los grupos A, B1 y D.
- Las que presentan genes pertenecientes al patotipo ETEC se encuentran en los grupos A, B1 y D.
- Las que presentan genes pertenecientes al patotipo EPEC pertenecen a los grupos A, B1 y D.
- Las que presentan genes pertenecientes al patotipo EHEC pertenecen a los grupos B1 y A.
- Las que presentan genes pertenecientes al patotipo EIEC pertenecen al grupo D.
- Las que presentan genes pertenecientes al patotipo EAEC se encuentran en los grupos A, B1 y D.

También es notorio que a través de los aislamientos el número de genes de virulencia presentes en las cepas se va reduciendo y podemos ver que los únicos que se mantienen a lo largo de los 4 aislamientos son los genes *est1A*, *est1B*, *cfal* y *aggR*, lo que podría indicarnos que las cepas, al estar bien establecidas en el intestino del niño y no tener necesidad de competir por un lugar, se están deshaciendo de los genes de patogenicidad. Por el otro lado podemos observar que la mayoría de los genes de patogenicidad detectados pertenecen a los patotipos ETEC y EAEC, lo que podría significar que son genes comunes en las cepas y que por tanto no permiten hacer una identificación adecuada del patotipo.

En el niño 2 se encontraron cepas pertenecientes a los grupos A, B1, B2, D, y F, de la cuales:

- Las cepas sin genes de virulencia (35) pertenecen a los grupos A, B1, B2, D y F. El 100% de las cepas de grupo F no presentan genes de virulencia.
- Las cepas que presentan genes pertenecientes al patotipo ETEC pertenecen a los grupos A, B1, B2 y D.
- Las cepas que presentan genes pertenecientes al patotipo EPEC pertenecen a los grupos A, B1 y B2
- Las cepas que presentan genes pertenecientes al patotipo EHEC pertenecen a los grupos A, B1 y B2
- Sólo una cepa presenta un gen perteneciente al patotipo EIEC y forma parte del grupo B2
- Las cepas que presentan genes pertenecientes al patotipo EAEC pertenecen a los grupos A, B1, B2 y D.

Contrario a lo esperado, se observa una alta cantidad de cepas sin genes de virulencia en esta población; tampoco podemos observar una relación entre estos genes y los aislamientos, pues, aunque el promedio de genes de virulencia encontrados en las cepas disminuye a lo largo de los dos meses estudiados, encontramos una alta variación entre estos, ya que sólo encontramos un gen (*est1B*) que se comparte en todos los aislamientos. En este caso, a diferencia de lo encontrado en el niño sin episodios diarreicos, aunque se puede observar que los genes que se presentan en mayor número son los del patotipo ETEC, no predominan homogéneamente en todas las muestras, sino que se concentran en una de ellas. Esta variación en el contenido de genes de virulencia coincide con lo que encontramos en el análisis de los perfiles cromosómicos y también sugiere el paso de poblaciones transitorias por el intestino del niño, lo que podría ser más significativo como causa de las diarreas que la presencia o ausencia de genes de virulencia en las cepas aisladas. Al igual que lo encontrado en el niño sin diarreas,

no es posible establecer una relación clara entre el perfil de restricción cromosómico, el grupo filogenético y el contenido de genes de virulencia en las cepas, aunque de forma interesante, de la población estudiada ninguna de las 10 cepas pertenecientes al grupo filogenético F presenta genes de virulencia, lo que podría sugerir que es un grupo en el cual se encuentran cepas con bajo contenido en genes de virulencia, lo que puede deberse a una menor capacidad de efectuar la transferencia horizontal de genes o a una menor capacidad de asimilar DNA obtenido mediante transferencia horizontal; dado el reciente descubrimiento de éste filogrupo en *E. coli* aún no se cuenta con suficiente información para responder esta pregunta y se requeriría analizar el contenido de genes de virulencia de más cepas pertenecientes a este filogrupo para tener un panorama más extenso del filogrupo y si es posible determinar una relación de éste con la ausencia de genes de virulencia en las cepas.

De acuerdo al artículo de Escobar-Páramo, *et al* (2004), en relación con la patogenicidad y el grupo filogenético, las cepas EPEC se distribuyen en dos complejos, EPEC1 y EPEC2, que corresponden a los grupos B1 y B2 respectivamente; estos dos grupos se diferencian por el tipo de gen *eaeA* de la isla de patogenicidad LEE. Las cepas EHEC se distribuyen en los grupos A y B1, pero las cepas serotipo O157:H7 se encuentran con mayor frecuencia en el grupo E. Las cepas ETEC se ubican en los grupos A, B1 y C, mientras las cepas EAEC y DAEC pueden encontrarse en todos los grupos excepto el E. Las cepas EIEC y *Shigella* se encuentran altamente localizadas en grupos monofiléticos, y las cepas ExPEC se hallan principalmente en el grupo B2 y en menor medida en el grupo D. Mientras que en los artículos de Picard, *et al* (1999) y Clermont, *et al* (2000) se menciona que las cepas comensales de *E. coli* se encuentran ubicadas principalmente en los grupos A y B1, aunque esto no es excluyente de encontrar la presencia de cepas patógenas en estos grupos. Sin embargo, contrario a lo reportado tenemos en el niño 1 cepas con genes de virulencia del patotipo ETEC pertenecientes al grupo D, cepas con genes del patotipo EPEC pertenecientes a los grupos A y D, cepas con genes de virulencia del patotipo EIEC pertenecientes al grupo D y cepas sin presencia de genes de virulencia pertenecientes a los grupos A, B1 y D. Al igual que

la variabilidad presente en el contenido de genes de virulencia de los grupos filogenéticos y la caracterización de patotipos, las cepas aisladas del niño 2 presentan cepas con genes de virulencia del patotipo ETEC pertenecientes a los filogrupos B2 y D, cepas con genes de virulencia del patotipo EPEC pertenecientes al grupo A, cepas con genes del patotipo EHEC pertenecientes al filogrupo B2, una cepa con genes de virulencia del patotipo EIEC y que forma parte del grupo B2 y cepas sin presencia de genes de virulencia pertenecientes a los grupos A, B1, B2, D y F. Esto nos indica que hacer una correlación filogrupo-patotipo no es adecuado, puesto que esta clasificación no nos permite diferenciar con estos criterios cepas comensales y patotipos entre la población de *E. coli* y que requiere ser revisada y probablemente modificada, pues los resultados que encontramos en el presente estudio no apoyan lo previamente reportado.

Por el otro lado, con respecto a la clasificación filogenética, está reportado que “seis grupos principales de *E. coli* (A, B1, C, E, D y B2), adicionalmente a los diferentes grupos monofiléticos de *Shigella* forman el corazón de la especie *E. coli*. Los grupos A, B1, D y B2 han sido reportados previamente como los grupos principales de la especie, donde B2 es el grupo más ancestral, seguido por el grupo D. Los grupos C y E representan dos grupos monofiléticos adicionales. El grupo C [...] es un grupo hermano de los grupos A y B1 y de los grupos de *Shigella*, los cuales emergieron durante la radiación. El grupo E emergió después del grupo D, pero antes de la radiación.” (Escobar-Páramo, *et al.*, 2004). En 2008 se agregó el filogrupo F, el cual es hermano al grupo B2 (Jaureguy *et al.* 2008). Esta información nos haría esperar que, al construir los dendogramas, las cepas estuvieran agrupadas de acuerdo a su grupo filogenético, mostrando estas relaciones; sin embargo, podemos observar que en ambos dendogramas los grupos filogenéticos se encuentran dispersos y no muestran algún tipo de relación con respecto al agrupamiento de las cepas. Esto puede deberse a que los estudios que han logrado estas clasificaciones filogenéticas se han realizado utilizando una alta cantidad de genes como referencia e incluso análisis de secuenciación de genoma completo (Leimbach *et al.*, 2013) para obtener sus resultados, mientras que el esquema

propuesto por Clermont sólo contempla el uso de 3 genes y un fragmento anónimo de DNA.

También es interesante observar que la diferencia más visible respecto a la clasificación filogenética en nuestros resultados es la presencia de los grupos B2 y F en las cepas aisladas del niño 2, lo que podría ser interpretado como una de las posibles causas de las diarreas que presentó el infante, sin embargo, ninguna de las 6 cepas pertenecientes al grupo F presentó genes de virulencia, mientras que el grupo B2 está más comúnmente involucrado en problemas extraintestinales, además de que podemos ver que cepas de estos dos grupos fueron halladas en aislamientos tanto cuando no se presentó diarrea como cuando la hubo. La presencia de los genes de virulencia tampoco resulta definitiva para identificar si alguna de las cepas de *E. coli* aisladas es la causante de los episodios diarreicos, ya que se observa que, contrario a lo que cabría esperar, las cepas encontradas en el niño 1 presentan una alta cantidad de genes de virulencia, incluso más que aquellas encontradas en el niño 2, lo cual, considerando que el niño 1 no presentó diarreas, podría significar que no hay tampoco una distinción clara entre cepas comensales y patógenas puesto que ambas pueden contener genes de virulencia y que las condiciones en las que se encuentra el hospedero es un factor determinante para el desarrollo de un cuadro clínico. También observamos que las cepas presentan genes de virulencia pertenecientes a más de un patotipo. Dado que la definición y distinción de los patotipos se basa en la presencia de estos genes de virulencia (Nataro, Kaper, 1998), esto podría indicar que la definición clásica requiere ser revisada, puesto que ya no resulta adecuada. Esto coincide con las conclusiones a las que llega el artículo: *Are Escherichia coli pathotypes still relevant in the era of the whole-genome sequencing?* (Robins-Browne, *et al*, 2016) que dice “estos esquemas [biotipificación, serotipificación y patotipificación] se han probado invaluable en la identificación y rastreo de brotes, y para el diagnóstico de casos individuales de infección, pero son imprecisos y potencialmente engañosos debido a la maleabilidad y continua evolución de *E. coli*”. Por este motivo se sugeriría, principalmente en el caso de patotipos como ETEC o EAEC, cuyos genes marcadores aparecen con una alta frecuencia en las cepas estudiadas y sugiere

que son genes comunes en la población, la búsqueda de nuevos marcadores genéticos para identificar a los patotipos.

Conclusiones

- No es posible encontrar una correlación entre el grupo filogenético y el patotipo de las cepas estudiadas; esto puede deberse tanto a la evolución paralela de los patotipos como al alto nivel de intercambio de DNA por transferencia horizontal entre las cepas que no permite que los patotipos se limiten únicamente a un grupo filogenético.
- Se encontró que las cepas analizadas pertenecientes al filogrupo F no presentan genes de virulencia, pero debido al pequeño número de estas cepas estudiadas y al muy reciente descubrimiento de dicho filogrupo, es necesario realizar un estudio más a fondo para determinar si esta observación tiene algún valor para la investigación o si se trata de una casualidad.
- No es posible encontrar una correlación entre el grupo filogenético y el perfil cromosómico de las cepas estudiadas; esto puede deberse a que la clasificación filogenética requiere realizarse usando un mayor número de puntos informativos para construir un dendograma que permita conocer la relación entre las cepas.
- No es posible encontrar una correlación entre el perfil cromosómico de las cepas estudiadas y la presencia de genes de virulencia; esto también puede deberse al gran intercambio de material genético mediante transferencia horizontal que se lleva a cabo entre la microbiota intestinal.
- Es posible observar que, en el niño sin diarreas, la presencia de genes de virulencia en las cepas estudiadas disminuye con el paso del tiempo, lo que nos sugiere que al conformarse una microbiota estacionaria en el intestino, las bacterias no tienen más necesidad de usar estos factores de virulencia y se deshacen de ellos.
- Es posible observar que, en el niño con diarreas, hay una importante presencia de cepas de *E. coli* transitorias, las cuales, aún más que la presencia de genes de virulencia, pueden haber causado un desequilibrio en la microbiota intestinal del infante y ser la causa de los episodios diarreicos observados.

- Se encontró que la presencia de los genes de virulencia pertenecientes a los patotipos ETEC y EAEC es extremadamente común entre las cepas, lo que nos sugiere que su uso como identificadores de estos patotipos requiere ser revisado para encontrar nuevos genes que no sean tan comunes y puedan servir como identificador, puesto que podemos observar que la presencia de estos genes no implica necesariamente que la cepa pertenezca a este patotipo.
- Se encontró que muy comúnmente las cepas estudiadas contenían genes de virulencia pertenecientes a más de un patotipo a la vez, lo que nos sugiere que su clasificación respecto a la presencia/ausencia de estos genes debe ser revisada para contemplar este tipo de situaciones.

Bibliografía

- Aagaard, K., Ma, J., Anthony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine*, 6, 1–22. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Adlerberth, I., Jalil, F., Carlsson, B., Mellander, L., Hanson, L. a, 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, 587–598. <https://doi.org/10.1017/S0950268898001484>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>
- Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S., & Hall, R. M. (2010). Distribution of human commensal Escherichia coli phylogenetic groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3455–3456. <https://doi.org/10.1128/JCM.00760-10>
- Baker, K. S. (2015). Demystifying Escherichia coli pathovars. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 1.
- Baker, S., Hanage, W. P., & Holt, K. E. (2010). Navigating the future of bacterial molecular epidemiology. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5), 640–645. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.002>
- Berrington, J. E., Stewart, C. J., Cummings, S. P., & Embleton, N. D. (2014). The neonatal bowel microbiome in health and infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(3), 236–243. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000061>
- Bettelheim, K. a, Breadon, a, Faiers, M. C., O'Farrell, S. M., & Shooter, R. a. (1974). The origin of O serotypes of Escherichia coli in babies after normal delivery. *The Journal of Hygiene*, 72(1), 67–70. <https://doi.org/10.1017/S002217240002413X>
- Bio-Rad Laboratories, I. (2011). Pulsed Field Gel Electrophoresis Protocol. *Bulletin* 6225.
- Brooks, G. F., Carrol, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2008). *Jawets, Melnick y Adelberg: Microbiología Médica*. (McGrawHill, Ed.) (19th ed.). Manual Moderno.
- Candela, M., Biagi, E., Maccaferri, S., Turrone, S., & Brigidi, P. (2012). Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends in Microbiology*, 20(8), 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.05.003>

- Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I. Z., Gomes, T. a T., ... Ottoboni, L. M. M. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology*, 10, 161. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-161>
- Chapman, T. A., Wu, X. Y., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., ... Chin, J. J. C. (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4782–4795. <https://doi.org/10.1128/AEM.02885-05>
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>.Updated
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Gordon, D. M., Brisse, S., Walk, S. T., & Denamur, E. (2011). Characterization of the cryptic *Escherichia* lineages: Rapid identification and prevalence. *Environmental Microbiology*, 13(9), 2468–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x>
- Clermont, O., Gordon, D., & Denamur, E. (2015). Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology (Reading, England)*, 161(2015), 980–988. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000063>
- Cooper, K. (n.d.). PFGE : General Overview and Troubleshooting Tips. *PulseNet Methods Development and Reference Laboratory Enterics Disease Laboratory Branch Centers for Disease Control and Prevention*.
- Cravioto, A., Reyes, R. E., Ortega, R., Fernández, G., Hernández, R., & López, D. (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*, 101(1), 123–134. <https://doi.org/10.1017/S0950268800029289>

- Cravioto, A., Reyes, R. E., Trujillo, F., Uribe, F., Navarro, A., De la Roca, J. M., ... Vázquez, V. (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.
- Crossman, L. C., Chaudhuri, R. R., Beatson, S. A., Wells, T. J., Desvaux, M., Cunningham, A. F., ... Henderson, I. R. (2010). A commensal gone bad: Complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *Journal of Bacteriology*, 192(21), 5822–5831. <https://doi.org/10.1128/JB.00710-10>
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2009). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(JANUARY). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Dobrindt, U. (2005). (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6–7), 357–371. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.009>
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., ... Karch, H. (2003). Analysis of Genome Plasticity in Pathogenic and Commensal. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1831–1840. <https://doi.org/10.1128/JB.185.6.1831>
- Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 60(10), 3953–3961.
- Doré, J., & Corthier, G. (2010). The human intestinal microbiota. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 198(9), 1667–1684. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70015-4](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70015-4)
- Doyle J., Evans, J., and D. G. E. (1983). Classification of Pathogenic *Escherichia coli* According to Serotype and the Production of Virulence Factors, with Special Reference to Colonization-Factor Antigens. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(sept-oct), s692–s701.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventré, A., Elion, J., ... Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, 147(6), 1671–1676. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-6-1671>

- Elion, J., Duriez, P., Clermont, O., Elion, J., Bingen, E., Bonacorsi, S., ... Denamur, E. (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology*, *147*(September), 1671–1676.
- Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguéneq, C., & Denamur, E. (2004). A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(6), 1085–1094. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh118>
- Escobar-Paramo, P., Grenet, K., Le Menac'h, A., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., ... Ruimy, R. (2004). Large-Scale Population Structure of Human Commensal *Escherichia coli* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(9), 5698–5700. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5698>
- Escobar-Páramo, P., Le Menac'h, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., ... Denamur, E. (2006). Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*, *8*(11), 1975–1984. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01077.x>
- Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., ... Doré, J. (2010). Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *51*(1), 77–84. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e>
- Fallani, M., Young, D., Scott, J., Norin, E., Amarri, S., Adam, R., ... Doré, J. (2010). Intestinal Microbiota of 6-week-old Infants Across Europe: Geographic Influence Beyond Delivery Mode, Breast-feeding, and Antibiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *51*(1), 77–84. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181d1b11e>
- Gillespie, S., & Hawkey, P. M. (2006). *Principles and practice of clinical bacteriology*. John Wiley & Sons.
- Goering, R. V. (2000). Molecular Strain Typing for the Clinical Laboratory: Current Application and Future Direction. *Clinical Microbiology Newsletter*, *22*(22), 169–173. [https://doi.org/10.1016/S0196-4399\(01\)80013-1](https://doi.org/10.1016/S0196-4399(01)80013-1)
- Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, *10*(7), 866–875. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>

- Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., & Denamur, E. (2008). Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: Multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*, *10*(10), 2484–2496. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x>
- Goulet, P., & Picard, B. (1989). Comparative electrophoretic polymorphism of esterases and other enzymes in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, *135*(1), 135–143. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2674323>
- Gritz, E. C., & Bhandari, V. (2015). The Human Neonatal Gut Microbiome: A Brief Review. *Frontiers in Pediatrics*, *3*(March). <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00017>
- Hamelin, K., Bruant, G., El-Shaarawi, A., Hill, S., Edge, T. A., Bekal, S., ... Brousseau, R. (2006). A virulence and antimicrobial resistance DNA microarray detects a high frequency of virulence genes in *Escherichia coli* Isolates from Great Lakes recreational waters. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(6), 4200–4206. <https://doi.org/10.1128/AEM.00137-06>
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M., & Whittam, T. S. (1990). Phylogenetic Distribution of Branched Rna-Linked Multicopy Single-Stranded-Dna Among Natural Isolates of *Escherichia-Coli*. *Journal of Bacteriology*, *172*(11), 6175–6181.
- Hirozumi, K., Nakajima, H., Machida, M., Yamaguchi, M., Takeo, K., & Kitamoto, K. (1999). Cloning and characterization of a gene (*arpA*) from *Aspergillus oryzae* encoding an actin-related protein required for normal nuclear distribution and morphology of conidiophores. *Molecular and General Genetics*, *262*(4–5), 758–767. <https://doi.org/10.1007/s004380051138>
- Jauregui, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., ... Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, *9*(1), 560. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-560>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, *2*(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Lee, J., Hiibel, S. R., Reardon, K. F., & Wood, T. K. (2010). Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *Journal of Applied Microbiology*, *108*(6), 2088–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04611.x>

- Leimbach, A., Hacker, J., & Dobrindt, U. (2013). E. coli as an All-Rounder: The Thin Line Between Commensalism and Pathogenicity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 6(4), 23–27. <https://doi.org/10.1007/82>
- Logue, C. M., Wannemuehler, Y., Nicholson, B. A., Doetkott, C., Barbieri, N. L., & Nolan, L. K. (2017). Comparative analysis of phylogenetic assignment of human and avian ExPEC and fecal commensal Escherichia coli using the (previous and revised) clermont phylogenetic typing methods and its impact on avian pathogenic Escherichia coli (APEC) classification. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00283>
- Magdeldin, S. (2012). *GEL ELECTROPHORESIS – PRINCIPLES AND BASICS*.
- Maurelli, A. T., Fernandez, R. E., Bloch, C. A., Rode, C. K., & Fasano, A. (1998). “Black holes” and bacterial pathogenicity: A large genomic deletion that enhances the virulence of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3943–3948. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3943>
- Mühldorfer, I., & Hacker, J. (1994). Genetic aspects of Escherichia coli virulence. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1006/mpat.1994.1018>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201.
- 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. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000069843.20655.EE>
- Ochman, H., & Selander, R. K. (1984). Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. *Journal of Bacteriology*, 157(2), 690–693. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/157/2/690.short>
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., ... Denamur, E. (1999). The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extraintestinal infection. *Infection and Immunity*, 67(2), 546–553.
- Pupo, G. M., Karaolis, D. K. R., Lan, R., & Reeves, P. R. (1997). Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infection and Immunity*, 65(7), 2685–2692.
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S. A., Mongodin, E. F., Fricke, W. F., Gajer, P., ... Ravel, J. (2008). The pangenome structure of Escherichia coli: Comparative genomic analysis of E. coli commensal and pathogenic isolates.

Journal of Bacteriology, 190(20), 6881–6893. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-08>

Robins-Browne, R. M., Holt, K. E., Ingle, D. J., Hocking, D. M., Yang, J., & Tauschek, M. (2016). Are Escherichia coli Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00141>

Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A., & Prats, G. (2006). Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic Escherichia coli isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 880–886. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01461.x>

Sela, D. A., & Mills, D. A. (2010). Nursing our microbiota: Molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends in Microbiology*, 18(7), 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.03.008>

Serrano García, L. R. (2016). *Determinación de Genes de Virulencia en una Población de Escherichia coli Comensal Aislada de Dos Niños Durante sus Primeros Meses de Vida*. Facultad de Medicina, UNAM.

Surawicz, C. M. (2010). The Microbiota and infectious diarrhea. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 34(SUPPL. 1), S29–S36. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(10\)70018-X](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(10)70018-X)

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207–217. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>

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), 2233–2239. <https://doi.org/0095-1137/>

Torres, a G., & Payne, S. M. (1997). Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Molecular Microbiology*, 23(4), 825–833. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2641628.x>

Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., ... Denamur, E. (2009). Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genetics*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>

- Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2013). Defining the Human Microbiome. *NIH Manuscripts*, 70(Suppl 1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>. Defining
- Vidal, M., Kruger, E., Durán, C., Levine, M., Prado, V., Toro, C., ... Lagos, R. (2005). Single Multiplex PCR Assay to Identify Simultaneously the Six Categories of Diarrheagenic *Escherichia coli* Associated with Enteric Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5362–5365. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5362>
- Watt, S., Lanotte, P., Mereghetti, L., Moulin-schouleur, M., Picard, B., & Quentin, R. (2003). *Escherichia coli* Strains from Pregnant Women and Neonates: Intraspecies Genetic Distribution and Prevalence of Virulence Factors. *Escherichia coli* Strains from Pregnant Women and Neonates: Intraspecies Genetic Distribution and Prevalence of Virulence Fac. *Journal of Bacteriology*, 41(5), 1929–1935. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.1929>
- Yatsuneko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>. Human

Anexo 1: Medios de cultivo y soluciones

- 1) EDTA 0.5 M, pH 8.0
 - a) 186.1 g de EDTA dihidratado
 - b) 800 mL de agua desionizada estéril
 - c) Agitar vigorosamente en agitador magnético y ajustar el pH a 8.0 con NaOH sólido.
 - d) Aforar a 1000 mL con agua estéril.

- 2) Tris 1M
 - a) Pesar 121.14 g de tris base
 - b) Disolver en 500 mL de agua estéril
 - c) Ajustar pH a 8.0
 - d) Aforar a 1000 mL con agua estéril

- 3) Buffer TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)
 - a) 10 mL de Tris 1 M, pH 8.0
 - b) 2mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0
 - c) Aforar a 1000 mL con agua estéril.

- 4) Buffer TBE 5x
 - a) 54 g de Tris Base
 - b) 27.5 g de ácido bórico
 - c) 20 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0
 - d) Aforar a 1000 mL con agua estéril

- 5) Agarosa 1% Seaplaque / 1%SDS (110 mL/gel)
 - a) Pesar 0.75 g de agarosa Seaplaque
 - b) Añadir 47 mL de buffer TE
 - c) Fundir la agarosa y añadir 2.5 mL de solución SDS al 20% m/v
 - d) Disolver y mantener en baño a 50°C hasta su uso

- 6) Buffer de Suspensión celular (CBS)
 - a) 10 mL de Tris 1 M pH 8.0
 - b) 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0
 - c) Aforar a 1000 mL con agua estéril

- 7) Buffer de lisis celular (CLB)
 - a) 50 mL de Tris 1 M pH 8.0
 - b) 100 mL EDTA 0.5 M pH 8.0
 - c) 100 mL Sarcosyl 10% m/v
 - d) Aforar a 1000 mL con agua estéril.

- 8) Caldo Luria (LB)
 - a) Suspender 25 g del medio en 1000 mL de agua destilada
 - b) Agitar suavemente el matraz hasta que el medio se disuelva completamente
 - c) Distribuir en tubos de ensayo de 16x150 mm con tapón de rosca (3 mL por tubo)
 - d) Esterilizar en autoclave 15 min/121°C
 - e) Conservar a 4°C

9) Agar MacConkey

- a) Suspender 50 g del medio en 1000 mL de agua destilada
- b) Hidratar por 15 min
- c) Hervir hasta completa disolución
- d) Esterilizar en autoclave 15 min/121°C
- e) Vaciar en cajas Petri estériles y dejar solidificar
- f) Conservar a 4°C

10) Gelosa especial

- a) Suspender 20 g de base de agar sangre, 15 g de agar bacteriológico y 1.5 g de extracto de carne en 1000 mL de agua destilada
- b) Hervir hasta completa disolución. Ajustar pH a 7.2
- c) Distribuir en tubos de ensayo de 13x75 mm con tapón de rosca (4 mL por tubo)
- d) Esterilizar en autoclave 15 min/121°C
- e) Dejar solidificar en posición inclinada para generar un pico de flauta.
- f) Conservar a 4°C

11) Bromuro de etidio 10mg/mL

- a) 1 g de bromuro de etidio
- b) 100 mL de agua desionizada estéril
- c) Mezclar hasta asegurar la completa disolución
- d) Almacenar a temperatura ambiente en un recipiente oscuro.

Anexo 2: Técnicas empleadas

Procedimiento de extracción de DNA utilizando el kit DNEasy Blood and Tissue de Qiagen®

1. Inocular una asada del cultivo bacteriano en 3 mL de caldo Luria e incubar de 12 a 15 horas (overnight)
2. Colectar en un tubo Eppendorf 1 mL del cultivo y centrifugar a 7500 rpm (5000 g) por 10 minutos
3. Resuspender células en 200 μ L de Buffer ATL
4. Agregar 25 μ L de proteinasa K y 200 μ L de Buffer AL. Mezclar por vortex.
5. Incubar por 30 minutos en un baño a 70°C. Mezclar ocasionalmente.
6. Añadir 200 μ L de etanol absoluto a la mezcla y mezclar por vortex.
7. Vaciar toda la mezcla en una minicolumna; colocarla sobre un tubo de recolección de 2 mL y centrifugar a 8000 rpm (7600 g) por 1 minuto. Desechar el sobrenadante.
8. Agregar 500 μ L de buffer AW1 y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Desechar el sobrenadante.
9. Agregar 500 μ L de buffer AW2 y centrifugar a 14000 rpm (20000 g) por 3 minutos. Desechar el sobrenadante y centrifugar una vez más a la misma velocidad por 1 minuto.
10. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y debidamente etiquetado. Agregar 200 μ L de agua bidestilada al centro de la membrana. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto para colectar el DNA.
11. Repetir el paso 10 incubando por 5 minutos a temperatura ambiente y usando un nuevo tubo Eppendorf.

Amplificación de genes marcadores de Clermont mediante PCR

La amplificación se llevó a cabo con los siguientes parámetros:

Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción para la amplificación de los genes del cuádruplex.

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
Multiplex Mix (Qiagen®)	6.25
Agua	1.25
ArpA1	0.5
AccK	0.5
ChuA1b	0.5
ChuA2b	0.5
YjaA1b	0.5
YjaA2b	0.5
TspE4.C2 1b	0.75
TspE4.C2 2b	0.75
DNA	0.5
Total	12.5

Tabla 8. Preparación de la mezcla de reacción para la determinación de grupo A o C

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
Multiplex Mix (Qiagen®)	7.5
Agua	4.5
TrpA gpC (f)	0.6
TrpA gpC (r)	0.6
TrpBA (f)	0.6
TrpBA (r)	0.6
DNA	0.6
Total	15

Tabla 9. Preparación de la mezcla de reacción para la determinación de grupo D o E

Reactivo	Volumen por reacción (µL)
Multiplex Mix (Qiagen®)	7.5
Agua	4.5
ArpA gpE (f)	0.6
ArpA gpE (r)	0.6
TrpBA (f)	0.6
TrpBA (r)	0.6
DNA	0.6
Total	15

La amplificación se llevó a cabo utilizando el siguiente programa para las tres reacciones:

Tabla 10. Programa de amplificación por PCR de los genes

Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	4 minutos
30	94	5 segundos
	58	20 segundos
	72	40 segundos
1	72	5 minutos
1	4	10 minutos
1	10	∞

Electroforesis de Campos Pulsados (PFGE)

- Lavado y ajuste de densidad óptica

Día 1

1. Una asada del cultivo de las cepas de *E. coli* y de *Salmonella* ser. Braenderup debe inocularse en 3 mL de caldo Luria-Bertani y dejar incubando de 14 a 18 hrs (overnight) a 37°C con agitación de 150 rpm.

Día 2

2. Recolectar las células en un tubo Eppendorf centrifugando durante 2 minutos a 14,000 rpm y desechando el sobrenadante al terminar. Repetir hasta terminar el inóculo.
3. Resuspender células en 500µL de Cell Suspension Buffer (CSB) (apéndice 1) Centrifugar y desechar sobrenadante. Repetir 1 vez.
4. Resuspender células en 200 µL de CSB. Asegurarse de que no queden grumos.
5. En una celda de plástico colocar 1 mL de CSB y agregar 5 µL de la suspensión celular. Agitar bien.
6. En una placa para ELISA colocar 200 µL de la preparación anterior usando CSB como blanco. Esta placa debe leerse en un espectrofotómetro a 620 nm para obtener la densidad óptica de la suspensión.
7. Ajustar la densidad óptica de la suspensión celular original usando la siguiente fórmula, donde Vol. CSB es el volumen de CSB que debe agregarse a la suspensión para alcanzar una densidad óptica de 5

$$(Lectura\ Abs\ x\ 40\ x\ 210) - 210 = Vol.\ CSB$$

8. Una vez ajustada la D.O. a 5, en un nuevo tubo Eppendorf debidamente etiquetado colocar 105 µL de la suspensión y adicionar 195 µL de CSB para un volumen total de 300 µL.

- Preparación de los bloques de agarosa

9. Agregar 15 μL de Proteinasa K (20 mg/ mL) a la suspensión obtenida en el paso 7 y mezclar bien. Colocar los tubos en un baño a 50°C.
10. Fundir agarosa para plugs (apéndice 1) y dejar atemperar a 50°C en el baño. Una vez que tanto los tubos como la agarosa están a la misma temperatura agregar 300 μL de la agarosa a los tubos, mezclando suavemente con la micropipeta.
11. Vaciar la mezcla de células y agarosa en moldes previamente etiquetados e irradiados con luz UV por 3 minutos. Dejar solidificar por 10 minutos a temperatura ambiente o 5 minutos a 4°C. Se obtienen 5 bloques de agarosa por los 600 μL de mezcla.

- Lisis de las células

12. En tubos falcon de 50 mL previamente lavados, irradiados con luz UV por 3 minutos y etiquetados mezclar 5 mL de Cell Lysis Buffer (apéndice 1) y 25 μL de proteinasa K (20 mg/ mL) por tubo. Transferir los plugs a los tubos.
13. Incubar a 54°C overnight.

Día 3

14. Repetir los pasos 11 y 12 una vez.

Día 4

- Lavado de los bloques de agarosa

15. Desechar buffer de lisis usando un trozo de gasa para evitar que los plugs se caigan.

16. Agregar 40 mL de agua estéril a 50°C y dejar en agitación suave por 30 minutos. Desechar agua y repetir 1 vez.
17. Desechar el agua y agregar 50 mL de buffer TE (apéndice 1) a 50°C y colocar en el balancín a velocidad baja durante 1 hora.
18. Desechar buffer y repetir 7 veces para un total de 8 lavados.
19. Para conservación: desechar el buffer de los lavados, agregar 30 mL de buffer TE nuevo y refrigerar.

- Restricción

Para el presente estudio se utilizó la enzima *Xba*I con su correspondiente buffer (Buffer H)

1. En un tubo Eppendorf diluir el buffer H a 1x considerando utilizar 100 µL de buffer por cada fragmento de plug.
2. Cortar los plugs usando un portaobjetos y un cubreobjetos, ambos previamente limpiados con alcohol. Se utilizó ½ plug por carril para tener una concentración adecuada de DNA en la electroforesis.
3. Colocar el fragmento de plug en un tubo Eppendorf, añadir 100 µL de buffer H 1x y dejar atemperar en un baño a 37°C por 30 minutos.
4. En un tubo Eppendorf diluir buffer H a 1x y añadir enzima a 30 U por muestra para tener un total de 100 µL de mezcla por fragmento de plug.
5. Retirar el buffer de los tubos cuidando de no dañar el plug y agregar 100 µL de la mezcla de enzima a cada tubo.
6. Incubar a 37°C overnight.

- Preparación del gel de agarosa para electroforesis
1. Preparar 2400 mL de buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) a 0.5x a partir de TBE 5x
 2. Preparar un gel de agarosa a 1% de la siguiente forma:
 - a. Pesar 1.1 g de agarosa SeaKem Gold
 - b. En un matraz agregar la agarosa y 110 mL del TBE 0.5x preparado. Agitar y calentar hasta que la agarosa esté completamente disuelta.
 - c. Colocar el matraz en un baño a 50°C para atemperar.
 3. Equilibrar adecuadamente el molde para el gel y colocar el peine sobre él. Extraer los fragmentos de plug de los tubos y colocarlos sobre las puntas de los dientes del peine.
 4. Remover el exceso de buffer con un papel filtro y acomodar los plugs de forma que queden colocados en el carril que ocuparán.
 5. Colocar el peine en posición vertical, posicionar adecuadamente los plugs (que toquen la base del molde) y fijar al peine usando una micropipeta y un poco de la agarosa ya preparada. Dejar solidificar.
 6. Vaciar la agarosa en el molde, guardando 1-2 ml para sellar los pozos. Se debe cuidar de no dejar burbujas y que los plugs se mantengan en su sitio. Dejar solidificar.
 7. Retirar el peine cuidando de no arrastrar los plugs y sellar los pozos con la agarosa restante usando una micropipeta.
 8. Equilibrar la cámara de electroforesis, colocar el marco externo del gel y agregar 2.2 L del TBE 0.5x previamente preparado
 9. Encender el módulo refrigerante, el sistema de bombeo y la fuente de energía. Ajustar a 12°C y dejar enfriar.
 10. Colocar el gel de agarosa en la cámara, asegurándose de quitar todos los sobrantes de agarosa alrededor del gel para evitar que se tape la bomba. Iniciar el programa.

- Condiciones de electroforesis

Se utilizó el equipo CHEF Mapper™ de BioRad con el siguiente programa:

Tabla 11. Programa de electroforesis empleado

Gradiente de voltaje	6.0 V/cm
Ángulo incluido	±120°
Switch inicial	2.16 s
Switch final	54.17 s
Tiempo	19:30 hrs
Temperatura	14°C
Factor de escalamiento	lineal

- Documentación de los resultados
 1. Una vez terminada la electroforesis el gel debe teñirse con bromuro de etidio, colocándolo en un contenedor con aproximadamente 300 mL del buffer TBE 0.5 empleado en la electroforesis y 100 µL de una solución de bromuro de etidio 1 mg/mL. Mantener en agitación por 30 minutos.
 2. Fotografiar el gel teñido. En este estudio se utilizó el fotodocumentador Kodak Gel Logic 112; las imágenes se guardaron en formato TIFF para su posterior análisis usando el programa BioNumerics.
 3. La cámara de electroforesis debe drenarse y lavarse con agua destilada por al menos una hora antes de apagarse para evitar acumulación de sales.