



**Centro de investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
COMO UN MEDIO PARA CONOCER LAS RELACIONES
FILOGENÉTICAS DE *Enterococcus* spp DE POLLO**

Por:

Fernando Pérez Benavides

TESIS APROBADA POR LA

CORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Fernando Pérez Benavides, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Alfonso García Galaz
Director de Tesis



Dra. Maritza Lizeth Álvarez Ainza
Co-directora de Tesis



Dra. Susana María Scheuren Acevedo
Integrante del Comité de Tesis



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Integrante del Comité de Tesis

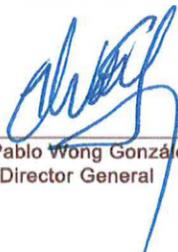
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Importancia de la Caracterización Molecular como un Medio para Conocer las Relaciones Filogenéticas de *Enterococcus* spp. de Pollo” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Fernando Pérez Benavides, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por brindarme la oportunidad de formar parte de su institución y de poder desarrollarme profesionalmente. Gracias por brindarme sus instalaciones para poder concluir mis estudios de maestría.

Gracias a mi director de tesis, Dr. Alfonso García Galaz, por brindarme siempre de su tiempo y su conocimiento, así como su confianza y apoyo para realizar este proyecto. Gracias por ser un asesor que cumplió con mucha eficiencia en todo momento.

Agradezco a los miembros del comité de tesis, Dra. Maritza Lizeth Álvarez Ainza, a la Dra. Susana María Scheuren Acevedo y a la Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort, por la disposición y el interés brindado en este proyecto, así como también por las enseñanzas, sugerencias y aportaciones brindadas con la búsqueda de mi crecimiento personal y profesional.

Agradezco a mis compañeros de maestría a quienes tuve el gusto de conocer a algunos en persona y a otros únicamente de manera virtual, les agradezco por haber hecho estos dos años muy divertidos.

Agradezco a mis amigos Iván Chávez, Carlos García, Jonathan Pérez, Jesús Morán, Saúl Doumerc, Adilene Calderón, Marlene Fimbres por todo el apoyo, motivación brindados durante estos dos años.

Gracias a mi novia Alba Valenzuela, porque siempre creíste en mí, te agradezco también por ser de las personas que más apoyo me brindó en este proceso de maestría. Gracias por estar ahí en los momentos más difíciles, por escucharme y motivarme cuando algo no salía como esperaba, por los consejos y, sobre todo, estoy agradecido contigo por tu paciencia y amor.

DEDICATORIA

A mis padres Cecilia Benavides Duarte y Javier Pérez Herrán, quienes siempre me han apoyado a lo largo de mi vida. Por enseñarme que es importante trabajar por las metas que uno se propone y por estar siempre pendientes a pesar de la distancia. Los amo.

A mis hermanos Paola Pérez Benavides y Javier Pérez Benavides por estar siempre que los he necesitado.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. PRESENCIA DEL GÉNERO <i>Enterococcus</i> EN ALIMENTOS Y LA CRECIENTE PREOCUPACIÓN SANITARIA	14
2.1. Biología del Género <i>Enterococcus</i>	15
2.2. Principales Enfermedades Causadas por el Género <i>Enterococcus</i>	16
2.3. Infección y Toxinas Producidas por Enterococos.....	18
2.4. Resistencia de <i>Enterococcus</i> hacia Antibióticos.....	19
2.4.1. Mecanismos de Adquisición.....	20
2.4.2. Expresión de Resistencia.....	21
2.5. Tendencia Secular en la Resistencia de <i>Enterococcus</i> spp.....	23
3. AREAS DE OPORTUNIDAD DE LAS TÉCNICAS CONVENCIONALES UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE <i>Enterococcus</i> spp	25
3.1. Biotipificación.....	25
3.2. Serotipificación.....	26
4. LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR COMO LA HERRAMIENTA MAS ÚTIL PARA CARACTERIZACIÓN DE ENTEROCOCOS PRESENTES EN ALIMENTOS	28
4.1. Secuenciación.....	28
4.2. Hibridación.....	29
4.3. Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción.....	30
4.4. Análisis de Restricción de ADN Ribosómico Amplificado.....	30
4.5. Amplificación al Azar de ADN Polimórfico.....	31
4.6. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado.....	34
5. HIPÓTESIS	36
6. OBJETIVOS	37
6.1. Objetivo General.....	37
6.2. Objetivos Específicos.....	37

CONTENIDO (continuación)

7. MATERIALES Y MÉTODOS	38
7.1. Obtención y Reactivación de Aislados Bacterianos.....	38
7.2. Extracción de Ácidos Nucleicos.....	38
7.3. Selección de los Iniciadores.....	39
7.4. Electroforesis.....	41
7.5. Análisis Estadístico y Filogenético.....	42
8. RESULTADOS y DISCUSIONES	43
8.1. Reactivación de Aislados Bacterianos.....	43
8.2. Extracción de Ácidos Nucleicos.....	43
8.3. Iniciadores Seleccionados y Programas de Amplificación en PCR para RAPD.....	44
8.4. Relaciones Filogenéticas Utilizando RAPD.....	47
8.5. Relaciones Filogenéticas Polifásicas.....	52
9. CONCLUSIONES	58
10. RECOMENDACIONES	60
11. REFERENCIAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Morfología del género <i>Enterococcus</i> visto con tinción Gram.....	16
2	Representación de los distintos mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos.....	23
3	Representación de una RAPD-PCR.....	33
4	Ejemplo de los patrones electroforéticos obtenidos a partir de la RAPD-PCR utilizando los iniciadores OPX-01 y OPX-03.....	46
5	Dendrograma que agrupa los resultados obtenidos por RAPD-PCR con el iniciador OPX-01.....	49
6	Dendrograma que agrupa los resultados obtenidos por RAPD-PCR con el iniciador OPX-03.....	50
7	Dendrograma que agrupa los resultados obtenidos por RAPD-PCR con el iniciador OPX-01 y OPX-03.....	51
8	Dendrograma que abarca los resultados de las pruebas moleculares RAPD-PCR utilizando los iniciadores OPX-01 y OPX-03 y pruebas de detección de genes de patogenicidad.....	53
9	Dendrograma que abarca los resultados de las pruebas moleculares RAPD-PCR utilizando los iniciadores OPX-01 y OPX-03 y pruebas fenotípicas de fermentación de carbohidratos y pruebas de susceptibilidad a antibióticos....	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Lista de iniciadores OPB y OPX.....	41
2	Porcentaje de polimorfismo presente en los iniciadores OPX-01 y OPX-03.....	47

RESUMEN

El género *Enterococcus* ha sido utilizado a través de los años en distintos procesos de la industria alimentaria. En las últimas décadas se comenzó a asociar este microorganismo con problemas de salud humana considerándose como un patógeno emergente debido a sus capacidades adaptativas y factores de patogenicidad. Actualmente, se sabe que dicho género está presente en animales como el pollo, en los cuales, el mal uso de antibióticos en las granjas de producción ha contribuido a la generación de cepas resistentes. Filogenéticamente se ha observado un incremento en las similitudes de cepas aisladas en animales y cepas nosocomiales. El riesgo potencial de una zoonosis asociada al consumo de pollo contaminada con *Enterococcus* spp, es un riesgo para la salud. El uso de técnicas moleculares permite identificar las similitudes genómicas entre diferentes aislados. Mediante el análisis de conglomerados utilizando los datos de la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), aplicado a 80 aislados de *Enterococcus* spp provenientes de pollo expendido en Hermosillo, Sonora, no se encontró una relación filogenética entre los mismos. Sin embargo, el análisis de conglomerados utilizando RAPD, biotipificación y resistotipo sí permitió encontrar esas relaciones filogenéticas. De esta forma, la caracterización polifásica resultó la más útil para asociar a los aislados entre sí.

Palabras clave: *Enterococcus*, patógeno, RAPD, pollo.

ABSTRACT

The *Enterococcus* genus has been used over the years in different processes within the food industry. In the last decades, this microorganism began to be associated with human health problems, being considered as an emerging pathogen due to its adaptive capacities and pathogenicity factors. Currently, it is known that this genus is present in animals such as chicken, in which the misuse of antibiotics in production farms has contributed to the generation of resistant strains. Phylogenetically, an increase in the similarities between strains isolated in animals and nosocomial strains has been observed. The potential risk of a zoonosis associated with the consumption of chicken contaminated with *Enterococcus* spp is a health risk. The use of molecular techniques allows the identification of genomic similarities between different isolates. Through cluster analysis using data from the random amplification of polymorphic DNA (RAPD) technique, applied to 80 *Enterococcus* spp isolates from chickens sold in Hermosillo, Sonora, no phylogenetic relationship was found between them. However, cluster analysis using RAPD, biotyping, and resistotyping did allow us to find these phylogenetic relationships. In this way, the polyphasic characterization was the most useful to associate the isolates with each other.

Key words: *Enterococcus*, pathogen, RAPD, chicken.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, se han descrito más de 30 especies del género *Enterococcus* consideradas como oportunistas, por su asociación con problemas de la salud humana en casos particulares (Schell *et al.*, 2010). Este género está compuesto por microorganismos ubicuos que habitan el tracto gastrointestinal del hombre y de animales; pueden colonizar diversos nichos ecológicos como vegetales y alimentos de origen animal. Hay que destacar que los alimentos contaminados por microorganismos forman un vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas. Sin embargo, no existen datos que muestren una correlación directa entre el consumo de alimentos con enterococos y los mecanismos directos para el desarrollo de enfermedades (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2017). Las cepas de enterococos con factores de patogenicidad y resistencia a antibióticos transferidas exógenamente al intestino humano a través de alimentos pueden representar un riesgo para personas inmunocomprometidas. Estas cepas pueden provenir de diversos puntos de contaminación a lo largo de la producción, transporte y almacenamiento de los alimentos. El tratamiento profiláctico que se puede establecer si se conocen las similitudes propias de las clonas o bien las diferencias en las mismas, permite establecer apropiadas medidas de control. Es por ello, que la caracterización de cepas de enterococos presentes en alimentos a través de técnicas moleculares es de gran importancia ya que permite conocer si las cepas con factores de patogenicidad tienen relación filogenética o si pertenecen a cepas distintas.

Se dice que la diseminación global de bacterias con resistencia a antibióticos es una amenaza emergente a la seguridad en la industria alimentaria, así como también lo es para la salud pública. Los enterococos, además de poseer resistencia intrínseca a algunos antibióticos tienen una gran capacidad para adquirir mecanismos de resistencia y genes de patogenicidad. Comúnmente, se utilizan métodos fenotípicos en los laboratorios para realizar caracterización microbiológica de especies de enterococos, aunque se sabe que son más propensos a errores, debido a que, las características observadas en los perfiles fenotípicos pueden cambiar según el estrés o factores evolutivos (Sanderson *et al.*, 2019). Sin embargo, las técnicas moleculares han permitido el desarrollo de investigaciones como la de Kasimoğlu Dođru y colaboradores (2009), quienes han encontrado similitudes genéticas entre aquellos enterococos de origen humano y los de origen

animal y la diferenciación de cepas aparentemente inocuas con aquéllas que no lo son, no es sencilla debido a los mecanismos de transferencia horizontal de genes. Al tener muy poca información al respecto se requiere seguir investigando la posible relación entre la procedencia de las distintas cepas patógenas de enterococos.

En la actualidad existen algunos estudios que demuestran la importancia de la implementación de técnicas moleculares como amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés) para la caracterización filogenética del género *Enterococcus*. Hasan y colaboradores (2018), aislaron cepas de *Enterococcus faecalis* a partir de pollo para investigar su potencial zoonótico, al comparar los perfiles filogenéticos obtenidos por RAPD con los perfiles de cepas de origen humano encontraron que estas eran muy similares, indicando la posibilidad de causar zoonosis. De igual manera Hejazi y colaboradores (2019) realizaron un análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado sobre las muestras de enterococo obtenidas a partir de queso y como resultado lograron caracterizar distintas especies del género *Enterococcus* e incluso se propone el descubrimiento de una especie nueva de enterococo. Por lo anterior, se espera encontrar genes que codifican factores de patogenicidad y resistencia a antibióticos y la posible existencia de relación filogenética en nuestras cepas de enterococos provenientes de pollo expedito en la localidad. La finalidad de este trabajo fue reconocer la importancia de la aplicación de técnicas de caracterización molecular como RAPD para determinar la posible asociación filogenética entre las cepas de enterococos aisladas de pollo expedito en comercios de la localidad.

2. PRESENCIA DEL GÉNERO *Enterococcus* EN ALIMENTOS Y LA CRECIENTE PREOCUPACIÓN SANITARIA

El uso de microorganismos en la industria alimentaria se lleva a cabo desde hace miles de años y aunque no se conocía su presencia, estos formaban parte de procesos de fermentación, maduración y conservación de alimentos. Sin embargo, a lo largo de los años han surgido nuevas aplicaciones para los microorganismos en la industria alimentaria, como lo son los probióticos y el uso de microorganismos productores de bacteriocinas, causando efectos benéficos al consumidor como un aporte que vaya más allá del aspecto nutricional del alimento (potencializador del sistema inmune, reducción de niveles plasmáticos de colesterol, entre otros) y mediante las bacteriocinas se consigue evitar el desarrollo de microorganismos patógenos. Cabe hacer mención que los enterococos han sido utilizados tanto como probióticos como agentes productores de bacteriocinas.

Los enterococos en alimentos son utilizados comúnmente durante el proceso de fermentación de productos de origen lácteo (como *Enterococcus casseliflavus* en queso) y de origen cárnico (como *E. faecalis* y *E. faecium* en chorizo) en distintas regiones europeas. Estos alimentos fermentados son posteriormente distribuidos a distintas partes del mundo (Franz *et al.*, 2003). Así mismo, el género *Enterococcus* es utilizado frecuentemente como probiótico debido a que es capaz de estimular el sistema inmune, así como también posee la capacidad de ayudar a la digestión y a mantener una microbiota estable mediante la producción de bacteriocinas de acción selectiva (entre las más comunes la enterocina A y enterocina B) contra microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tyrobutiricum*, entre otros. Por otro lado, la presencia en alimentos de algunas especies de enterococos ha generado controversia a lo largo de los años debido a que, al pertenecer a la microbiota intestinal, suelen ser también indicadores de contaminación fecal (Aarestrup *et al.*, 2002).

Actualmente algunas especies son consideradas como *E. faecalis* y *E. faecium* oportunistas debido a que poseen un potencial para causar enfermedades y es de suma importancia considerar varios factores. Por ejemplo: presencia de factores de patogenicidad, presencia y transferencia de genes de resistencia a múltiples antibióticos (Bonacina *et al.*, 2017). En los últimos años se ha propuesto

caracterizar las cepas del género *Enterococcus* presentes en animales, ya que se ha observado que el uso de antibióticos en granjas de producción de pollo contribuye a la generación de resistencia en varias bacterias, los enterococos entre las mismas. Como producto de estas investigaciones, se conoce que algunas de las cepas de enterococos aisladas a partir de animales comparten cada vez más similitud con aquellas aisladas en hospitales en cuanto a resistencia antimicrobiana y otros factores de patogenicidad, por lo que se teme sobre el potencial zoonótico que pudieran presentar (Hasan y colaboradores, 2018).

2.1. Biología del Género *Enterococcus*

Los enterococos fueron considerados antiguamente parte del grupo D del género *Streptococcus* de acuerdo a la clasificación de Lancefield, debido a las similitudes bioquímicas y morfológicas que presentaban con las bacterias de este género. Fue hasta finales de la década de 1980 que se separaron en su propio género, gracias a la invención de la tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos (Solache y Rice, 2019). El género *Enterococcus* pertenece a la familia *Enterococcaceae* y se compone de bacterias Gram positivas, que son anaerobias facultativas, catalasa negativa, no esporuladas, poseen bajas cantidades de guanina y citosina en su ADN. Además, poseen una forma ovoide y pueden ser encontradas principalmente en pares, formando cadenas cortas y en menor escala como grupos pequeños (Diaz *et al.*, 2010). Las bacterias de este género pertenecen a la familia de bacterias ácido lácticas, debido a que son capaces de producir dicho ácido y a que por lo general se desarrollan a temperaturas desde los 10°C hasta los 45°C; no obstante, la temperatura óptima para su crecimiento reportada es de 35°C. Son capaces de desarrollarse en presencia de hasta 6.5% de NaCl, hidrolizan esculina y pueden soportar concentraciones de sales biliares de hasta un 40% (Gilmore *et al.*, 2014). En la Figura 1 se puede observar la morfología y agrupación del género *Enterococcus*.

Zhong y colaboradores (2017), reportan que el tracto gastrointestinal humano y de mamíferos es el reservorio del género *Enterococcus*, sin embargo, debido a los procesos evolutivos, algunas especies fueron capaces de diseminarse y migrar a otros hospederos como aves y plantas. Cabe

mencionar que gracias a las altas capacidades adaptativas que poseen, es fácil para los enterococos diseminarse hacia otros hábitats poco usuales, lo cual se observa más y más con el paso del tiempo. Dentro de estos hábitats poco usuales donde se describe puede estar presente este microorganismo (aunque en menor medida), se encuentra el tracto gastrointestinal de reptiles y de algunos insectos, así como en el suelo y agua, donde son considerados como contaminantes provenientes de las heces de animales (Aarestrup *et al.*, 2002).

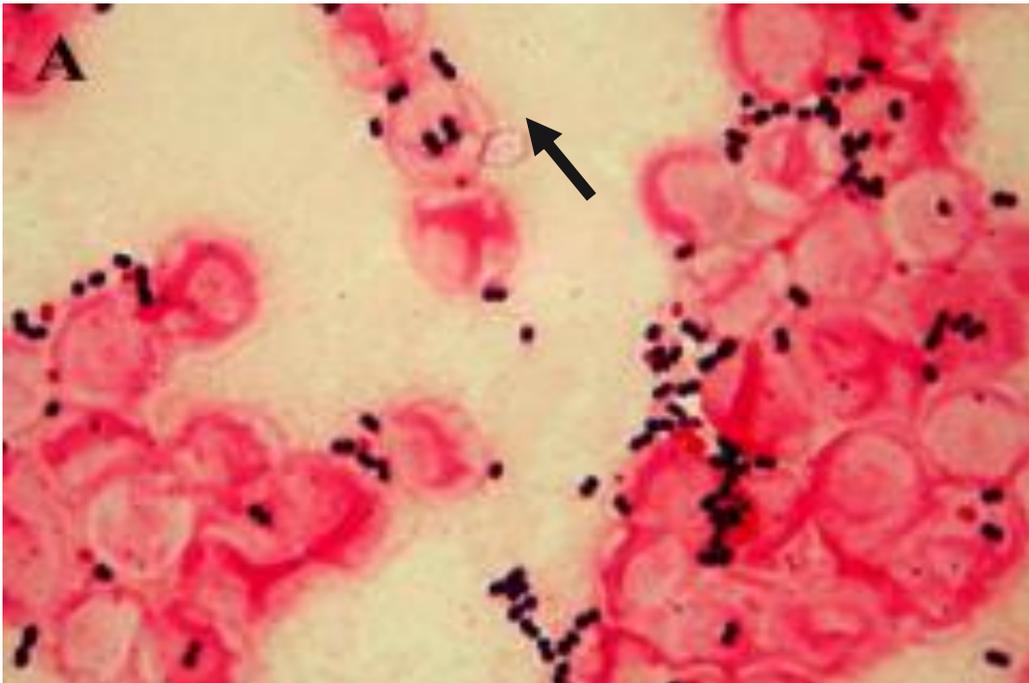


Figura 1. Morfología del género *Enterococcus* visto con tinción Gram sobre medio líquido, en presencia de eritrocitos (células rosas) donde se señalan a través de una flecha color negro los diplococos de color morado característicos de enterococos (Schell, 2018).

2.2. Principales Enfermedades Causadas por el Género *Enterococcus*

Los enterococos son conocidos como uno de los oportunistas asociados a infecciones nosocomiales más comunes ya que su presencia se ha asociado con el uso de catéteres y otros dispositivos propios de terapias invasivas (los cuales llegan a contaminarse), así como con periodos prolongados en las estancias hospitalarias. Sin embargo, el aumento de poblaciones inmunodeprimidas, la habilidad

de los enterococos para adquirir determinantes genéticos relacionados con el desarrollo de resistencia y la adquisición de nuevos factores de patogenicidad, también han sido asociados con las crecientes infecciones nosocomiales por enterococos (Rojas Chávez, 2014). Es posible que cepas de enterococo resistentes de origen animal lleguen a hospitales a través de factores ambientales como fómites y otros vehículos acarreadores como el agua y los alimentos. Entre los alimentos más comúnmente asociados con la presencia de cepas de enterococos se encuentra el pollo. En las granjas de producción de pollo, en muchas ocasiones los enterococos presentes en el tracto gastrointestinal de dichos animales son excretados en altas concentraciones a través de las heces, las cuales al secarse se pueden pulverizar, volatizar y contaminar a los mismos alimentos que consumen, aumentando el recambio entre cepas, produciendo una alta probabilidad de transferencia horizontal de genes relacionados con patogenicidad. Como consecuencia de lo anterior, se ha descrito que las principales infecciones causadas por las cepas patogénicas de este microorganismo son la endocarditis, bacteremia, infecciones en el tracto urinario, así como infecciones intra-abdominales, pélvicas y por último, en menor medida, infecciones en el sistema nervioso central (Moreno *et al.*, 2006; Schell, 2018).

Se considera que los enterococos son la tercera causa más común asociada a endocarditis infectiva en países industrializados, atribuyéndoseles del 9 al 13% de los casos. Cabe destacar que, en los últimos años se ha observado un incremento en los casos de endocarditis infectiva causados por *Enterococcus faecalis* pasando de 15% en el año 2007 hasta un 25.4% en el año 2018 (Escolà-vergè *et al.*, 2021). Por otra parte, estudios realizados por Ursi y colaboradores (2020), indican que existe una asociación directa entre la endocarditis infectiva enterocócica y enfermedades colorectales. Esto es debido a que al pertenecer a la microbiota intestinal de varios animales, los enterococos son capaces de resistir las barreras intestinales y tras colonizar los tejidos (causando severos daños en el tejido) y diseminarse al torrente sanguíneo generándose así una bacteremia y posteriormente en los casos más severos una endocarditis.

El género *Enterococcus* se ve asociado con las infecciones en el tracto urinario principalmente en pacientes hospitalizados que han sido intervenidos con catéter o algún otro procedimiento invasivo. Sin embargo, según la información reportada por Turjeman y colaboradores (2021), los enterococos ocupan el segundo lugar como patógeno del tracto urinario en hospitales después de

Escherichia coli. En el estudio realizado por Goel y colaboradores (2020), se encontró un aumento en la prevalencia de cepas de *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. dispar* y *E. pseudoavium* multiresistentes a antibióticos en pacientes con infección en vías urinarias. Dicho aumento lleva a concluir que las infecciones urinarias causadas por enterococos han ido en aumento debido al manejo desmedido de antibióticos y es necesario que se tomen medidas preventivas sobre el control de los mismos.

Según la información reportada por Lee y colaboradores (2020), las infecciones al sistema nervioso central causadas por enterococos son poco frecuentes; aun así, cabe destacar, que ocupan entre el 0.3% y el 4% de los casos de meningitis bacteriana. Dentro del género, *E. faecium* es considerado el principal causante de meningitis siendo capaz de infectar principalmente a niños generalmente menores a 5 años. De igual manera, los pacientes en estado crítico son susceptibles, ya sea por haber recibido alguna neurocirugía, por haber contraído una bacteremia o bien tras una severa enfermedad pulmonar. Por otro lado, se han descrito infecciones aún menos comunes causadas por *E. gallinarum* que han escalado hasta casos severos de meningitis debido a un mal diagnóstico ya que, por lo general es considerada como una especie con poco potencial de patogenicidad y no se le da la importancia debida (Han *et al.*, 2018).

2.3. Infección y Toxinas Producidas por Enterococos

Para poder generar una infección en el hospedero, es necesario que los enterococos cumplan con una serie de pasos que todos los microorganismos patógenos llevan a cabo. Con el objetivo de llevar a cabo la colonización los patógenos poseen una serie de factores de patogenicidad que trabajan en conjunto para facilitar la tarea de invadir y colonizar. Estos factores se clasifican según la función que desempeñan, por ejemplo; según Chajęcka-Wierzchowska y colaboradores (2017), describen la existencia de factores que permiten la adherencia de las células bacterianas con las membranas mucosas y proteínas de la matriz extracelular de otras células. Otros de estos factores secretados por los enterococos son llamados “destructores de tejido” resultando en la obtención de nutrientes que le permiten al microorganismo continuar con su desarrollo. Y, por último, se

conocen las feromonas sexuales, cuyo nombre se da gracias a la atracción que generan entre una célula receptora y una donadora, cumpliendo con la función de promover la comunicación celular y la transferencia conjugativa de genes.

Aunado a la producción de estos factores de patogenicidad, algunas especies del género *Enterococcus* producen sustancias de carácter proteico llamadas enterocinas cuya función es inhibir el crecimiento de otros microorganismos que puedan representar competencia a los enterococos (Hugas *et al.*, 2003). Esto les brinda ventajas en cuanto a la obtención de nutrientes ya que eliminan a los microorganismos que también intentan colonizar en el mismo sitio que el enterococo. En el trabajo de Padilla y colaboradores (2012), en pacientes hospitalizados con bacteremia, se aislaron cepas de enterococos productoras de enterocinas. El aislamiento de estas cepas puso en alerta sobre el creciente uso que se hacía para algunas cepas de enterococos como probióticos, ya que la producción de enterocinas pudiera ser la responsable del desarrollo de infecciones y pudiera también ser una característica que se transfiera horizontalmente entre las diferentes cepas. Debido a la suposición que las enterocinas son capaces de despejar el epitelio intestinal permitiendo la colonización de especies patógenas, se ha propuesto posponer su uso como probiótico, hasta que se estudie a fondo este fenómeno.

2.4. Resistencia de *Enterococcus* hacia Antibióticos

Hoy en día, una de las principales amenazas hacia la inocuidad alimentaria y a la salud, es la resistencia a antibióticos generada precisamente por el uso inapropiado de los mismos, ya sea por parte de la medicina humana o bien por la administración a largo plazo en granjas productoras de animales de consumo. De manera similar, los alimentos de origen vegetal no están exentos de contribuir al crecimiento de la resistencia a antibióticos, ya que estos pueden contaminarse con bacterias resistentes a antibióticos en varias etapas de su producción. Por ejemplo, los enterococos resistentes a antibióticos forman parte de la microbiota intestinal de muchos animales y es común que estos contaminen frutas y verduras a través de las heces y el agua de riego contaminada con las mismas (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2020). En la investigación realizada por Schell (2018)

se menciona que al día de hoy está prohibido el uso de avoparcina (antibiótico) como promotor del crecimiento en pollo, ya que fue el causante de la emergencia de enterococos resistentes a vancomicina a nivel ambiente, alimentario y en infecciones no hospitalarias.

A partir de la década de 1990, algunas especies de los enterococos pasaron de ser microorganismos comensales a patógenos emergentes y es debido a esto que las infecciones enterocócicas se posicionan entre las primeras diez infecciones adquiridas en hospitales a nivel mundial (Gilmore *et al.*, 2014). En los últimos años han surgido nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos que son fácilmente transferibles, dejando cada vez menos opciones para combatir a los microorganismos patógenos. Es preciso enfatizar que la resistencia a antibióticos puede ser intrínseca, es decir, que la bacteria posea mecanismos naturales para poder defenderse contra los antibióticos. Pero también puede ser que la resistencia sea adquirida mediante diversos mecanismos ampliando las posibilidades de sobrevivir cada vez a un número mayor de antibióticos. Es por eso que gracias a que los enterococos son capaces de presentar resistencia intrínseca a una amplia gama de antibióticos como algunos betalactámicos, se ha demostrado también su resistencia intrínseca a las cefalosporinas, clindamicina, trimetoprim con sulfametoxazol y a aminoglucósidos (Solache y Rice, 2019). El Centro de Control de Enfermedades (CDC) estima que, si para el año 2050 no se disponen de nuevos antibióticos, se producirán aproximadamente 10 millones de muertes anuales a nivel mundial, por infecciones bacterianas multiresistentes (Church y Mckillip, 2021).

2.4.1. Mecanismos de Adquisición de Resistencia a Antibióticos

Existen diversos mecanismos por los cuales las bacterias pueden conseguir material genético exógeno que les brinda la capacidad de generar resistencia a antibióticos que antes no poseían; dichos mecanismos se conocen como transformación, transducción y conjugación. El mecanismo de transformación es aquel en el que la célula bacteriana entra en contacto con fragmentos de ADN exógeno en el ambiente proveniente de otra célula bacteriana muerta y estos fragmentos se integran a su genoma bacteriano, resultando en la adquisición de nuevas características. Por otro lado, la transducción es el mecanismo por el cual una bacteria obtiene fragmentos de ADN de otra bacteria

a través de un fago. Sin embargo, aún no ha habido reportes de bacterias intestinales como los enterococos que diseminaran genes de resistencia a antibióticos por estos mecanismos, aunque de igual manera la información es escasa (Mendoza Medellín, 2011). Por lo tanto, es importante seguir investigando si es posible que esto suceda a nivel intestinal y si puede llegar a representar un riesgo a la población.

Por último, la conjugación bacteriana es un mecanismo bajo el cual los microorganismos pueden intercambiar material genético entre sí mediante el contacto directo. El mecanismo consiste en el contacto celular entre bacterias vivas y es un proceso en el cual se consume energía para llevarse a cabo, el resultado de esto, es la transferencia de plásmidos conjugativos o de transposones conjugativos. Según los reportes de Licht y Wilcks (2006), la transferencia conjugativa en bacterias Gram positivas asociadas al tracto gastrointestinal de varios animales como pollo, cerdo y roedores ha ido en aumento en las últimas décadas. Por otro lado, algunos estudios han demostrado que es posible que una célula donadora perteneciente a una especie transfiera plásmidos conjugativos a un receptor de una especie diferente. Como consecuencia de lo anterior, la preocupación de la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos a especies que no han tenido contacto con antibióticos ha ido en aumento.

2.4.2. Expresión de la Resistencia a Antibióticos

Tras haber adquirido genes de resistencia a antibióticos, las bacterias expresan esta resistencia mediante procesos bioquímicos que llevan a la inactivación, degradación o a la expulsión del antibiótico de la célula bacteriana y estos mecanismos pueden ser activados al mismo tiempo. Uno de los principales retos de los antibióticos es la impermeabilidad de la membrana bacteriana. Este mecanismo es de suma importancia para microorganismos Gram negativos y Gram positivos (como los enterococos). Esto es debido a que algunos antibióticos necesitan atravesarla para llegar al sitio de acción y otros tienen sus sitios de reconocimiento en dicho lugar pero las bacterias son capaces de reorganizar la membrana para evitar el reconocimiento del antibiótico (Troncoso *et al.*, 2017). En caso de que el antibiótico ingrese, otro mecanismo con la finalidad de expulsar al agente

antimicrobiano de la célula, tanto en Gram positivos como Gram negativos es la expresión de bombas de eflujo, que funcionan como proteínas transmembranales que captan al antibiótico tan pronto entra al citoplasma y lo llevan de vuelta al exterior. Mediante este mecanismo se genera resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, betalactámicos, así como a los antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario (Robles-Contreras y Pérez-Cano, 2014).

El mecanismo de inactivación se lleva a cabo mediante enzimas producidas por la bacteria para modificar el antibiótico o en otros casos para degradarlo mediante reacciones de hidrólisis, óxido reducción y transferencia de grupos funcionales. Algunas de estas enzimas producidas son excretadas al ambiente extracelular para inactivar al agente antimicrobiano y otras actúan dentro de la célula misma debido a que necesitan de un cofactor para realizar su función. Como es el caso de las betalactamasas, las cuales son enzimas secretadas que actúan hidrolizando el anillo betalactámico de penicilinas y cefalosporinas, en cambio, las transferasas actúan en el citoplasma catalizando reacciones como N-acetilación o fosforilación para modificar aminoglucósidos, rifampicinas y macrólidos. Džidić y colaboradores (2008), describen que, al día de hoy se sabe que ambos mecanismos enzimáticos son de suma importancia ya que se encuentran presentes en una gran diversidad de bacterias, entre ellas el género *Enterococcus* y son bastante difíciles de eliminar.

De igual manera, uno de los mecanismos más importantes contra la resistencia a antibióticos es la modificación del sitio activo, debido a que muchos agentes antimicrobianos actúan sobre proteínas ribosomales. Los enterococos, entre otros microorganismos, son capaces de sintetizar proteínas que protegen a los ribosomas interactuando con las proteínas ribosomales causando un cambio conformacional en los sitios de unión de antibióticos como las tetraciclinas quienes son posteriormente expulsadas mediante bombas de eflujo (Troncoso *et al.*, 2017). En la Figura 2 se pueden observar en conjunto los mecanismos de resistencia a antibióticos y su distribución.

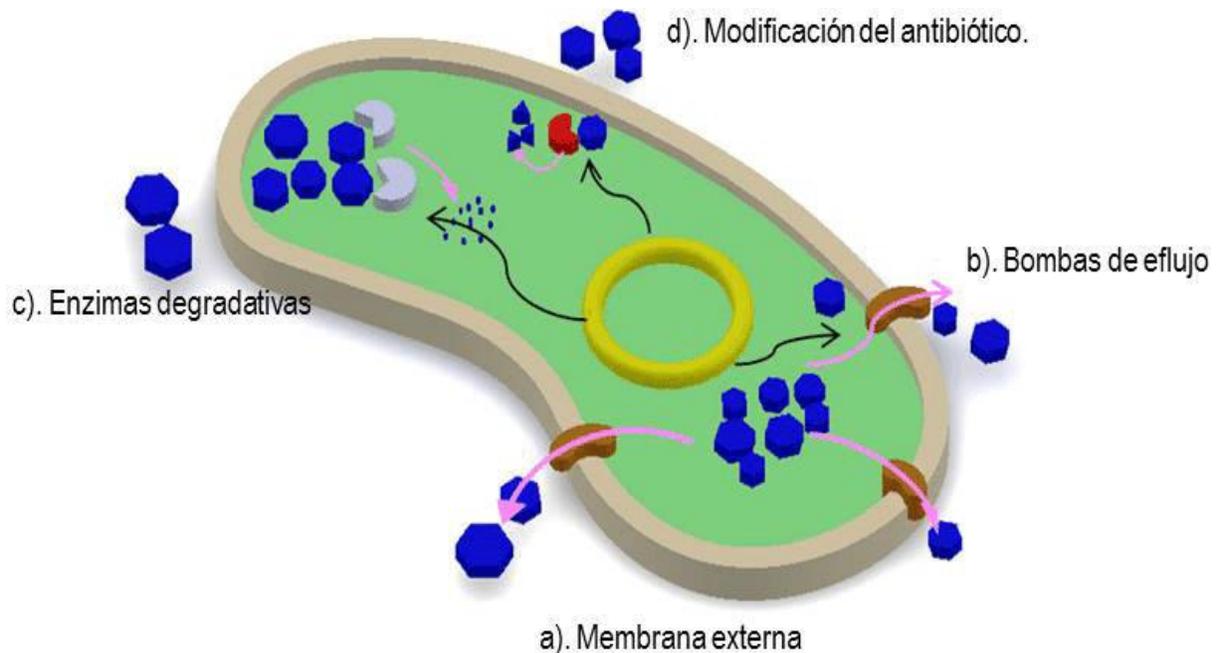


Figura 2. Representación de los distintos mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos donde el inciso a) Representa los cambios en la permeabilidad de la membrana externa. b) Las bombas de eflujo. c) La degradación enzimática del antibiótico y d) la modificación del sitio activo del antibiótico (Loera-Valenzuela *et al.*, 2016).

2.5. Tendencia Secular en la Resistencia de *Enterococcus* spp.

Según los datos publicados por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), el porcentaje de resistencia de *Enterococcus faecalis* a vancomicina en el Reino Unido se ha mantenido entre 0.6% hasta 5.3% en el periodo 2006-2017. Aunque según su último reporte, la prevalencia de estas bacterias resistentes disminuyó hasta el 1.6% en el 2018, posiblemente por un mejor uso en la administración del antibiótico. Por otro lado, la resistencia de *Enterococcus faecium* a vancomicina representa una señal de alarma ya que esta se ha observado que en el periodo 2006-2018 se ha mantenido en porcentajes mayores al 20%. Este mismo seguimiento se llevó a cabo en varios países europeos y en el caso de *E. faecalis* solo presentó un porcentaje de resistencia a vancomicina mayor del 10% en Letonia. En cuanto a *E. faecium* más de 10 países presentan resistencias mayores del 25% siendo posible que se esté llevando a cabo un uso excesivo de este antibiótico ya sea en la industria alimentaria y en el área hospitalaria, aunque también existe la posibilidad que se esté presentando un brote (ECDC, 2018).

La información proporcionada por el CDC (2019), dice que aproximadamente el 30% de las infecciones nosocomiales son causadas por enterococos resistentes a vancomicina. En el 2012 fueron causantes de aproximadamente 84,800 casos de infección en los Estados Unidos, pero gracias al control y apropiado uso de antibióticos y consecuente a eso, estos casos fueron disminuyendo año con año donde, en el 2017, se reportaron cerca de 54,500 casos de infección por este microorganismo en pacientes hospitalizados. Garza-González y colaboradores (2019), describen en su trabajo un seguimiento de la resistencia a antibióticos en 47 centros de salud de 20 estados de México donde se reporta que el 21% de *E. faecium* y *E. faecalis* aislados resultaron resistentes a vancomicina y en el caso de *E. faecalis* se encontró que el 7% de los aislados eran resistentes a linezolid.

3. AREAS DE OPORTUNIDAD DE LAS TÉCNICAS CONVENCIONALES UTILIZADAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE *Enterococcus* spp.

3.1. Biotipificación

La biotipificación consta de la observación de las propiedades fisiológicas y metabólicas que los microorganismos realizan, las cuales suelen ser distintas entre bacterias de una especie y otra, permitiendo su caracterización parcial. El cultivo bacteriano sigue siendo el método de elección primaria ya que permite el aislamiento del microorganismo, para posteriormente poder observar su morfología tanto colonial como bajo microscopio tras realizar algún tipo de tinción. Los métodos de caracterización fenotípica son métodos bastante sencillos de realizar, sin mencionar que son muy accesibles, es por ello que son la primera opción cuando se quiere caracterizar un microorganismo (Smilja Kalenic, 2011). Sin embargo, a pesar de ser métodos muy prácticos, no se debe basar al 100% en los resultados obtenidos por este medio ya que una de las limitantes de esta técnica es el hecho que las bacterias pueden adaptarse y al hacerlo, estas pueden adquirir o perder genes que le permitirán expresar fenotipos diferentes.

Para realizar una caracterización fenotípica de las especies del género *Enterococcus* se realiza principalmente la observación morfológica, las pruebas de fermentación de carbohidratos y pruebas de susceptibilidad a antibióticos (Gilmore *et al.*, 2014). Sin embargo, existen, otras pruebas que permiten ampliar la caracterización al momento de distinguir entre una especie de otras, por ejemplo: prueba de la catalasa, la prueba de hidrólisis de L-pirrolidonil β -naftil-amida (PYR), entre otras. El problema principal de la caracterización fenotípica es que suelen reportarse resultados erróneos debido a la diversidad y heterogeneidad del género y sus características fenotípicas (Schell, 2018). Así mismo, existen otros factores limitantes que hacen que estos métodos sean deficientes, por ejemplo; puede que la cepa a identificar posea genes que no se están expresando cuando se esperaría que lo hicieran y esto puede llevar a una caracterización inapropiada. Por otro lado, tenemos el tiempo que se requiere para la generación de resultados, este tipo de métodos por lo general requieren de días o semanas para poder obtener resultados debido a que se debe

esperar a que el cultivo bacteriano se desarrolle y purifique para así poder trabajar con él, lo cual lleva al consumo de varios días de trabajo.

Ballesteros y Calderón (2018), realizaron pruebas de fermentación de carbohidratos por microplaca y de susceptibilidad a antibióticos por difusión en disco para caracterizar muestras de enterococo provenientes de vísceras de pollo, mismas muestras que se utilizaron en el presente trabajo. Según los datos obtenidos a partir de la fermentación de carbohidratos (sorbosa, lactosa, adonitol, melisitosa, melobiosa, rafinosa, arabinosa, glucosa, galactosa, sacarosa, trealosa, inulina, xilosa, manitol y sorbitol) se encontraron 9 especies pertenecientes al género *Enterococcus*, entre ellas *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. raffinosus*, *E. faecium*, entre otras. En cuanto a las pruebas de susceptibilidad a antibióticos (amikacina, kanamicina, amoxicilina con ácido clavulánico, eritromicina, norfloxacin, nitrofurantoina, imipenem, tetraciclina, vancomicina, ampicilina y estreptomycin) se encontró que la mayoría de las cepas presentaban resistencia a múltiples antibióticos siendo *E. faecium* la especie que mayor resistencia presentó.

Por otro lado, en el trabajo realizado por Sanderson y colaboradores (2019), no fue posible distinguir mediante caracterización fenotípica a dos especies, mismas que si se resolvieron mediante el empleo de caracterización molecular: *Enterococcus casseliflavus* y *Enterococcus gallinarum*. Con este trabajo se mostró que las técnicas moleculares son una herramienta apropiada para la caracterización, por lo cual se deben buscar adaptar estos tipos de métodos como herramientas de caracterización para estos microorganismos.

3.2. Serotipificación

Los métodos de caracterización serológica son principalmente utilizados para fines epidemiológicos. Sin embargo, tienen otras aplicaciones que permiten conocer el diagnóstico de infecciones por microorganismos que no se pueden cultivar o también para conocer el estado inmunitario de un individuo o población previo a una vacunación. Estos métodos se basan en la búsqueda de antígenos que poseen los microorganismos o bien se puede realizar de manera

indirecta buscando los anticuerpos que se generan para contrarrestar dichos antígenos (García-Bermejo y de Ory, 2017). Para llevar a cabo estas interacciones antígeno-anticuerpo se han desarrollado una gran cantidad de técnicas que hoy en día se siguen utilizando debido a que son bastante prácticas y muy accesibles. Entre ellas se han desarrollado técnicas de precipitación, ensayos de aglutinación, fijación del complemento, coagulación, inmunofluorescencia, radioinmunoensayos, entre otros (Guzmán Urrego y Bernal Rivera, 1999).

La aplicación de técnicas serológicas para la caracterización de enterococos ha quedado en el pasado debido a que estos microorganismos poseen mucha similitud con los estreptococos del grupo D de Lancefield, tanto así que los enterococos pertenecían al género *Streptococcus* en el pasado hasta la aparición de la secuenciación (Domig *et al.*, 2003). La automatización de las técnicas serológicas ha permitido la obtención de resultados de manera más rápida y confiable, aunque la caracterización microbiológica no se debe basar solo de la realización de estas pruebas ya que, como toda prueba de laboratorio, estas tienen sus limitaciones. Además del tiempo que puede llegar a tardar para obtener resultados fiables, existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos o falsos negativos, es por esto que los resultados deben ser tomados como una guía y posteriormente realizar otro tipo de pruebas más específicas y sensibles. En el trabajo realizado por García (2009), se menciona que a pesar de la mejora en los métodos de serotipificación, aun así, esta metodología se ve desplazada por los métodos de biología molecular. Esto se ha visto especialmente por la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) debido a su alta especificidad y sensibilidad, por lo que se espera que en el futuro por lo menos en el caso de los enterococos, la caracterización serológica se utilice únicamente en casos especiales, principalmente de índole epidemiológica.

4. LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR COMO LA HERRAMIENTA MÁS ÚTIL PARA CARACTERIZACIÓN DE ENTEROCOCOS PRESENTES EN ALIMENTOS

La utilización de métodos microbiológicos clásicos generalmente implica un cultivo apropiadamente aislado y purificado. Posteriormente la aplicación de pruebas morfológicas, bioquímicas y serológicas, las cuales pueden extender el trabajo de caracterización de microorganismos desde días hasta semanas (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014). Mediante el avance de las técnicas moleculares, se ha logrado analizar la diversidad microbiana a través del uso de métodos que permiten obtener información más precisa de los genomas bacterianos. El uso de marcadores moleculares, es al día de hoy un recurso de alto valor en el área de la genética debido a que permiten distinguir entre genotipos. Cabe mencionar que a lo largo de las últimas cuatro décadas se ha ido mejorando la resolución de los marcadores moleculares, particularmente los marcadores de ADN gracias a los avances conseguidos en las técnicas de reacción en cadena de polimerasa, secuenciación e hibridación (Grover y Sharma, 2016).

4.1. Secuenciación

Esta técnica surge en 1977 por Maxam y Gilbert con un método químico, sin embargo, a su vez surge el método enzimático de secuenciación de Sanger; con la diferencia que el primero se basa en el rompimiento de la cadena de ADN mediante agentes químicos y el otro se basa en una replicación controlada. La finalidad de estos métodos es el de conocer el ordenamiento de las bases nitrogenadas (estructura primaria) en una secuencia o fragmento de ADN (Márquez *et al.*, 2014). A lo largo de los años las técnicas de secuenciación han ido evolucionando hacia métodos automatizados y métodos que ya no dependen de electroforesis, permitiendo reducir los problemas que las técnicas originales presentaban. Gracias a la implementación de fluorescencia y a la automatización, fue posible pasar de secuenciacines de genomas que tardaban meses, a secuenciacines de horas y menos costosas. La secuenciación de ácidos nucleicos es considerada a la fecha como el estándar de oro de la biología molecular ya que permite un conocimiento de la

estructura primaria de los nucleótidos (con las bases nitrogenadas correspondientes) en los ácidos nucleicos implicados en los diferentes procesos celulares, así como la composición de mapas cromosómicos (Meda Gómez *et al.*, 2013).

Abad-Guamán y colaboradores (2017) fueron capaces de obtener un amplio conocimiento acerca de la composición de la microbiota intestinal del pollo en diferentes etapas de crecimiento a través del uso de secuenciación del ARN ribosomal 16S y observaron la presencia del género *Enterococcus* en la mucosa ileal a partir de los 7 días en la fase inicial de crecimiento del pollo, así como en el buche y en el intestino delgado en etapas ya desarrolladas. Gracias a esta información, no solo se puede obtener una visión de la composición de la microbiota, sino que también es posible observar la relación que existe entre los microorganismos con procesos metabólicos.

4.2. Hibridación

El fundamento de este método se basa en el apareamiento reversible de hebras de ácidos nucleicos, dichas hebras pueden ser separadas mediante la aplicación de calor o agentes alcalinos para romper los puentes de hidrógeno formados entre las bases complementarias. Según Franco (2013), la hibridación *in situ* es una de las principales técnicas utilizadas en la biología molecular ya que, al agregar un marcador a las hebras de ácido nucleico, es posible determinar la expresión en tejidos individuales y heterogéneos de manera específica. Por otro lado, Domig y colaboradores (2003), indican que el uso de sondas para genes codificados en el ARN ribosomal permite realizar identificación de microorganismos debido a que este ARN posee una gran cantidad de regiones conservadas. Además, tras la experimentación continua, se han llegado a crear sondas específicas para especies y grupos de enterococos lo cual brinda una evidente ventaja sobre las pruebas fenotípicas convencionales.

4.3. Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP)

La técnica de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés) fue establecida en 1974 y permite detectar la aparición de fragmentos de ADN de diferentes tamaños tras digerir el ADN genómico con enzimas de restricción, seguido de la separación de fragmentos mediante electroforesis y por último se hibridan dichos fragmentos con sondas radioactivas o quimioluminiscentes y se observan por autoradiografía. Una segunda opción es después de la electroforesis aplicar un agente intercalante de ADN y visualizar el gel en transiluminador/fotodocumentador, por lo que se considera como una técnica de confianza que aporta información valiosa en la distinción de genotipos ya que, al utilizar enzimas de restricción conocidas, los sitios de restricción son constantes con el paso del tiempo (Yang *et al.*, 2013). Sin embargo, como toda técnica presenta desventajas, en el caso de RFLP se requiere mucho tiempo y labor así como también una cantidad elevada de ADN (5-20µg) para llevar a cabo el proceso, otra desventaja de suma importancia es que solo permite detectar mutaciones en los sitios de restricción volviendo limitada la comparación de genomas completos entre diferentes cepas bacterianas (Grover *et al.*, 2016).

4.4. Análisis de Restricción de ADN Ribosómico Amplificado (ARDRA)

Utilizada por primera vez en 1992 y también conocida como ARDRA (por sus siglas en inglés), es una técnica útil para la caracterización de microorganismos puros, esta se basa en la amplificación del gen de ARN ribosomal 16S mediante PCR, seguida de una digestión de los amplicones con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos son analizados a través de electroforesis en gel de agarosa. Los perfiles obtenidos son comparados entre sí para determinar la similitud entre los mismos y de esa forma estimar la similitud genómica existente entre los aislados. Se conoce que la utilización de una sola enzima de restricción que reconoce sitios de cuatro nucleótidos no brinda la resolución adecuada a la hora de realizar el análisis de patrones, por lo que se recurre a utilizar de

3 a 4 enzimas de restricción y la selección de estas también tiene un rol importante para mejorar la resolución (Kashyap *et al.*, 2020).

Hejazi y colaboradores (2019) aislaron distintas muestras de posibles enterococos aislados a partir de queso, los cuales se caracterizaron a través de métodos fenotípicos (pruebas bioquímicas y pruebas de susceptibilidad a antibióticos) así como métodos moleculares (ARDRA, secuenciación de ADN ribosomal 16S, entre otras). Al analizar en conjunto la información obtenida a partir de los métodos fenotípicos, así como ARDRA y la secuenciación del ADN ribosomal 16S se logró caracterizar con un criterio más discriminatorio las muestras hasta el nivel de especie, incluso se menciona la posibilidad de la aparición de una posible nueva especie dentro del género *Enterococcus*. Sin embargo, se plantea que es necesario realizar más pruebas para confirmar, por ejemplo, obtener la secuenciación completa del ADN genómico de la posible nueva especie para comparar con las secuenciaciones en las bases de datos públicas existentes.

En el estudio realizado por Scheidegger y colaboradores (2009) se obtuvieron distintas muestras de enterococos que provenían de carne de pollo y otros alimentos y tras haber amplificado el gen de ARN ribosomal 16S y ser sometido a ARDRA, se comparó la información obtenida con información recopilada a través de pruebas bioquímicas y se llegó a la conclusión que al aplicar la técnica de ARDRA junto con la caracterización fenotípica por pruebas bioquímicas se obtiene un método confiable y relativamente simple para lograr caracterizar y separar por género los aislados de enterococos obtenidos a partir de alimentos de origen animal.

4.5. Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD)

La técnica de PCR es reconocida a nivel mundial debido a que es una técnica sencilla y con una alta probabilidad de éxito, utilizada para realizar estudios genéticos basados en la amplificación de ADN. Uno de los principales inconvenientes de la PCR es la necesidad de conocer las secuencias de ADN que se desean amplificar, sin embargo, al descubrir que al utilizar iniciadores cortos con secuencias aleatorias para amplificar regiones de ADN al azar se facilitó la creación de marcadores

moleculares con una gran variedad de propósitos. La técnica de RAPD a diferencia de la PCR convencional utiliza iniciadores de 10 nucleótidos y gracias a ellos se es capaz de diferenciar entre individuos genéticamente distintos siempre y cuando el método sea reproducible (Gurusubramanian y N. Senthil, 2011). Además, se utiliza un solo iniciador, no los dos que tradicionalmente se utilizan en PCR de punto final (forward y reverse). El uso de un solo iniciador se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de bases a lo largo del genoma.

La técnica de RAPD consiste en la utilización de iniciadores para dirigir una reacción de amplificación de cadena de ácidos nucleicos en lugares no específicos del genoma, dando como resultado la generación de bandas de diversos tamaños. Entre las aplicaciones que esta metodología puede realizar se encuentran los mapeos genómicos, permite estudiar la diversidad genética entre especies, además que permite la observación entre las interacciones animales-plantas-microorganismos. La ventaja de esta técnica es que no se requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN con la que se trabajara ni de la utilización de sondas homologas. El iniciador a utilizar consiste de una secuencia corta (aproximadamente 10 nucleótidos), de manera que es más fácil que este encuentre una secuencia complementaria en el genoma blanco y se amplifique. Aun así, para que se lleve a cabo la amplificación se deben cumplir varios requisitos, el primero de ellos, es que el iniciador debe unirse a la secuencia de ADN de interés en una orientación en particular, de manera que queden direccionados apuntando el uno hacia el otro y el segundo requisito que debe ocurrir es que estos iniciadores queden acoplados a la cadena de ADN en una distancia razonable entre ellos, ya que si la distancia es muy grande no ocurrirá la amplificación.

La figura 3 muestra un ejemplo de como sucede la unión de los iniciadores, así como el sentido en el que estos están posicionados y los productos generados de la RAPD-PCR.

Se considera polimorfismo cuando la secuencia de bases nitrogenadas de una molécula de ADN es variable entre los organismos de una población, y con esta técnica esto es visible mediante la observación de bandas de diferente número de pares de bases entre las muestras cuando son analizadas por electroforesis. Si las bandas son idénticas entre un individuo y otro, se considera que hay homología entre ellas, por lo tanto, entre más bandas idénticas se observen mayor será la homología (Gurusubramanian y N. Senthil, 2011; Meda Gómez et al., 2013; Ríos et al., 2009). El

grado de homología es una medida proporcional a la distancia filogenética entre los aislados. Si dos aislados tienen un 100% de homología se puede sospechar que son la misma cepa, pero esto debería ser confirmado por secuenciación del ADN genómico total.

Gilmore y colaboradores (2014), mencionan que el método de secuenciación rRNA 16S no posee la resolución adecuada para distinguir entre algunas especies del género *Enterococcus* como *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*. Esto es debido a que estas especies son 99.9% idénticas bajo este método. Sin embargo, con apoyo de RAPD y otras técnicas moleculares llega a poseer la resolución adecuada para separar entre una especie y otra. Por otro lado, Hasan y colaboradores (2018), fueron capaces de encontrar la relación filogenética entre especies de *Enterococcus faecalis* provenientes de pollo y de *E. faecalis* de origen clínico mediante la implementación de esta técnica. Por lo que, la amplificación al azar de ADN polimórfico resulta ser un gran recurso para la caracterización y búsqueda de relación filogenética de especies del género *Enterococcus* de origen tanto clínico como alimentario.

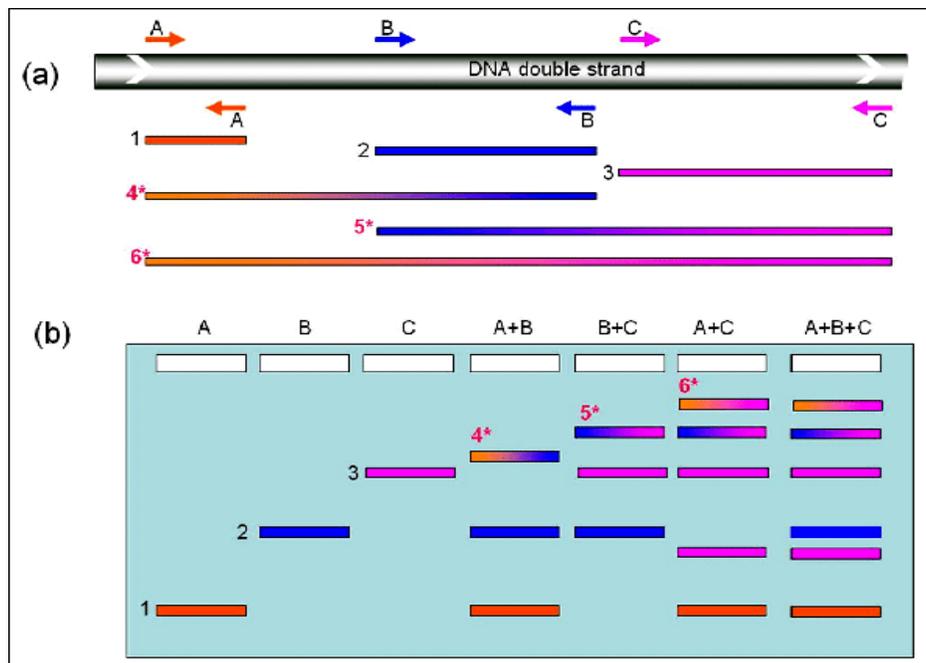


Figura 3. Representación de una RAPD-PCR con amplificación simple (A, B, C), doble (A+B, B+C, A+C) y triple (A+B+C), la imagen (a) muestra las indicaciones hipotéticas de patrones de bandeo y (b) muestra una sola banda amplificada por iniciador, las bandas extra amplificadas por dos y tres iniciadores se indican con asterisco (Alzohairy, 2016).

4.6. Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Este método fue desarrollado en 1984 por David Schwartz y Charles Canton y se basa en la separación de grandes fragmentos de ADN, con la finalidad principal de encontrar patrones específicos conocidos como huellas genómicas o “fingerprints” en estos fragmentos de ADN. El método consiste en la aplicación de distintos campos eléctricos que cambian su ángulo de orientación en un determinado periodo, a un gel de agarosa en el que se encuentran los fragmentos de ADN obtenidos por macrorestricción y entre mayor sean estos fragmentos, mayor será el tiempo que tardara el campo eléctrico en reorientarse. Al día de hoy existen algunas variantes para la realización de esta técnica lo cual resulta en variaciones en la resolución y en la relación geométrica de los carriles de la muestra (Cardozo-Bernal *et al.*, 2013). La separación por el método Contour-clamped Homogenous Electric Field (CHEF) se considera como el método de mayor resolución entre todos y ha resultado muy útil para la implementación en el área de la microbiología molecular en estudios sobre relación filogenética bacteriana, así como evolución de especies y su diseminación. Sin embargo, se puede utilizar para otros fines como análisis cromosomales (cariotipos), en la prevención, control y seguimiento de infecciones bacterianas y aseguramiento de inocuidad alimentaria (Neoh *et al.*, 2019).

A pesar de no ser una técnica que se inventó recientemente, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) sigue siendo hasta la fecha el segundo estándar de oro, después de la secuenciación, en la biología molecular para establecer la relación entre especies. Esto es debido a que los fragmentos de ADN observables representan más del 90% del genoma total, además, los métodos estándares utilizados para realizar PFGE varían muy poco entre microorganismos Gram positivos o Gram negativos lo cual brinda practicidad a este método (Goering, 2010). Domig y colaboradores (2003), mencionan que la PFGE ha mostrado ser superior en la interpretación de relación inter especie en el género *Enterococcus* por lo que, comúnmente se utiliza para la diferenciación y evaluación epidemiológica de infecciones nosocomiales enterocócicas, así como también para la tipificación de las cepas resistentes a antibióticos como vancomicina o glucopéptidos.

Existe muy poca evidencia en México sobre la utilización de técnicas moleculares para realizar una caracterización del género *Enterococcus* proveniente de muestras de alimentos, particularmente de pollo, que es una fuente común para el aislamiento de este microorganismo. A pesar de conocer el riesgo potencial que presentan los enterococos como agentes patógenos, debido entre otras causas a que son portadores de multirresistencia, observada en cepas aisladas de diferentes orígenes, así como de su capacidad intrínseca de conjugación para transferir horizontalmente dichos genes a otros microorganismos. Es importante la estandarización de procesos de caracterización molecular para la caracterización de enterococos en pollo, porque esto sería una forma más sensible, específica y rápida para llevar un seguimiento epidemiológico adecuado del microorganismo y la prevención de posibles problemas con impacto en la salud pública.

5. HIPÓTESIS

La implementación de las técnicas moleculares de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) permite establecer la relación filogenética, asociada con la caracterización polifásica, de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de pollo distribuido comercialmente en Hermosillo Sonora.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Implementar el uso de la técnica de amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) para la caracterización filogenética de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de vísceras de pollo, distribuido comercialmente en Hermosillo Sonora.

6.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar dos iniciadores para la técnica de RAPD que permitan evaluar el polimorfismo en aislados previamente caracterizados de *Enterococcus* spp provenientes de pollo distribuidas en el mercado local de Hermosillo, Sonora.
- Caracterizar los aislados de *Enterococcus* spp. utilizando los 2 iniciadores seleccionados mediante la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD).
- Determinar cuáles son las relaciones filogenéticas entre los aislados de *Enterococcus* spp utilizando la caracterización por RAPD y las demás caracterizaciones previamente establecidas (fermentación de carbohidratos, presencia de genes asociados a patogenicidad y sensibilidad a antibióticos) mediante análisis de conglomerados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Obtención y Reactivación de Aislados Bacterianos

Se trabajó con 80 aislados de *Enterococcus* spp. previamente caracterizados fenotípicamente obtenidos a partir de vísceras de pollo expandidas en distintos puntos de venta, seleccionados en un muestreo aleatorio de corte transversal en enero del 2018 en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. Primeramente, se descongelaron los aislados de *Enterococcus* spp. que se encontraban resguardados en ultracongelación a -70°C en el cepario del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad de Sonora. Los aislados estaban congelados en BHI (Brain Heart Infusion) con glicerol al 20%. Se inocularon las cepas en caldo BHI (BD No. 211200) fresco y se incubaron durante 24 h a 37°C ; después, se inoculó mediante estría cruzada en medio Bilis Esculina (BEM BD No. 299068) bajo las mismas condiciones de incubación. Posterior a la incubación, se observaron las características coloniales morfológicas características del género *Enterococcus* como la presencia de colonias de color negro, lisas, puntiformes de 1 a 2 mm, bordes regulares. Después se tomó muestra de la colonia estudiada y se inoculó en medio Agar Base Sangre (MCD No. 7242) por 24 a 37°C mediante estría cruzada, se comprobó que la morfología colonial revelará un solo tipo de colonias y se tomaron al azar 3 colonias de cada placa para realizar tinción Gram y de esta forma confirmar la pureza de cada uno de los aislados. Una vez confirmada la pureza y el Gram, se inoculó en caldo BHI con glicerol al 20% el cultivo puro y se incubó de igual manera a 37°C durante 24 h para finalmente resguardar nuevamente en ultracongelación.

7.2. Extracción de Ácidos Nucleicos

Una vez reactivados los aislamientos de *Enterococcus* spp. y comprobada su pureza se realizó la estandarización de extracción de ADN mediante la utilización del kit comercial GenElute™ (Sigma Aldrich No. 2110) con lisozima (Sigma L6876) para asegurar la lisis del péptidoglicano de la pared celular. Para lo anterior, se utilizaron cuatro inóculos de 24 h cultivados en 1 mL de BHI y se

realizaron pequeñas modificaciones a las especificaciones del kit comercial. Brevemente, las instrucciones del fabricante fueron: La centrifugación por 2 min a 16,000 g de 1.5 mL de cultivo bacteriano incubado 24 h para posteriormente descartar el sobrenadante, seguido de una resuspensión del cultivo con 200 μ L lisozima, dejándose incubar a 37° C por 30 min, después se agregaron 20 μ L de proteinasa K y 200 μ L de solución de lisis y se incubó a 55° C por 10 min. Agregando 500 μ L de solución de preparación se prepararon columnas que contienen una membrana de sílica y se centrifugó a 12,000 g por 1 min, después se agregaron 200 μ L de etanol a la muestra para posteriormente transferirla a la columna y centrifugarla a 6500 g por 1 min para realizar un lavado con 500 μ L de solución de lavado y centrifugar nuevamente a 6500 g por 1 min, después se agregan 500 μ L de una segunda solución de lavado y se centrifugó a 16,000 g durante 3 min (los microtubos utilizados en los últimos 3 pasos se descartaban después del centrifugado y se colocaba la columna en un tubo nuevo), para finalizar con la elución de la muestra agregando 200 μ L de solución de elución y centrifugando a 6500 g por 1 min. Las modificaciones probadas fueron: preparar 10 mg de proteinasa K disuelta en 1 mL de agua, siendo esta una proteinasa K más diluida a lo que indica el kit y la incubación de las muestras con esta enzima fue a 40°C por 10 min.

Para comprobar el éxito de las extracciones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Sigma Aldrich No. A9539) utilizando SYBRSafe 10,000x (Invitrogen No. S33102) como agente intercalante, como buffer se utilizó TBE 0.5x y se aplicaron 70 volts durante 60 min con un generador de corriente (BIO RAD Power Pac 200), la visualización del ácido nucleico extraído se realizó aplicando luz UV ($\lambda=315$ nm) sobre un transiluminador. Se comparó el esquema originalmente planteado por el fabricante y la modificación para ver cuál de los dos protocolos arrojaba mejor resultado. Con el protocolo seleccionado se realizaron 3 repeticiones para asegurar la reproducibilidad de la técnica, quedando así estandarizada.

7.3. Selección de los Iniciadores

Se probaron 8 iniciadores para RAPD de los iniciadores probados, 4 iniciadores eran denominados OPB y 4 iniciadores llamados OPX (La secuencia de dichos iniciadores se presenta en el Cuadro

1). Inicialmente cada iniciador se probó bajo las condiciones descritas por (Al-Badah, Abdulhakim S., *et al.*, 2015), las cuales se describen más adelante y a estas condiciones se les denominó *Condición 1*. El cuadro 1 muestra la lista de iniciadores probados, así como su secuencia y la temperatura de hibridación utilizada para la *Condición 1*. Para llevar a cabo la amplificación en esta *Condición 1* en la mezcla de reacción se utilizó un volumen final de 25 µL de mezcla la cual estaba constituida por buffer 1x con colorante (5x Colorless GoTaq Flexi Buffer, Promega M890A), MgCl₂ 2.5 mM (Promega A351H), desoxirribonucleótidos trifosfato 0.8 mM (Promega U120A, U121A, U122A y U123A), Taq polimerasa 2U (GoTaq Flexi DNA Polymerase Promega M829B); 50 µg de ADN, 0.2 mM de iniciador RAPD específico y agua libre de nucleasas todo ello disuelto en agua hasta alcanzar el volumen de reacción. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Thecne Techgene FTGENE 5D). Las condiciones de amplificación probadas consistieron en una desnaturalización inicial a 94°C durante 120 s, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 °C para la desnaturalización, seguido de 36 °C durante 30 segundos para la hibridación y 72 °C durante 1 min para elongación, seguido de una elongación final por 10 min a 72°C.

Para la *Condición 2*, se modificó el volumen final de la mezcla de reacción hasta 35 µL, pero se respetaron las concentraciones mencionadas anteriormente, además del volumen, se modificaron también las temperaturas de hibridación de la reacción, con ayuda de la herramienta “oligoanalyzer tool™”. Esta herramienta bioinformática determina la temperatura óptima para la hibridación considerando además de su secuencia las concentraciones de sales presentes en la muestra. Los productos obtenidos después de la amplificación (bajo las mismas condiciones previamente descritas) fueron analizados mediante electroforesis.

La mejor condición probada fue repetida 3 veces con los iniciadores seleccionados para asegurar la reproducibilidad de la técnica, así como la estandarización de la misma.

Cuadro 1. Lista de iniciadores OPB y OPX con su respectiva secuencia de oligonucleótidos y temperatura de hibridación utilizada en la RAPD-PCR.

Iniciador	Secuencia de Oligonucleótidos (5' a 3')	T _m	T _m *
OPB-01	GTT TCG CTC C	33.4 °C	39.8 °C
OPB-10	CTG CTG GGA C	36.6 °C	41.3 °C
OPB-12	CCT TGA CGC A	35.7 °C	41.3 °C
OPB-14	TCC GCT CTG G	38.8 °C	43.6 °C
OPX-01	CTG GGC ACG A	39.9 °C	44.7 °C
OPX-03	TGG CGC AGT G	41.8 °C	46.7 °C
OPX-06	ACG CCA GAG G	39.3 °C	44.1 °C
OPX-07	GAG CGA GGC T	39.5 °C	44.4 °C

*La temperatura de hibridación mostrada se obtuvo con ayuda de la herramienta “oligoanalyzer tool™”

7.4. Electroforesis

Los productos obtenidos para la selección de iniciadores y para la estandarización de la técnica de RAPD-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% el cual se preparó disolviendo 0.35 mg de agarosa en 30 mL de buffer TBE al 0.5x, posteriormente se calentó hasta disolver por completo la agarosa para posteriormente ser vaciada sobre el molde y se añadió SYBR Safe 10,000x, una vez solidificado el gel se colocó en la cámara electroforética y se colocaron las muestras en los pocillos del gel y este se sumergió con buffer TBE 0.5x. Para realizar la electroforesis se aplicó la *Condición I* la cual constó de la aplicación de una corriente de 70 volts durante 60 min con un generador de corriente, la visualización de los amplicones se realizó aplicando luz UV ($\lambda=315$ nm) sobre un transiluminador.

Aunque posteriormente para la aplicación del protocolo RAPD-PCR sobre las muestras se optó por utilizar *la Condición II*, en la cual se conservan las condiciones bajo las cuales se preparó el gel de

agarosa, sin embargo, se realizó un cambio en la corriente y en el tiempo de duración de la misma, aplicando una corriente de 60 volts durante 80 min para lograr una mejor separación de las bandas electroforéticas.

7.5. Análisis Estadístico y Filogenético

Para el análisis de aglomerados jerárquicos se utilizó el software IBM SPSS Statistics 26 tomando el método de Ward como método de conglomeración y la distancia euclídea al cuadrado como medida de distancia, los aislados se agruparon en aglomerados con un índice de similitud del 90%. Posteriormente se analizaron los datos obtenidos en el presente estudio junto con la información de caracterización fenotípica mediante fermentación de carbohidratos, susceptibilidad a antibióticos y determinación de factores de patogenicidad de estos aislados obtenida a partir de los trabajos de caracterización previamente realizados por Ballesteros y Calderón (2018), Pérez Benavides (2020) y Morán Vásquez (2021).

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. Reactivación de Aislados Bacterianos

Se reactivaron 80 muestras de enterococos provenientes de vísceras de pollo distribuido en distintos puntos de venta de Hermosillo, Sonora, así como las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (cepas control). Tras realizar las pruebas para verificar la pureza de los aislados se observaron colonias características del género *Enterococcus* (colonias gris-negro, con bordes regulares, convexas, de 1 a 2 mm de diámetro) en el medio BEM. Una vez sembradas en el medio agar base sangre, se pudo notar un crecimiento homogéneo de colonias lisas y puntiformes de 1 a 2 mm de tamaño. Por último, en la observación microscópica utilizando tinción Gram se observó la morfología de los aislados reactivados, encontrándose al microscopio (100 X) cadenas cortas y diplococos Gram positivos (Zimbro *et al.*, 2009; Schell, 2018). Con base en la información obtenida se concluyó que las muestras de enterococo se mantenían como cultivos axénicos, sin la presencia de cultivos mixtos.

Comparando los resultados obtenidos con otros estudios como el de Lara Orozco y Suárez Palacios (2021) quienes también trabajaron con muestras de enterococo reactivadas tras crío preservación, se observó que lograron reactivar 13 muestras pertenecientes al género *Enterococcus* siendo este el 100% de las muestras que buscaban obtener al igual que en el presente estudio donde también se logró reactivar el 100% de las muestras, siendo un total de 80 aislados de enterococo.

8.2. Extracción de Ácidos Nucleicos

Para la extracción del ADN de las muestras de enterococos previamente reactivadas, se observó primeramente que bajo la aplicación de la metodología utilizando la proteinasa K diluida, no se logró obtener ningún bandeo al momento de realizar la electroforesis de ninguna de las muestras

con las que se probó este cambio metodológico. Sin embargo, tras aplicar el método de extracción de ADN bajo las especificaciones del kit comercial, se logró observar tras una primera electroforesis de prueba, un bandeo en la parte superior del gel de agarosa indicando así que bajo estas condiciones fue posible extraer el ADN de las 4 muestras que se probaron (4, 19, 3-51 y G5) y tras aplicar las mismas indicaciones, se logró extraer el ADN de las 76 muestras de enterococos restantes.

Al día de hoy se ha demostrado que la utilización de proteinasa en procedimientos de extracción de ácidos nucleicos permite una mejor recuperación de estos debido a que permite su liberación de los complejos proteicos. (Díaz-Cano y Brady, 1998). Como se pudo observar, al tratar de extraer en ADN de las muestras de enterococo utilizando una proteinasa K a una concentración menor de la que indicaba el kit comercial no permitió la extracción de este. Según de Armas y colaboradores (2010) la temperatura y tiempo de incubación, así como la concentración de la enzima influyen en la extracción y pureza del ADN. Es probable que al intentar extraer el ADN de las muestras utilizando una proteinasa de menor concentración esta no fuera suficiente para degradar las proteínas presentes.

8.3. Iniciadores Seleccionados y Programas de Amplificación en PCR para RAPD

Una vez reactivadas, comprobándose su pureza y tras haber realizado la extracción de ADN, se llevó a cabo la aplicación de la técnica de RAPD-PCR para la obtención de perfiles electroforéticos que pudieran ser utilizados para la realización de una caracterización filogenética.

Se probaron primeramente cuatro iniciadores OPB los cuales fueron OPB-01, OPB-10, OPB-12 y OPB-14 para realizar las RAPD-PCR bajo las condiciones descritas anteriormente en la metodología y tras el revelado electroforético no se logró observar ningún patrón de bandeo en los geles de agarosa. Por lo que posteriormente se probaron cuatro iniciadores OPX, conformados por OPX-01, OPX-03, OPX-06 y OPX-07 y tras haber realizado RAPD-PCR con cada uno de ellos se pudo observar que los iniciadores OPX-06 y OPX-07 no mostraron ningún perfil de bandeo tras

haberse realizado la electroforesis de cada uno, sin embargo, no fue el caso para los iniciadores OPX-01 y OPX-03 los cuales no solo mostraron un perfil de bandeo, sino que también mostraron polimorfismo y como consecuencia, se seleccionó este par de iniciadores para evaluar el polimorfismo en las muestras de enterococo estudiadas en el presente trabajo.

Una vez seleccionados los iniciadores OPX-01 y OPX-03 se evaluó el polimorfismo presente en cada uno de los aislados previamente identificados mediante biotipificación como *Enterococcus*. Al llevar a cabo el análisis molecular se logró observar una alta diversidad de productos de la RAPD-PCR al utilizar el iniciador OPX-01 ya que se lograron observar 71 perfiles electroforéticos diferentes y únicamente 4 perfiles se repitieron dentro de los 80 aislados. Dentro de estos perfiles repetidos se puede observar que uno de ellos no mostró ninguna banda amplificada y este se conformaba por las muestras A2, B1, H3, 29 y 654, el segundo perfil pertenece a las muestras A3 y G2, seguido del tercer perfil conformado por E1 y E2 y el cuarto perfil se conformó por las muestras B2, H1, 154 y 456(2). Dentro del primer perfil se encontraron muestras clasificadas bajo las especies de *E. casseliflavus* y *E. faecalis* según la caracterización mediante pruebas bioquímicas, el segundo y tercer perfil estaban conformados únicamente por *E. casseliflavus* y el último perfil se conforma por muestras caracterizadas como *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*. Es importante mencionar que dentro de cada perfil se encontró que los perfiles de fermentación de carbohidratos y de patogenicidad eran muy similares más nunca coincidieron al 100%.

Para el caso de la RAPD-PCR para la cual se utilizó el iniciador OPX-03 se observó un número mayor de muestras que presentaron perfiles similares. En total se presentaron 66 perfiles distintos y en 26 aislados se presentaron perfiles similares. La figura 4 muestra un ejemplo de los patrones electroforéticos obtenidos a partir de la RAPD-PCR utilizando los iniciadores OPX-01 y OPX-03. Al comparar la información se pudo observar que a pesar que algunos aislados presentaran perfiles similares al realizar RAPD-PCR con el iniciador OPX-03 ninguna de ellas resultó idéntica al realizar PCR con el iniciador OPX-01.

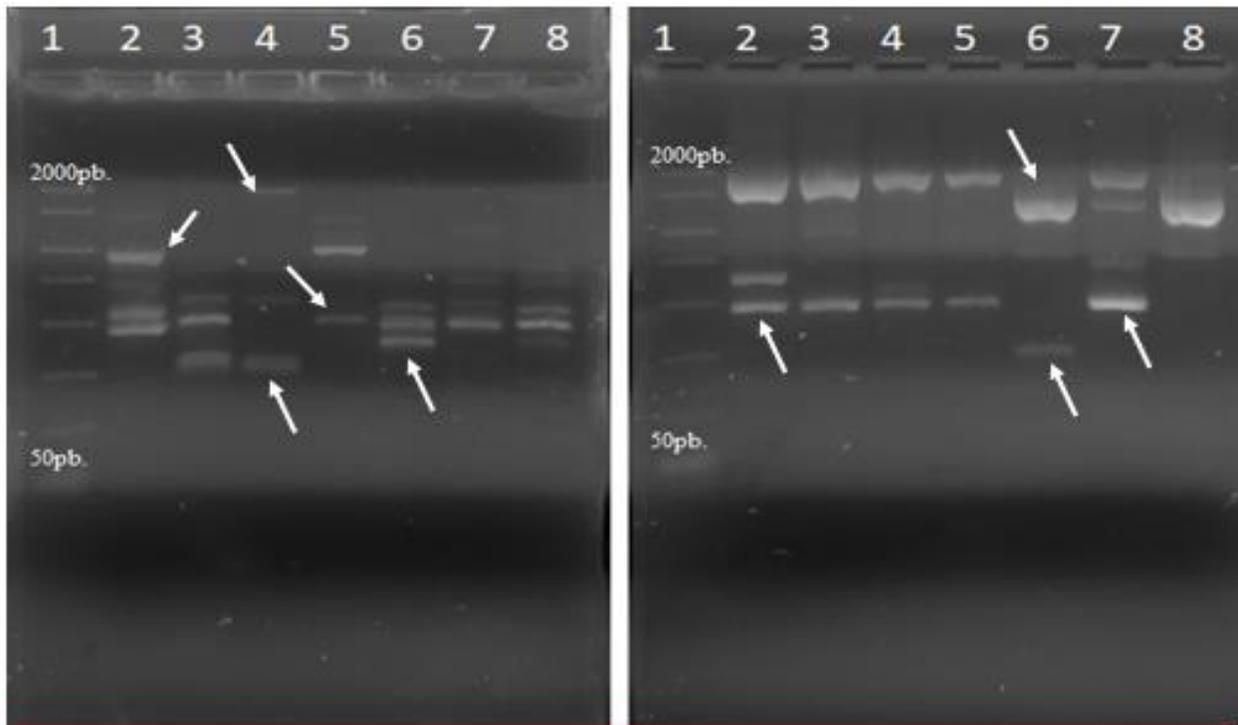


Figura 4. Imágenes de dos geles de agarosa que muestran los perfiles electroforéticos de algunas muestras de *Enterococcus* spp. aislado de vísceras de pollo utilizando la técnica de RAPD-PCR. En la imagen del lado izquierdo se utilizó el iniciador OPX-01, en el carril número 1 se encuentra el marcador de pares de bases (2000-50pb) y de los carriles 2 al 8 se montaron muestras de enterococo. En la imagen de la derecha se utilizó el iniciador OPX-03, mostrando en el carril número 1 el marcador de pares de bases y de los carriles 2 al 8 se montaron muestras de enterococo. Las flechas blancas indican algunos puntos donde sucede el polimorfismo.

Por otro lado, se analizaron ambas bases de datos de los perfiles electroforéticos de los iniciadores OPX-01 y OPX-03 se obtuvo el porcentaje de polimorfismo que presentó cada iniciador, tomando en cuenta el total de bandas amplificadas y la cantidad de bandas polimórficas y se llegó a la conclusión que el iniciador OPX-03 posee un mayor poder discriminatorio de polimorfismo en las pruebas de RAPD-PCR, a pesar de que con el iniciador OPX-01 el número de perfiles y bandas sea mayor. En el cuadro 2 se muestra de manera detallada el número de bandas amplificadas y el número de bandas que presentaron polimorfismo para cada uno de los iniciadores.

Cuadro 2. Porcentaje de polimorfismo presente en los iniciadores OPX-01 y OPX-03

Iniciador	Secuencia de Oligonucleótidos (5' a 3')	Total de Bandas Amplificadas	Total de Bandas Polimórficas	Porcentaje de Polimorfismo
OPX-01	CTG GGC ACG A	1138	414	36.38%
OPX-03	TGG CGC AGT G	646	256	39.63%

El polimorfismo ocurre según la variación en la secuencia de unión a la que va dirigida el iniciador, la literatura menciona que una ventaja de la utilización de la técnica de RAPD-PCR es que estas uniones son aleatorias y reproducibles al iniciador que se utilice, lo cual le brinda la validez a la técnica (Grover *et al.*, 2016; Gurusubramanian *et al.*, 2016). Dicho lo anterior, Ben y colaboradores (2019) presentaron resultados muy similares a los obtenidos en el presente estudio, a pesar que ellos trabajaron con distintos iniciadores, también obtuvieron una gran diversidad genotípica al tratar con cepas de *Enterococcus lactis* aisladas de queso de distintos puntos de aislamiento. El hecho de que se obtuvieran esta variabilidad genética podría significar que en verdad existe una diversidad de enterococos en los puntos de aislamiento, como es el caso del presente trabajo de aislamientos de vísceras de pollo expandidas en el mercado local.

8.4. Relaciones Filogenéticas Utilizando RAPD

Una vez obtenidos los perfiles, se realizó el análisis de conglomerados donde se incluyeron los datos obtenidos con cada uno de los iniciadores por separado, así como también un análisis con los resultados de ambos iniciadores para buscar un posible patrón de agrupamiento entre los aislados (Ver Figuras 5, 6 y 7). Es importante mencionar que este análisis se realizó utilizando como apoyo la información obtenida a través de las pruebas de fermentación de carbohidratos (sorbosa, lactosa, adonitol, melisitosa, melobiosa, rafinosa, arabinosa, glucosa, galactosa, sacarosa, trealosa, inulina, xilosa, manitol y sorbitol) bajo las cuales se caracterizaron las muestras según su especie, aunque para el análisis de conglomerados únicamente se utilizaron 65 muestras debido a que 15 de ellas

resultaron ser muestras repetidas. Según la información recabada a partir de las pruebas de fermentación de carbohidratos, se contó con un total de 42 muestras caracterizadas como *E. casseliflavus*, 10 de *E. faecalis*, 5 de *E. raffinosus*, 3 de *E. faecium*, 3 de *E. mundtii*, 1 de *E. malodoratus* y 1 de *E. solitarius*. A estas muestras se les había determinado también el perfil de sensibilidad a los antibióticos (Amikacina, kanamicina, amoxicilina con ácido clavulánico, eritromicina, ciprofloxacina, norfloxacina, nitrofuratoína, imipenem, tetraciclina, vancomicina, ampicilina y estreptomina).

Para los análisis de conglomerados se utilizó un índice de disimilitud del 10% para agrupar los aislados. Como puede verse en la Figura 5, para el iniciador OPX-01 se generó un dendrograma en donde se muestran 5 clusters distintos, no se encontró ningún patrón de agrupamiento específico entre los aislados dentro de un mismo cluster. Se puede observar cómo los aislados previamente caracterizados mediante fermentación de carbohidratos se encuentran distribuidos entre los 5 clusters, cuando lo esperado sería que los que pertenecen al mismo cluster fueran de la misma especie. El mismo caso de dispersión de los aislados entre los diferentes clusters ocurrió al realizar el análisis de conglomerados utilizando los resultados obtenidos por RAPD-PCR con el iniciador OPX-03 (Ver Figura 6). Una vez obtenidos los resultados de los análisis de conglomerados utilizando los iniciadores OPX-01 y OPX-03 por separado, se optó por realizar un análisis incluyendo ambos iniciadores para observar si combinando los resultados se podía observar un patrón de agrupamiento en específico. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 7, al utilizar un índice de disimilitud del 10% para agrupar los aislados, se obtuvo un dendrograma con 6 clusters distintos donde se puede observar la ausencia de algún patrón de agrupamiento entre las muestras al igual que como lo fue en los análisis de conglomerados utilizando los iniciadores RAPD específicos por separado.

Dicha falta de agrupación entre las muestras puede interpretarse como la presencia de un alto grado de polimorfismo y una alta diversidad genética en las muestras de enterococo procesadas. Así mismo, estos resultados podrían indicar que existen distintos puntos de origen entre los aislados de enterococo utilizados en el presente estudio y que a pesar de ser aislados caracterizados bioquímicamente como dentro de la misma especie, son clonas distintas con diferentes orígenes y que por lo tanto no son contaminación cruzada en las muestras de pollo de origen, es decir no tienen una relación filogenética estrecha entre sí.

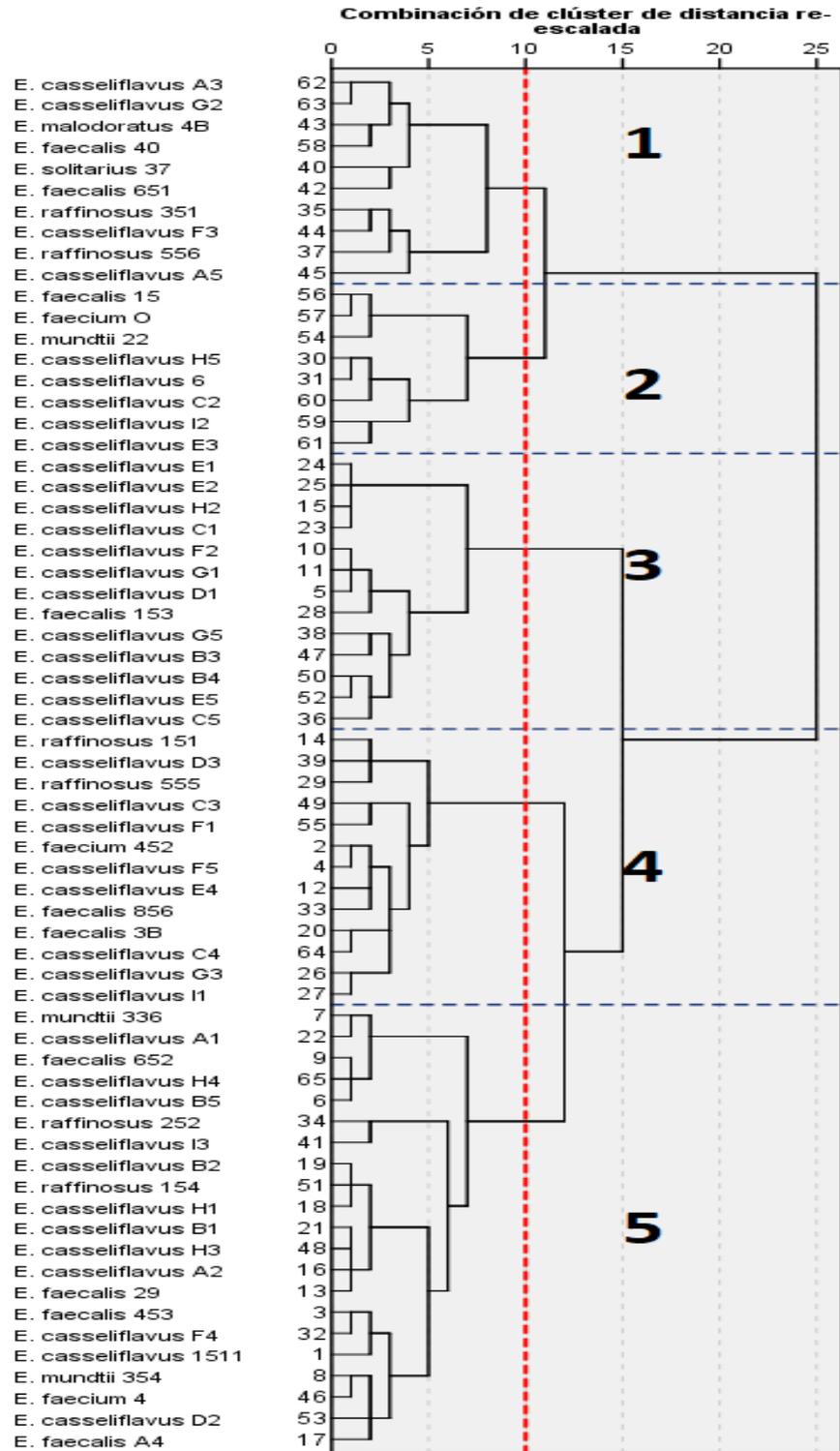


Figura 5. Dendrograma que agrupa los resultados obtenidos por RAPD-PCR con el iniciador OPX-01.

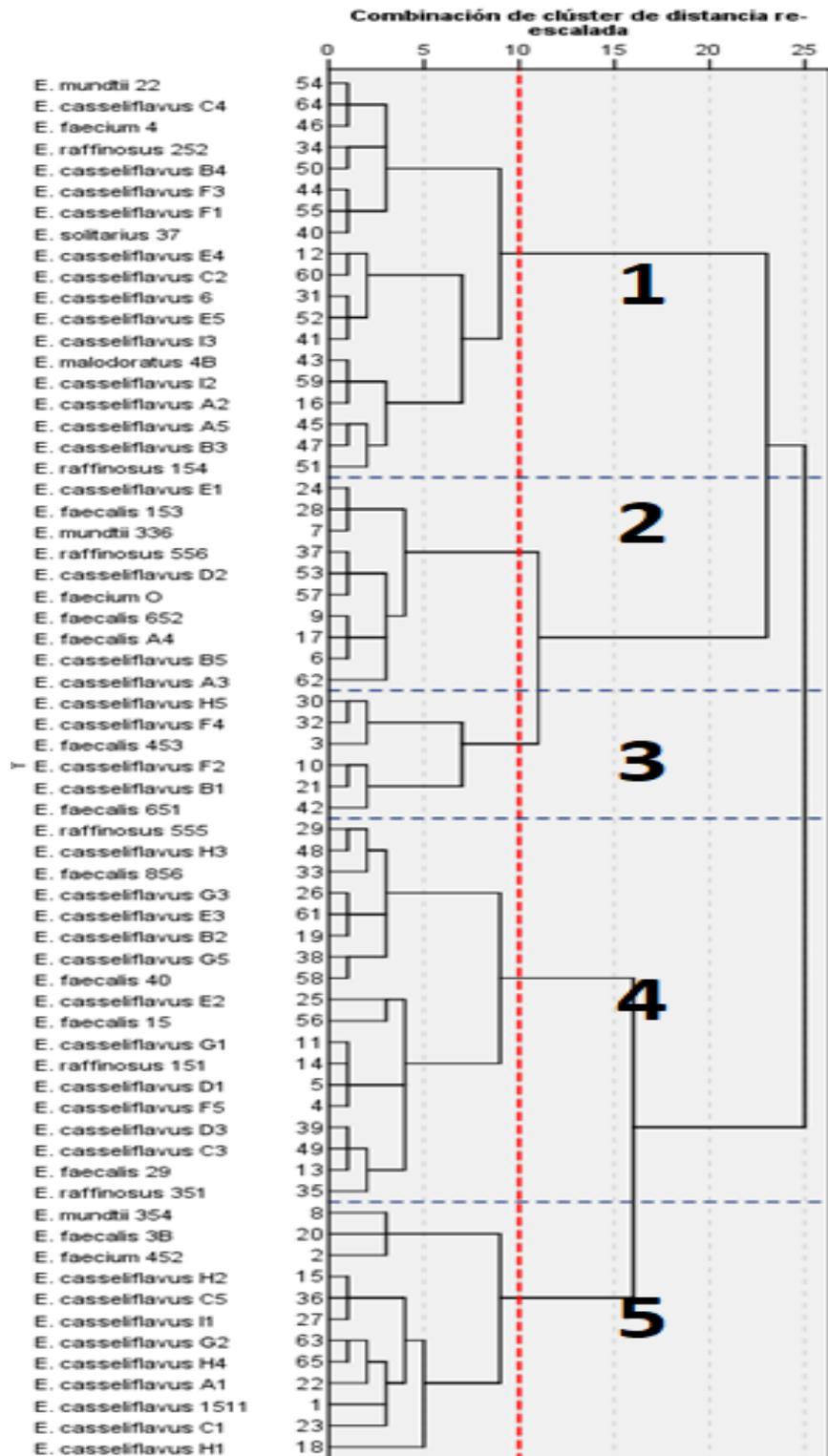


Figura 6. Dendrograma que agrupa los resultados obtenidos por RAPD-PCR con el iniciador OPX-03.

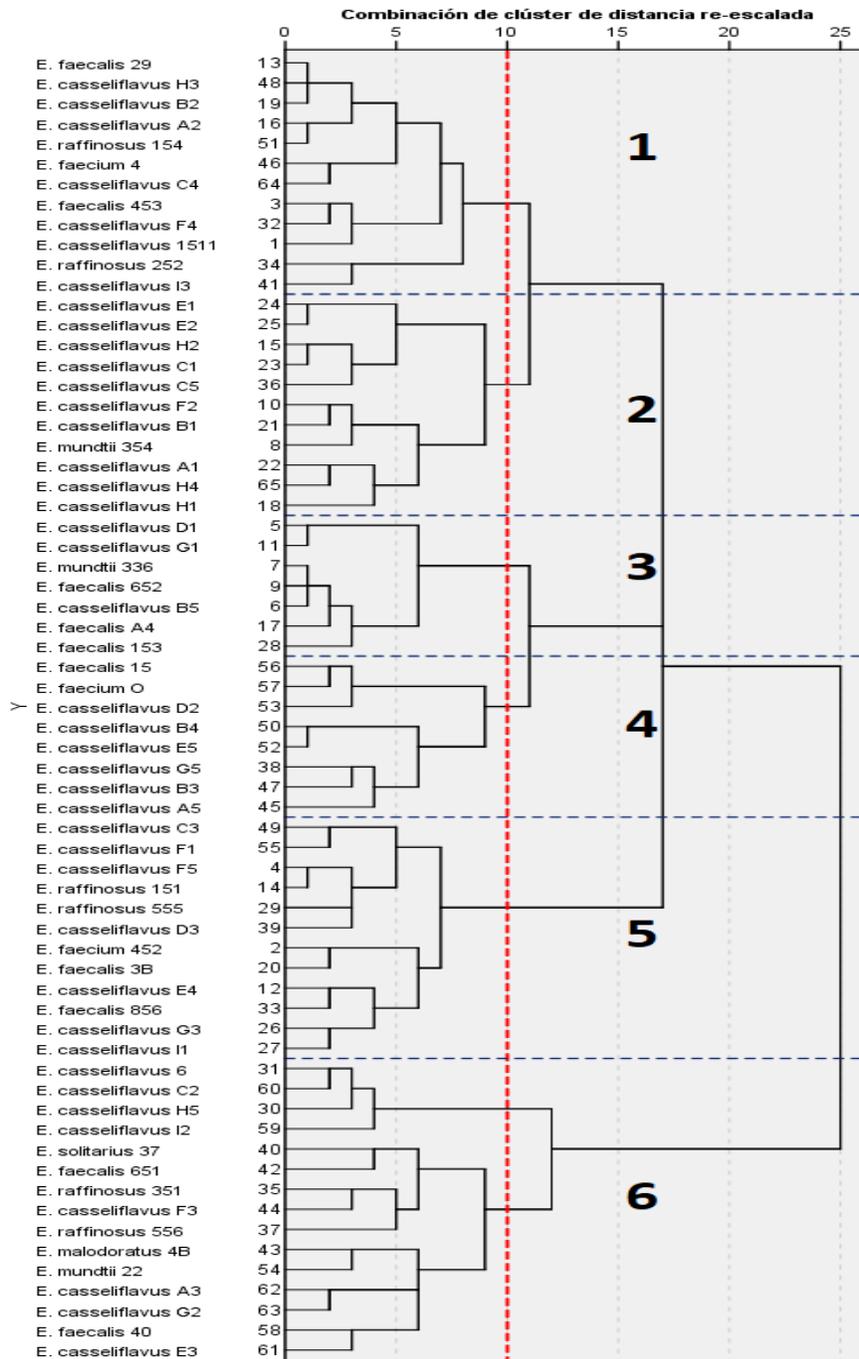


Figura 7. Dendrograma que agrupa los resultados obtenidos por RAPD-PCR con los iniciadores OPX-01 y OPX-03.

8.5. Relaciones Filogenéticas Polifásicas

Posteriormente se realizó un análisis de conglomerados donde se incluyeron los datos de RAPD-PCR y los datos de las pruebas de detección de factores de patogenicidad (*cyiB*, *cylA*, *cylM*, *cpd*, *asa1*, *aggA* y *gelE*) obtenidos por Pérez Benavides (2020) y Morán Vásquez (2021). Sin embargo, la ocurrencia de genes de patogenicidad tampoco permitió observar algún patrón de agrupamiento en específico como lo muestra la Figura 8. Según Lindenstrau y colaboradores, (2011) quienes tampoco encontraron una relación al realizar un análisis de RAPD-PCR y detección de factores de patogenicidad, esta falta de asociación podría deberse a que los genes de patogenicidad son un rasgo común en los enterococos de cualquier fuente por lo que el vínculo con la fuente de aislamiento puede no ser tan marcado para generar un cluster. Dicha información también concuerda con Medeiros y colaboradores (2014), quienes comparan muestras de enterococo de origen clínico y de origen animal y demuestran que los aislados de ambas matrices muestran en su genoma los mismos factores de patogenicidad.

Al día de hoy se conoce que los genes de resistencia a antibióticos y genes que codifican factores de patogenicidad pueden ser transferidos gracias a los mecanismos de transmisión vertical u horizontal que poseen los microorganismos. Además, gracias a la plasticidad del genoma del género *Enterococcus* le es posible integrar plásmidos, transposones, profagos e incluso inserciones de secuencias de ADN lo cual les facilita la adquisición de genes entre la misma especie, también entre especies distintas dentro del mismo género y en algunos casos, entre especies de distintos géneros. Ocasionalmente que el género *Enterococcus* se volviera un riesgo debido a que tanto los genes de resistencia a antibióticos y de factores de patogenicidad pueden ser desafortunadamente encontrados tanto en reservorios humanos como animales (Ben Braïek y Smaoui, 2019).

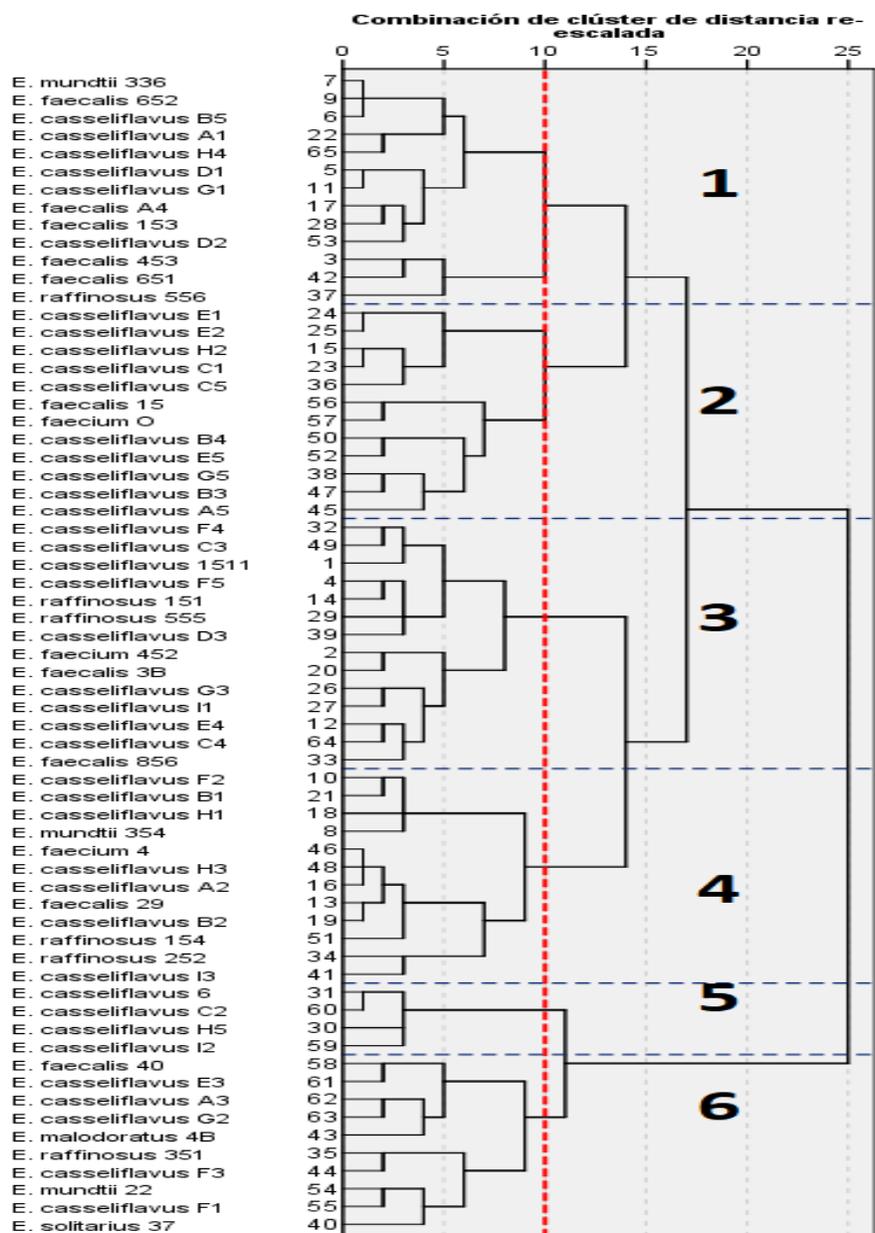


Figura 8. Dendrograma de las muestras de enterococo donde se agrupan las muestras según los resultados de las pruebas moleculares de RAPD-PCR utilizando los iniciadores OPX-01 y OPX-03 junto con las pruebas de detección de factores de patogenicidad *cyB*, *cylA*, *cylM*, *cpd*, *asa1*, *aggA* y *gelE*.

Un quinto análisis de conglomerados se realizó utilizando los datos obtenidos a partir de RAPD-PCR y la caracterización mediante pruebas de caracterización fenotípica de fermentación de carbohidratos y pruebas de susceptibilidad a antibióticos realizado por Ballesteros y Calderón (2018) y este se ve representado en la Figura 9. Dicho análisis resultó en la agrupación de las 65

muestras en 4 clusters distintos, donde se tienen 8 de las 10 muestras de *E. faecalis*, 3 de 3 muestras de *E. faecium* y 2 de 3 muestras de *E. mundtii* en el cluster número 1, en el cluster 2 se encuentra 1 muestra de *E. raffinosus*, y las muestras de *E. solitarius* y *E. malodoratus*. Los clusters 3 y 4 están conformados casi en su totalidad por las muestras de *E. casseliflavus* salvo por 1 muestra de *E. faecalis* y 1 de *E. raffinosus*, en el cluster número 3 y en el cluster número 4 están 2 de *E. raffinosus*, 1 muestra de *E. faecalis* y 1 de *E. mundtii*. Se encontró que con el iniciador OPX-01 las muestras A2, B1, H3 y 29 resultaron con patrones idénticos mediante RAPD-PCR, aunque A2, B1 y H3 están caracterizadas como *E. casseliflavus* y ubicadas en el cluster 3 y la muestra 29 ubicada en el cluster 1 se caracterizó como *E. faecalis*, además, ninguna compartió resultados 100% idénticos en cuanto a pruebas fenotípicas. El mismo caso ocurrió con las muestras B2 (Cluster 3), H1 y 154 (Ambas en el cluster 4) siendo las primeras dos *E. casseliflavus* y la última *E. raffinosus*.

Un patrón similar se observó en las muestras A3 y G2 (Cluster 3) ambas con patrones de bandeo idénticos y caracterizadas bajo la misma especie, sin embargo, difieren un poco en cuanto a los resultados de pruebas fenotípicas de fermentación de carbohidratos y susceptibilidad a antibióticos. Por último, se observó que las muestras E1 y E2 (Cluster 4) caracterizadas como *E. casseliflavus* resultaron también resultaron idénticas mediante RAPD-PCR y en las pruebas de fermentación de carbohidratos mas no en las pruebas de susceptibilidad a antibióticos. Por otro lado, en el caso de la RAPD-PCR utilizando el iniciador OPX-03 se observó que C5 y H2 fueron idénticas mediante RAPD-PCR (cluster 4), así como G3 y E3(cluster 3 y 4 respectivamente) poseían el mismo perfil de bandeo, 6 y E5 (clusters 3 y 4 respectivamente), también las muestras A5 y B3 (cluster 3), las muestras C2 y E4 (cluster 3).

Otro perfil compartido fue de las muestras F1 y F3 (clusters 3 y 4 respectivamente), recalando que todas estas muestras se caracterizaron como *E. casseliflavus* y ninguna de ellas resultó 100% idénticas en las pruebas fenotípicas, aunque en el caso de las muestras G1, F5 (ambos en el cluster 3) y D1 (cluster 4) también clasificadas como *E. casseliflavus* se observó que tanto G1 como F5 fueron idénticas en cuanto a pruebas de fermentación de carbohidratos aunque no a las de susceptibilidad a antibióticos. Otro par de muestras que resultó con perfil de RAPD utilizando el iniciador OPX-03 idéntico fueron I2 (cluster 3) y 4B (cluster 2) caracterizadas bajo las especies *E. casseliflavus* y *E. malodoratus* (de acuerdo a fermentación de carbohidratos) respectivamente, otro

caso similar fue el de las muestras 4 y 22 caracterizadas como *E. faecium* y *E. mundtii* (ambas en el cluster 1) y por último las muestras 153 y 336 caracterizadas como *E. faecalis* y *E. mundtii* (ambas en el cluster 1) y de igual manera ninguno de estos pares resulto 100% idéntico en las pruebas fenotípicas de fermentación de carbohidratos y susceptibilidad a antibióticos. Es importante destacar que al enfocarse únicamente en los resultados obtenidos por una sola prueba como RAPD-PCR, es posible que los perfiles resulten ser idénticos, resultando en una caracterización insuficiente, sin embargo, al tomarse en cuenta los resultados de otras pruebas como lo fueron en este caso pruebas de fermentación de carbohidratos y susceptibilidad a antibióticos, es posible realizar un análisis más amplio que permita una caracterización polifásica más completa.

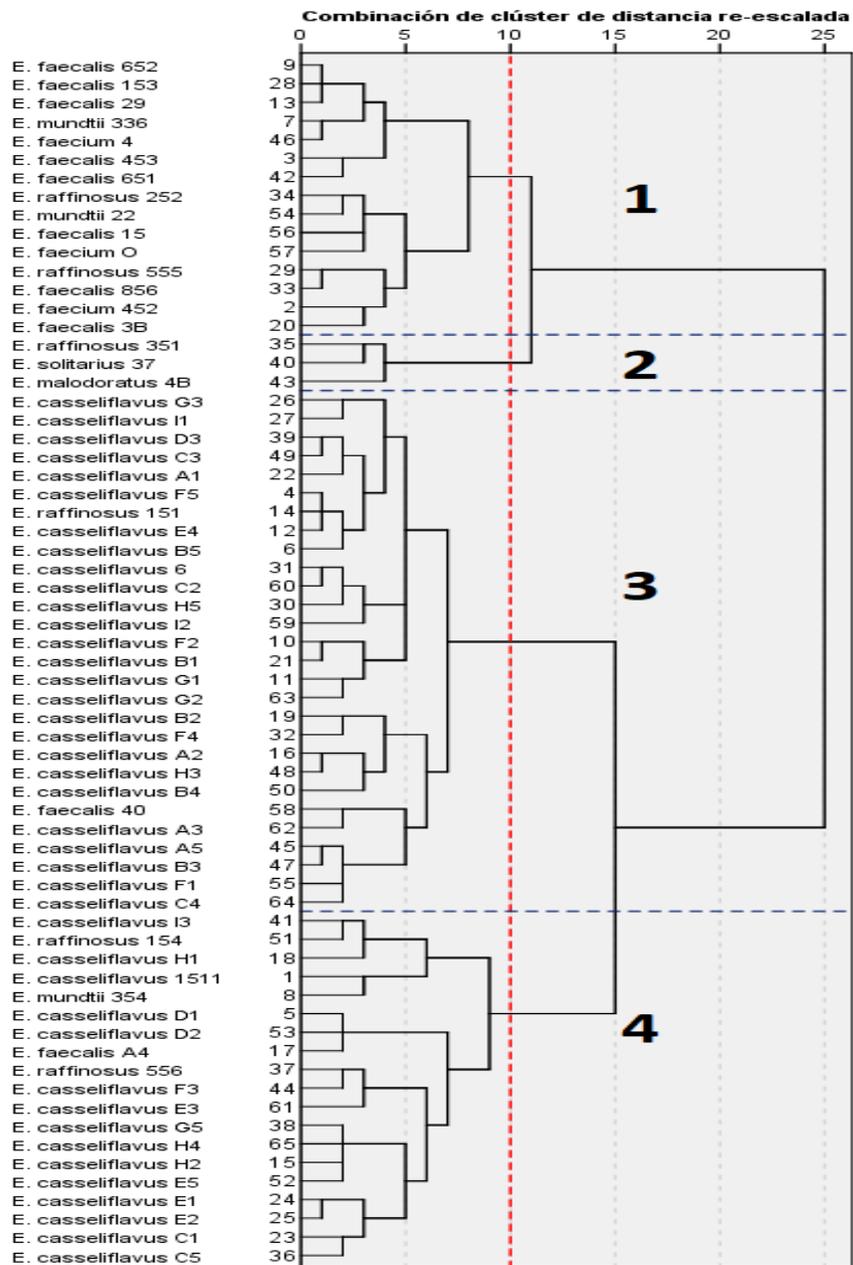


Figura 9. Dendrograma de las muestras de enterococo donde se agrupan las muestras según los resultados de las pruebas moleculares de RAPD-PCR utilizando los iniciadores OPX-01 y OPX-03 y las pruebas de caracterización fenotípica de fermentación de carbohidratos y susceptibilidad a antibióticos.

Comparando los resultados obtenidos en el análisis de conglomerados del presente trabajo con los obtenidos por Hejazi y colaboradores (2019) quienes analizaron aislados de enterococos a partir de quesos iraníes tradicionales, se notó una similitud ya que, aunque en sus resultados si se obtuvieron muestras que resultaran 100% idénticas en cuanto a pruebas de fermentación de carbohidratos y

RAPD hubo algunas que necesitaron re-identificarse mediante otras técnicas moleculares como ARDRA y secuenciación de la región de rDNA 16S tras la obtención de resultados ambiguos. De igual manera, los resultados obtenidos son similares a los de Morandi y colaboradores (2006) quienes reportan haber realizado un análisis de RAPD-PCR tras la identificación fenotípica de especies del género *Enterococcus* recolectadas de queso de distintos puntos de Italia y se concluye que la caracterización de especies mediante técnicas fenotípicas por si solas, lleva a resultados de identificación ambiguos que gracias a RAPD y el uso de otras técnicas moleculares permiten la caracterización correcta de especies de enterococo.

La aparente disconcordancia entre los resultados de aislamientos caracterizados bajo las pruebas de fermentación de carbohidratos y de RAPD-PCR, puede deberse a la diversidad y heterogeneidad de los microorganismos y sus características fenotípicas (Schell, 2018). Por el lado de la resistencia a antibióticos hay que recordar que el género *Enterococcus* está conformado por microorganismos con una alta capacidad adaptativa capaces de mutar para generar resistencia a antibióticos o bien, obtener genes de resistencia a través de la transferencia horizontal (Solache y Rice, 2019). Dicho lo anterior, el hecho de haber encontrado cepas con perfiles idénticos mediante RAPD y caracterizadas fenotípicamente como especies distintas, de acuerdo al perfil de fermentación de carbohidratos, no es indicativo de que pertenezcan a la misma clona. Es necesario corroborar esta inferencia con algún otro análisis como podría ser la secuenciación o cualquier otro que permite una caracterización polifásica.

Según Gilmore y colaboradores (2014), los pollos en edades tempranas (de 1 mes a 1 mes y medio de nacidos) poseen como parte de su microbiota a la especie *Enterococcus faecalis*, sin embargo, una vez alcanzada la madurez del animal, esta especie se ve desplazada por *Enterococcus faecium*. La presencia de las especies *E. casseliflavus* y *E. mundtii*, en pollo también ha sido descrita aunque la aparición de estas especies en este animal es ocasional (Aarestrup *et al.*, 2002). Sin embargo, estos datos difieren con los datos que se presentan en el presente estudio ya que en este caso se caracterizó la especie de *E. casseliflavus* en 42 de las 65 muestras (64%) utilizadas y aunque la especie *E. faecalis* si se asemeja a lo que reporta la bibliografía, no es el mismo caso con la especie *E. faecium* ya que este solo se caracterizó en 3 muestras. Aunque cabe mencionar que los pollos para consumo son sacrificados en una edad adulta por lo que se esperaría haber encontrado un mayor número de muestras de *E. faecium* y una disminución de *E. faecalis*.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se determinó que la técnica de RAPD-PCR utilizando los iniciadores OPX 01 y OPX 03, por si solos o combinados no permitió establecer relaciones filogenéticas entre los aislados que coincidieran con resultados previos de caracterización por fermentación de carbohidratos en aislados de potenciales *Enterococcus* recuperados de vísceras de pollo provenientes de distintos puntos de venta de la localidad de Hermosillo, Sonora. Se observó también que la caracterización mediante RAPD-PCR con ambos iniciadores seleccionados en combinación con la presencia de los genes que codifican factores de patogenicidad, no permitieron establecer una correlación con los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica. Sin embargo, se observó que al combinar los resultados obtenidos de RAPD-PCR con ambos iniciadores, pruebas de fermentación de carbohidratos y pruebas de susceptibilidad a antibióticos, sí se logró establecer una relación filogenética mediante el análisis de conglomerados. Es decir, bajo las condiciones probadas, para las poblaciones de *Enterococcus* spp la caracterización polifásica resultó ser más útil para encontrar las relaciones filogenéticas y establecer conglomerados que la caracterización fenotípica o molecular por si solas.

La presencia de un alto grado de polimorfismo encontrada utilizando RAPD PCR con los iniciadores OPX 01 y OPX 03 es un indicativo de la existencia de una amplia biodiversidad de enterococos en las vísceras de pollo que se expende dentro de la población hermosillense. Esta biodiversidad puede ser debida a la capacidad de transferencia horizontal de material genético que poseen los enterococos, así como a los diversos factores estresantes a los que se enfrentan durante la cadena de producción del alimento que podrían inducir mutaciones aleatorias. Independientemente del origen de aislamiento. La biodiversidad está presente y dentro de las características genómicas se ven variaciones que pueden ser correlacionadas con la diversidad presente también en los factores fenotípicos que van desde diferentes capacidades metabólicas para la utilización de carbohidratos, hasta diferenciación en los factores de patogenicidad presentes dentro del grupo de aislados analizados. La biodiversidad genotípica es proporcional a la biodiversidad fenotípica observada.

La falta de asociación encontrada entre los aislados pone de manifiesto la necesidad de incrementar el número de pruebas tanto fenotípicas como moleculares para la caracterización de los aislados, ya que la asociación es más clara a medida que aumenta el número de pruebas de caracterización utilizadas para hacer análisis de conglomerados.

10. RECOMENDACIONES

Es importante tomar en cuenta el apoyo de otras técnicas moleculares como secuenciación y amplificación del gen 16S para realizar una caracterización más completa de los aislados de enterococo, para buscar una mejor asociación entre los aislados analizados.

También es importante tomar en cuenta e informar acerca de las medidas de higiene que deben ser consideradas por los manipuladores de alimentos, en este caso particular los manipuladores de las vísceras de pollo, al momento de manipular el producto, durante su producción y embalaje, debido a que la presencia de distintos factores de patogenicidad, así como genes de resistencia a antibióticos que poseen los aislados de *Enterococcus* spp podrían transferirse entre ellos e incluso alcanzar organismos humanos provocando una zoonosis en la población consumidora.

11. REFERENCIAS

- Aarestrup, F.M., Butaye P. y Witte W. 2002. Nonhuman reservoirs of Enterococci. En *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance*, editado por Michael S. Gilmore, Don B. Clewell, Patrice Courvalin, Gary M. Dunny, Barbara E. Murray y Louis B. Rice. Washington DC: ASM Press, 55–99. <https://doi.org/10.1128 / 9781555817923>.
- Abad-Guamán, R., Capa-Morocho M., Herrera-Yunga V., Herrera-Herrera R. y Escudero-Sanchez. G. 2017. Cambios en la microbiota intestinal de las aves y sus implicaciones prácticas. *Centro de Biotecnología*, 6 (February): 98–108.
- Alzohairy, A. M. 2016. Molecular markers , genotyping , and (next generation) nucleic acid sequencing. En *Plant genetics, biotechnology and forestry*, editado por G. Gyulai. St. Istvan University Press, 30–40.
- Bonacina, J., Suárez N., Hormigo R., Fadda S., Lechner M. y Saavedra L. 2017. A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains. *DNA Research*, 24 (1): 11–24. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsw043>.
- Braïek B. O., y Smaoui S. 2019. Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. *BioMed research international*, 2019: 5938210. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>.
- Braïek, B. O., Smaoui S., Ennouri K., Morandi S., Cremonesi P. y Hani K.. 2019. LWT - Food Science and Technology RAPD-PCR characterisation of two *Enterococcus lactis* strains and their potential on *Listeria monocytogenes* growth behaviour in stored chicken breast meats : Generalised linear mixed-effects approaches. 99 (September 2018): 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.053>.
- Cardozo-Bernal, Á. M., Ramón L. F., Poutou-Piñales R. A., Carrascal-Camacho A. y Zambrano. D. C. 2013. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 18 (2): 203–222. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC18-2.egcp>.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska A. y Łaniewska-Trokenheim L. 2017. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT - Food Science and Technology*, 75: 670–676. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.026>.
- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zarzecka U. y Zadernowska A. 2020. Enterococci isolated from plant-derived food - Analysis of antibiotic resistance and the occurrence of resistance genes. *LWT*, 139: 110549. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110549>.
- Church, N. y Mckillip J.. 2021. Antibiotic resistance crisis : challenges and imperatives. *Biologia*, 76: 1535–1550. *Biologia*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11756-021-00697-x>.
- de Armas, Y., Capó V., López L., Mederos L. y Díaz R. 2010. Comparison of four methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 14 (24): 44–47. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.014>.

- Díaz-Cano, S. y Brady S. 1998. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagnostic Molecular Pathology*, 6 (6): 342–346. <https://doi.org/10.1097/00019606-199712000-00006>.
- Díaz, M., Rodríguez C. y Zhurbenko R. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48 (2): 147–161. <http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v48n2/hie06210.pdf>.
- Domig, K., Mayer H. y Kneifel W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. - 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2–3): 165–188. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00178-8).
- Džidić, S., Šušković J. y Kos B. 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria : Biochemical and genetic aspects. antibiotic resistance in bacteria, *Food Technol. Biotechnol.*, 46 (1): 11–21.
- Escolà-Vergé, L., Fernández-Hidalgo N., Nieves Larrosa M. y Fernandez-Galera R. 2021. Secular trends in the epidemiology and clinical characteristics of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis at a referral center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, (1). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10096-020-04117-x>.
- Franco, M. L. 2013. Características, ventajas y desventajas de la hibridización in situ para la identificación de agentes patógenos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 25 (1): 63–78.
- Franz, C., Stiles M., Heinz Schleifer K. y Holzapfel W. 2003. Enterococci in foods - A conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88 (2–3): 105–122. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00174-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00174-0).
- García-Bermejo, I. y De Ory, F. 2017. Diagnóstico rápido en serología. 35 (4): 246–254.
- García Coca, M., Fernández Robles R. y Gadea Gironés I. 2009. Serología en el siglo XXI: ¿continúa teniendo interés? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37 (1): 40–46.
- García-Solache, M. y Rice L. B. 2019. crossm The *Enterococcus* : a Model of Adaptability to Its Environment. 32 (2): 1–28.
- Garza-González, E., Morfin-Otero R., Mendoza-Olazara S., Bocanegra-Ibarias P., Flores-Treviño S., Rodríguez-Noriega E., Ponce de Leon A., et al. 2019. A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico . Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *Plos one*, 14 (3): 1–13.
- Gilmore, M., Clewell D., Yasuyoshi, I. y Shankar N. 2014. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston. <https://doi.org/10.1016/j.jinteco.2006.12.001>.
- Goel, V., Kumar, D., Kumar, R., Mathur P. y Singh S. 2020. Community acquired enterococcal urinary tract infections and antibiotic resistance profile in north india. *Journal of Laboratory Physicians*, 50–54. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.176237>.
- Goering, R. 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. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>.

- Grover, A., y Sharma P. C. 2016. Development and use of molecular markers: Past and present. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (2): 290–302. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.959891>.
- Gurusubramanian, G., y Kumar S. 2016. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Mipograss*, 11 (3): 116–124. www.usask.ca/.../pawlin/.
- Guzmán Urrego, M. y Bernal Rivera M. 1999. Las pruebas serológicas en el diagnóstico de la enfermedad infecciosa. *Revista de la Facultad de Medicina*, 47 (2): 89–97.
- Hassriana Fazilla S., Hui-min, N., Xin Ee T., y Toh Leong T. 2019. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, 74 (March): 103935. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>.
- Hejazi, M. A., Ghafouri-Fard S., Eslami S., Afshar D., Barzegari A. y Khorshidian N. 2019. Polyphasic characterization of *Enterococcus* strains isolated from traditional Moghan cheese in Iran. *Journal of Food Safety*, 39 (3). <https://doi.org/10.1111/jfs.12631>.
- Huanqin H., Mo F., Zhang W. y Luo Q. 2018. Meningitis caused by *Enterococcus gallinarum* in an immunocompetent host. *Jundishapur J Microbiology*, 11 (9): 10–12. <https://doi.org/10.5812/jjm.67164>.
- Kalenic, S. 2011. El rol del laboratorio de microbiología en conceptos básicos de control de infecciones de international federation of infection control, editado por Candace Friedman y William Newsom. Portadown, 89–118. http://theifc.org/wp-content/uploads/2014/08/Spanish_ch7_PRESS.pdf.
- Kashyap S. K., Maherchandani S. y Kumar N. 2020. Ribotyping: a tool for molecular taxonomy. *Animal Biotechnology. INC.* <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811710-1.00017-3>.
- Kasimoğlu Doğru, A., Gençay Y. E. y Ayaz N. D. 2009. Comparison of virulence gene profiles of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* chicken neck skin and faeces isolates. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 16: 129–133. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2010.2479>.
- Khwaja A. H., Ali S. A., Rehman M., Bin-Asif H. y Zahid S. 2018. The unravelled *Enterococcus faecalis* zoonotic superbugs : Emerging multiple resistant and virulent lineages isolated from poultry environment. *Zoonoses Public Health*, 1–15. <https://doi.org/10.1111/zph.12512>.
- Lara Orozco, K. M., y Suárez Palacios L.M. 2021. Patrón de bandas genéticas en *Enterococcus* sp . aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo .
- Lee, B.J., Vu, B., Seddon A. N., Hodgson H., y Wang S. 2020. Treatment Considerations for CNS Infections Caused by Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* : A Focused Review of Linezolid and Daptomycin. *Annals of Pharmacotherapy*, 52 (12): 1243–1251. <https://doi.org/10.1177 / 1060028020932513>.
- Licht, T. R., y Wilcks A. 2006. Conjugative gene transfer in the gastrointestinal environment. en *advances in applied microbiology*, editado por A. I. Laskin, J. W. Bennett, G. M. Gadd y S. Sariaslani. SAN DIEGO, CA: Elsevier Academic Press Inc, 77–95.

[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\)58002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05)58002-X).

- Lindenstrauß, A., Pavlovic M., Bringmann, A., Behr, J., Ehrmann M., y Vogel R. 2011. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 34 (8): 553–560. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.05.002>.
- Márquez, L., Serrato A., y Cerritos R. 2014. Secuenciación de fragmentos de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos, 231–249. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/secuenciacion.pdf>.
- Meda Gómez, C. B., Zamora Pérez A. L., y Sánchez Parada M. G. 2013. Polimorfismos de ADN y huella genética. En *Biología Molecular Fundamentos y Aplicaciones en las ciencias de la salud*, editado por Adriana María Salazar Montes, Ana Soledad Sandoval Rodríguez y Juan Armendáriz Borunda. México, 171–176.
- Medeiros, A. W., Pereira, R.I., Oliveira, D. V., Martins, P. D., d’Azevedo P. A., Van der Sand, S. Frazzon, J., y Frazzon A. P. G. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1): 327–332. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000031>.
- Mendoza Medellín, A. 2011. El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 54 (1): 18–27.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., y Lodi R. 2006. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal*, 16 (8): 867–875. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.005>.
- Moreno F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E. y De Vuyst L.. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106 (1): 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>.
- Padilla, C., Núñez, M., Padilla A., y Lobos O. 2012. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la región del Maule, Chile. *Revista Chilena de Infectología*, 29 (1): 55–61. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182012000100010>.
- Palomino-Camargo, C., y González-Muñoz Y. 2014. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 31 (3): 535–546. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2014.313.93>.
- Ríos, E., Mejía-Ruiz H., y Álvarez-Castañeda, S. T. 2009. Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. *Ciencia*, 5–13.
- Robles-Contreras, A., y Pérez-Cano H. 2014. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4 (3): 186–191.
- Rojas Chávez, F.D. 2014. Enterococos asociados a patologías humanas : Diferencias fenotípicas y moleculares entre aislados marinos y clínicos.
- Sanderson, H., Ortega-Polo, R., Mcdermott, K., Zaheer, R., Brown, R. S., Majury, A., Mcallister T., y Liss S. N. 2019. Comparison of biochemical and genotypic speciation methods for

- vancomycin-resistant enterococci isolated from urban wastewater treatment plants. *Journal of Microbiological Methods*, 161 (May): 102–110. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.04.019>.
- Scheidegger E.M.D., Fracalanza, S.A.P., Teixeira, L.M., y Cardarelli-Leite P. 2009. RFLP analysis of a PCR-amplified fragment of the 16S rRNA gene as a tool to identify *Enterococcus* strains. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (7): 1003–1008. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700011>.
- Schell, C. M. 2018. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de líquidos obtenidos por punción provenientes de infecciones invasivas humanas. Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y parasitológicos. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/73675>.
- Schell C. M., Delpech, G., Pourcel, N. G., Bernstein, J. C., Grenovero, M. S., Sparo, M. D., Basualdo J.A., y De Luca M. M. 2010. Especies emergentes de enterococos con multi-resistencia antimicrobiana aislados de alimentos de origen animal. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Médicas*, 2 (2): 1–2.
- Solache, M. y Rice L. 2019. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32 (2): 1–28. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-18>.
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar R., y Barrientos L. 2017. Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. 35 (4): 1214–1223.
- Turjeman, A., Babich, T., Pujol, M., Carratalà, J., Shaw, E., Gomila-Grange, A., Vuong, C., et al. 2021. Risk factors for enterococcal urinary tract infections : a multinational , retrospective cohort study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.
- Ursi, M. P., Bertolino L., Andini, R., D Amico, F., Iossa, D., Karruli, A., D Avenia, E., Manduca, S., Bernardo, M., y Zampino, R. 2020. Enterococcal infective endocarditis is a marker of current occult or future incident colorectal neoplasia. *European Journal of Internal Medicine*, (September): 1–6. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2020.10.006>.
- Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin Y., y Fang M. 2013. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4 (1): 2–7. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-2>.
- Zhong, Z., Zhang, W., Song, T., Liu, W., Xu, H., Xi, X., Menghe, B., Zhang H., y Sun, Z. 2017. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research*, 196: 95–105. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.12.009>.
- Zimbardo, M., J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson G. E., y Johnson J. A. 2009. Difco y BBL Manual: Manual of microbiological culture media. Citeseer. Sparks 21152. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C).