



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E.A.P DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**GRUPOS FILOGENÉTICOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE
Escherichia coli AISLADA DE QUESOS ELABORADOS EN EL
DEPARTAMENTO DE CAJAMARCA.**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. WILFREDO ANTONY TAYCA SALDAÑA

ASESOR:

Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO

COASESOR:

Blgo .Mblgo. JUAN JOSÉ COLINA VENEGAS

Cajamarca – Perú

2022

COPYRIGHT ©

WILFREDO ANTONY TAYCA SALDAÑA

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Tayca, S. 2022. **Grupos filogenéticos y diversidad genética de *Escherichia coli* aislada de quesos elaborados en el departamento de Cajamarca/Wilfredo Antony Tayca Saldaña.**

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-Asesor: Blgo .Mblgo. Juan José Colina Venegas

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo – UNC
2022

GRUPOS FILOGENÉTICOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Escherichia coli*
AISLADA DE QUESOS ELABORADOS EN EL DEPARTAMENTO DE
CAJAMARCA

AUTOR: Bach. Wilfredo Antony Tayca Saldaña

ASESOR: Dr. Marco Antonio Tayca Saldaña

CO-ASESOR: Blgo. Mblgo. Juan José Colina Venegas

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo –
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



.....
Presidente

Ronald Fernando Zelada Mazmela



.....
Secretario

Luis Felipe Valdez Nuñez



.....
Vocal

Arturo Ulises Díaz Aliaga

Cajamarca, 2022 – Perú





Av. Atahualpa 1050

Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 11:36 del 28 de octubre del año 2022, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente II -304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Grupos Filogenéticos y diversidad genética de *Escherichia coli* aislada de quesos elaborados en el departamento de Cajamarca", del Bachiller en Ciencias Biológicas : Wilfredo Antony Tayca Saldaña.

Siendo las 12:30 am del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: **APROBADA - BUENO**, con el calificativo de **16**, con lo cual el Bachiller en Ciencia Biológicas se encuentra **APTO** para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Jurado Evaluador:

Presidente: M.Cs. Ronald Fernando Zelada Mázmela

Secretario: M.Cs. Luis Felipe Valdez Nuñez

Vocal: Dr. Arturo Ulises Díaz Aliaga

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Blgo. Mblgo. Juan José Colina Venegas

Presidente

Ronald Fernando Zelada Mazmela

Asesora

Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Secretario

Luis Felipe Valdez Nuñez

Co asesor

Blgo. Mblgo. Juan José Colina Venegas

Vocal

Arturo Ulises Díaz Aliaga

Tesista

Wilfredo Antony Tayca Saldaña

A:

Dedico esta tesis a mi papá, a mi mamá y a mis hermanas, por su apoyo incondicional y motivación.

Agradecimiento

Al Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto (UNC) por su apoyo, confianza y asesoría constante desde la concepción de la idea de investigación, durante todo el proceso de elaboración y finalmente en la redacción de este trabajo.

Al Dr. Marco Antonio Cabrera González (INIA-E.E.A Baños del inca) por la oportunidad otorgada y el apoyo con reactivos y equipos para concretar este trabajo en el laboratorio de biotecnología en sanidad animal.

Al Blgo .Mblgo. Juan Jose Colina Venegas por su apoyo en la realización de este trabajo y en el análisis de datos.

Tabla de contenido

Resumen	xiv
Abstract.....	xv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II	3
MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.2 Bases teóricas	5
2.2.1 Características de <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.2 Grupos filogenéticos de <i>Escherichia coli</i>	6
2.2.3 Orígenes de la diversidad genética	7
2.2.4 Diversidad genética mediante secuencias de ADN repetitivas	8
2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	9
2.2.6 PCR Cuádruplex y REP-PCR	10
2.2.7 Contaminación del queso.....	12
CAPÍTULO III.....	13
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPOTESIS.....	13
3.1 Aislados de <i>E. coli</i> y procedencia	13
3.2 Extracción de ADN genómico.....	14
3.3 Determinación de los grupos filogenéticos	14
3.4 Diversidad genética mediante REP-PCR	16
3.5 Análisis estadístico de los datos	17
CAPÍTULO IV.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 Aislamiento y extracción de ADN de <i>E. coli</i>	18
4.2 Determinación de los grupos filogenéticos	19
4.3 Diversidad genética mediante REP-PCR	21
4.4 Análisis estadístico de los datos	23
4.5 Discusión.....	25
CAPÍTULO V	31
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
5.1 Conclusiones.....	31

5.2 Recomendaciones	31
LISTA DE REFERENCIAS	32
APÉNDICES.....	41
Apéndice 1. Resultados de la medición del ADN en el espectrofotómetro Lambda (PCRmax).....	41
Apéndice 2. Evaluación de las concentraciones y calidad del ADN extraído de <i>E. coli</i> mediante espectrofotometría.	42
Apéndice 3. Perfil térmico de REP-PCR	43
Apéndice 4. Perfil térmico de la PCR cuádruplex	43
Apéndice 5: Análisis estadístico con la prueba de Chi cuadrado utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics v. 26.....	44
ANEXOS	45
Anexo 1. Perfiles electroforéticos de la PCR cuádruplex para asignar los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> (Tomado de Clermont <i>et al.</i> , 2013).....	45
Anexo 2. Preparación de los reactivos para la electroforesis (Sambrook and Russell, 2003).	45

Lista de ilustraciones

Índice de figuras

Figura 1. Colonias de <i>E. coli</i> lactosas positivas reactivada en Agar MacConkey.....	18
Figura 2. Gel de electroforesis de los productos de la PCR cuádruplex. MPM: marcador de peso molecular.....	19
Figura 3. Gel de electroforesis de los productos de la PCR para confirmar el grupo filogenético C. MPM: marcador de peso molecular.....	20
Figura 4. Figura 4. Perfil electroforético de los fragmentos obtenidos mediante REP-PCR .MPM: marcador de peso molecular.....	21
Figura 5. Dendograma de los aislados de <i>E. coli</i> provenientes de muestras de queso, obtenido a partir del perfil electroforético de la REP-PCR utilizando el programa estadístico PAST 4.09, método UPGMA, coeficiente de Jaccard y parámetros por defecto. Con un corte de similitud de 50 % se observa la conformación de 5 grupos.....	22
Figura 6. Frecuencia de los grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> según tipo de queso.	23
Figura 7. Frecuencia de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> según su procedencia.....	24

Índice de tablas

Tabla 1. Aislados reactivados para este estudio según tipo de queso.....	13
Tabla 2. Primers utilizados en la PCR cuádruplex (Clermont et al., 2013).....	15
Tabla 3. Distribución de los grupos filogenéticos y procedencia de los aislados de <i>Escherichia coli</i>	20

Lista de abreviaciones

ADN: ácido desoxirribonucleico

C°: Centígrados

ClMg: cloruro de magnesio

dNTPs: desoxirribonucleótidos libres (adenina-timina, guanina-citosina)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ERIC-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa basada en secuencias de consenso intergénico repetitivo enterobacteriano

ng: nanogramos

mL: mililitro

mM: milimolar

MPM: Marcador de peso molecular

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

REP-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa basada en elementos palindrómicos extragénicos repetitivos

Rpm: revoluciones por minuto

TBE: Tris- borato-EDTA

U: unidad

uv: ultravioleta

μL: microlitros

Glosario

arp A

El gen *arp A* es un regulador de la acetil CoA sintetasa, además es un marcador molecular fuertemente vinculado a cepas de *E. coli que* causan meningitis neonatal (Clermont, Bonacorsi y Bingen, 2004).

Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)

Conjunto de medidas de higiene aplicadas en el proceso de elaboración y distribución de alimentos, destinadas a asegurar su calidad sanitaria e inocuidad. Las BPM se formulan en forma escrita para su aplicación, seguimiento y evaluación (Codex alimentarius, 2009).

Dendograma

Un dendograma o árbol filogenético, es un diagrama que muestra la historia evolutiva entre especies biológicas u otras entidades basadas en sus características genéticas (Carroll *et al.*, 2014).

Fragmento génico TspE4.C2

Gen putativo de la lipasa esterasa. Utilizado para asignar a los aislados de *E. coli* en uno de los grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E y F) (Clermont *et al.*, 2013).

Primers

Los primers son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se quiere amplificar y son complementarios a la misma. Habitualmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia(Becerril Parra *et al.*, 2015).

.

**GRUPOS FILOGENÉTICOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Escherichia coli*
AISLADA DE QUESOS ELABORADOS EN EL DEPARTAMENTO DE
CAJAMARCA.**

Resumen

El queso cajamarquino es ampliamente consumido en la región y otros lugares del país, sin embargo, este producto podría estar contaminado con *E. coli* pero se desconoce la fuente de contaminación y si estos contaminantes bacterianos son patógenos o simples indicadores de mala calidad. Este estudio se enfocó en determinar los grupos filogenéticos predominantes y la diversidad genética de *E. coli* aislada de quesos producidos en el departamento de Cajamarca. Para ello, se reactivaron 49 aislados de *E. coli* obtenidos en un trabajo previo; se extrajo ADN genómico de cada aislado y se hizo una PCR cuádruplex para establecer los grupos filogenéticos y una REP-PCR para determinar la diversidad genética de los mismos. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa y los perfiles de bandas se analizaron en el programa PAST v. 4.03. Se encontró que 33 (67,4 %) de aislados de *E. coli* pertenecerían al grupo filogenético A, 15 (30,6 %) al grupo filogenético C, y solo 1 (2 %) al grupo filogenético B1. Este estudio permitió conocer la diversidad genética y la distribución de grupos filogenéticos, evidenciándose que la mayoría correspondería a aislados comensales con bajo potencial patogénico que provendría fundamentalmente de animales.

Palabras clave: *Escherichia coli*, grupos filogenéticos, queso.

Abstract

Cajamarca cheese is widely consumed in the region and other parts of the country, however, this product could be contaminated with *E. coli* but the source of contamination is unknown and whether these bacterial contaminants are pathogenic or simple indicators of poor quality. This study was focused on determining the predominant phylogenetic groups and the genetic diversity of *E. coli* isolated from cheeses produced in the department of Cajamarca. For this, 49 *E. coli* isolates obtained in a previous study were reactivated; genomic DNA was extracted from each isolate and Quadruplex PCR was performed to establish the phylogenetic groups and a REP-PCR was made to determine the genetic diversity of the same. PCR products were visualized in gel agarose and band profiles were analysed in PAST v. 4.09. It was found that 33 (67, 4%) isolates of *E. coli* would belong to phylogenetic group A, 15 (30, 6%) to phylogenetic group C, and only 1 (2%) to phylogenetic group B1. This study allowed to know the genetic diversity and the phylogenetic group's distribution, showing that the majority could correspond to commensal isolates with low pathogenic potential that would come mainly from animals.

Keywords: *Escherichia coli*, Phylogenetic Groups, cheese

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Cajamarca es uno de los principales departamentos productores de queso del Perú (Ministerio de Agricultura y Riego, 2019), alimento que en gran mayoría es elaborado de manera artesanal (DIGESA-MINSA, 2017), por tanto, es un producto susceptible de contaminación microbiana debido a la falta de implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) durante el proceso de su elaboración (Ruíz, Menco y Chams, 2017). La presencia de *Escherichia coli* en los quesos indica, generalmente, contaminación de origen fecal en alguna de las etapas de su producción y/o comercialización; asimismo, podría estar asociado con la presencia de patógenos intestinales y el riesgo de una infección o intoxicación por el consumo de estos alimentos (Guillen, Millan y Araque, 2014). En el Perú, las investigaciones en cuanto a *E. coli* en quesos son en su mayoría estudios de caracterización microbiológica (Delgado y Torres, 2003; Condo, 2016; Vásquez et al., 2018) donde no se establece si las características de *E. coli* contaminantes corresponden a grupos comensales o virulentos o si existe una o diversas fuentes de contaminación de dicho producto. Por consiguiente se ha planteado que los grupos filogenéticos predominantes de *E. coli* aislados de quesos producidos en el departamento de Cajamarca son A y B1 y la diversidad genética de los aislados es elevada.

La determinación de los grupos filogenéticos a los que pertenecen los aislamientos de *E. coli* se realizó mediante la amplificación de los genes (*chuA*, *yjaA* y *arpA* y el fragmento génico TspE4.C) por PCR y se clasificó en base a los perfiles electroforéticos de Clermont mediante la presencia o ausencia de los genes antes mencionados (Clermont *et al.*, 2013) y la diversidad genética se estableció mediante REP-PCR. Este trabajo fue realizado en el laboratorio de biotecnología en sanidad animal – E.E.A Baños del Inca y en el

laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca. Una de las limitaciones que se presentó fue la falta de un fotodocumentador, para obtener imágenes con una mejor resolución de los geles agarosa y así facilitar su posterior análisis.

La investigación es de diseño no experimental, descriptivo simple, la técnica utilizada fue la observación de los resultados de los análisis de laboratorio teniendo como instrumento una hoja de registro de los resultados de laboratorio.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Guillen y su equipo caracterizaron molecularmente cepas de *E. coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. Analizaron 45 cepas de *E. coli* provenientes de productos lácteos artesanales, de las cuales el 82,2 % fueron ubicadas en el grupo filogenético A y en los grupos B1 y D, con 8,9 % de los aislados cada uno. El grupo filogenético B2 no fue detectado en este estudio. También evaluaron la diversidad clonal de los aislados mediante la tipificación por REP-PCR en la que se demostró una estructura poblacional heterogénea (Guillen, Millan and Araque, 2014).

En un estudio realizado en Brasil, se evaluó la diversidad genética de *E. coli* proveniente de leche pasteurizada procesada en 21 lecherías en el estado noroccidental de Paraná. Las bacterias se analizaron genotípicamente mediante reacción en cadena de la polimerasa del consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (ERIC-PCR) y se reveló una alta diversidad genética, agrupando los 95 aislados bacterianos en 90 patrones genotípicos (Oltramari *et al.*, 2014).

En otro estudio, se analizó 147 muestras de quesos provenientes de cinco estados de Brasil, de las cuales 28 fueron positivos para *E. coli* obteniéndose 39 aislados de esta bacteria; uno de los aislados fue positivo para el gen *eae* y negativo para *bpfA* y *efal/lifA* siendo clasificado como *E. coli* enteropatogénica atípica (EPECa), además, dos aislados fueron positivos para *E. coli* extraintestinal (ExPEC). El aislado EPECa perteneció al serogrupo O: 127 y fue clasificado en el grupo filogenético A y los aislados ExPEC pertenecieron a los serotipos O73:H12 y O644:H8. Estas últimas se ubicaron en el grupo filogenético A y C respectivamente. El 28,2 % del total de *E. coli* fueron ubicadas en el

grupo filogenético A, los grupos C y E tuvieron el 23,1 % de los aislados cada uno, el 15,4 % en el grupo B1 y el 5,1 % en el grupo B2. En este trabajo no se evaluó la diversidad genética de *E. coli* (De Campos *et al.*, 2017).

Otro grupo de investigación logró caracterizar molecular y serológicamente *E. coli* provenientes de quesos artesanales de seis departamentos de Honduras. De 48 aislados obtenidos, el 86 % (n=41) provino de queso semiseco y el resto de queso fresco y seco. Un 58 % (n=28) amplificó macadores para dos patotipos principales *E. coli* enteropatógena (EPEC) (54%) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (46%). El grupo filogenético predominante fue el B1 con un 50 % (n=24), seguido del grupo A con el 21 % (n=10), el grupo C tuvo una frecuencia de 8 % (n=4) y el grupo B2 un 4 % (n=2). Los grupos D, E y el clado 1 tuvieron una frecuencia de 2 % (n=1) cada uno. Un 11 % (n=5) de los aislados no se ubicaron en ninguno de los grupos filogenéticos (Fiallos López *et al.*, 2018).

Por otro lado, Vásquez y su equipo evaluaron la calidad bacteriológica de quesos frescos en la ciudad de Cajamarca. Para ello analizaron 30 muestras provenientes de 6 empresas productoras de queso fresco industrial. Al concluir el proceso de análisis encontraron que el 33,3 % muestras fueron positivas para *E. coli*, sin embargo, no realizaron ningún tipo de caracterización molecular de los aislados de *E. coli* que obuvieron (Vásquez A. *et al.*, 2018).

Finalmente, en Egipto, se evaluó el estado higiénico del queso karish y se determinó los grupos filogenéticos de *E. coli*. Se encontró coliformes termotolerantes en el 65 % de las muestras analizadas y el análisis filogenético reveló que el 88,6 % (124/140) de los aislados de *E. coli* pertenecían al grupo A y el 11,4 % restante (16/140) al grupo B1 (Hammad *et al.*, 2022).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Características de *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, lactosa positivo, indol positivo y usualmente móvil por flagelos peritricos (Chaudhuri y Henderson, 2012). Clasificada dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, esta bacteria fue descrita por primera vez por Theodor Escherich en 1885 (Lim, Yoon y Hovde, 2010). *E. coli* es predominante en la microbiota del tubo digestivo de humanos y animales, donde reside sin afectar la salud de sus hospedadores (Kaper, Nataro y Mobley, 2004). *E. coli* comprende comensales inofensivos así como diferentes variantes patogénicas con la capacidad de causar enfermedades extraintestinales o intestinales en humanos y muchos animales hospedadores (Leimbach, Hacker y Dobrindt, 2013).

Las cepas patógenas intestinales se encuentran divididas en seis grupos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Kaper, Nataro y Mobley, 2004). Estas cepas probablemente se derivaron de cepas comensales tras la adquisición horizontal de genes, así como de operones cromosómicos y extracromosómicos (Tenailon *et al.*, 2010). La presencia de esta bacteria en alimentos es un indicador de contaminación de origen fecal, que en algunas ocasiones pudiera estar acompañada de otros patógenos intestinales debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos y animales (Guillen, Millan y Araque, 2014).

2.2.2 Grupos filogenéticos de *Escherichia coli*

Inicialmente el agrupamiento filogenético de *E. coli* fue en cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D), para ello se desarrolló un método basado en la ausencia o presencia de los genes *chuA* y *yjaA* y el fragmento de ADN TSPE4.C2 mediante PCR, a través de lo cual se pudo asignar las cepas de *E. coli* a uno de cuatro grupos filogenéticos (Clermont, Bonacorsi y Bingen, 2000). Recientemente, el agrupamiento filogenético de *E. coli* se ha revisado basándose en la tipificación de secuencias multilocus (MLST) y los datos de la secuencia del genoma para añadir a los grupos filogenéticos C, E, F y *Escherichia* clado I, que son comparativamente raros en comparación con los principales grupos filogenéticos (A, B1, B2 y D) (Chaudhuri y Henderson, 2012). Un nuevo método basado en una PCR cuádruplex permite clasificar rápidamente las cepas de *E. coli* en uno de los siete grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E, F) sin tener que realizar MLST (Clermont *et al.*, 2013).

El grupo A incluye principalmente a *E. coli* comensales, el grupo filogenético B1 está constituido por una variedad de diferentes patotipos y cepas comensales (Leimbach, Hacker y Dobrindt, 2013). Los grupos filogenéticos B2 y D divergieron simultáneamente, el grupo B2 comprende la mayoría de cepas de *E. coli* extraintestinales (ExPEC) y el grupo filogenético D comprende patógenas extraintestinales en menor medida (Leimbach, Hacker y Dobrindt, 2013). Los resultados de algunos estudios han indicado que *E. coli* pertenecientes a los grupos filogenéticos A y B1, a pesar de que en general presentan una baja virulencia, pueden provocar infecciones extraintestinales, especialmente en pacientes con factores favorecedores de infección (Moreno *et al.*, 2006; Varela, Millán y Araque, 2017). Asimismo, se ha encontrado que las *E. coli* comensales

bovinas son filogenéticamente distintas de las cepas comensales humanas. El linaje asociado a bovinos consiste en cepas que pertenecen a los grupos filogenéticos B1 y A en su gran mayoría y el linaje asociado a humanos consiste principalmente en los grupos filogenéticos B2 y D (Arimizu *et al.*, 2019).

Finalmente, estudios también han indicado que los grupos filogenéticos A y B1 (cepas comensales) presentan un mayor patrón de resistencia a los antibióticos, pero poseen pocos genes de virulencia, mientras que los grupos filogenéticos B2 y D (cepas patógenas) poseen varias islas de patogenicidad y expresan múltiples factores de virulencia como factores de adherencia, pero son más susceptibles a los antibióticos (Saralaya *et al.*, 2015).

2.2.3 Orígenes de la diversidad genética

Las mutaciones son cambios al azar en la secuencia génica que se acumulan a lo largo del tiempo en todas las secuencias de ADN, son una fuente fundamental de la variación natural que impulsa el proceso evolutivo (Fitzgerald y Rosenberg, 2019). La mayoría de las mutaciones son neutras o deletéreas, pero algunas ocasiones pueden resultar beneficiosas, las mutaciones pueden ser generadas por sustituciones, deleciones, inserciones y duplicaciones en el material genético (Madigan *et al.*, 2015). Las duplicaciones producen una copia redundante de un gen que se puede modificar por otra mutación posterior sin perder la función codificada por el gen original por tanto, las duplicaciones permiten la diversificación de las funciones génicas (Madigan *et al.*, 2015).

Por su parte, la recombinación es un proceso por el cual se rompen segmentos de ADN y se vuelven a unir para crear nuevas combinaciones de material genético; además, la recombinación puede causar la reordenación de material genético ya presente en un genoma y también es necesaria para la integración en el genoma de ADN adquirido por transferencia horizontal; en conclusión la mutación y la recombinación causan variaciones en las secuencias génicas y producen nuevos alelo (Madigan *et al.*, 2015).

2.2.4 Diversidad genética mediante secuencias de ADN repetitivas

Los genomas microbianos contienen una variedad de secuencias de ADN repetitivas, que representan hasta el 5% del genoma bacteriano (Ussery *et al.*, 2004). Muchas de estas secuencias repetitivas se han localizado en regiones intergénicas como extragénicas del genoma microbiano (Ishii y Sadowsky, 2009).

Las secuencias repetitivas de ADN palindrómico extragénico (REP), se distribuyen ampliamente entre muchos miembros de bacterias filogenéticamente diversas como *E. coli* (Tobes y Ramos, 2005). Para que una secuencia de ADN se considere REP debe presentar las siguientes características: ser extragénica, palindrómica, presentar una longitud entre 21 y 65 bases y, por último, constituir más del 0,5% del espacio extragénico (Tobes y Ramos, 2005). Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias REP más utilizadas (Castro *et al.*, 2009), para examinar la diversidad genética entre serotipos de *E. coli* estrechamente relacionados, así como entre cepas no relacionadas (Ishii y Sadowsky, 2009). Utilizando este tipo de secuencias (Oltramari *et al.*, 2014), encontraron una alta diversidad genética entre los aislados de *E. coli* provenientes de leche pasteurizada.

Adicionalmente, en el estudio desarrollado por (Pusparini *et al.*, 2018), el análisis de huellas génicas de secuencias REP Y ERIC reveló una amplia diversidad genética entre las cepas de *E. coli* aisladas de sitios de producción de cubitos de hielo.

2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una determinada secuencia de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia diana es copiada fielmente, para ello, se aprovecha la actividad de una enzima llamada ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar ADN de forma natural en las células (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013). Los elementos utilizados en la PCR son el molde de ADN, la enzima ADN polimerasa, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, citosina, timina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺) el cual funciona como un cofactor y generalmente es sulfato de magnesio, una solución buffer y agua (Becerril *et al.*, 2015).

Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Metzker y Caskey, 2009). El equipo en donde se realiza la reacción es el termociclador, el cual está diseñado para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de tiempo y temperatura necesarias no se modifican en cada uno de los ciclos (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013). Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia diana de interés, los productos de PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa mediante la electroforesis (Becerril *et al.*, 2015).

La electroforesis consiste en la separación de moléculas a través de un campo electromagnético, en el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona carga negativa (Becerril *et al.*, 2015). Para la electroforesis se emplea una fuente de energía con un polo negativo y otro positivo, un gel de agarosa, un búffer, además se adiciona un colorante como bromuro de etidio, esta última molécula se intercala en las cadenas de ADN y cuando este es estimulado por la luz UV emite una señal, lo cual permite visualizar la molécula clonada (Lee *et al.*, 2012).

Existen diferentes variantes de la PCR como, la PCR múltiplex la cual consiste en la amplificación simultánea en un único tubo distintas secuencias específicas, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés en una sola reacción (Méndez y Pérez, 2004). Esto implica que los reactivos mezclados y el programa (condiciones de termociclado) utilizado sean adecuados y suficientes para permitir la detección de cada diana y no permita inhibir las demás dianas, con este fin, algunos parámetros, como la concentración de magnesio, de primers, y el tipo y la cantidad de ADN polimerasa, pueden adecuarse experimentalmente (Méndez y Pérez, 2004).

2.2.6 PCR Cuádruplex y REP-PCR

Hace algunos años se validó una nueva metodología para realizar la clasificación de aislados de *E. coli* en diferentes grupos filogenéticos, basándose en el genotipo obtenido mediante una PCR cuádruplex, en la que se detecta los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2. Esto permite asignar inmediatamente a uno de los grupos filogenéticos los aislados de *E. coli* en base a la ausencia o presencia de dichos genes. En la descripción del método se asume que solo los aislamientos con un fenotipo típico de

Escherichia (lactosa positivo, citrato negativo e indol positivo) se analizan mediante este método y se resalta que más del 95% de los aislamientos de *E. coli* pueden asignados correctamente a uno de los grupos filogenéticos (Clermont *et al.*, 2013).

La REP-PCR es una técnica que utiliza cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas que se encuentran distribuidas en el genoma de muchas enterobacterias, así como en algunas bacterias Gram positivas (Castro *et al.*, 2009). El número y la posición de estos elementos difieren entre las cepas de una especie. La técnica detecta directamente cambios en la composición de las bases de nucleótidos y proporciona un método simple, rápido y directo para identificar posibles reordenamientos o cambios de composición en la estructura del genoma bacteriano (Ishii y Sadowsky, 2009). Los productos de PCR que se obtienen se pueden visualizar mediante electroforesis en gel que muestra un patrón de bandas que puede usarse como una huella genómica (Madigan *et al.*, 2015). El análisis de estos patrones se realizan a partir de la construcción de dendrogramas que se construyen en programas bioinformáticos cuyos inputs son los resultados ingresados en una matriz binaria ((Del Toro , Gálvez y Sánchez, 2015)

Un dendograma es un tipo de árbol o diagrama ramificado en el que se muestra las relaciones evolutiva entre taxones, especies biológicas u otras entidades en función de sus características genéticas. Las entidades o especies están unidas por nodos que pueden representar su descendencia de un ancestro común y son más similares genéticamente. Los dendogramas se han utilizado para representar las similitudes y diferencias genéticas entre cepas y variantes de un determinado organismo (Carroll *et al.*, 2014).

Los programas contienen diferentes métodos para la construcción de estos árboles filogenéticos, entre los métodos más utilizados para comparar o agrupar

especies tenemos los métodos basados en distancias como Neighbor Joining (NJ) y UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) (Del Toro , Gálvez y Sánchez , 2015). UPGMA es un método en el que se asume que las especies son grupos por sí mismas, luego relaciona los dos grupos más cercanos basado en la matriz de distancias, recalcula la matriz de distancia y repite el proceso hasta que todas las especies estén conectadas a un único grupo (Pavlopoulos *et al.*, 2010).

2.2.7 Contaminación del queso

El queso puede ser elaborado de manera industrial y artesanal (Ruíz, Menco y Chams, 2017), el queso artesanal es elaborado por la fermentación de leche cruda de bovinos, ovinos y caprinos principalmente, con mano de obra familiar, cuya elaboración está definida por costumbres, gustos o circunstancias ambientales de cada región y utilizando metodologías muy rudimentarias (Merchán *et al.*, 2019). Al producto elaborado de esta forma se le considera microbiológicamente inseguro debido a la posible presencia de patógenos, provenientes ya sea de la leche cruda o por contaminación durante el proceso de manufacturación del queso (Merchán Castellanos *et al.*, 2018). La contaminación del queso artesanal puede deberse a la inadecuada implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) durante el proceso de elaboración del mismo (Arteaga *et al.*, 2021), a la elevada carga microbiana de la materia prima, inadecuadas temperaturas aplicadas en los procesos de pasteurización de la leche, condiciones incorrectas de almacenamiento y transporte, entre otras (Merchán *et al.*, 2019).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPOTESIS

3.1 Aislados de *E. coli* y procedencia

Los aislados de *E. coli* se obtuvieron en un trabajo previo, a partir del análisis microbiológico de muestras de quesos de distinto tipo (Mantecoso y suizo) y que se producen en diversas provincias de Cajamarca; las plantas productoras están ubicadas en Cochán, Tongod, San Pablo, Cutervo y Chota. Los aislados se mantuvieron en refrigeración (4 °C) y congelación (-86 °C) en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Para este trabajo se reactivaron 49 de los aislados (tabla 1) en agar selectivo MacConkey y fueron incubados a 37 °C por 24 horas para verificar la pureza de cada aislado; luego, fueron repicados en agar base e incubados bajo las mismas condiciones antes mencionadas para la extracción de ADN bacteriano.

Tabla 1. Aislados de *E. coli* reactivados para este estudio según tipo de queso.

Nº de aislados	Códigos	Tipo de queso	Procedencia
9	ch11-ch12-ch13-ch14-ch15-ch-16-ch18-ch19-ch20	Mantecoso	Chota
8	to20-to21-to22-to23-to24-to25-to26-to27-to28	Suizo	Tongod
10	co39-co40-co41-co42-co43-co44-co45-co46-co47-co48	Suizo	Cochán
10	cu49-cu50-cu51-cu52-cu53-cu54-cu55-cu56-cu57-cu58	Mantecoso	Cutervo
6	sp1-sp2-sp3-sp4-sp5-sp6	Suizo	San Pablo
6	sp29-sp30-sp31-sp32-sp34	Mantecoso	San Pablo

3.2 Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN bacteriano se empleó el método de shock térmico descrito por Dashti et al. (2009). Se resuspendió 5 colonias provenientes de un cultivo de 18 horas de crecimiento en 200 μL de agua grado molecular. La mezcla se sometió a ebullición por 15 minutos y luego se colocó en congelación (a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 20 minutos, después se centrifugó a 13500 rpm por 8 minutos y se transfirió 100 μL del sobrenadante a un microtubo nuevo. Finalmente se evaluó la cantidad y calidad en un espectrofotómetro Lambda (PCRmax) y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (Dashti et al., 2009).

3.3 Determinación de los grupos filogenéticos

Los aislados fueron clasificados dentro de los grupos filogenéticos (A, B1, B2, C, D, E Y F) utilizando una PCR Cuádruplex (Clermont et al., 2013) y una PCR para confirmar el grupo C (Tabla 2). Para la primera PCR, la mezcla de amplificación tuvo un volumen final de 20 μL y estuvo compuesta por: 4 μL de buffer de reacción (10X), 0.8 μL de CIMg (25 mM), 0.6 μL de dNTPs (2.5 mM), 1 μL de cada primer y 2 μL de los primer *arp* A (ver Tabla 2), 0.2 μL de la Got taq(1 U/ μL), 1.6 μL de agua grado PCR y 2.8 μL del ADN extraído (100 ng/ μL). Las reacciones de PCR siguieron las siguientes condiciones: 1 ciclo de $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de: desnaturalización a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos, hibridación a $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 segundos y extensión a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 segundos; y 1 ciclo de extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos.

Para confirmar el grupo filogenético C se utilizó una reacción de PCR con un par de primers específicos, la mezcla de amplificación tuvo un volumen final de 25 μL y estuvo compuesta por: 5 μL de buffer de reacción (10X), 2 μL de CIMg a (25 mM), 0.5 μL de dNTPs (2.5 mM), 2 μL de cada primer (ver tabla 2),0.15 μL de la Got taq(1 U/ μL),

11.35 μL de agua grado PCR y 2 μL del ADN extraído (100 ng/ μL). Las reacciones de PCR siguieron las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 15 segundos, hibridación a 59 °C por 20 segundos y extensión a 72 °C por 20 segundos; y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 minutos.

Los productos amplificados de todas las PCRs se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR safe al 10%, utilizando TBE 0,5X como buffer de corrida a 100 voltios durante 50 minutos, posteriormente los gels fueron visualizados en el transiluminador de luz UV. Los resultados se interpretaron en base a los perfiles electroforéticos de Clermont (ver anexo 1), mediante la presencia o ausencia de los genes (*chuA*, *yjaA* y *arpA*) y el fragmento génico TspE4.C (Clermont et al., 2013).

Tabla 2. Primers utilizados en la PCR cuádruplex (Clermont et al., 2013).

Tipo de PCR	Primer ID	Gen	Secuencia de Primers	Producto de PCR (pb*)
Cuádruplex	chuA.1b chuA.2	<i>chuA</i>	5'-ATGGTACCGGACGAACCAAC-3' 5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	288
	yjaA.1b 'yjaA.2b	<i>yjaA</i>	5'-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG-3 5'-AATGCGTTCCTCAACCTGTG-3'	211
	TspE4C2.1b TspE4C2.2b	<i>TspE4.C</i> 2	5'-CACTATTCGTAAGGTCATCC-3' 5'-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC-3'	152
	AceK.f ArpA1.r	<i>arpA</i>	5'-AACGCTATTCGCCAGCTTGC-3' 5'-TCTCCCCATACCGTACGCTA-3	400
Para el Grupo C	trpAgpC.1 trpAgpC.2	<i>trpA</i>	5'-AGTTTTATGCCAGTGCGAG-3' 5'-TCTGCGCCGGTACGCCC-3	219

* Pares de bases

3.4 Diversidad genética mediante REP-PCR

La diversidad genética entre los aislados de *E. coli* fue determinada por la amplificación de secuencias repetitivas por PCR a partir de ADN genómico, utilizando los primers REP-1-F: 5'-IIINCGNCGNCATCNGGC-3' y REP-2-R: 5'-NCGNCTTATCNGGGCTAC-3' (Castro *et al.*, 2009).

La mezcla de reacción para la REP-PCR se realizó en un volumen final de 25 μ L, constituida por 5 μ L de buffer de reacción (10X), 2 μ L de ClMg a (25 mM), 1 μ L de dNTPs (2.5 mM), 1.25 μ L de cada primer, 0.35 μ L de la Got taq (1 U/ μ L), 12.15 μ L de agua grado PCR y 2 μ L del ADN extraído (100 ng/ μ L). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 94 °C por 7 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 41.5 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por 5 minutos; y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 8 minutos.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñido con SYBR safe al 10%, utilizando TBE 0,5X como buffer de corrida a 100 voltios durante 70 minutos, posteriormente los geles fueron visualizados en el transiluminador de luz UV y se fotodocumentaron los patrones de bandas para su posterior análisis.

Los patrones electroforéticos obtenidos de REP-PCR fueron transformados a una matriz binaria de ausencia (0) o presencia (1) de bandas. Posteriormente se elaboró un dendograma utilizando una matriz de distancia genética construida con el método UPGMA y el índice de similaridad de Jaccard del programa PAST versión 4.09 con los parámetros establecidos por defecto.

3.5 Análisis estadístico de los datos

Para el procesamiento preliminar de los datos se empleó una hoja de cálculo de Excel (Microsoft 2019). El análisis de asociación de variables cualitativas se realizó con los programas estadísticos R v. 4.2.1 y el IBM SPSS Statistics v. 26, considerando como estadístico de prueba el Chi cuadrado con un nivel de confianza de 95 % y una significancia estadística equivalente a un p-valor $\leq 0,05$.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y extracción de ADN de *E. coli*

Se reactivaron 49 aislados de *E. coli* en Agar MacConkey, todos los aislados mostraron ser lactosa positivos como se puede observar en la figura 1. Es posible que en algunos productos se puedan encontrar aislados de *E. coli* lactosa negativos, los mismos que generalmente se asocian a cepas virulentas (Yaratha, Perloff y Changala, 2017)l). Ocho de los aislados proceden de quesos de Cochán, 10 de quesos de Tongod, 10 de quesos de Cutervo, 9 de quesos de Chota y 12 de quesos de San Pablo.



Figura 1. Colonias de *E. coli* lactosas positivas reactivada en Agar MacConkey.

La concentración de ADN bacteriano obtenido de los aislados de *E. coli* osciló entre 94 y 506 $\mu\text{g/mL}$ con una relación de A260/A280 entre 1.879 y 2.03 (ver apéndice 1 y 2). Las

muestras de ADN analizadas se ajustaron a una concentración de 100 µg/mL. La calidad del ADN extraído fue óptima para los propósitos de este estudio, de acuerdo con lo recomendado en publicaciones especializadas (Gupta, 2019).

4.2 Determinación de los grupos filogenéticos

En la figura 2 se muestra el gel electroforético de los productos de PCR de los genes *arpA* (400 pb), *yjaA* (211 pb) y al fragmento de ADN *TspE4.C2* (152 pb), cuya ausencia o presencia permitió la clasificación de los aislados en los grupos filogenéticos A, C y B1. A algunos de los aislados de *E. coli* se les asignó un grupo preliminar de A o C hasta que se les confirmó su grupo filogenético final después de evidenciar (grupo filogenético C) o no la presencia de una banda del gen *trpA* (219 pb), producto de una PCR secundaria con los primers *trpAgpC.1* y *trpAgpC.2* como se observa en la figura 3. Se encontró que 33 (67,4 %) aislados de *E. coli* pertenecen al grupo filogenético A, 15 (30,6 %) al grupo filogenético C, y solo 1 (2 %) al grupo filogenético B1, como se muestra en la Tabla 3.

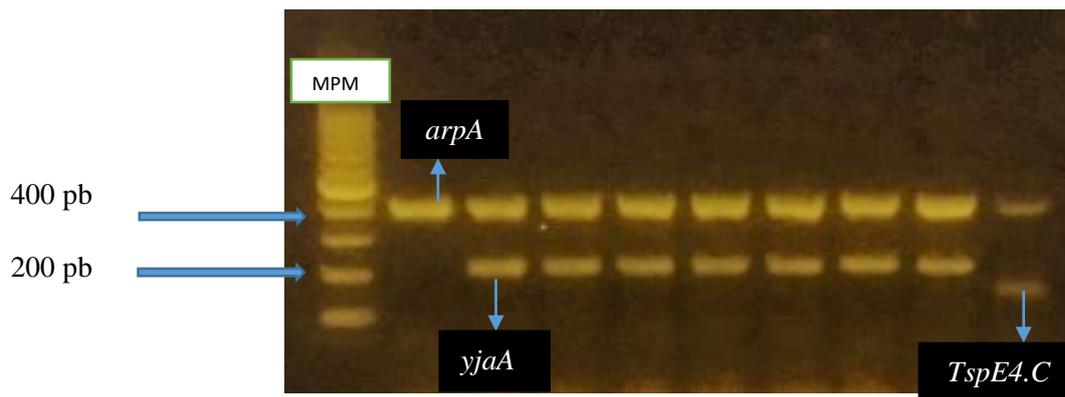


Figura 2. Gel de electroforesis de los productos de la PCR cuádruplex. MPM: marcador de peso molecular.



Figura 3. Gel de electroforesis de los productos de la PCR para confirmar el grupo filogenético C. MPM: marcador de peso molecular

Tabla 3. Distribución de los grupos filogenéticos y procedencia de los aislados de *E. coli*.

Lugar de procedencia	Nº de aislados de <i>E. coli</i>	Grupo filogenético
Tongod	8	A (6)
		C (2)
Chota	9	A (6)
		C (3)
Cutervo	10	A (8)
		C (2)
Cochán	10	A (1)
		C (8)
		B1 (1)
San Pablo	12	A (12)

4.3 Diversidad genética mediante REP-PCR

En la figura 4 se muestra el patrón de bandas del corrido electroforético y el tamaño de los productos amplificados que fueron de 300 a 1500 pb, conformando un grupo de 13 bandas a evaluar: 300, 350, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200 y 1500 pb. Para el análisis de la diversidad genética de los 49 aislados de *E. coli* provenientes de quesos artesanales se establecieron 35 perfiles genéticos en un dendograma construido a partir de los perfiles de bandas utilizando el programa PAST v 4.09, y a partir de asignar un valor de corte de similitud del 50 % como se observa en la figura 5. De los 5 grupos conformados solo el grupo 2 contiene un único aislado (co40). Basados en el dendograma, se demostró que existe una alta diversidad entre los aislados de *E. coli* que contaminan los quesos que se producen en Cajamarca.

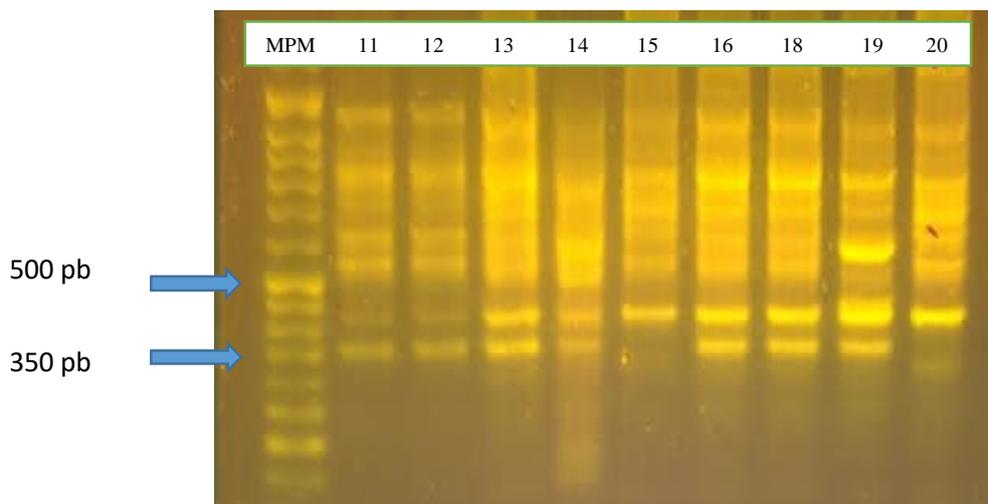


Figura 4. Perfil electroforético de los fragmentos obtenidos mediante REP-PCR .MPM: marcador de peso molecular (100 pb).

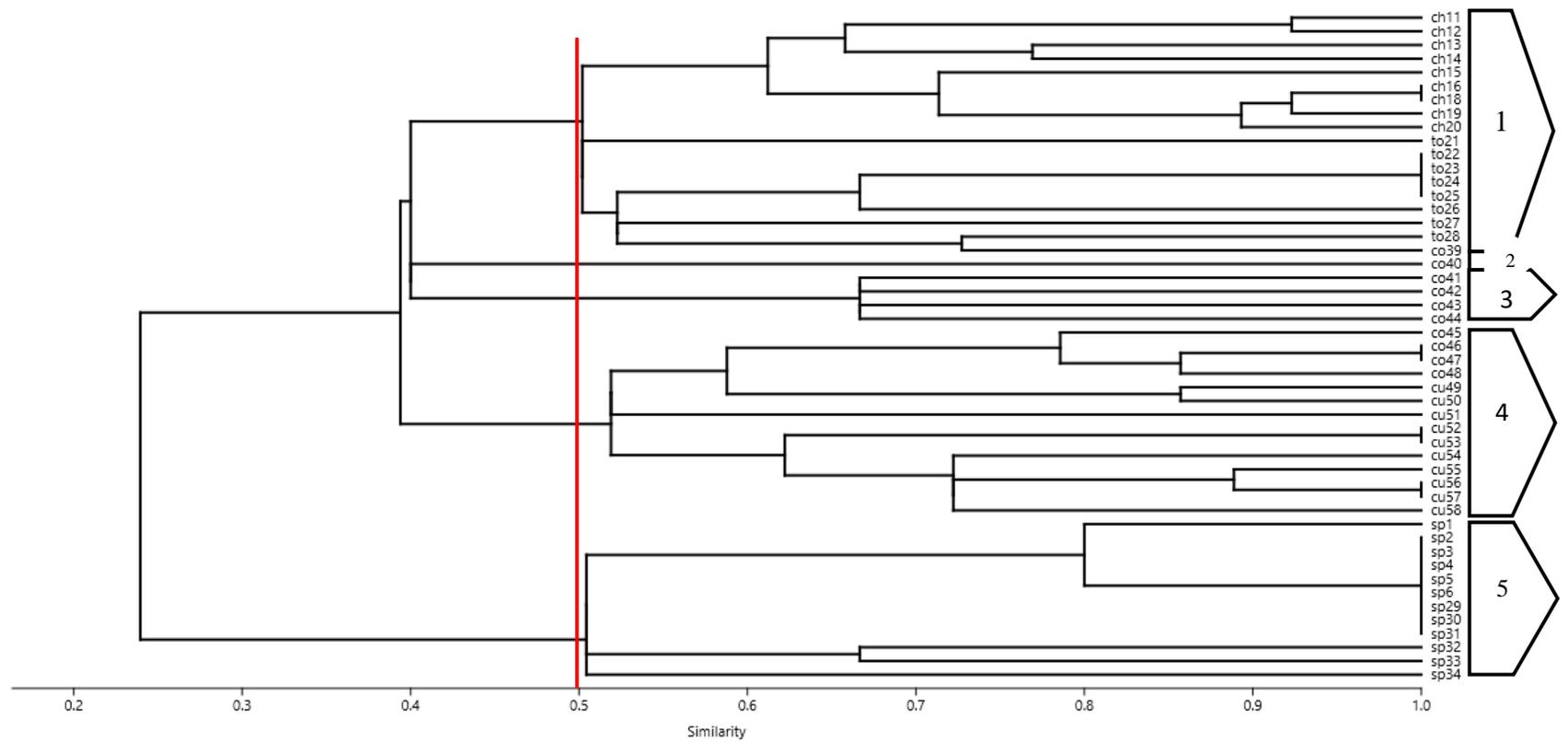


Figura 5. Dendrograma de los aislados de *E. coli* provenientes de muestras de queso, obtenido a partir del perfil electroforético de la REP-PCR utilizando el programa estadístico PAST 4.09, método UPGMA, coeficiente de Jaccard y parámetros por defecto. Con un corte de similitud de 50 % se observa la conformación de 5 grupos.

4.4 Análisis estadístico de los datos

En el análisis de asociación de variables cualitativas, considerando como estadístico de prueba el Chi cuadrado con un nivel de confianza de 95 % y una significancia estadística equivalente a un p-valor $\leq 0,05$, se pudo determinar la relación que tienen los grupos filogenéticos encontrados con el tipo de queso y su procedencia. En la figura 6, se observa que no hay asociación entre el tipo de queso y los grupos filogenéticos, esto significa que independientemente del tipo de queso es posible que estos se contaminen con cualquiera de los grupos filogenéticos bacterianos, dicho de otro modo y de acuerdo al análisis estadístico hecho (con un p-valor = 0,08) ambos tipos de queso (mantecoso y suizo) tienen el mismo riesgo de contaminarse por *E. coli* de los grupos A y C, independientemente. Es importante indicar que el grupo B1 fue excluido, por conveniencia, del análisis estadístico debido a que sólo se encontró un único aislado en un solo tipo de queso.

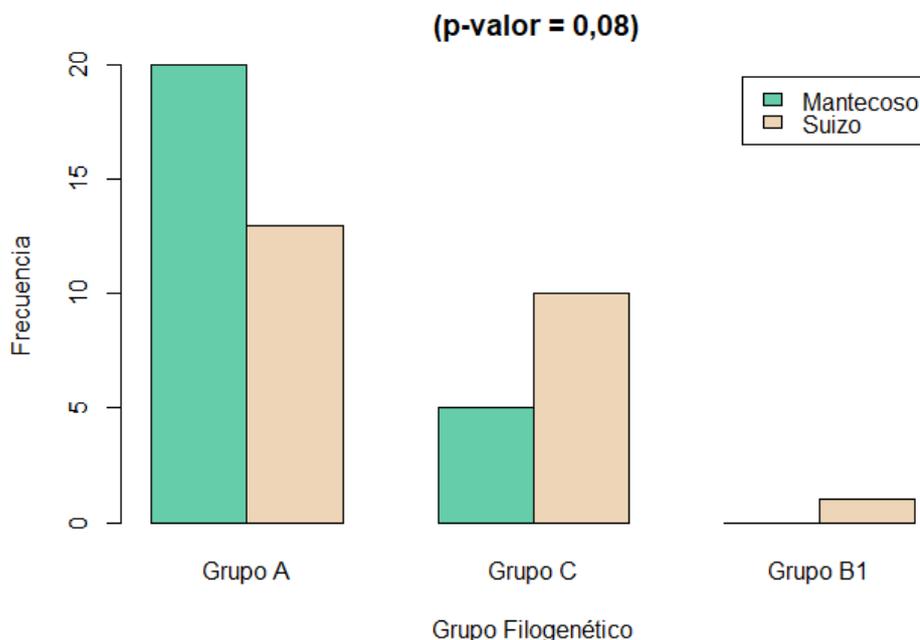


Figura .6 Frecuencia de los grupos filogenéticos de *E. coli* según tipo de queso

En la figura 7, se muestra que el grupo filogenético A es predominante en las muestras de todas las zonas muestreadas excepto Cochán donde predomina el grupo C (ver Apéndice 5). De igual forma, el grupo filogenético B1, aunque se muestra en la figura, no fue considerado para el análisis estadístico, es decir que el p-valor= 0,007 señalado y que es estadísticamente significativo, demostraría que la procedencia del queso si se asocia con los grupos filogenéticos. Aquí es preciso aclarar que durante el análisis estadístico las muestras de Tongod y Cochán fueron agrupadas en una nueva categoría (San Miguel) con la finalidad de ajustar de mejor manera las proporciones y hacerlas comparables (ver el Apéndice 5). Queda claro entonces que se necesita realizar estudios más amplios y profundos para conocer el motivo por el cual hay predominancia de cierto grupo filogenético de *E. coli* en un determinado lugar de producción de queso; esto ayudaría a establecer el origen de la contaminación y tomar medidas más precisas para evitarla.

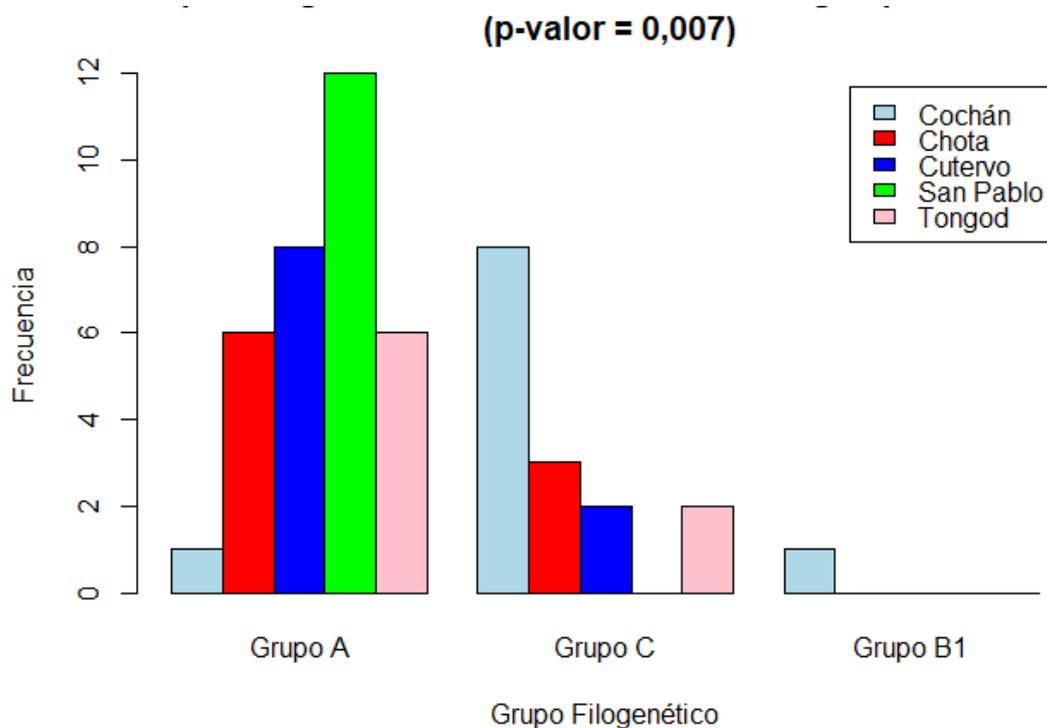


Figura 7. Frecuencia de grupos filogenéticos de *E. coli* según su lugar de procedencia.

4.5 Discusión

E. coli es una bacteria Gram negativa susceptible de alteración genética natural y aleatoria. Diversas bases de datos de acceso público contienen un número importante de genomas completos secuenciados de *E. coli*, en donde se exhiben diferentes tamaños y contenido genético, lo cual demuestra la diversidad existente entre las cepas de esta bacteria, incluso entre las cepas patógenas y/o comensales, es decir, existe una gran variabilidad génica dentro de la misma especie bacteriana (Foster y Pallen, 2022). Las *E. coli* no patógenas pueden actuar como comensales y residentes inocuos del tracto gastrointestinal de humanos y animales, y por otro lado existen variantes patogénicas que pueden causar enfermedades intestinales o extraintestinales, algunas de ellas graves (Santos, Melchior y Moreira, 2020). Ambos tipos bacterianos han sido detectados como contaminantes en diferentes productos alimenticios, incluyendo el queso y otros derivados lácteos (Chaleshtori *et al.*, 2017; Vásquez A. *et al.*, 2018; Hussien *et al.*, 2019).

De los 49 aislados de *E. coli* de este estudio se encontró que los grupos filogenéticos de mayor frecuencia fueron el grupo filogenético A (67,4 %) y C (30,6 %), y en menor frecuencia el grupo filogenético B1 (2 %); estos datos coinciden con lo reportado en un estudio realizado en Brasil donde se encontró que las cepas de *E. coli* pertenecían en su mayoría a los grupos filogenéticos A (28,2 %) y C (23,1 %) (De Campos *et al.*, 2017). Además, en otro estudio realizado en Egipto con muestras de quesos karish, se reportó que la mayoría de aislados de *E. coli* pertenecían al grupo A (88,6 %) y solo algunos eran del grupo B1, pero, a diferencia de nuestro estudio no encontraron el grupo filogenético C (Hammad *et al.*, 2022). Algo importante por resaltar es la predominancia del grupo filogenético A en ambos estudios, lo cual es concordante con lo hallado por nosotros.

Por otra parte, Guillen y su equipo, en un estudio realizado en Venezuela, también reportaron que la mayoría de los aislados *E. coli* (82,2%) se ubicaban en el grupo filogenético A y el 8,9 % se distribuían en los grupos B1 y D. Sin embargo, en este trabajo tampoco se reportó el grupo C, debido probablemente a que solo emplearon la PCR Triplex (Clermont, Bonacorsi and Bingen, 2000) y no cuádruplex como en nuestro estudio y que ha sido desarrollada por otros investigadores (Guillen, Millan and Araque, 2014). Por el contrario, en un estudio realizado en Honduras encontraron que las *E. coli* aisladas de quesos artesanales pertenecían con mayor frecuencia (50 %) al grupo B1, seguido del grupo A (21 %) , el grupo C (8 %) y otros en menor medida (Fiallos López *et al.*, 2018); estos datos difieren con lo encontrado en este trabajo, ya que pese a utilizar la misma técnica, no se detectó otros grupos filogenéticos distintos a los mencionados.

Asimismo, algunos estudios (Moreno *et al.*, 2006; Chakraborty *et al.*, 2015; Amofo *et al.*, 2022; Bong *et al.*, 2022) señalan que los grupos A y B1 corresponden a cepas comensales, las cuales, de acuerdo con la literatura, presentan un bajo potencial de virulencia aun cuando poseen genes de resistencia a los antibióticos (Moreno *et al.*, 2006; Chakraborty *et al.*, 2015; Amofo *et al.*, 2022; Bong *et al.*, 2022); en este trabajo se encontró que la mayoría pertenecían a estos grupos, lo cual podría indicar un menor riesgo para salud de los consumidores de queso aunque probablemente también sean resistentes a algunos de los antimicrobianos, pero este aspecto que no ha sido evaluado en este trabajo.

Por otro lado, una de las posibles fuentes de contaminación del queso producido en Cajamarca podría ser el ganado vacuno de donde se obtiene la materia prima para su

producción, esta afirmación se basa en que los grupos A y B1 están asociados a la microbiota intestinal de bovinos (Carlos *et al.*, 2010; Bong *et al.*, 2022); así mismo, la ausencia de aislados de *E. coli* pertenecientes al grupo filogenético B2 respaldaría la hipótesis de que la fuente de contaminación fecal del queso podría ser de origen animal, debido a que el grupo filogenético B2 es considerado un buen indicador de contaminación fecal humana y se asocia a enfermedades extraintestinales (Chakraborty *et al.*, 2015) y no han sido detectadas en este estudio.

En cuanto al grupo filogenético C, se afirma que este está estrechamente relacionado con el grupo B1 y lo hemos detectado a través de la PCR cuádruplex desarrollada en este trabajo, aunque es frecuente que aparezcan como grupo A cuando se desarrolla una PCR-triplex (Guillen, Millan and Araque, 2014). En realidad hay pocos datos disponibles sobre estas cepas pero se las ha encontrado como comensales en primates no humanos (por ejemplo, la cepa ECOR 70) (Moissenet *et al.*, 2010) y aunque se las ha reportado en algunos alimentos, incluyendo productos lácteos, no se da mayor explicación de su presencia en ellos, aspecto que sería necesario dilucidar con estudios complementarios.

Si bien es cierto, en este estudio la mayoría de aislados se asocian a cepas comensales y no se ha detectado aislados con perfil patógeno, queda claro que la presencia de *E. coli* en los quesos artesanales que se comercializan en Cajamarca refleja las deficiencias en la implementación de las buenas prácticas de manufactura durante la elaboración de este producto tan importante en nuestra región (Ruíz , Menco y Chams , 2017). La implementación y evaluación de procesos de calidad microbiológica no solo garantizarían

la inocuidad del producto sino que mejorarían la productividad y los ingresos de los productores (Arteaga *et al.*, 2021).

En este estudio también se analizó la diversidad genética de *E. coli* entre los aislados provenientes de diferentes lugares de Cajamarca donde se produce queso (Figura 4), esto se hizo mediante el análisis de los perfiles de bandas REP obtenidas por la técnica de REP-PCR, la cual ha demostrado ser una herramienta valiosa para rastrear, identificar, y examinar la diversidad entre los microorganismos desde el punto de vista epidemiológico y ambiental (Ishi y Sadowsky, 2009); así mismo, diferentes estudios han demostrado que tiene un buen poder discriminatorio, como lo describen algunos estudios en Perú y otros lugares, donde reportaron una alta diversidad de *E. coli* en distintos alimentos (Pusparini *et al.*, 2018; Sanchez Villanueva, 2018).

Utilizando la REP-PCR se determinó 35 perfiles de *E. coli*, un valor de corte de similitud del 50 % permitió conformar 5 grupos; el grupo 1 abarca a la mayoría de los aislados, el grupo 2 solo presenta un aislado (co40), el grupo 4 presenta aislados de Cutervo y Cochan (Figura 5); esto demuestra la alta diversidad de los aislados encontrados en queso. Lo antes mencionado concuerda con lo reportado en un estudio realizado en Brasil, donde encontraron alta diversidad entre los aislados de *E. coli* procedentes de leche pasteurizada, sin embargo, solo emplearon secuencias ERIC y no REP como en este trabajo (Oltramari *et al.*, 2014).

La alta diversidad genética encontrada en este estudio puede ser explicada por el hecho de que existen diferentes fuentes de contaminación por *E. coli* antes, durante y después

del proceso de elaboración del queso (Oltramari *et al.*, 2014). En cuanto a la diversidad de esta bacteria, otros estudios, a partir de otro tipo de muestras, como efluentes de aguas grises, demuestran que muestras contaminadas siempre tienen una alta diversidad genética en la población de *E. coli* (Bong *et al.*, 2022). Estos estudios no solo demuestran que la técnica de REP-PCR se puede utilizar para analizar la diversidad genética de diferentes fuentes de aislamiento, sino que a mayor contaminación podría haber mayor diversidad.

Entre los métodos de tipificación molecular, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) generalmente se la considera el Gold Estándar debido a su alta capacidad de discriminación, pero requieren de equipos de electroforesis especiales y mucho más tiempo requerido para analizar los perfiles de bandas de ADN (pulsotipos)(Fernández , López y Pascual , 2013). En comparación con la PFGE, la REP-PCR es la técnica más utilizada por ser menos laboriosa y por no requerir de equipos costosos, además de tener un aceptable nivel discriminatorio y buena reproducibilidad, como lo hemos podido comprobar en este trabajo.

Una limitante en el estudio fue que no obtuvimos datos sobre la susceptibilidad antimicrobiana y los genes de virulencia de los aislados, los cuales hubieran ayudado a comprender mejor si existe o no correlación con las características de los grupos filogenéticos (comensales o patógenos) de *E. coli*. Sin embargo, la información presentada puede ser de utilidad para que se adopten medidas de control y preventivas, por parte de las entidades sanitarias de Cajamarca; dado que además se revela la necesidad de intensificar los controles higiénico-sanitarios en las etapas que conlleva la manufactura

artesanal del producto, para minimizar la contaminación bacteriana. La implementación de medidas que permitan la vigilancia epidemiológica de este tipo de bacterias, potencialmente patógenas, en los quesos de fabricación artesanal que se expenden en la ciudad, son de urgente atención.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se logró determinar los grupos filogenéticos a los que pertenecen los aislados de *E. coli*, en los que se encontró una predominancia del grupo A (67,4 %), también se detectó los grupos filogenéticos C (30,6 %) y en menor medida el grupo B1 (2 %).
- Se encontró una alta diversidad genética entre los aislados de *E. coli* provenientes de quesos, mediante la técnica de REP-PCR.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar un estudio más completo, en el que se analice los posibles genes de resistencia a los antimicrobianos, factores de virulencia y los serotipos asociados a *E. coli*, para ampliar el análisis y comprender mejor el impacto de los grupos filogenéticos sobre la producción de quesos en Cajamarca.
- Se sugiere establecer la diversidad genética utilizando el gold estándar “electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)” para comparar si existen diferencias o no con los resultados obtenidos mediante la REP-PCR.

LISTA DE REFERENCIAS

Amofo, O. Y., Malekar, V., Jones, E. and On, S. L. W. (2022) ‘Antibiotic resistance and phylogenetic profiling of Escherichia coli from dairy farm soils; organic versus conventional systems’, *Current Research in Microbial Sciences*. Elsevier, 3. doi: 10.1016/J.CRMICR.2021.100088.

Arimizu, Y., Kirino, Y., Sato, M. P., Uno, K., Sato, T., Gotoh, Y., Auvray, F., Brugere, H., Oswald, E., Mainil, J. G., Anklam, K. S., Döpfer, D., Yoshino, S., Ooka, T., Tanizawa, Y., Nakamura, Y., Iguchi, A., Morita-Ishihara, T., Ohnishi, M., Akashi, K., Hayashi, T. and Ogura, Y. (2019) ‘Large-scale genome analysis of bovine commensal Escherichia coli reveals that bovine-adapted E. Coli lineages are serving as evolutionary sources of the emergence of human intestinal pathogenic strains’, *Genome Research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 29(9), pp. 1495–1505.

Arteaga Solórzano, R. A., Armenteros Amaya, M., Quintana García, D. and Martínez Vasallo, A. (2021) ‘Evaluación de las buenas prácticas en la elaboración de queso artesanal en Manabí, Ecuador’, *Revista de Salud Animal*, 43(2).

Becerril Parra, D. E., Torres Guerrero, E., Moreno Coutiño, G., Aguilar Sarmiento, A. S., Arenas Guzmán, R. and Hernández Castro, R. (2015) ‘Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus aplicaciones en dermatología’, *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 13(3), pp. 214–219.

Bong, C. W., Low, K. Y., Chai, L. C. and Lee, C. W. (2022) ‘Prevalence and Diversity of Antibiotic Resistant Escherichia coli From Anthropogenic-Impacted Larut River’, *Frontiers in Public Health*. Frontiers Media SA, 10, p. 195. doi: 10.3389/FPUBH.2022.794513/BIBTEX.

- De Campos, A. C. L. P., Puño Sarmiento, J. J., Medeiros, L. P., Gazal, L. E. ., Maluta, R. P., Navarro, A., Kobayashi, R. K. T., Fagan, E. P. and Nakazato, G. (2017) ‘Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in Escherichia coli from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil’, *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(2), pp. 105–122.
- Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I. Z., Gomes, T. A. T., Amaral, L. A. and 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*. BMC Microbiol, 10. doi: 10.1186/1471-2180-10-161.
- Carroll, L. N., Au, A. P., Detwiler, L. T., Fu, T. chieh, Painter, I. S. and Abernethy, N. F. (2014) ‘Visualization and analytics tools for infectious disease epidemiology: A systematic review’, *Journal of Biomedical Informatics*. Academic Press Inc., 51, pp. 287–298.
- Castro Alarcón, N., Alonso Morales, A., Silva Sánchez, J. and Armenta Solís, A. (2009) ‘Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de Enterobacter cloacae productores de β - lactamasas de espectro extendido’, *Bioquimia*, 34(4), pp. 165–174.
- Chakraborty, A., Saralaya, V., Adhikari, P., Shenoy, S., Baliga, S. and Hegde, A. (2015) ‘Characterization of Escherichia coli Phylogenetic Groups Associated with Extraintestinal Infections in South Indian Population’, *Annals of Medical and Health Sciences Research*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 5(4), p. 246. doi: 10.4103/2141-9248.160192.
- Chaleshtori, F. S., Arani, N. M., Aghadavod, E., Naseri, A. and Chaleshtori, R. S. (2017) ‘Molecular characterization of Escherichia coli recovered from traditional milk products

in Kashan, Iran', *Veterinary World*. *Veterinary World*, 10(10), pp. 1264–1268. doi: 10.14202/vetworld.2017.1264-1268.

Chaudhuri, R. R. and Henderson, I. R. (2012) 'The evolution of the Escherichia coli phylogeny', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier, pp. 214–226. doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.005.

Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2000) 'Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group', *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 66(10), pp. 4555–4558.

Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. (2004) 'Characterization of an Anonymous Molecular Marker Strongly Linked to Escherichia coli Strains Causing Neonatal Meningitis', *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 42(4), pp. 1770–1772.

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. and 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), pp. 58–65.

Codex alimentarius (2009) *Higiene de los Alimentos*. Roma.

Cotaquispe Nalvarte, R. Y., Koga Yanagui, Y. and Tinoco Romero, R. (2020) 'Genotipificación y fenotipificación de Gallibacterium sp procedentes de aves de corral con signos clínicos respiratorios', *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4), p. e19019. doi: 10.15381/rivep.v31i4.19019.

DIGESA-MINSA (2017) 'Lineamientos para la elaboración del plan de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) orientado a pequeños productores de queso fresco'. Lima, p. 35.

- Fernández Cuenca, F., López Cerero, L. and Pascual Hernández, Á. (2013) ‘Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier Doyma, 31(SUPPL.1), pp. 20–25. doi: 10.1016/S0213-005X(13)70110-1.
- Fiallos López, J. D., Enriquez, M. D. L., Montoya, B. D. and Navarra Ocaña, A. (2018) ‘Caracterización molecular y serológica de Escherichia coli en Quesos artesanales de seis departamentos de Honduras’, *Portal de la Ciencia*. Latin America Journals Online, (14), pp. 23–40.
- Fitzgerald, D. M. and Rosenberg, S. M. (2019) ‘What is mutation? A chapter in the series: How microbes “jeopardize” the modern synthesis’, *PLOS Genetics*. Public Library of Science, 15(4), pp. 1–14.
- Foster-Nyarko, E. and Pallen, M. J. (2022) ‘The microbial ecology of Escherichia coli in the vertebrate gut’, *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford Academic, 46(3). doi: 10.1093/FEMSRE/FUAC008.
- Guillen, L., Millan, B. and Araque, M. (2014) ‘Caracterización molecular de cepas de Escherichia coli aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela’, *Infectio*. Elsevier Doyma, 18(3), pp. 100–108.
- Gupta, N. (2019) ‘DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction’, *Journal of Cytology*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 36(2), p. 117. doi: 10.4103/JOC.JOC_110_18.
- Hammad, A. M., Eltahan, A., Hassan, H. A., Abbas, N. H., Hussien, H. and Shimamoto, T. (2022) ‘Loads of Coliforms and Fecal Coliforms and Characterization of Thermotolerant Escherichia coli in Fresh Raw Milk Cheese’, *Foods*. MDPI, 11(3). doi: 10.3390/FOODS11030332/S1.

- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A. and Moffett, B. F. (2003) 'Using ecological diversity measures with bacterial communities', *FEMS Microbiology Ecology*. Oxford Academic, 43(1), pp. 1–11. doi: 10.1111/J.1574-6941.2003.TB01040.X.
- Hussien, H., Elbehiry, A., Saad, M., Hadad, G., Moussa, I., Dawoud, T., Mubarak, A. and Marzouk, E. (2019) 'Molecular characterization of Escherichia coli isolated from cheese and biocontrol of shiga toxigenic E. coli with essential oils', *Italian Journal of Food Safety*. Page Press Publications, 8(3), pp. 162–167. doi: 10.4081/ijfs.2019.8291.
- Ishii, S. and Sadowsky, M. J. (2009) 'Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution: Minireview', *Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 11(4), pp. 733–740. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T. (2004) 'Pathogenic Escherichia coli', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 123–140.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. and Kim, Y. H. (2012) 'Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments', *Journal of Visualized Experiments*. Journal of Visualized Experiments, (62), pp. 1–5.
- Leimbach, A., Hacker, J. and Dobrindt, U. (2013) 'E. coli as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity', in *Current topics in microbiology and immunology*. Curr Top Microbiol Immunol, pp. 3–32. doi: 10.1007/82_2012_303.
- Lim, J. Y., Yoon, J. W. and Hovde, C. J. (2010) 'A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157', *Journal of Microbiology and Biotechnology*. NIH Public Access, pp. 1–10.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. and Stahl, D. A. (2015)

Brock. Biología de los microorganismos. 14. edicio.

Méndez Álvarez, S. and Pérez Roth, E. (2004) 'La PCR múltiple en microbiología clínica', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier, 22(3), pp. 183–192.

Merchán Castellanos, N. A., Pineda Gómez, L. M., Cárdenas Parra, A. K., González Neiza, G. N., Otálora Rodríguez, M. C. and Sánchez Neira, Y. (2018) 'Microorganismos comúnmente reportados como causantes de enfermedades transmitidas por el queso fresco en las Américas, 2007-2016', *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 56(1).

Merchán, N., Zurymar T, S., Niño, L. and Urbano, E. (2019) 'Determinación de la inocuidad microbiológica de quesos artesanales según las normas técnicas colombianas', *Revista chilena de nutrición*. SciELO Comision Nacional de Investigacion Cientifica Y Tecnologica (CONICYT), 46(3), pp. 288–294.

Metzker, M. L. and Caskey, C. T. (2009) 'Polymerase Chain Reaction (PCR)', in *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–10. doi: 10.1002/9780470015902.a0000998.pub2.

Ministerio de Agricultura y Riego (2019) *MINAGRI promueve la cadena de producción y mayor consumo de queso peruano*. Available at: <https://www.gob.pe/institucion/minagri/noticias/26977-minagri-promueve-la-cadena-de-produccion-y-mayor-consumo-de-queso-peruano>.

Moissenet, D., Salauze, B., Clermont, O., Bingen, E., Arlet, G., Denamur, E., Mérens, A., Mitanchez, D. and Vu-Thien, H. (2010) 'Meningitis caused by Escherichia coli producing TEM-52 extended-spectrum β -lactamase within an extensive outbreak in a neonatal ward: Epidemiological investigation and characterization of the strain', *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, 48(7), pp. 2459–2463. doi:

10.1128/JCM.00529-10/ASSET/F52850F0-1EF2-4731-ABD4-0E70285F5431/ASSETS/GRAPHIC/ZJM9990999170001.JPEG.

Moreno, E., Prats, G., Planells, I., Planes, A. M., Pérez, T. and Andreu, A. (2006) ‘Caracterización de Escherichia coli de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Ediciones Doyma, S.L., 24(8), pp. 483–489. doi: 10.1157/13092463.

Oltramari, K., Cardoso, R. F., Patussi, E. V., Santos, A. C. B. and Mikcha, J. M. G. (2014) ‘Genetic heterogeneity of Escherichia coli isolated from pasteurized milk in State of Paraná, Brazil’, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Faculdade de Ciências Farmaceuticas (Biblioteca), 50(2), pp. 337–343.

Pavlopoulos, G. A., Soldatos, T. G., Barbosa-Silva, A. and Schneider, R. (2010) ‘A reference guide for tree analysis and visualization’, *BioData Mining*. BioMed Central, 3(1), pp. 1–24. doi: 10.1186/1756-0381-3-1/TABLES/6.

Pusparini, N., Waturangi, D. E., Usia, T. and Nikastri, E. (2018) ‘Genetic diversity of Escherichia coli isolated from ice cube production sites’, *BMC Research Notes*. BioMed Central, 11(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/S13104-018-3737-3.

Ruíz Pérez, R. A., Menco Morales, N. Y. and Chams Chams, L. M. (2017) ‘Valoración microbiológica de queso costeño artesanal y evaluación higiénico-locativa de expendios en Córdoba, Colombia’, *Revista de Salud Pública*. Universidad Nacional de Colombia, 19(3), pp. 311–317.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2003) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory.

Sanchez Villanueva, A. (2018) *Caracterización molecular de factores de virulencia y*

genotipos de Escherichia coli aislada en langostino (litopenaeus vannamei) y camarones de rio (cryphiops caementarius) en terminales pesqueros de Lima metropolitana. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Santos Braz, V., Melchior, K. and Moreira, C. G. (2020) 'Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media SA, 10. doi: 10.3389/FCIMB.2020.548492.

Saralaya, V., Shenoy, S., Baliga, S., Hegde, A., Adhikari, P. and Chakraborty, A. (2015) 'Characterization of Escherichia coli phylogenetic groups associated with extraintestinal infections in South Indian population', *Annals of Medical and Health Sciences Research*. Medknow, 5(4), p. 241.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C. and Velasquillo, C. (2013) 'Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real', *Investigación en Discapacidad, Mediagraphic*, 2(2), pp. 70–78.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B. and Denamur, E. (2010) 'The population genetics of commensal Escherichia coli', *Nature Reviews Microbiology*. Nat Rev Microbiol, pp. 207–217. doi: 10.1038/nrmicro2298.

Tobes, R. and Ramos, J. L. (2005) 'REP code: Defining bacterial identity in extragenic space', *Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 7(2), pp. 225–228.

Del Toro Melgarejo, L., Gálvez Lio, D. and Sánchez Alba, R. (2015) 'Análisis del uso de las bibliotecas gsl y lapack en la construcción de árboles filogenéticos', *Revista Cubana de Ciencias Informáticas*, 9(1), pp. 32–44.

Ussery, D. W., Binnewies, T. T., Gouveia-Oliveira, R., Jarmer, H. and Hallin, P. F. (2004) 'Genome update: DNA repeats in bacterial genomes', *Microbiology*, 150(11), pp. 3519–

3521.

Varela, Y., Millán, B. and Araque, M. (2017) 'Diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud', *Biomédica*, 37, pp. 209–226.

Vásquez A., V., Salhuana, J. G., Jiménez D., L. A. and Abanto Ríos, L. M. (2018) 'Evaluación de la calidad bacteriológica de quesos fresco en Cajamarca', *Ecología Aplicada*. Universidad Nacional Agraria La Molina, 17(1), pp. 45–51.

Yaratha, G., Perloff, S. and Changala, K. (2017) 'Lactose vs Non-Lactose Fermenting *E. coli*: Epidemiology, Clinical Outcomes, and Resistance', *Open Forum Infectious Diseases*. Oxford University Press, 4(Suppl 1), pp. 589–590. doi: 10.1093/OFID/OFX163.1546.

APÉNDICES

Apéndice 1. Resultados de la medición del ADN genómico en el espectrofotómetro

Lambda (PCRmax)

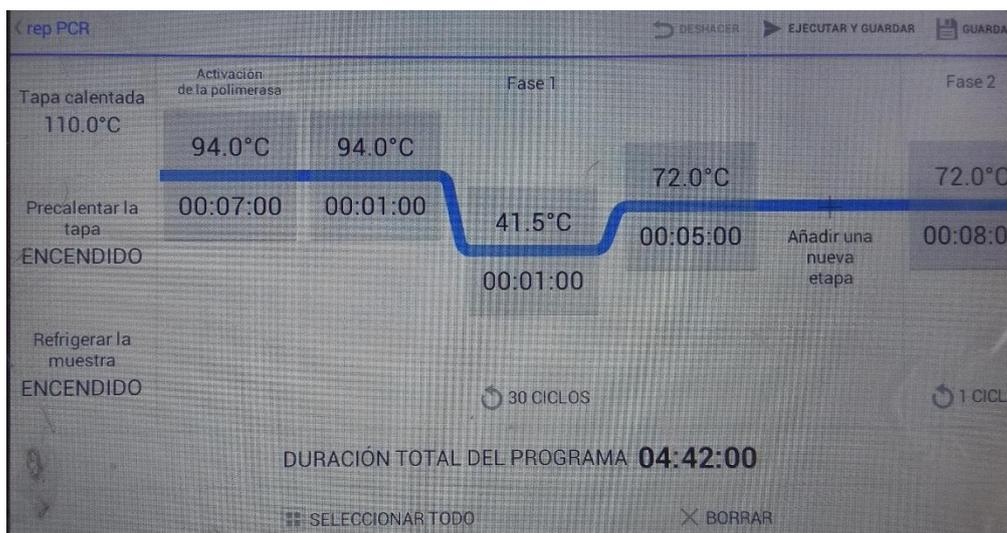


Apéndice 2. Evaluación de las concentraciones y calidad del ADN extraído de *E. coli* mediante espectrofotometría.

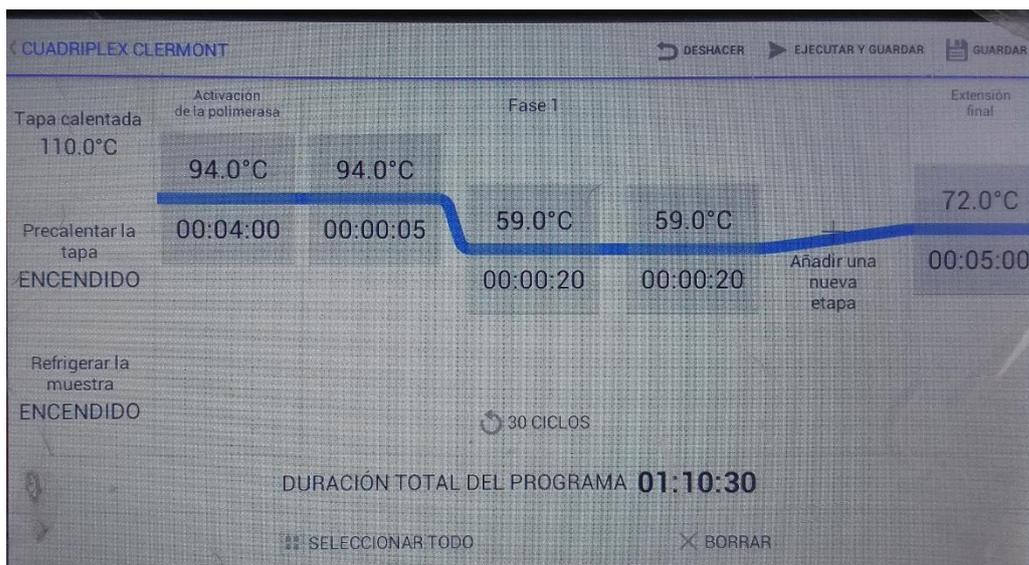
Procedencia	Código	Concentración(µg/ml)	260/280	260/230
Chota	Ch11	262.44	1.893	1.095
Chota	ch12	100.88	2.014	1.42
Chota	ch13	309.66	1.98	1.144
Chota	ch14	212.91	1.882	1.061
Chota	ch15	409.13	1.965	1.185
Chota	ch16	219.64	1.935	1.187
Chota	ch18	126.96	1.906	1.167
Chota	ch19	460.99	2.002	1.242
Chota	ch20	506.9	1.94	1.1
Tongod	to21	304.25	2.016	1.148
Tongod	to22	129.38	1.898	1.163
Tongod	to23	208.9	1.911	1.1
Tongod	to24	190.82	1.945	1.201
Tongod	to25	94.25	1.939	1.136
Tongod	to26	284.38	1.901	1.22
Tongod	to27	342	1.988	1.254
Tongod	to28	219.87	1.951	1.162
Cochán	co39	455.77	1.885	1.143
Cochán	co40	288.46	1.879	1.114
Cochán	co41	123.37	1.925	1.144
Cochán	co42	277.48	2.008	1.297
Cochán	co43	83.31	1.931	1.028
Cochán	co44	401.62	1.941	1.122
Cochán	co45	217.22	1.986	1.185
Cochán	co46	160	2.005	1.243
Cochán	co47	149.54	1.953	1.121
Cochán	co48	434.87	1.974	1.249
Cutervo	cu49	163.47	1.98	1.322
Cutervo	cu50	111.43	1.888	1.115
Cutervo	cu51	377.65	2.03	1.339
Cutervo	cu52	76.895	1.97	1.339
Cutervo	cu53	227.09	2.035	1.225
Cutervo	cu54	373.61	2.013	1.331
Cutervo	cu55	145.77	1.938	1.25
Cutervo	cu56	126.3	1.998	1.334
Cutervo	cu57	198.98	2.00	1.263
Cutervo	cu58	298.42	1.955	1.36
San pablo	sp1	244.23	1.907	1.13
San pablo	sp2	99.307	1.955	1.198
San pablo	sp3	372.44	1.933	1.219
San pablo	sp4	132.38	1.854	0.996
San pablo	sp5	213.96	1.938	1.128

San pablo	sp6	95.118	1.847	1.164
San pablo	sp29	247.04	1.944	1.145
San pablo	sp30	201.84	1.947	1.239
San pablo	sp31	218	1,922	1.098
San pablo	sp32	134.74	1.889	1.101
San pablo	sp33	181.26	1.933	1.124
San pablo	sp34	155.62	1.976	1.137

Apéndice 3. Perfil térmico de REP-PCR



Apéndice 4. Perfil térmico de la PCR cuádruplex



Apéndice 5: Análisis estadístico con la prueba de Chi cuadrado utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics v. 26.

Tabla cruzada Grupo Filogenético de *E. coliProcedencia modificada**

		Procedencia modificada				Total	
		San Miguel	Chota	Cutervo	San Pablo		
Grupo Filogenético de <i>E. coli</i>	Grupo A	Recuento	7	6	8	12	33
		% dentro de Procedencia modificada	41,2%	66,7%	80,0%	100,0%	68,8%
	Grupo C	Recuento	10	3	2	0	15
		% dentro de Procedencia modificada	58,8%	33,3%	20,0%	0,0%	31,3%
Total		Recuento	17	9	10	12	48
		% dentro de Procedencia modificada	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

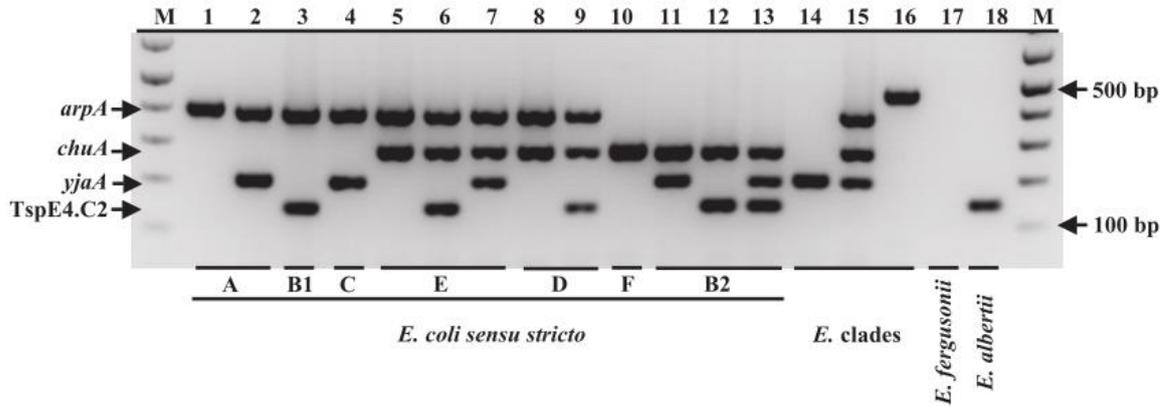
Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	12,078 ^a	3	,007
Razón de verosimilitud	15,124	3	,002
Asociación lineal por lineal	11,709	1	,001
N de casos válidos	48		

a. 3 casillas (37,5%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 2,81.

ANEXOS

Anexo 1. Perfiles electroforéticos de la PCR cuádruplex para asignar los grupos filogenéticos de *E. coli* (Tomado de Clermont *et al.*, 2013).



Nota: en el caso de perfiles idénticos se confirman con primers específicos de gen.

Anexo 2. Preparación de los reactivos para la electroforesis (Sambrook and Russell, 2003).

- **Buffer TBE 10X**

Se añadió 108 g de Tris Base y 55 g de ácido bórico en aproximadamente 800 mL de agua destilada. Luego se agregó 40 mL de 0.5 M EDTA y se enraso el volumen a 1 L y se homogenizó. Generalmente no hay necesidad de ajustar el pH.

- **Buffer TBE 0.5 X**

Se colocó 50 mL de TBE 5X en 450 mL de agua destilada y finalmente se homogenizó. Este es el buffer para la electroforesis de ADN o productos de PCR.