

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

Caracterización polifásica parcial de cepas de *Enterococcus* sp para su utilización como agente probiótico

Por

Alfonso García Galaz

Tesis aprobada por la

DIRECCIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como Requisito Parcial para Obtener

El Grado de


Maestro en Ciencias

Hermosillo, Sonora

Septiembre 9, 2003

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Alfonso García Galaz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

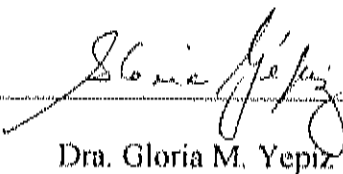


Dra. Evelia Acedo Félix

Directora de Tesis



Dra. Martha Elvia Díaz Cinco



Dra. Gloria M. Yepiz Plascencia



Dr. Jesús Hernández López

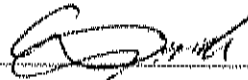
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Para la reproducción parcial o total de este manuscrito con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, México.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis.

ATENTAMENTE



Dr. Alfonso Antero Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por el apoyo económico brindado durante la realización del estudio.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (**CIAD, AC**), por abrirme las puertas de sus instalaciones y todo el apoyo brindado durante mis estudios.

A la Coordinación de Ciencias de los Alimentos, en particular al Laboratorio de Microbiología Molecular y a la **Dra. Evelia Acedo Félix** por confiarme esta parte de su proyecto de investigación.

A la **Q.B. Rosalva Pérez Morales**, por su invaluable ayuda moral y técnica durante mi estancia en el laboratorio de microbiología molecular.

A mis sinodales, la **Dra. Martha Elvia Díaz Cinco**, **Dra. Gloria Yepiz Plascencia** y **Dr. Jesús Hernández López** por sus atinados consejos para el mejoramiento de esta tesis.

A la **Q.B. América Gastelum Esparza** por su invaluable ayuda para el desarrollo técnico del estudio. Por ser maestra, condiscípula y una gran amiga.

Al **Dr. Gaspar Pérez Martínez** por las cepas de conejo proporcionadas para el proyecto de investigación. Así como también al **IATA, CSIC** por las cepas de referencia.

Al laboratorio de Microbiología por la infraestructura y facilidades otorgadas en particular a **Yolanda Núñez**, **Susana León**, **Eva Leyva** y **Ana Lilia López**, por las atenciones y apoyo técnico brindados.

DEDICATORIA

A **Dios** mi fortaleza y consuelo, por quien todo soy y a quien todo debo.

A **mis Padres** que como ya les he dicho, no han sido ni ancla ni vela, sino la luz que ilumina mi camino. ¡¡Este triunfo está 100% dedicado a ustedes!!!

A mi hermano **Alberto**, que humildemente me exigió 2 renglones exclusivamente para el en la dedicatoria. Así que aquí los tienes hermalitro.

También a **Conrado, Mariana, Conradito y Karlita**, quienes me han dado innumerables momentos felices.

A **mis compañeros de maestría** que no los nombro por miedo a que alguno se me olvide. Gracias a todos ustedes porque hicieron mas llevadera esta etapa de mi vida.

A mis buenos amigos del laboratorio: **Verito**, que te puedo decir mariposa traicionera, solo que no cambies nunca. **Claudita**, mi querida "Miss sutileza" te pediría que cambiaras, pero se que no lo haras y que bueno así me caes súper. **Marcelita**, güerita vaga y superpuntual eres megagenial. **Rocio**, eres una latosa pero como se te aprecia **Yolanda** "No pasa nada" y **Frank** ¡¡¡Oh gran maestro del RAPD!!!.

A **Jaqueline** mi gran amigocha de siempre, como te quiero niña bonita.

A mis amigas **Ame** y **Di** (cinéfilas compañeras de vicio, las quiero mucho). Así como a **Nidia, Javier, Ana, Yerén, Azucena, Consuelo, Abraham, Almita, Lupita, Noelia, Hermán, Cinthia, Ramón** y **Jandy**. Y a tí que siempre estás en mi mente.

A **todos ustedes** solo tengo dos cosas que decirles: en mi corazón y en mi oración siempre estarán presentes.

CONTENIDO

RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
General	4
Específicos	4
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	5
Alimentos Funcionales	5
Probiótico	6
Prebiótico	8
Simbiótico	8
Selección de Cepas Probióticas	9
Fuente: Collins y cols, 1998, Klaenhammer y cols., 1999	11
Determinaciones Fenotípicas	12
Pruebas de Tránsito Gastrointestinal	12
Antagonismo Bacteriano	13
Resistencia a antimicrobianos (Resistotipo)	14
Determinaciones Genotípicas	15
Análisis Plasmídico	15
Restricción de ADN	17
Ribotipado	17
Electroforesis de campo pulsado (PFGE)	18
Métodos basados en PCR	20
Algunos Estudios Realizados con Bacterias Probióticas	25
Género <i>Enterococcus</i>	30
Localización Taxonómica	30
Características Generales	31
Importancia del Género	32
Enterococcus como Probióticos	33
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Aislamiento Primario	36
Origen de las cepas	36
Pruebas preliminares	37
Prueba de hidrólisis de esculina	37
Prueba de BHI salado	37
Resistencia al Tránsito Gastrointestinal	38

Prueba Cualitativa de Supervivencia al Tránsito Gastrointestinal	38
Fase I	38
Fase II	39
Prueba Cuantitativa de Supervivencia al Tránsito Gastrointestinal	40
Resistencia a pH ácido	40
Tolerancia a sales biliares	41
Identificación de Especie Bacteriana	43
Prueba de PYR	43
Fermentación de carbohidratos y alcoholes	45
Antagonismo Bacteriano	47
Determinación Cualitativa	47
Determinación Cuantitativa	48
Resistencia a los Antimicrobianos	51
RAPD	51
Lisis rápida de colonia	51
Reacción de PCR	52
Electroforesis	53
PFGE (Electroforesis de campo pulsado)	53
Preparación de discos de agarosa con ADN cromosomal intacto	53
Digestión de ADN Inmovilizado en Discos de Agarosa	57
Electroforesis de Campo Pulsado	58
ARDRA	59
Análisis Estadístico	61
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
Aislamiento Primario	63
Cepas Utilizadas	63
Pruebas Preliminares	63
Resistencia al Tránsito Gastrointestinal	68
Recuperación	68
Resistencia a pH ácido	74
Tolerancia a sales biliares	75
Identificación de Especie Bacteriana	76
Antagonismo Bacteriano	79
Determinación Cualitativa	79
Determinación cuantitativa	80
Resistencia a los antimicrobianos	83
RAPD	89

PFGE	98
ARDRA	99
Correlaciones Generales	101
CONCLUSIONES	108
RECOMENDACIONES	111
REFERENCIAS	112
ANEXO I. PRINCIPIO DE LAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA	120
Tinción Gram	120
Prueba de Catalasa	122
Prueba de PYR	123
Hidrólisis de Esculina	123
Supervivencia en BHI salado	124
Fermentación de Carbohidratos	125
ANEXO II. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	126
Caldo M17	126
Agar M17	126
Caldo MRS	127
Agar MRS	128
Caldo Mueller Hinton	129
Agar Mueller Hinton	129
Agar Endo	129
Agar Hektoen Enteric	130
Caldo TPY	131
ANEXO III. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.	132

INDICE DE TABLAS

1	Criterios para seleccionar una cepa probiótica	11
2	Mezcla de reacción utilizada en la técnica de RAPD por PCR	54
3	Secuencia de los cinco iniciadores utilizados para la técnica de RAPD por PCR	55
4	Resultado de las pruebas de fermentación de carbohidratos	77
5	Identificación de especie de las cepas de <i>Enterococcus</i> en base a el patrón de fermentación de carbohidratos	78
6	Resistencia a los antimicrobianos de las cepas aisladas en el estudio	88

LISTA DE FIGURAS

1	Interrelación entre los tipos de alimentos funcionales	10
2	Pasos que se siguen en un ciclo convencional de PCR	22
3	Proceso esquematizado para la realización de la prueba de resistencia a pH ácido cuantitativa	42
4	Esquematación del procedimiento seguido para llevar a cabo la prueba de tolerancia a sales biliares cuantitativa	44
5	Esquema general de los pasos que se realizan para llevar a cabo la prueba de PYR	46
6	Procedimiento esquematizado de la técnica de cultivo mixto	50
7	Esquema general del procedimiento de la técnica de PFGE	60
8	Observación microscópica de <i>Enterococcus</i>	64
9	Prueba de catalasa	65
10	Hidrólisis de esculina	66
11	Supervivencia en BHI salado	67
12	Selección de cepas de cerdo basándose en el tránsito gastrointestinal	69
13	Porcentajes de resistencia a pH ácido y tolerancia a sales biliares en las cepas aisladas de cerdo	71
14	Porcentajes de resistencia a pH ácido y tolerancia a sales biliares en las cepas provenientes de conejo	72
15	Porcentajes de resistencia a pH ácido y tolerancia a sales biliares en las cepas	

	de referencia	73
16	Placa de medio MRS en el cual se observa el antagonismo manifestado por los halos de inhibición alrededor de los pocillos	81
17	Porcentaje de inhibición de las cepas de <i>Enterococcus</i> aisladas de cerdo frente a los dos patógenos probados	84
18	Porcentaje de inhibición de las cepas de <i>Enterococcus</i> provenientes de conejo frente a los dos patógenos probados	85
19	Porcentaje de inhibición de las cepas de <i>Enterococcus</i> de referencia frente a los dos patógenos probados	86
20	Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud de todas las cepas de <i>Enterococcus</i> estudiadas con el iniciador OPA 3	91
21	Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud de todas las cepas de <i>Enterococcus</i> estudiadas con el iniciador OPA 10	92
22	Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud de todas las cepas de <i>Enterococcus</i> estudiadas con el iniciador OPA 13	93
23	Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud de todas las cepas de <i>Enterococcus</i> estudiadas con el iniciador OPA 15	94
24	Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud de todas las cepas de <i>Enterococcus</i> estudiadas con el iniciador OPA 16	95
25	Dendrograma de las cepas de <i>Enterococcus</i> elaborado con las matrices combinadas de los iniciadores OPA 10 y 13	97

26	Perfil electroforético y dendrograma de correlación de todas las cepas de <i>Enterococcus</i> en base a electroforesis de campo pulsado	100
27	Perfil electroforético y dendrograma de correlación de todas las cepas de <i>Enterococcus</i> en base a ARDRA utilizando <i>Eco</i> RI	102
28	Dendrograma de correlación de las cepas de <i>Enterococcus</i> en base a características fenotípicas	104
29	Dendrograma de correlación de las cepas de <i>Enterococcus</i> en base a características genotípicas	105
30	Dendrograma de correlación de las cepas de <i>Enterococcus</i> en base a características fenotípicas y genotípicas	106
31	Pasos que se siguen en la tinción gram	121

RESUMEN

La flora intestinal de los diferentes organismos juega un papel importante en el estado de salud de los individuos. Los microorganismos que forman parte de la flora intestinal pueden ser, tanto inocuos como patógenos. Con la ingesta de alimentos adicionados con microorganismos benéficos para el organismo (probióticos), se puede mantener y restaurar un estado favorable de salud. En la actualidad se utilizan cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* como probióticos tanto en humanos como en animales. Una de las áreas con mayor potencial de beneficiarse con la aplicación de probióticos es la industria porcícola, principalmente, para evitar el problema de las enfermedades diarreicas ocasionadas por el patógeno *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar cepas del género *Enterococcus* del contenido gastrointestinal de cerdos sanos para utilizarlas a futuro como probióticos en ellos mismos. Se aislaron 2 cepas de *Enterococcus faecalis*, 2 de *Enterococcus mundii* y 7 de *Enterococcus faecium* con características de resistencia a ácido, tolerancia a sales biliares y una fuerte actividad antagónica superior al 80% contra los patógenos *E. coli* K88 y *S. choleraesuis*. Dentro de la caracterización polifásica se estudiaron características tanto fenotípicas como genotípicas. En el aspecto correspondiente a los estudios fenotípicos (identificación bioquímica, susceptibilidad a los antimicrobianos, resistencia al tránsito gastrointestinal y antagonismo bacteriano) se encontraron similitudes hasta del 100% entre las diferentes especies. Sin embargo al considerar únicamente los estudios genómicos (RAPD con los iniciadores OPA 3, 10, 13, 15 y 16; PFGE utilizando *Sma* I y ARDRA utilizando *Eco* RI), se lograron obtener

especies solo con el 95% de similitud entre ellas. Con lo anterior se reafirmó la mayor exactitud de la identificación genómica por encima de la identificación fenotípica. La identificación genómica permitió también elucidar de manera presuntiva el origen de la cepa en estudio, ya que los perfiles electroforéticos obtenidos en RAPD y PFGE mostraron una tendencia a agrupar entre sí a las cepas de cerdo, así como agrupar entre sí a las cepas de conejo (cepas de *Enterococcus* incluidas en el estudio para fines de comparación). Cuando se consideraron tanto los aspectos fenotípicos como genómicos, la similitud entre las cepas alcanzó un máximo del 91%, lo cual manifiesta la gran importancia para fines de identificación y clasificación de los estudios polifásicos, ya que en éstos difícilmente se encontrará que dos cepas distintas sean clasificadas como una misma. Con los datos anteriores se concluyó que a partir de las 195 cepas de *Enterococcus* aisladas al principio del estudio se lograron caracterizar 11 con potencial probiótico para su futura aplicación en cerdos.

INTRODUCCIÓN

La flora intestinal juega un papel muy importante en la salud del organismo (Falk y cols, 1998). A lo largo del tracto gastrointestinal humano y de los animales se han identificado alrededor de 400 a 500 especies bacterianas distintas (Nielsen y cols, 1994). Dentro de los microorganismos que se encuentran en dicho tracto existen tanto inocuos, como patógenos potenciales. Gracias al balance entre las poblaciones microbianas, no se presentan los efectos adversos de los patógenos (Forbes y cols, 1998). La inclusión de ciertos alimentos en la dieta, puede favorecer un adecuado balance microbiano intestinal (Gibson y cols, 2000).

El consumo de alimentos funcionales aporta beneficios al consumidor (Gibson y cols, 2000). Los alimentos fermentados (precursores de los alimentos funcionales), se consumen desde tiempos ancestrales sin tener conciencia de los beneficios que aportan (Shortt, 1999). A principios del siglo pasado, Metchnikoff propuso una asociación entre salud y alimentos fermentados (González y cols, 1993) y a partir de sus observaciones, se desarrolló el concepto de alimento funcional (Falk y cols, 1998). Los alimentos funcionales pueden ser fermentados o adicionados con nutrientes específicos y tienen como objetivo lograr un aporte que vaya más allá del nutricio (Gibson y cols, 2000).

Un tipo de alimento funcional es el que se adiciona con probióticos (Gibson y cols, 2000; Roberfroid, 2000). Los probióticos son microorganismos vivos que modifican el balance microbiano intestinal disminuyendo la población de patógenos (Roberfroid, 2000). Actualmente los microorganismos comúnmente utilizados como probióticos

pertenece a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Prasad y cols, 1998). El consumo de alimentos adicionados con probióticos disminuye la aparición de problemas gastrointestinales.

Los problemas gastrointestinales bacterianos aquejan a humanos y animales. En la mayoría de los casos la solución es la aplicación de antibióticos. Sin embargo, cada día es mayor el número de bacterias resistentes a los mismos (Forbes y cols, 1998).

Los alimentos funcionales son una alternativa profiláctica para lograr y mantener un estado de salud favorable. De lo anterior, se desprende la necesidad de concientizar a la industria alimentaria para que se reconozca el papel que juegan los probióticos en la protección de la salud. La utilización de probióticos puede evitar en ciertos casos la utilización de antibióticos, también pueden sustituir a ciertos conservadores que son utilizados en los alimentos, para una mayor preservación durante su comercialización. Si los probióticos son añadidos en los alimentos se obtendrán beneficios en la salud tanto humana como animal (Svenson, 1999).

Los efectos benéficos de los probióticos en animales son de interés para nuestro estado, ya que uno de sus principales pilares económicos es la industria porcícola. En Sonora, la producción de carne de porcinos durante el 2002 fue de 176,471 toneladas, ocupando el segundo lugar a nivel nacional (SAGAR, 2003). Uno de los principales problemas que enfrenta esta industria son las infecciones gastrointestinales causadas por *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis* (Izeta, 1992). La solución tradicional para resolver este problema es la aplicación de antibióticos. Sin embargo, a través de la ruta evolutiva las bacterias han desarrollado resistencia hacia muchos antibióticos, siendo

necesario la búsqueda de otras alternativas para el control de las enfermedades gastrointestinales.

La utilización de penicilina ha generado un aumento en la resistencia de *Salmonella* hacia dicha droga. En 1979 menos del 1% de las cepas de *Salmonella* aisladas en cerdos eran resistentes al fármaco, aumentando en 1996 hasta un 34% (CSPI, 1999). El desarrollo de resistencia a antibióticos, inducida por la utilización inadecuada de los mismos entre muchos otros factores, implica una búsqueda constante de nuevos antibióticos (McKellar, 1998; Trieu-Cuot y cols, 1999). Generalmente cuando se encuentra que una bacteria es resistente a un determinado antibiótico, se recurre a la administración de un antibiótico alternativo, pero a la larga también se genera resistencia hacia el nuevo antibiótico, lo que requiere la administración de uno nuevo. Esto genera un círculo vicioso que incrementa enormemente los costos de producción.

Hasta la fecha, la mayoría de los probióticos utilizados son aislados de humanos y se desconoce si dichos probióticos podrán expresar sus factores benéficos si son aplicados en cerdos, considerando el criterio de especificidad de especie (Kullen y cols, 1999). El género *Enterococcus* es una fuente adecuada para la búsqueda de probióticos. En principio, este género se puede aislar de los mismos lugares de donde se han aislado *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Gracias a las características de antagonismo bacteriano contra patógenos observadas en la especie *E. faecium*, se puede inferir que el género posee especies con potencial probiótico. Este género contiene varias especies y prácticamente solo se ha estudiado una de ellas como agente probiótico, lo que proporciona una amplia alternativa para la búsqueda de nuevas cepas probióticas.

OBJETIVOS

General

Caracterizar parcialmente cepas de *Enterococcus* obtenidas del contenido gastrointestinal del cerdo, de manera polifásica para su posible utilización como agentes probióticos.

Específicos

1. Seleccionar cepas de *Enterococcus* obtenidas del gastrointestinal de cerdos con características de resistencia a ácidos y tolerancia a sales biliares.
2. Realizar pruebas fenotípicas: Fermentación de carbohidratos, expresión de enzimas características y susceptibilidad a antimicrobianos a las cepas de *Enterococcus*.
3. Determinar el poder inhibitorio de las cepas de *Enterococcus* sobre los patógenos *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*.
4. Realizar la caracterización molecular sobre la base de amplificación de fragmentos polimórficos de ADN al azar (RAPD), electroforesis de campo pulsado (PFGE) y análisis de restricción ADN ribosomal (ARIDRA) a las cepas de *Enterococcus*.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Alimentos Funcionales

Los alimentos funcionales son aquellos que aportan acciones específicas que van más allá del aporte nutricional (Gibson y cols, 2000; Roberfroid, 2000). Los alimentos fermentados (precursores de los alimentos funcionales) se consumen desde tiempos ancestrales, sin tener una clara conciencia de los efectos benéficos que éstos aportan. Sin embargo, a principios del siglo XIX Metchnikoff observó una estrecha asociación entre el consumo de alimentos fermentados y un estado de salud favorable (González y cols., 1993). A partir de sus observaciones y gracias a la colaboración de varios investigadores, se desarrolló el concepto de alimento funcional. Estos alimentos, también llamados nutracéuticos, son los que están dirigidos hacia dos objetivos básicos: a) favorecer el correcto funcionamiento de las vías metabólicas y b) disminuir el riesgo de enfermedades provocadas por microorganismos patógenos. Los alimentos funcionales son administrados directamente al huésped a través de diferentes vías (Gibson y cols., 2000).

Los nutracéuticos son administrados en tres formas: a) como suplementos alimenticios en cápsulas o tabletas, b) alimentos completamente naturales y c) alimentos adicionados con microorganismos vivos (Gibson y cols, 2000). Estos alimentos se pueden clasificar a su vez en cuatro grupos: los adicionados con ingredientes específicos, los alimentos adicionados con probióticos, adicionados con prebióticos y adicionados con

simbióticos (Gibson y cols, 2000; Roberfroid, 2000; Ziemer y cols, 1998; Collins y cols, 1999).

Los alimentos adicionados con ingredientes específicos no implican una relación directa con bacterias (Gibson y cols, 2000). A esta clase de alimentos se le adicionan compuestos químicos naturales o sintéticos, que tienen una función específica sobre el organismo (Gibson y cols, 2000). Algunos ejemplos de este tipo de alimentos son los suplementados con vitamina A administrados a niños, para estudiar sus efectos nutricionales (Schmidt y cols, 2002; Sivan y cols, 2002). También la administración de ácido linoléico conjugado (comúnmente llamado CLA, por sus siglas en inglés), para disminuir la grasa abdominal y ver su efecto sobre lipoproteínas plasmáticas (Riserus y cols, 2001, Benito y cols, 2001). Por otra parte, los alimentos suplementados con probióticos, prebióticos y simbióticos, sí presentan una asociación con bacterias (Rosenberg, 1999; Vanderhoof, 2001; Saavedra, 2001; Wollowski y cols, 2001; Saxelin y cols, 1999).

Probiótico

Los probióticos son los microorganismos vivos adicionados a algunos alimentos para mejorar su balance microbiano intestinal y lograr una composición más saludable (Gibson y cols, 2000; Roberfroid, 2000; Collins y cols, 1999). Las infecciones intestinales se presentan cuando hay un sobrecrecimiento de patógenos (Forbes y cols, 1998). Los mecanismos por los cuales los probióticos mejoran el balance intestinal son: a) adherencia a la mucosa, evitando así que los patógenos se implanten en ésta; b)

inactivación de los mismos y c) estimulación del sistema inmune del hospedero, a través de una respuesta inmune no específica (Salminen y cols, 1998; Roffe, 2000). La mayoría de los microorganismos que actualmente se utilizan como probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (Roberfroíd, 2000; Rosenberg, 1999).

El grupo de bacterias ácido lácticas está constituido por doce géneros bacterianos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Netherwood y cols, 1999). Las bacterias que comúnmente son utilizados como probióticos en la actualidad son varias especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Collins y cols, 1999). A pesar de que el género *Enterococcus* contiene 29 especies y se han observado propiedades antagónicas en algunas de estas especies, solamente la especie *E. faecium* es utilizada como agente probiótico. (Netherwood y cols, 1999; Laukova y cols, 1998; Audisio y cols, 1999; Audisio y cols, 2000; Audisio y cols, 2001; Gardiner y cols, 1999). Las bacterias probióticas, independientemente del género o especie al que pertenezcan, ven favorecido su desarrollo en el tracto gastrointestinal del hospedero gracias a los prebióticos (Roberfroíd, 2000; Ziemer y cols, 1998; Collins y cols, 1999; Paludan y cols, 2002).

Prebiótico

El prebiótico es un ingrediente alimenticio que no es digerible por el huésped y lo utilizan las bacterias probióticas para aumentar su desarrollo o actividad metabólica (Rosenberg, 1999; Roberfroid, 2000; Gibson y cols, 2000). Las propiedades que debe cumplir una sustancia para ser considerado prebiótico son: a) que no se digiera ni absorba en el tracto gastrointestinal del huésped, b) que sea un sustrato selectivo para las bacterias probióticas y c) que tenga además la capacidad de alterar la microflora intestinal, hacia una composición en la que se vean favorecidos los microorganismos inocuos para el huésped (Collins y cols, 1999). De acuerdo con estas características, los únicos prebióticos probados y por lo tanto que se pueden llamar alimentos funcionales son los fructanos de tipo inulina (Roberfroid, 2000). Entre estos fructanos se incluye la inulina nativa, la inulina hidrolizada enzimáticamente u oligofructosa y algunos fructooligosacáridos sintéticos (Roberfroid, 2000). La lactulosa y el lactitol son otros carbohidratos que están actualmente en evaluación para su posible utilización como prebióticos. Aunque los prebióticos se pueden administrar solos, son más útiles si se administran mezclados con bacterias probióticas (Collins y cols, 1999).

Simbiótico

Los alimentos considerados simbióticos son los adicionados tanto con bacterias probióticas como con prebióticos (Ziemer y cols, 1998; Gibson y cols, 2000). La adición de microorganismos vivos (probióticos) con sustratos específicos para su desarrollo (prebióticos), constituye una buena opción para los alimentos funcionales. Por ejemplo en

las mezclas de cepas de *Bifidobacterium* con fructooligosacáridos o *Lactobacillus* con lactitol se mejora la supervivencia del probiótico, gracias a que el sustrato específico está disponible para su fermentación. El simbiótico beneficia al huésped mejorando la supervivencia e implantación del probiótico en el tracto gastrointestinal. Ver Figura 1 (Ziemer y cols, 1998).

Selección de Cepas Probióticas

Una cepa bacteriana necesita cumplir con varios criterios para ser considerada como un probiótico [Collins y cols, 1998; Salminen y cols, 1998 (b)]. En general, se estudian sus propiedades intrínsecas tales como: supervivencia y actividad, su recuperación a lo largo del tracto gastrointestinal y estudios sobre su interacción con el huésped [Salminen y cols, 1998 (b)].

La selección de cepas probióticas en el laboratorio se lleva a cabo mediante un conjunto de pruebas tanto fenotípicas como genotípicas (Gómez y cols, 1998). Las pruebas fenotípicas tienen como objetivo asegurar que la bacteria candidata a ser probiótica, cumpla con los criterios establecidos en la Tabla 1 (Collins y cols, 1998). La caracterización genotípica es utilizada para dar autenticidad a la cepa probiótica. De ésta manera, cuando se lleven a cabo estudios *in vivo* será posible su seguimiento a través del tracto gastrointestinal y esta misma autenticidad sirve para proteger a la cepa de una utilización comercial inadecuada (Schleifer y cols, 1989, Schleifer y cols, 1995).

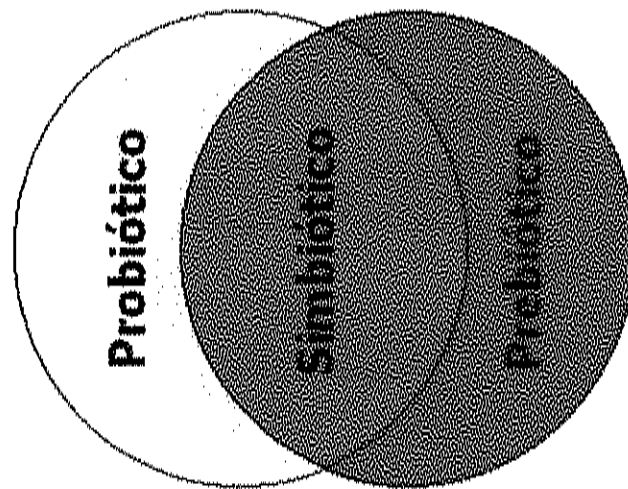


Figura 1. Interrelación que existe entre los tipos de alimentos funcionales

Tabla 1. Criterios para seleccionar una cepa probiótica.

1. La fuente de la cepa deberá ser la misma sobre la cual se pretende administrar.
2. Ser un microorganismo generalmente reconocido como seguro (condición GRAS por sus siglas en inglés).
3. La cepa deberá poseer un perfil de resistencia a los antibióticos deseable. Por ejemplo resistente a metronidazol pero con sensibilidad a otras drogas.
4. Debe producir factores antagónicos contra microorganismos patógenos potenciales, particularmente contra agentes gram negativos, invasivos.
5. Debe poseer una actividad metabólica deseable.
6. Ser un microorganismo de fácil aplicación en diferentes procesos tecnológicos.
7. No debe ser patógeno aun en huéspedes inmunocomprometidos.
8. Ser un microorganismo que no promueva la inflamación de tejidos.
9. Debe permanecer viable, evadiendo el sistema inmune del huésped, una vez que esté asociado a la mucosa del intestino.
10. Debe estimular el sistema inmune de la mucosa a través de citocinas.
11. El microorganismo debe tener propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas.
12. La cepa debe ser un vehículo potencial para la entrega de proteínas recombinantes y péptidos hacia un sitio específico del tracto gastrointestinal humano.
13. El microorganismo debe presentar una caracterización genómica exacta

Fuente: Collins y cols, 1998, Klaenhammer y cols., 1999

Determinaciones Fenotípicas

Las primeras determinaciones que se pueden realizar para la caracterización fenotípica son las pruebas de biotipificación y de resistencia al tránsito gastrointestinal (Gómez y cols, 1998; Prasad y cols, 1998). Las primeras, sirven para identificar bioquímicamente la especie bacteriana que se está estudiando y básicamente consisten en patrones de fermentación de carbohidratos y detección de enzimas características de los diferentes géneros bacterianos (Forbes y cols, 1998). Las pruebas que generalmente se llevan a cabo para la identificación bioquímica de bacterias del género *Enterococcus* son: Tinción Gram, Prueba de Catalasa, Prueba de PYR (L-pirrolidonil arilamidasa), Hidrólisis de Esculina, Supervivencia en BHI (infusión cerebro corazón) salado y Fermentaciones de carbohidratos. En cada una de las diferentes técnicas de caracterización se estandariza inicialmente el inóculo de trabajo dependiendo de la técnica que se está utilizando, aunque generalmente para la estandarización de dicho inóculo se utiliza el nefelómetro de McFarland, tubo número 3 cuya densidad óptica es similar a un cultivo bacteriano con una concentración de 9×10^8 UFC/mL. Consultar el Anexo I para ver los principios de las técnicas anteriormente mencionadas.

Pruebas de Tránsito Gastrointestinal

Las pruebas de tránsito gastrointestinal consisten en determinar la supervivencia de la bacteria ante condiciones de pH ácido y sales biliares (Prasad y cols, 1998). Éstas simulan la acidez en el estómago y presencia de sales biliares en el intestino, que debe soportar la bacteria probiótica al ser ingerida y llegar hasta el colon (Gómez y cols, 1998;

Kociubinski y cols, 1999). La prueba de resistencia a pH ácido se lleva a cabo en un medio basal, el cual se acidifica hasta alcanzar el pH estomacal (cerca de 3.0), en dicho medio se exponen las bacterias y posteriormente se analiza su supervivencia. Para la prueba de sales biliares, se puede utilizar también un medio basal al cual se le añaden sales biliares, o bien se pueden utilizar medios diferenciales que facilitan la determinación de la actividad de la bacteria frente a las sales biliares. En ambos casos, lo importante es determinar la supervivencia en el medio (Dashkevich y cols, 1989). Una vez que la bacteria ha soportado el tránsito gastrointestinal, se estudia su actividad antagonista (Collins y cols, 1998).

Antagonismo Bacteriano

El antagonismo bacteriano proporciona información acerca de las propiedades inhibitorias del candidato a probiótico, contra algunos patógenos de interés (Kociubinski y cols, 1996). Las bacterias probióticas producen sustancias que inhiben el desarrollo de bacterias patógenas (González y cols, 1993; Kociubinski y cols, 1996). Dichas sustancias pueden ser ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno o bacteriocinas (González y cols, 1993; Vandenberg, 1993). En las cepas con potencial probiótico se identifican frecuentemente bacteriocinas, las cuales son proteínas con actividad antibacteriana (Jin y cols, 1996; Klaenhammer, 1993). Existen varias técnicas para determinar el antagonismo bacteriano, una de las más usuales es el ensayo con disco de papel, en el cual se realiza una lisis y centrifugación del cultivo de prueba. Con el sobrenadante se impregnan discos de papel que se colocan sobre cultivos masivos del patógeno y se observa el halo de

inhibición alrededor del disco. Existen variantes para este ensayo como son los pocillos en la superficie del agar, inoculado con el patógeno, para posteriormente llenar los pocillos con el sobrenadante. Estas determinaciones de antagonismo son cualitativas, sin embargo existen técnicas que permiten cuantificar el antagonismo bacteriano (González y cols, 1993; Houtsma y cols, 1996).

Una de las determinaciones más útiles que se llevan a cabo para cuantificar el antagonismo bacteriano es la técnica del cultivo mixto. En dicha técnica se ponen en contacto en un medio general tanto el candidato a probiótico como la cepa patógena, se realiza una cuenta viable y se incuba el cultivo mixto durante 6 horas. Posteriormente, se cuantifica nuevamente el cultivo mixto mediante cuenta viable utilizando en ambas cuentas un agar selectivo para el patógeno (González y cols, 1993). Una vez que se obtiene el espectro de inhibición contra patógenos, se realizan otros ensayos que permiten determinar la utilidad *in vivo* de la bacteria candidata a probiótico (Collins y cols, 1998).

Resistencia a antimicrobianos (Resistotipo)

Otro aspecto útil que se utiliza para la caracterización de cepas candidatas a probióticas, es el perfil de resistencia a antimicrobianos (Collins y cols., 1998). A pesar de ser una práctica permitida (siempre y cuando se bajo un estricto control), en muchas ocasiones se les administran antibióticos en exceso a los cerdos como promotores de crecimiento y la vía de administración de los mismos es a través de los alimentos (Carro y cols, 2002). Con el establecimiento del resistotipo, es posible conocer los efectos que

pueden tener los antibióticos presentes en el animal, o en el alimento sobre la cepa candidata a probiótica.

Determinaciones Genotípicas

Estas técnicas están basadas en el análisis del material genético cromosómico o extracromosómico presente en la bacteria (Farber, 1996). Este tipo de determinaciones genotípicas es extremadamente valioso para la detección y caracterización específica de las cepas seleccionadas como probióticas (Holzapfel y cols, 2001). Algunos métodos moleculares comúnmente utilizados son: perfil de plásmidos, análisis de restricción de ácido desoxirribonucleico (ADN), Ribotipado, electroforesis de campo pulsado (PFGE), sistema de tipado basados en Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y actualmente algunos métodos cuantitativos de PCR (Farber, 1996).

Análisis Plasmídico

El análisis de plásmidos es la determinación genotípica más sencilla que existe (Farber, 1996). Los plásmidos son secuencias de ácidos nucleicos extracromosómicos que pueden presentarse en un número variable de copias en una misma célula. Los plásmidos pueden poseer una amplia gama de pesos moleculares desde 1.5 Kb hasta alrededor de 300 Kb. Generalmente son pequeños, se presentan de manera circular o superenrollada. Tienen replicación autónoma en la célula y algunas secuencias codifican características que modifican el fenotipo de la bacteria, pero no funciones vitales de la misma (Madigan y cols, 1998; Lewin, 2002). La determinación consiste en extraer el

material plasmídico y realizar una electroforesis del mismo, en geles de agarosa. Se obtienen una serie de bandas (teñidas con bromuro de etidio), que representa a los plásmidos de diferentes pesos moleculares. Una de las principales desventajas de esta determinación es que pueden existir diferentes plásmidos en la misma bacteria que a pesar de poseer el mismo peso molecular presenten funciones diferentes. Para resolver este problema se puede realizar una digestión de los plásmidos con enzimas de restricción. Otra desventaja es que los plásmidos pueden encontrarse en diferentes formas (lineal, circular abierto, circular completamente cerrado y superenrollado) y al momento de realizar el gel se obtengan diferentes bandas que correspondan a un mismo plásmido en diferente conformación. Este último problema se puede resolver mediante la técnica de análisis bidimensional. La presencia y el número de plásmidos es un criterio parcial de identificación de las cepas (Farber, 1996). Por desgracia, ante diferentes condiciones, por ejemplo los diferentes medios de cultivo, los plásmidos pueden o no manifestarse (García, 2001). A pesar de ser una técnica sencilla, es la más inespecífica (Farber, 1996). De acuerdo a Levene, cuando los plásmidos son de un peso molecular muy alto, no es factible separarlas a través de electroforesis convencional y en su lugar se puede utilizar electroforesis de campo pulsado (PFGE), que también ha demostrado ser útil para separar plásmidos en estado circular abierto (Levene y cols, 1987). Una forma de optimizar los análisis del perfil plasmídico es mediante la utilización de esta técnica de PFGE, ya que la misma permite una separación de bandas más fina que la obtenida con electroforesis convencional (Livesley y cols, 1997).

Restricción de ADN

El análisis de restricción de ADN cromosómico es específico para identificar una cepa (Farber, 1996). La determinación consiste en extraer el material cromosómico de las bacterias, posteriormente éste es digerido con enzimas de restricción (endonucleasas). El material digerido es sometido a electroforesis en geles de agarosa. Se obtiene una serie de bandas que corresponden a fragmentos de un determinado peso molecular. Los fragmentos son característicos del ADN de la cepa digerido con dicha enzima (Sambrook y cols, 1990; Lewin, 2002). La principal desventaja de esta determinación es el gran número de bandas que se obtiene, lo que dificulta la identificación de fragmentos con pesos moleculares similares. Sin embargo, si se utilizan diferentes enzimas de restricción para una misma cepa, se pueden obtener diferentes perfiles de bandas y con ello aumentar o disminuir el número de las mismas. Este tipo de análisis es también llamado de microrrestricción. Los diferentes perfiles de bandas que se pueden obtener con diferentes enzimas de restricción son llamados longitudes polimórficas de fragmentos al azar o RFLP por sus siglas en inglés (Farber, 1996; Sambrook y cols, 1990).

Ribotipado

El ribotipado se refiere a la utilización de sondas de ácidos nucleicos que reconocen genes ribosomales. El ácido ribonucleico ribosomal (ARNr), presente en todas las bacterias, constituye aproximadamente el 82% del ARN total en un bacteria típica. Este ARNr está compuesto por tres especies denominadas 23S, 16S y 5S. Los genes que codifican el ARNr son altamente conservados, por ejemplo en los genes en muchas

bacterias diferentes el ARNr es muy similar. Además, mientras que la mayoría de los genes bacterianos están presentes en solamente una copia, los operones ribosómicos pueden estar presentes en 2 a 11 copias por célula. En la práctica, lo que se hace es aislar el ADN cromosómico y realizar la digestión con una enzima de restricción para cortar el ADN en fragmentos pequeños. Una vez que el ADN es sometido a electroforesis, es transferido a una membrana de nitrocelulosa o de nylon. Esta membrana puede ser utilizada como un soporte sólido para la hibridación con la sonda que contiene secuencias del 23S, 16S y 5S, las cuales se encuentran generalmente marcadas con digoxigenina o con isótopos radioactivos (Farber, 1996).

Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

La electroforesis de campo pulsado es una determinación específica y bastante confiable para identificar una cepa (McClelland y cols, 1987; Méndez y cols, 1995; Bustamante y cols, 1993). En esta técnica se extrae el material cromosomal y se somete a la digestión con enzimas de restricción. Las enzimas de restricción que se utilizan en esta determinación son de corte poco frecuente, lo anterior asegura que se generarán pocos cortes al ADN cromosómico y por lo tanto, se obtendrán un número bajo de fragmentos (entre 10 y 15) (McClelland y cols, 1987), lo cual es una ventaja sobre los análisis de microrrestricción en los cuales se pueden obtener varios cientos de bandas. Una característica de esta técnica, es que el tratamiento con las enzimas líticas, así como con las enzimas de restricción, se realiza *in situ*, nunca hay una manipulación manual directa de ADN. Las enzimas de restricción de corte poco frecuente son enzimas que reconocen 8 pares de bases o más, en cambio las enzimas de restricción convencionales reconocen

solo 4 – 6 pares de bases. Como puede deducirse, al ser menor el número de fragmentos que se obtienen después de una digestión con enzimas de corte poco frecuente, sus pesos moleculares serán bastante altos, por lo cual si hubiese una manipulación directa de éstos, sería muy probable causar un rompimiento en los mismos, lo cual nos daría mas bandas de las reales. Las bacterias son embebidas en agarosa y en esa matriz se realizan todos los tratamientos, de tal forma que al finalizarlos, lo único que se obtiene es el ADN embebido en la misma agarosa, posteriormente se digiere con las enzimas de restricción sin causarle ningún daño físico. Dichos fragmentos posteriormente se separan en un gel de agarosa mediante electroforesis de campo pulsado y se tiñen con bromuro de etidio. Las bandas que aparecen en el gel corresponden a los fragmentos de ADN y son características de cada cepa ante dicha enzima. Es importante mencionar que si los fragmentos obtenidos después de la digestión fueran sometidos a una electroforesis convencional debido a su alto peso molecular, su migración sería muy pobre. De ahí que la electroforesis de campo pulsado se realice con varios pulsos eléctricos aplicados en diferentes direcciones, creando campos magnéticos que permiten la separación adecuada de fragmentos de alto peso molecular, sin causarles ningún daño (Farber, 1996; McClelland y cols, 1987; Méndez y cols, 1995; Bustamante y cols, 1993). Esta técnica ha sido útil para identificar probióticos potenciales (Vaughan y cols, 1999). Su principal desventaja es el costo del equipo y los reactivos requeridos para la determinación, así como el tiempo que se consume para el desarrollo del protocolo de análisis (McClelland y cols, 1987).

Métodos basados en PCR

Los métodos de tipado molecular basados en PCR básicamente son: RAPD, ARDRA, PCR-RFLP y Rep-PCR (Farber, 1996). En la técnica de PCR se requieren dos iniciadores sintéticos (también llamados oligonucleótidos) que son secuencias de ADN de cadena sencilla de aproximadamente 20 a 30 pares de bases. Dichos iniciadores pueden aparearse específicamente cada uno con una de las cadenas de la doble hélice del ADN. Considerando que se conoce la secuencia del gen que se desea amplificar, los iniciadores se diseñan de forma tal que cada uno de ellos tenga complementariedad de bases con las regiones que delimitan dicho gen o segmentos de éste. De esta manera se diseñan iniciadores que permitan la amplificación de genes de virulencia o de proteínas específicas que caractericen a una bacteria en particular. De una forma muy general los pasos que se siguen en una técnica de PCR son los siguientes:

1. Desnaturalización. El ADN puro de doble cadena es separado en sus dos cadenas sencillas. Generalmente esto se logra exponiendo el material genético a una temperatura de 94 °C.
2. Hibridación o alineación. En este paso los iniciadores añadidos se unen a la región complementaria en el ADN blanco. La temperatura de anillado utilizada es muy importante, porque determina la especificidad de la unión del iniciador con el ADN, también conocida como astringencia de la reacción.
3. Elongación. Este último paso se refiere a la polimerización, es decir, la extensión y duplicación de la región de interés con la ayuda de una ADN polimerasa

termoestable y los cuatro deoxyribonucleótidos trifosfato, así como de la presencia del ión magnesio.

Cada ciclo se completa en aproximadamente 5 minutos, dependiendo de la capacidad de calentamiento / enfriamiento del termociclador. En cada ciclo se duplica el material genético. De esta forma en aproximadamente 30 ciclos se logra una cantidad suficiente de ADN producto de la amplificación. En la Figura 2, se pueden observar los pasos que se siguen en un ciclo tradicional de PCR.

Técnica de RAPD

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), son las siglas en inglés de amplificación de fragmentos de ADN al azar. Es uno de los métodos genotípicos más utilizados basados en la reacción de PCR. Ha sido utilizado para el tipado molecular de microorganismos patógenos en alimentos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp entre otros, RAPD es un método genotípico sencillo y barato que tiene grandes ventajas. Básicamente esta técnica es similar a la PCR convencional descrita anteriormente y difiere de esta en dos aspectos básicos:

1) Los iniciadores utilizados son cortos (solo 8 a 10 oligonucleótidos y en algunos casos hasta 23) y las secuencias de los mismos son escogidas al azar. Debido a esto, no es necesario conocer la secuencia del ADN que se desea amplificar. Además debido a que la secuencia de oligonucleótidos es corta, teóricamente existen muchos sitios en donde se puede aparear con el ADN blanco.

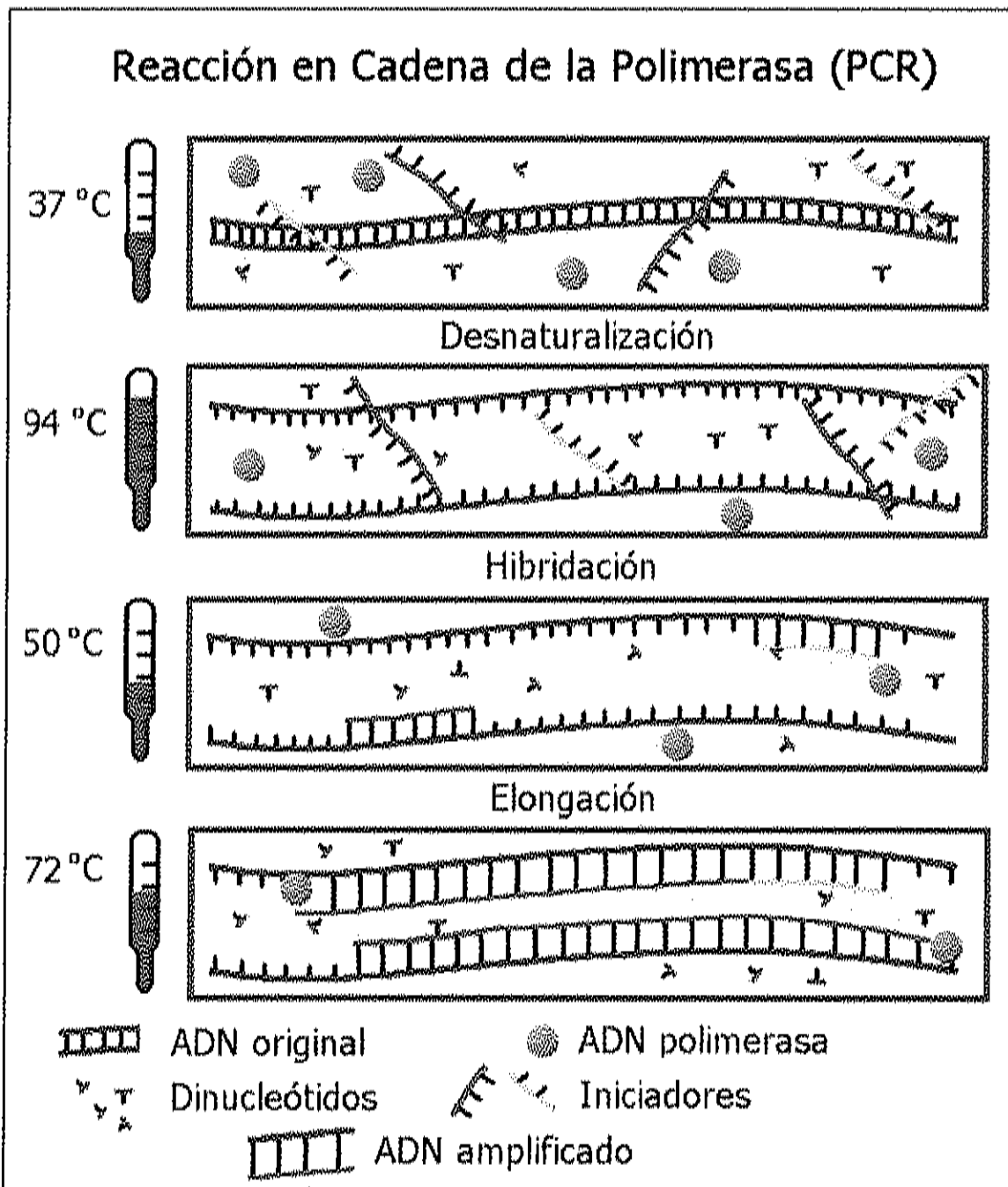


Figura 2. Pasos que se siguen en un ciclo convencional de PCR. En la parte izquierda se presentan las temperaturas a las cuales se llevan a cabo cada uno de los pasos.

2) La temperatura utilizada en RAPD es más baja que la utilizada en PCR convencional, esto para favorecer aun más la hibridación al azar. Las amplificaciones se producen cuando dos iniciadores se unen en cadenas opuestas en la dirección requerida (5' → 3') con una distancia promedio entre ellos que puede ir de 200 a 2000 pares de bases. Cada sitio que es amplificado se refleja con la aparición de una banda en un gel teñido. Algo indispensable para la correcta reproducibilidad de esta técnica, son las condiciones del ciclo de PCR y las concentraciones utilizadas de los diferentes reactivos (Farber, 1996).

ARDRA

Otra técnica basada en PCR es ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) o análisis de restricción de ADN ribosomal. Este método se basa en la existencia de heterogenicidad de secuencia que existe entre las regiones espaciadoras entre los genes que codifican el ARNr en los microorganismos. En los organismo procariotes, los tres genes que codifican el ARNr (16S, 23S y 5S) están separados por regiones espaciadoras que pueden mostrar una amplia gama de secuencias y de longitud de las mismas, ambas características tanto a nivel de especie como a nivel de género. La mayoría de las bacterias contienen múltiples copias del operón ribosómico (*rnn*), por lo cual las regiones espaciadoras dentro de los mismos pueden diferir en secuencia y longitud dentro de la misma cepa. Debido a lo anterior, se obtienen múltiples bandas de una cepa en particular cuando se le amplifican los espaciadores intergénicos del operon debido a diferentes longitudes de los espaciadores localizados en los diferentes operones

que codifican éste. Existen iniciadores que pueden ser utilizados de manera universal para diferentes bacterias, la universalidad de los mismos se debe a la conservación de las secuencias 16S y 23S, hacia los cuales se diseñan los iniciadores. Para aumentar el poder discriminatorio de la técnica se utilizan endonucleasas de restricción que digieren el producto obtenido del ribotipado por PCR inicial. Las principales ventajas del ribotipado por PCR (ARDRA) son: la universalidad de los iniciadores que se utilizan, los productos que se obtienen de la amplificación son fácilmente detectables en los geles y tiene un potencial alto para ser utilizada en epidemiología molecular (Farber, 1996).

PCR-RFLP

La técnica de PCR-RFLP es parecida a la técnica anteriormente mencionada, de hecho el ribotipado por PCR, es un tipo particular de PCR-RFLP. Esta técnica consiste en amplificar la secuencia de un gen de virulencia o algún determinado gen que caracterice a la bacteria que se está analizando y posteriormente someter el producto amplificado a una digestión con endonucleasas de restricción. Posteriormente el producto ya digerido se coloca en un gel de agarosa y después de realizar la electroforesis y posterior tinción con bromuro de etidio se obtiene un perfil de bandas. Dicho perfil es utilizado para el tipado molecular. Teóricamente cualquier región conocida de interés puede ser amplificada por PCR para posteriormente ser digerida con endonucleasas de restricción.

Las principales ventajas de esta técnica son su velocidad, simplicidad y reproducibilidad. Algunas de sus desventajas pueden ser que se requiere un conocimiento previo de la secuencia del gen que se desea amplificar. Además el poder discriminatorio

de la técnica tiende a variar substancialmente dependiendo de las diferentes especies, loci y enzimas de restricción. Algunos investigadores utilizan este método no solo con fines de tipado molecular, sino además como un método de identificación bacteriana (Farber, 1996).

Rep-PCR

La última técnica que mencionaremos en la presente revisión es Rep-PCR (REPetitive sequences – PCR). Esta técnica se basa en la existencia de secuencias que se encuentran esparcidas a lo largo del genoma. Estos elementos se encuentran de forma repetida en un alto número de copias en el mismo genoma. Dichas secuencias son llamadas Rep y se localizan en diferentes posiciones y están separadas por diferentes distancias dependiendo de la cepa bacteriana. La amplificación por PCR de la región genómica entre estos elementos repetidos conducirá a la amplificación de fragmentos de ADN de diferentes pesos moleculares, dependiendo de la longitud de ADN que existe entre las secuencias repetidas diferentes que se encuentren. Estas secuencias repetidas son bien conocidas en las bacterias Gram negativas y son referidas como ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) (Farber, 1996).

Algunos Estudios Realizados con Bacterias Probióticas

Las bacterias probióticas se han estudiado principalmente por su acción benéfica en contra del desarrollo de enfermedades gastrointestinales. Uno de los padecimientos

gastrointestinales más común es la diarrea, la cual puede ser causada por diferentes agentes etiológicos, entre ellos retrovirus, *Escherichia coli* O157:H7 y diferentes especies del género *Salmonella*, etc (Rolfe, 2000; Isolauri, 2001).

La diarrea provocada por retrovirus es bastante común en diferentes países (McQuaid, 2000). Un estudio realizado por Juntunen y cols (2001), mostró que la administración constante de cepas probióticas es benéfica para prevenir e incluso solucionar el padecimiento de esta diarrea.

Otro agente causante de diarreas severas es *Escherichia coli* O157:H7, esta bacteria produce diarreas que pueden desencadenar en patologías muy severas en el ser humano, incluso la muerte. *E. coli* O157:H7, pertenece a la microflora normal del ganado bovino, por lo cual la administración oral de dosis elevadas de esta bacteria no provoca diarrea o enfermedad aparente en las vacas. El aspecto del animal es normal y la expulsión fecal varía entre animales de la misma edad, pero constantemente es mayor en los animales más pequeños que en los adultos. Por lo anterior, cuando los procesos de sanitización y operaciones de evisceración son inadecuados, los productos pueden ser contaminados con materia fecal, convirtiéndose en vehículos de transmisión y en focos infecciosos para los alimentos que se manejen de forma paralela (Gastelum, 2002; Karch, 1987). Se ha demostrado que la utilización de bacterias probióticas disminuye la presencia de esta bacteria en ganado bovino (Zhao, 1998).

Whelan y cols. (2001), estudiaron el efecto de probióticos y prebióticos contra padecimientos diarreicos en pacientes que son alimentados por sondas orales y lograron observar la disminución de los cuadros diarreicos en ellos. Existe una gran cantidad de

estudios que apoyan la utilización de estas bacterias para el tratamiento y prevención de diarreas provocadas por diferentes fuentes. A pesar de que los mecanismo a través de los cuales los probióticos combaten los padecimientos diarreicos no están completamente elucidados, sí existe evidencia de que en gran medida este efecto es producto de la competición de nutrientes que los probióticos ejercen contra los microorganismos patógenos (De Ross y cols, 2000).

Las bacterias probióticas también juegan un papel benéfico importante en el metabolismo de lípidos. Las bacterias degradan prebióticos y producen ácidos grasos de cadena corta que por sí solos pueden inhibir la síntesis de colesterol hepático. Otro mecanismo propuesto, es que la actividad de estas bacterias provoca un aumento en la deconjugación de las sales biliares, estado en el cual no pueden reabsorberse en el intestino y son excretadas en las heces. Al ser excretadas, el colesterol plasmático es utilizado para sintetizar a partir de él, nuevas sales biliares (St-Onge y cols, 2000; De Ross y cols, 2000). Otro mecanismo propuesto para la disminución del colesterol sanguíneo es que éste se una al probiótico y precipite, eliminándose en las heces (Kociubinski y cols, 1999). Actualmente existen muchas dudas acerca de los mecanismos responsables de la disminución del colesterol sanguíneo gracias a los probióticos. Sin embargo, pese a que estos mecanismos no están completamente elucidados, los efectos benéficos de la disminución del colesterol sanguíneo han sido observados claramente (De Ross y cols, 2000).

Un beneficio importante durante la ingestión de probióticos en el organismo es la disminución en la carcinogénesis (De Ross y cols, 2000). Esta disminución se ha

observado experimentalmente y se han propuesto dos mecanismos para explicarla. El primer mecanismo consiste en que el probiótico se une a agentes carcinogénicos evitando su absorción, disminuyendo de esta forma el riesgo de que se presente cáncer. El segundo mecanismo propone que las bacterias probióticas inhiben a las bacterias de la flora que convierten los procarcinógenos en carcinógenos activos. Estas observaciones experimentales, también son líneas de investigación relativamente nuevas, por lo cual algunos estudios muestran el papel protector de los probióticos contra el desarrollo de tumores mientras que otros lo cuestionan (McIntosh y cols, 1999). Obviamente, se requieren más investigaciones para determinar la posible utilidad de las bacterias probióticas como anticarcinogénicos, sin embargo, las expectativas son prometedoras (De Ross y cols, 2000).

Existen otros efectos benéficos observados durante la administración de bacterias probióticas (Reid y cols, 2001; Hatakka y cols, 2001). Uno de estos efectos es la disminución observada en las infecciones respiratorias en niños que recibieron dosis periódicas de bacterias probióticas. El mecanismo al cual se asoció esta posible disminución en las infecciones respiratorias fue la estimulación del sistema inmune (Hatakka y cols, 2001; Tejada y cols, 1999; Matsuzaki y cols, 2000).

Otra importante observación experimental fue la disminución de infecciones urogenitales cuando los probióticos son administrados oralmente. Lo anterior causó mucho asombro debido a que no existe una traslocación bacteriana probada desde el tracto gastrointestinal hacia el tracto genitourinario. Posiblemente esta disminución se debió a malas prácticas de higiene, ya que las bacterias probióticas administradas

oralmente se lograron aislar en la vagina de las mujeres que la consumieron. Lo anterior, permite inferir la posible existencia de efectos benéficos adicionales a los esperados por parte de las bacterias probióticas (Reid y cols, 2001). A pesar de las observaciones experimentales es necesario elucidar todos estos diferentes mecanismos por los cuales las bacterias probióticas pueden beneficiar al organismo en tan variados aspectos (De Ross y cols, 2000)

Las bacterias probióticas han empezado a cobrar tanta importancia que en la actualidad se han desarrollado una serie de técnicas para su identificación rápida (Durant y cols, 1997; Roy y cols, 2000; Heidi y cols, 2001). Durant y cols. (1997), adaptaron la técnica de ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de algunas bacterias lácticas con potencial probiótico aisladas en aves de corral. Se han desarrollado técnicas como la detección de carbohidratos específicos en *Lactobacillus* probióticos, a través de lectinoensayos (Heidi y cols, 2001) y también la caracterización de los mismos mediante diferentes métodos moleculares (Roy y cols, 2000). El desarrollo de nuevas técnicas rápidas para la identificación de probióticos se encuentra en aumento en la actualidad, por supuesto que estas identificaciones son presuntivas, y se requiere posteriormente llevar a cabo las pruebas de supervivencia al tránsito gastrointestinal, antagonismo bacteriano, poder detoxificante y las demás mencionadas en la Tabla 1, es importante mencionar que la caracterización genómica completa es indispensable para una adecuada caracterización probiótica. Sin embargo, las pruebas fenotípicas si resultan ser muy útiles para realizar un tamiz de las cepas con potencial probiótico (Durant y cols, 1997; Roy y cols, 2000; Heidi y cols, 2001).

Género *Enterococcus*

Localización Taxonómica

Antiguamente las bacterias que actualmente constituyen los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* se encontraban agrupadas dentro de un solo género llamado *Streptococcus*. Lo anterior era debido a que las clasificaciones taxonómicas estaban hechas en base a criterios fenotípicos (Schleifer y cols, 1995). Actualmente la clasificación se realiza a través del análisis de ácidos nucleicos. De manera más específica, es común la utilización del análisis del ARN ribosomal 16S, el cual es útil para inferir y construir árboles filogenéticos (Schleifer y cols, 1989). Debido a la caracterización molecular, se logró establecer que algunas bacterias consideradas como *Streptococcus* poseían características genotípicas que las hacían lo suficientemente diferentes para constituir un nuevo género, como es el caso de *Enterococcus* (Axelsson, 1998). Actualmente el género *Enterococcus* posee 29 especies bacterianas distintas dichas especies son *E. asini*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundii*, *E. porcinus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. seriolicida*, *E. solitarius*, *E. sulfureus* y *E. villorum* (Holt y cols, 1994).

Características Generales

Las bacterias del género *Enterococcus* comparten entre si características fenotípicas muy similares a las del género *Streptococcus* (Holt y cols, 1994; Koneman y cols, 1994). Son células esféricas u ovoides de 0.6 – 2.5 µm de diámetro. Se presentan en pares o cadenas cuando crecen en medio líquido, aunque es posible también ver estas estructuras en cultivos sobre agar. *Enterococcus* son bacterias con morfología de cocos gram positivos, no móviles, incapaces de formar esporas o cápsulas obvias. Las especies de este género son anaerobias facultativas y quimioorganotróficas. Requieren un medio nutricionalmente enriquecido para su desarrollo y algunas veces CO₂ al 5%. Los *Enterococcus* poseen un metabolismo fermentativo y el producto principal de dicho metabolismo es ácido láctico. La producción de este ácido, que se da sin producción de gas, conduce al medio hasta un pH final cercano a 4. Las cepas del género carecen de las enzimas catalasa y oxidasa. Generalmente los *Enterococcus* crecen dentro del rango de temperatura de los 10 a los 45 °C (temperatura óptima 37 °C) y pueden crecer en un medio con NaCl al 6.5% y bilis al 40%. La mayoría pertenecen al grupo D de la clasificación de Lancefield (Holt y cols, 1994). Estas bacterias están distribuidas en el medio ambiente, principalmente en heces de vertebrados que son depositadas en el suelo (Koneman y cols, 1994), en donde puede permanecer viables por más de dos meses (Cools y cols, 2001). Algunas veces causan infecciones piogénicas oportunistas, aunque generalmente son consideradas bacterias inocuas (Koneman y cols, 1994).

Importancia del Género

Existen pocos estudios en comparación a los realizados con el género *Streptococcus* efectuados en *Enterococcus* sobre su patogenicidad (Forbes y cols, 1998). Los *Enterococcus* pueden ser portadores de factores de virulencia o genes de resistencia a los antibióticos (Franz y cols, 1999). En cuanto a su virulencia, producen adhesinas, citolisinas y poseen otras capacidades metabólicas que les permiten proliferar como patógenos nosocomiales (Koneman y cols, 1994). Otro factor importante que se asocia con patogenicidad es la multirresistencia a antibióticos (Franz y cols, 1999). La mayoría de las infecciones nosocomiales provocadas por *Enterococcus* incluyen infecciones del tracto urinario, bacteremia, endocarditis e infecciones mixtas de abdomen y pelvis (Forbes y cols, 1998; Koneman y cols, 1994).

Los *Enterococcus* tiene muy poco uso en el ámbito industrial. En general, se considera que no tienen ninguna importancia en la industria y solamente se han encontrado presentes en algunos tipos de quesos elaborados en el sur de Europa (Axelsson, 1998). Estos microorganismos se consideran fuente de contaminación alimentaria y son indeseables en la industria de los alimentos (Franz y cols, 1999). Una forma de controlar la proliferación de *Enterococcus* sin afectar las propiedades organolépticas del alimento, es a través de bacteriocinas. Desafortunadamente existen pocos estudios acerca de los mecanismos de acción de las mismas, por lo cual las buenas prácticas de higiene siguen siendo la única medida profiláctica útil para prevenir contaminaciones con estas bacterias (Klaenhammer, 1993; Franz y cols, 1999). Sin embargo, pese a los estudios anteriores, existe cada vez mas evidencia de que este género

presenta una gran probabilidad de contener cepas que son buenos agentes probióticos y a continuación se detallan algunos estudios que muestran la bondad del género.

Enterococcus como Probióticos

La mayoría de los estudios de *Enterococcus* como probióticos se han realizado con la especie *Enterococcus faecium*. Netherwood y cols. (1999), demostraron que la flora bacteriana del tracto gastrointestinal de aves se modifica hacia una composición más saludable cuando se les administra *E. faecium*. Este microorganismo es productor de una bacteriocina que tiene un fuerte efecto antagonico contra *Listeria monocytogenes* y por la misma razón se recomendó la utilización del microorganismo para la fermentación de quesos que pueden contaminarse con este microorganismo (Laukova y cols, 1998). También se demostró su efecto antagonico *in vitro* contra los serotipos de *Salmonella*: gallinarum, pullorum y enteritidis (Audisio y cols, 1999). Posteriormente se probó el poder antagonico *in vivo* en pollos infectados con *Salmonella* pullorum y los resultados indicaron un fuerte poder antagonico contra dicho serotipo (Audisio y cols, 2000). Se ha visto que en la mayoría de los aislamientos de *Enterococcus* el principio activo responsable del antagonismo contra los diferentes patógenos son bacteriocinas producidas por la cepa. Las bacteriocinas se han estudiado en *E. faecium* y se ha observado que si se cambia la fuente de carbono se afecta la síntesis de la proteína con acción bactericida (Audisio y cols, 2001).

Enterococcus faecium inhibe la adhesión de *Escherichia coli* enterotoxigénica K88 en la mucosa intestinal del cerdo (Jin y cols, 2000). *Enterococcus faecium* es una especie que se perfila como un buen agente probiótico y sus efectos benéficos están cada día más aceptados, incluso es una especie a la cual en los últimos años se le cita comúnmente como una especie probiótica (Gardiner y cols, 1999). Ha sido tanto el interés que se ha generado en esta especie que se han realizado estudios para demostrar su resistencia al tracto gastrointestinal (una de las características mostradas en la Tabla 1) y se ha demostrado, que esta especie puede llegar al tracto gastrointestinal viable a través de su administración con queso tipo Cheddar y obtener de esta forma los efectos deseables que la cepa ofrece (Gardiner y cols, 1999).

Se han realizado algunos estudios acerca de la posible resistencia de *Enterococcus faecium* a vancomicina, uno de los principales factores que se relaciona con patogenicidad. Se ha demostrado que la especie *Enterococcus faecium* puede ser receptora del gen de resistencia a la vancomicina (Lund y cols, 2001) y se ha visto también que el intercambio de factores de virulencia y genes de resistencia a los antibióticos es posible entre los enterococos encontrados en alimentos y los responsables de patologías (Eaton y cols, 2001). Existe una prevalencia de cepas resistentes a la vancomicina en *Enterococcus* aislados a partir de cerdos y patógenos nosocomiales (Herrero y cols, 2000; Franz y cols, 1999). Sin embargo, afortunadamente se ha visto también que las diferentes cepas de *Enterococcus* poseen especificidad hacia un solo huésped, lo cual demostró que las cepas que se aislaban en humanos, no se podían aislar en animales, aunque estuvieran en contacto cercano, ni viceversa (Willems y cols,

1994). Finalmente, se demostró que las cepas utilizadas para elaborar leches o productos fermentados no poseían resistencia a la vancomicina y por lo mismo podrían ser consideradas como cepas seguras para el consumo humano. Estas mismas cepas son las que se utilizan como agentes probióticos (Lund y cols, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento Primario

Origen de las cepas

En una planta dedicada a la comercialización de carne de cerdo Tipo Inspección Federal, de la ciudad de Hermosillo, Sonora se recolectaron las muestras de vísceras porcinas. Se tomó el paquete completo del tracto gastrointestinal del cerdo recién sacrificado, se separó el estómago e intestinos del animal, para posteriormente cortar parte del intestino delgado, intestino grueso y estómago. La porción seleccionada fue cortada con tijeras estériles y se colocó en bolsas que contenían el medio de transporte Stuart (Difco). Posteriormente, las muestras se transportaron en hielo para su posterior análisis. Se tomaron 37 muestras de estómago, 66 muestras de intestino delgado y 85 muestras de intestino grueso. Las muestras se colocaron en un homogenizador (Masticador IUL) durante 2 minutos para liberar las células bacterianas adheridas a los tejidos.

A partir de la muestra anterior se inocularon placas de agar M17 (Difco), las cuales fueron incubadas a 37° C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, se seleccionaron colonias aisladas con morfología colonial típica de *Enterococcus* (colonias puntiforme blancas a grisáceas) y se sembraron en el mismo medio para obtener el cultivo puro.

Otras 5 cepas que poseían actividad antagónica contra *Listeria monocytogenes* fueron donadas por el laboratorio español de bacterias lácticas del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, España CSIC. Dichas cepas fueron aisladas del tracto gastrointestinal de conejos sanos. 5 cepas más de referencia del género *Enterococcus* fueron donadas por la Colección Española de Cepas Tipo (CECT), de la Universidad de Valencia, para la realización del presente estudio.

Pruebas preliminares

Una vez purificada la cepa, se le realizó tinción Gram y la prueba de catalasa (Ver Anexo I). Las cepas de cocos gram positivos, sin actividad de catalasa fueron congeladas a -20° C en caldo M17 (utilizando glicerol como crioprotector hasta una concentración final del 20%) hasta el momento de su utilización.

Prueba de hidrólisis de esculina

La cepa en estudio fue inoculada por estriado sobre la superficie de una placa de medio BEM (agar con bilis y esculina, Difco), esta placa se incubó durante 24 horas a 37° C, con CO₂ al 5% (Forbes y cols., 1998).

Prueba de BHI salado

La cepa a identificar fue inoculada en 3 mL de caldo BHI (infusión cerebro-corazón, Difco), al cual se le añadió NaCl hasta una concentración de 6.5%. El tubo se

incubó durante 24 horas a 37 °C, con CO₂ a una concentración del 5% (Forbes y cols., 1998).

Una vez que se habían realizado las cuatro pruebas anteriores (Tinción Gram, catalasa, hidrólisis de Esculina y supervivencia en BHI salado), se procedió a llevar a cabo la selección de cepas en base a su resistencia al tránsito gastrointestinal, para posteriormente llevar a cabo la confirmación del género bacteriano (prueba de PYR) así como la identificación de especie a través de las pruebas de fermentación de carbohidratos.

Resistencia al Tránsito Gastrointestinal

Prueba Cualitativa de Supervivencia al Tránsito Gastrointestinal

Las pruebas de tránsito gastrointestinal que se presentan en estudios previos de caracterización probiótica, reportan que tanto la prueba de resistencia a ácidos, así como la prueba de tolerancia a sales biliares, se realizan de manera cuantitativa (Prasad y cols, 1998; Gómez y cols, 1998). En el presente estudio, con fines de optimización de recursos se llevó a cabo inicialmente una prueba cualitativa y las cepas seleccionadas posteriormente fueron sometidas a un estudio cuantitativo.

Fase I

Esta fase se realizó para determinar la resistencia al ácido de manera cualitativa. Se inoculó el microorganismo en 3 mL de caldo M17 y se incubó durante 24 horas con

incubó durante 24 horas a 37 °C, con CO₂ a una concentración del 5% (Forbes y cols., 1998).

Una vez que se habían realizado las cuatro pruebas anteriores (Tinción Gram, catalasa, hidrólisis de Esculina y supervivencia en BHI salado), se procedió a llevar a cabo la selección de cepas en base a su resistencia al tránsito gastrointestinal, para posteriormente llevar a cabo la confirmación del género bacteriano (prueba de PYR) así como la identificación de especie a través de las pruebas de fermentación de carbohidratos.

Resistencia al Tránsito Gastrointestinal

Prueba Cualitativa de Supervivencia al Tránsito Gastrointestinal

Las pruebas de tránsito gastrointestinal que se presentan en estudios previos de caracterización probiótica, reportan que tanto la prueba de resistencia a ácidos, así como la prueba de tolerancia a sales biliares, se realizan de manera cuantitativa (Prasad y cols, 1998; Gómez y cols, 1998). En el presente estudio, con fines de optimización de recursos se llevó a cabo inicialmente una prueba cualitativa y las cepas seleccionadas posteriormente fueron sometidas a un estudio cuantitativo.

Fase I

Esta fase se realizó para determinar la resistencia al ácido de manera cualitativa. Se inoculó el microorganismo en 3 mL de caldo M17 y se incubó durante 24 horas con

5% de CO₂ (Incubadora VWR 1815 TC). Una vez desarrollado el cultivo cuando éste alcanzó una densidad óptica de 3 en el nefelómetro de McFarland se sembró mediante estriado, en una placa de agar M17 (placa A). El mismo cultivo del tubo anteriormente utilizado se centrifugó a 2600 x g durante 30 minutos a 4° C (Beckman GS – 6R), se decantó el caldo de cultivo y el precipitado bacteriano se resuspendió en 3 mL de caldo M17 con un pH de 3.0 (ajustado con HCl 4 N). Se incubó el cultivo ácido durante 1 hora a 37 °C en condiciones aeróbicas (Incubadora VWR Univar), se inoculó mediante estriado el cultivo acidificado en una placa de agar M17 con el pH ajustado a 7.0 (placa B) y tanto la placa A como la B fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C, con 5% de CO₂. Las cepas que no presentaron crecimiento en la placa A (antes del tratamiento con ácido) fueron sometidas de nueva cuenta a la prueba cualitativa Fase I, mientras que aquellas que sí lo presentaron, pero no hubo desarrollo en la placa B (después de la exposición al ácido) fueron desechadas del estudio.

Fase II

Las cepas supervivientes al ácido se probaron también frente a sales biliares porcinas. Las cepas fueron inoculadas en 3 mL de caldo M17 y se incubaron durante 24 horas en condiciones anaeróbicas o hasta alcanzar una densidad óptica de 3 en el nefelómetro de McFarland. Una vez ajustado el cultivo en caldo, éste se inoculó en dos placas de agar M17. Una de estas placas contenía la fórmula original del medio (placa C), mientras que la otra contenía además sales biliares porcinas (Sigma) al 0.5% (placa D). Tanto la placa C como la D, fueron incubadas por 24 horas con 5% de CO₂. Las cepas

que no presentaron crecimiento en la placa C se sometieron de nuevo a la determinación de la Fase II, mientras que aquellas que si desarrollaron en C, pero no en D no fueron incluidas en el presente estudio.

Prueba Cuantitativa de Supervivencia al Tránsito Gastrointestinal

Resistencia a pH ácido

Se inoculó el microorganismo puro en 4 mL de caldo M17 el cual se incubó durante 24 horas en condiciones anaeróbicas. A partir del cultivo líquido con una densidad óptica de 3 en el nefelómetro de McFarland se realizaron 7 diluciones seriadas 1:10 utilizando como diluyente 9 mL de una solución de NaCl al 0.85% (Difco). A partir de las diluciones anteriores se realizó la técnica de placa vaciada con agar M17 (NOM-092-SSA1-1994). Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37° C, con CO₂ 5% (serie de placas A). El cultivo líquido restante (3 mL) se centrifugó durante 30 minutos a 2600 x g a 4° C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en 3 mL de caldo M17 ajustado a un pH de 3.0 con HCl 4 N y se dejó incubar durante 1 hora. Posteriormente se realizaron 6 diluciones seriadas 1:10 en solución de NaCl al 0.85% y se realizó nuevamente la técnica de placa vaciada con agar M17 (serie de placas B). Estas placas fueron colocadas en incubación por 24 horas en las mismas condiciones que las placas A. La preparación tanto de la serie de placas A, como de las placas B se realizó por duplicado.

Se seleccionaron tanto de la serie A, como de la B aquellas placas que contenían entre 25 y 250 UFC, a partir de éstas se obtuvo un promedio de la cuenta viable utilizando los duplicados. Se realizó una comparación entre los promedios de las cuentas viables para las series tanto A como B. Se determinó el porcentaje de resistencia al ácido de acuerdo con la ecuación propuesta por Kociubinsky (1999).

$$\%RA = 100 (UFC_{ácido}/UFC_{control})$$

Donde:

%RA es el porcentaje de resistencia al ácido

UFC_{ácido} es el promedio de las cuentas viables obtenidas después del caldo acidificado.

UFC_{control} es el promedio de las cuentas viables obtenidas antes del caldo ácido.

En la Figura 3 se esquematiza el procedimiento de esta técnica.

Tolerancia a sales biliares

Se inoculó una muestra del microorganismo puro en 3 mL de caldo M17 el cual se incubó durante 24 horas en condiciones anaerobias. Se ajustó el cultivo a una densidad óptica similar al tubo 3 en el nefelómetro de McFarland y se realizaron 7 diluciones seriadas 1:10 a partir del cultivo en solución de NaCl al 0.85% y se llevó a cabo la técnica de la placa vaciada (serie de placas C). Posteriormente se inoculó a partir de las mismas diluciones otra serie de 6 placas, pero en esta ocasión el agar utilizado estaba adicionado con sales biliares porcinas a una concentración de 0.5% (serie de placas D). Se incubaron las series de placas C y D por 24 horas a 37° C, CO₂ al 5%. La preparación de ambas series de placas se realizó por duplicado. Ver Figura 4.

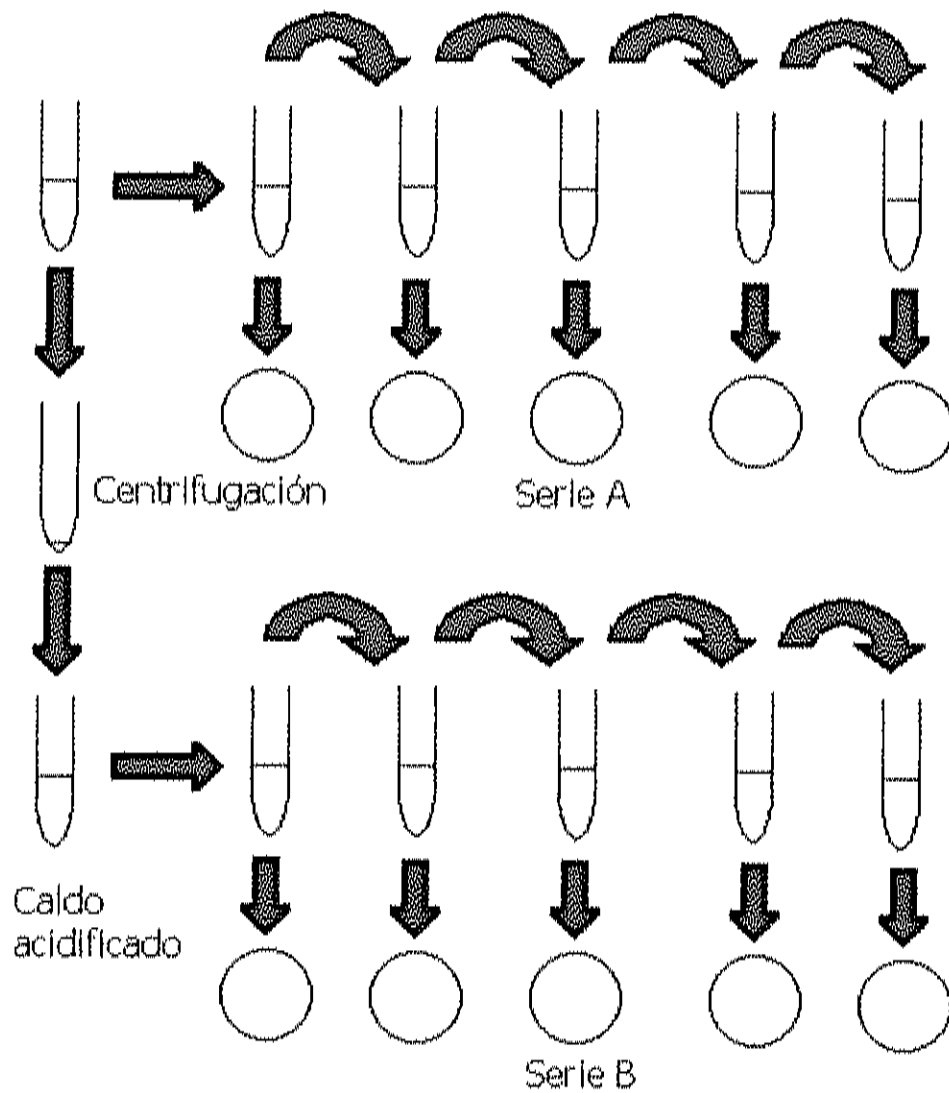


Figura 3. Proceso esquematizado para la realización de la prueba cuantitativa de resistencia a pH ácido.

Se seleccionaron tanto de la serie C, como de la D aquellas placas que contenían entre 25 y 250 UFC a partir de éstas se obtuvo un promedio de la cuenta viable utilizando los duplicados. Se determinó el porcentaje de tolerancia a las sales biliares de acuerdo con la ecuación propuesta por Kociubinsky (1999).

$$\%TSB = 100 (UFC_{sales}/UFC_{control})$$

Donde:

%TSB es el porcentaje de resistencia al ácido

UFC_{sales} es el promedio de las cuentas viables de las placas adicionadas con sales biliares

UFC_{control} es el promedio de las cuentas viables de las placas con el medio M17 sin sales

Identificación de Especie Bacteriana

Prueba de PYR

Se preparó caldo Todd-Hewitt el cual se distribuyó en porciones de 0.2 ml. en tubos 13 x 100. Se esterilizó el caldo y una vez estéril se le adicionó L-pirrolidonil-β-nafilamida hasta alcanzar una concentración final en el medio del 0.01%. Posteriormente con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una colonia aislada en medio M17 y se resuspendió en el caldo Todd-Hewitt adicionado con el sustrato. La suspensión anterior se incubó a 37 °C durante 2 horas. Finalmente se le añadió a cada tubo una gota del reactivo de PYR (p-dimetil aminocinamaldehído al 0.01%). Se leyó el cambio de color en la superficie después de 1 minuto añadido el reactivo (Konemman y cols., 1994).

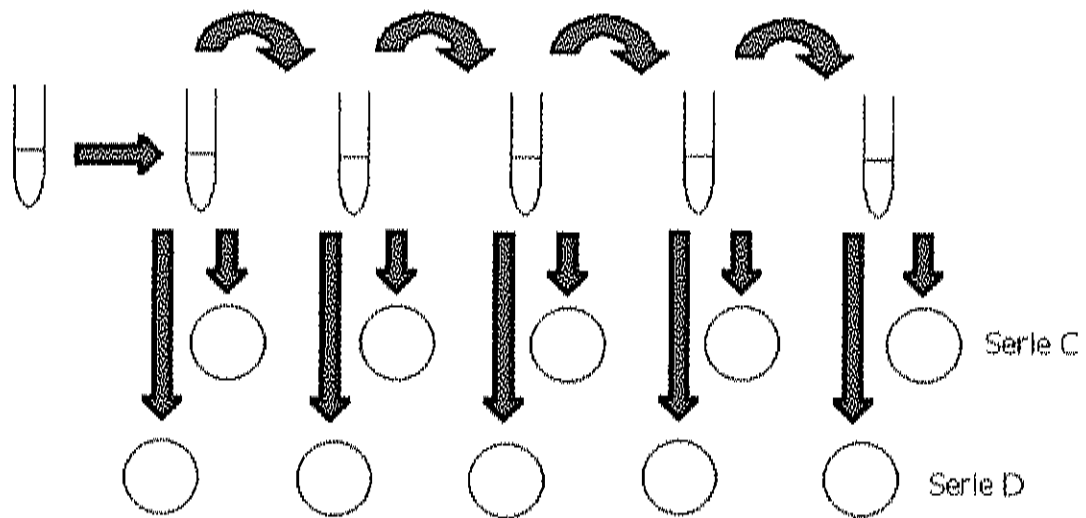


Figura 4. Esquemmatización del procedimiento seguido para llevar a cabo la prueba cuantitativa de tolerancia a sales biliares.

La prueba de PYR es una prueba para identificar al género *Enterococcus*, ya que detecta la presencia de la enzima L-pirrolidonil arilamidasa, propia del género. Sin embargo, en el presente estudio la utilizamos como confirmación final del género antes de identificar la especie. Ver Figura 5. Esto se debió a que previamente se habían realizado las pruebas de hidrólisis de Esculina y supervivencia en BHI salado (pruebas también específicas de género).

Fermentación de carbohidratos y alcoholes

Se prepararon soluciones acuosas estériles de los carbohidratos al 10%. Los carbohidratos utilizados fueron: ribosa, arabinosa, lactato, celobiosa, rafinosa, sorbitol, xilosa, manosa, fructosa, galactosa, sacarosa, maltosa, melezitosa, trehalosa, y manitol. Las pruebas de fermentación se llevaron a cabo en caldo TPY (triptona, peptona y levadura, Difco) adicionado con uno de los carbohidratos mencionados anteriormente. En el caldo TPY el carbohidrato fue añadido hasta alcanzar una concentración del 1%. Al mismo caldo se le añadió también el indicador púrpura de bromocresol. Se tomaron 180 μ L de cada uno de los caldos TPY adicionados con los diferentes carbohidratos y fueron colocados en microplacas ELISA. Posteriormente se añadieron 20 μ L de un cultivo de 24 horas (con densidad óptica similar al tubo 3 del nefelómetro de McFarland) de la cepa a identificar, el cual había sido lavado previamente 2 veces con 1 mL de solución salina (centrifugación 10 minutos a 18000 x g). Se incubaron las cepas inoculadas en TPY durante 24 horas en condiciones anaeróbicas (Holt y cols, 1994).

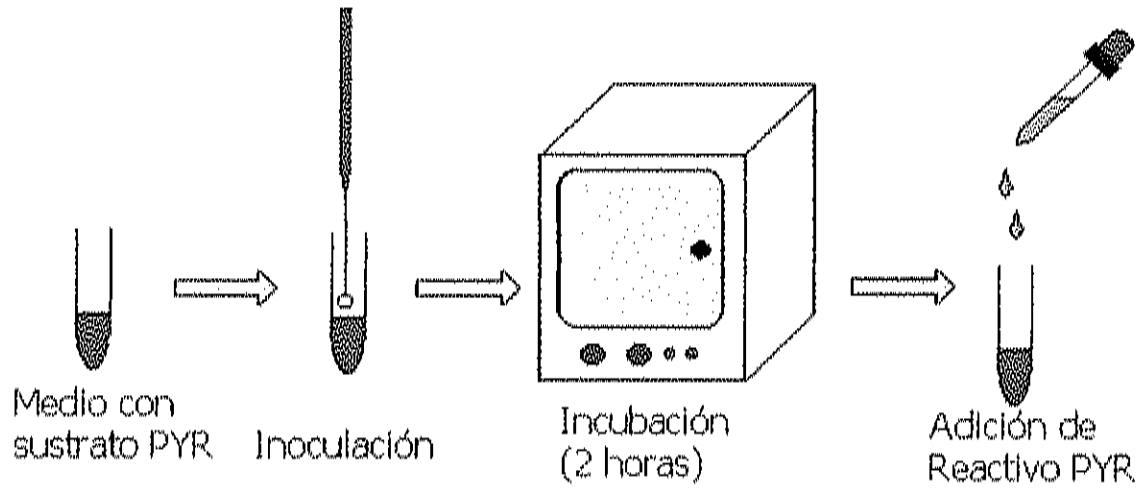


Figura 5. Esquema general de los pasos que se realizan para llevar a cabo la prueba de PYR.

El caldo TPY originalmente presenta una coloración púrpura, si esta viraba a amarillo, indicaba una fermentación positiva para el carbohidrato o alcohol en cuestión (Forbes y cols., 1998; Acedo, 1999).

Antagonismo Bacteriano

Determinación Cualitativa

Se cultivaron las cepas de *Enterococcus*, así como las cepas de *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis* en caldo BHI (Difco) adicionado con lactosa al 1% e incubando durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5%. Se ajustó la densidad óptica de los cultivos con BHI estéril, hasta alcanzar una densidad óptica similar al tubo número 3 del nefelómetro de McFarland. Se prepararon placas de agar MRS (Difco) y sobre la superficie del mismo se perforaron 6 pocillos con la parte superior de una pipeta Pasteur. Posteriormente, con un hisopo estéril se sembró masivamente cada una de las cepas de los microorganismos patógenos *E. coli* K88 y *S. choleraesuis* en diferentes placas. Se colocaron las placas bajo la campana de flujo laminar en ambiente estéril durante 10 minutos para eliminar el exceso de humedad del cultivo. En cada uno de los pocillos se agregaron los diferentes sobrenadantes cultivo de las cepas de *Enterococcus* en BHI con lactosa al 1% (densidad óptica de 3 en el nefelómetro de McFarland), dejando un pocillo libre como control. Se incubaron las placas sin invertir en condiciones de CO₂ al 5% durante 24 horas (González y cols., 1993, De Martinis y cols., 2002). En esta prueba, se

deseaba observar los halos de inhibición alrededor del pocillo si es que existía antagonismo bacteriano.

Determinación Cuantitativa

Para la cuantificación del antagonismo bacteriano, de las cepas frente a cada uno de los patógenos, se llevó a cabo el protocolo de cultivos mixtos (González y cols., 1993). Cultivos de 24 horas tanto de *Enterococcus* como de *E. coli* K88 y *S. choleraesuis* previamente preparados en caldo con BHI, adicionado con lactosa 1%, fueron ajustados con el nefelómetro de McFarland número 3 hasta alcanzar la misma densidad óptica. Posteriormente, a partir del cultivo de cada uno de los patógenos se realizaron una serie de tres diluciones seriadas 1:10 con solución salina fisiológica. Por otro lado, en un tubo que contenía 3 mL de BHI con lactosa al 1%, se añadieron 100 µL de la cepa de *Enterococcus* (ajustada con el nefelómetro) y 100 µL de la tercera dilución del patógeno. Resumiendo, bajo las condiciones anteriores en el cultivo mixto se tenía *Enterococcus*:patógeno en una relación 1000:1. Se repitió el procedimiento anterior para cada una de las cepas de *Enterococcus* y se inoculó también un tubo únicamente con la dilución del patógeno. Es importante mencionar, que las cepas fueron probadas contra los dos patógenos por separado, es decir, nunca se preparó un cultivo mixto con más de 2 cepas bacterianas.

Una vez que se tenían preparados los cultivos mixtos, éstos se homogenizaron con el vortex y se realizaron dos diluciones 1:10 con solución salina. Se inocularon 100 µL de cada una de las diluciones anteriores en placas de agar Endo (Difco) por duplicado (se

utilizó agar Endo cuando el patógeno era *E. coli* K88 y se utilizó agar Hecktoen Enteric cuando el patógeno era *Salmonella choleraesuis*). El inóculo se esparció por difusión con varillas de vidrio estéril. Las placas anteriores fueron etiquetadas como tiempo 0 para cada una de las cepas de *Enterococcus* frente a cada uno de los patógenos. Los cultivos mixtos líquidos fueron incubados durante 6 horas a 37 °C, CO₂ al 5% y posteriormente se repitió el procedimiento anterior, pero en esta ocasión se realizaron 4 diluciones. Las placas anteriores fueron etiquetadas como tiempo 6 para cada una de las cepas probadas. Todas las placas fueron incubadas durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis. El porcentaje de antagonismo fue cuantificado basándose en la siguiente relación:

$$\%AB = 100 - 100(T_{6\text{mixto}} - T_{6\text{control}})$$

Donde %AB es el porcentaje de antagonismo bacteriano para cada una de las cepas, $T_{6\text{mixto}}$ es el número de UFC obtenidas en las placas de agar Endo o Hecktoen Enteric a las 6 horas para el cultivo mixto y $T_{6\text{control}}$, es el número de UFC obtenidas en las placas de agar Endo o Hecktoen Enteric, para el cultivo control a las 6 horas. Los tiempos 0 únicamente se utilizaron para verificar que tanto en el cultivo mixto, como en el cultivo control, existiese la misma cantidad de UFC para cada uno de los patógenos al principio del experimento. En la Figura 6 se muestra la técnica esquematizada de cultivo mixto utilizada en el presente estudio.

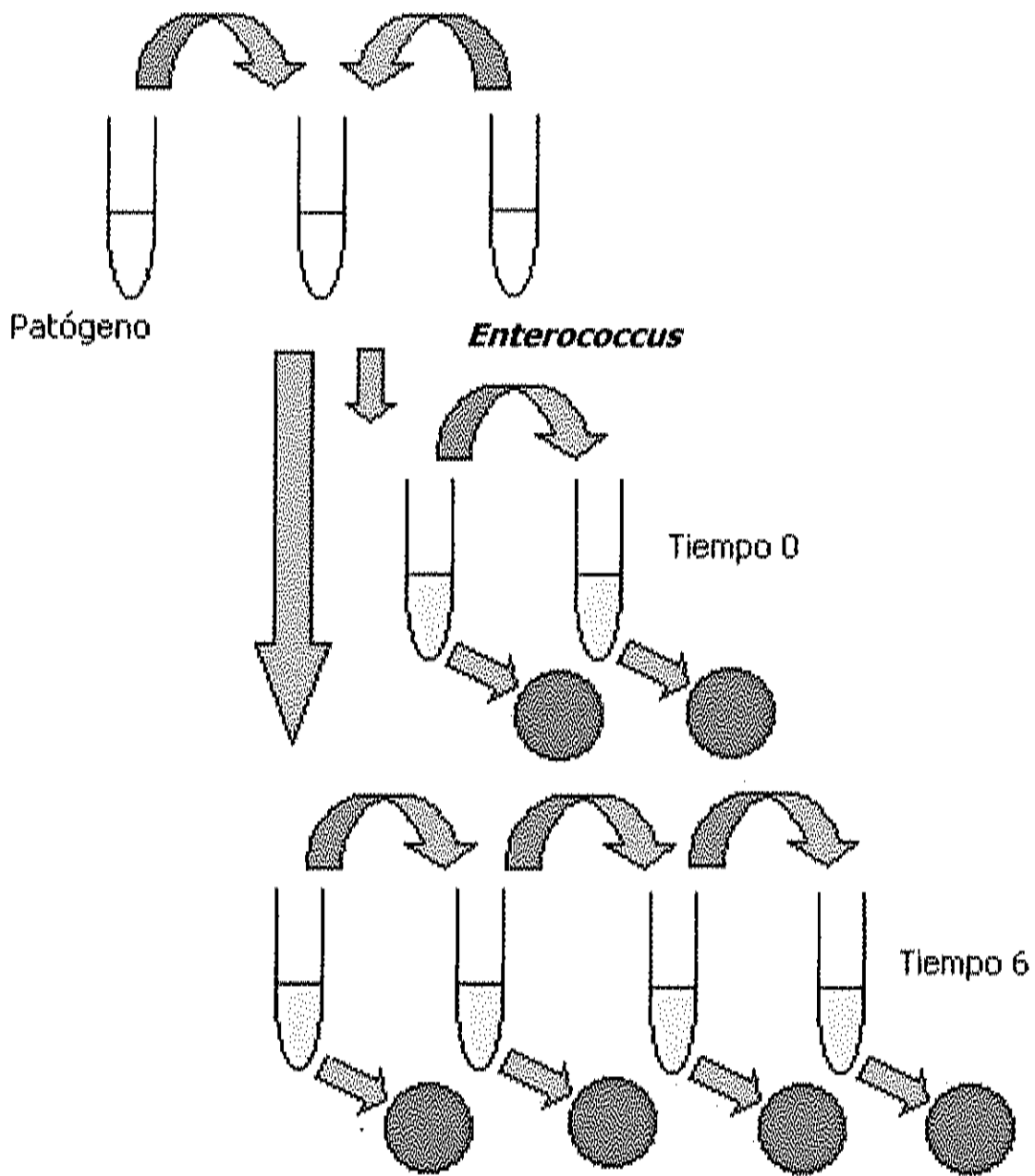


Figura 6. Procedimiento esquematizado de la técnica de cultivo mixto.

Resistencia a los Antimicrobianos

Se prepararon cultivos frescos de las cepas de *Enterococcus*, en caldo Mueller Hinton (Difco). Todos los cultivos se ajustaron con el mismo medio, hasta presentar una densidad óptica similar a la del tubo 0.5 del nefelómetro de MacFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL). A través de un hisopo se inoculó masivamente el cultivo anterior sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton (Difco). Se dejó la placa en la campana de flujo laminar en ambiente estéril durante 10 minutos para eliminar humedad. Posteriormente se colocaron con pinzas estériles los discos de antimicrobianos, cuidando de no colocar más de 5 discos por placa. Los antimicrobianos utilizados fueron los siguientes: amikacina, ampicilina, carbencilina, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, kanamicina, nitrofurantoina, tetraciclina, tobramicina y vancomicina (cada uno de ellos en las concentraciones indicadas por el fabricante de los sensidiscos). Las placas se incubaron invertidas durante 24 horas a 37° C, con CO₂ al 5%.

RAPD

Lisis rápida de colonia

Se siguió la técnica reportada por Acedo y cols., (2003), para llevar a cabo este análisis. Se preparó un cultivo nuevo de cada una de las cepas de *Enterococcus* en agar MRS. Posteriormente con un palillo estéril se tomó una colonia, la cual se resuspendió en

50 mL del amortiguador Trizma (Sigma, Co.) 10 mM, pH 7.5, el cual contenía 6 U de mutanolisina. La suspensión se incubó durante 2 horas a 37 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, se centrifugó el microtubo a 18000 x g durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en amortiguador Trizma 10 mM, pH 9.0. Se agitó el microtubo suavemente y se centrifugó en las mismas condiciones anteriormente descritas. Se desechó nuevamente el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en amortiguador Trizma 10 mM, pH 9.0 adicionado con Tritón X-100 al 1%. Se sometió el microtubo a ebullición durante 10 minutos y finalmente se colocó inmediatamente en hielo.

Reacción de PCR

Se colocaron en un microtubo 35 µL de la mezcla de reacción cuya composición aparece en la Tabla 2. Posteriormente se le añadieron 5 µL del ADN obtenido de la lisis rápida. Se homogenizó suavemente y se colocó esta mezcla en un termoblock a 96 °C durante 5 minutos. Inmediatamente después de transcurrido este tiempo, se colocó el microtubo en hielo. Después de algunos minutos, se sacó el microtubo del hielo y se le añadieron 2 U de Taq polimerasa. Finalmente, se recubrió la mezcla con 35 µL de aceite mineral estéril y se colocó el microtubo en el termociclador Perkin-Elmer 480.

Para el termociclador, se siguió el programa de 36 ciclos que aparece a continuación:

- 1) Desnaturalización a 96 °C durante 1 minuto
- 2) Hibridación a 32 °C durante 1 minuto

3) Elongación a 72 °C durante 1 minuto

Es importante mencionar que se utilizaron 5 iniciadores distintos para las reacciones de PCR, los nombres, así como las secuencias de los mismos aparecen en la Tabla 3.

Electroforesis

Los productos de amplificación obtenidos con la técnica de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% adicionado con 5 mL de solución acuosa de bromuro de etidio 7×10^{-4} mg/mL. Se aplicó una corriente de 80V durante 100 minutos. Se utilizó como marcador de peso molecular el fago λ digerido con *Hind* III. Una vez terminada la electroforesis se colocó el gel en un transiluminador con luz ultravioleta y se fotografió el gel con una cámara Polaroid.

PFGE (Electroforesis de campo pulsado)

Preparación de discos de agarosa con ADN cromosomal intacto

Este análisis se llevó a cabo utilizando la técnica propuesta por Acedo y cols. (2003) con las siguientes modificaciones: Un cultivo de toda la noche en MRS de la cepa de *Enterococcus* a probar se llevó a una densidad óptica igual a la del tubo número 2 del nefelómetro de McFarland (equivalente a 6×10^8 UFC/mL), se centrifugó y se desechó el sobrenadante.

Tabla 2. Mezcla de reacción utilizada en la técnica de RAPD por PCR en el presente estudio

Componente	Concentración
Deoxinucleotidos trifosfato (mezcla de dATP, dCTP, dGTP y dTTP)	10 mM
Iniciador (OPA 3, OPA 10, OPA 13, OPA 15 ú OPA 16)	25 pM
Cloruro de magnesio (MgCl ₂ 25 mM)	1 mM
Agua desionizada estéril	cbp 35 µL

Tabla 3. Secuencia de los cinco iniciadores utilizados en el estudio para la técnica de RAPD por PCR

Iniciadores (Operon Inc.)	Secuencia nucleotídica
OPA 3	5' – AGTCAGCCAC – 3'
OPA 10	5' – GTGATCGCAG – 3'
OPA 13	5' – CAGCACCCAC – 3'
OPA 15	5' – TTCCGAACCC – 3'
OPA 16	5' – AGCCAGCGAA – 3'

Posteriormente, se resuspendió el precipitado con 5 mL de EDTA 50 mM, se centrifugó a $2600 \times g$, $4^{\circ}C$ durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y se repitió el lavado anterior, pero esta vez utilizando solución salina fisiológica. Finalmente se lavó el precipitado con 1 mL de solución PIV (Tris-HCl 0.01 M, pH 8; NaCl 1 M) y posteriormente se llevó el precipitado a un volumen de 500 μ L con solución PIV.

Se le adicionó a la suspensión anterior 500 μ L de agarosa de bajo punto de ebullición al 1.5% (en solución PIV) a una temperatura aproximada a los $41^{\circ}C$. Se homogenizó esta mezcla y se succionó con una jeringa para insulina, a la cual previamente se le había cortado la punta en condiciones estériles. Ya en el interior de la jeringa se dejó solidificar la suspensión bacteriana durante 30 minutos a $5^{\circ}C$.

Una vez solidificada la suspensión, con ayuda de un cubreobjetos estéril se cortaron discos de agarosa de un grosor aproximado a 1 mm. Los discos se colocaron en una solución de lisis que contenía Tris-HCl 6 mM, pH 8; NaCl 1 M; EDTA 0.1 M; desoxicolato de sodio 0.2%; lauril sarcosinato de sodio 0.5%; ribonucleasa A 50 μ g/mL y lisozima 2 mg/mL. Se dejaron incubar los discos en la solución 38-40 horas a $37^{\circ}C$ con agitación suave.

Al día siguiente se le colocó una gasa estéril en la boca del tubo, se decantó la solución de lisis y se añadieron a los discos 10 mL de solución ES (EDTA 0.5M, pH 9; lauril sarcosinato de sodio 1%). Se agitaron suavemente durante 5 minutos y posteriormente con ayuda de otra gasa se decantó nuevamente la solución.

Se le adicionó a los discos 5 mL de solución ESP (EDTA 0.5 M, pH 9; lauril sarcosinato de sodio 1%; proteinasa K 1 mg/mL). Se colocaron en la incubadora y se dejaron incubar a 50° C durante 96 horas.

Después de la incubación con proteinasa K, se decantó la solución y los discos se lavaron 5 veces con amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM). Todos los lavados fueron por una hora, excepto el cuarto que fue por 14 horas. Los lavados se realizaron, manteniendo los tubos con agitación a temperatura ambiente. Después de los lavados los discos se conservaron a 4 °C en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM).

Digestión de ADN Inmovilizado en Discos de Agarosa

Se colocó 1 disco en 1 mL de TE a temperatura ambiente en un microtubo y se dejó reposar durante 1 hora. Se retiró el amortiguador TE y se sustituyó por 100 µL del amortiguador de la enzima de restricción *Sma* I (Sigma Co.). Se dejó en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrida la hora se sustituyó el amortiguador por 100 µL del amortiguador adicionado con 5 U de la enzima *Sma* I. Se incubó el disco a 28 °C durante 14 horas siguiendo las indicaciones del fabricante. Después de la digestión con la enzima de restricción, se le adicionaron 500 µL de una solución que contenía partes iguales de TE, pH 8 y EDTA 0.5 M, pH 9. Los discos se conservaron en esta solución hasta su utilización. También se realizó la digestión de los discos con las enzimas de restricción: *Sfi* I, *Spe* I, *Not* I, *Pst* I y *Xba* I todas ellas a una concentración de 5 U siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Electroforesis de Campo Pulsado

Se preparó un gel de agarosa para electroforesis de campo pulsado a una concentración del 1% utilizando como diluyente de la agarosa el amortiguador TBE 1X (10,8 g de Trizma, 5,5 g de ácido bórico, 4 mL de EDTA 0.5 M, pH 8.0 aforados a 1 L con agua destilada). En este gel se colocaron los discos digeridos previamente con *Sma* I y se utilizaron como marcadores de peso molecular *Low Range PFG marker* (BioLabs Inc.) y *Lambda Ladder PFG Marker* (BioLabs Inc.). La electroforesis se llevó a cabo en un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad) bajo el siguiente protocolo de 2 bloques:

Block 1: Pulsos 5 – 30, 7 horas, 6 V, 120° para separar fragmentos de bajo peso molecular

Block 2: Pulsos 60 – 90, 9 horas, 6 V, 120° para separar fragmentos de alto peso molecular

Después de finalizados los tiempos de ambos bloques se procedió a tefir el gel en una solución acuosa de bromuro de etidio 7×10^{-4} mg/mL durante 20 minutos y posteriormente se colocó el gel en un transiluminador (luz ultravioleta) y se fotografió el gel en una cámara Polaroid. El procedimiento que se siguió para llevar cabo esta técnica se encuentra esquematizado en la Figura 7.

ARDRA

Los primeros pasos para la técnica de ARDRA fueron similares a los pasos seguidos para la técnica de RAPD, solo que en ARDRA existe un paso adicional que se realiza antes de llevar a cabo la electroforesis. La lisis rápida de colonia, la reacción de PCR y la electroforesis se llevó a cabo de la manera previamente descrita para RAPD con las siguientes excepciones: (1) En la mezcla de reacción en vez de utilizar los iniciadores OPA, se utilizaron 2 μ L del iniciador 27 F y 2 μ L del iniciador 1492 R cada uno de ellos a una concentración de 25 pM (Operon Co.) que permiten amplificar la secuencia del 16S (Lane, 1991). Las secuencias de dichos iniciadores se presentan a continuación:

27 F: 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'

1492 R: 5' – TACGGCACCTTGTTACGACTT – 3'

(2) La otra modificación para esta técnica fue que en el programa utilizado en el termociclador, la temperatura de hibridación en vez de ser 32 °C (temperatura de hibridación utilizada en RAPD) fue de 50 °C.

El paso adicional que se siguió antes de llevar a cabo la electroforesis fue una digestión del amplicón obtenido en la reacción de PCR con la enzima de digestión *Eco* RI (Sigma, Co.). Dicha digestión se llevó a cabo colocando 30 μ L del producto de amplificación libre de aceite mineral en un microtubo estéril. Posteriormente a dicho microtubo se le añadieron 5 U de la enzima *Eco* RI resuspendida en el amortiguador proveído por el fabricante y se homogenizó.

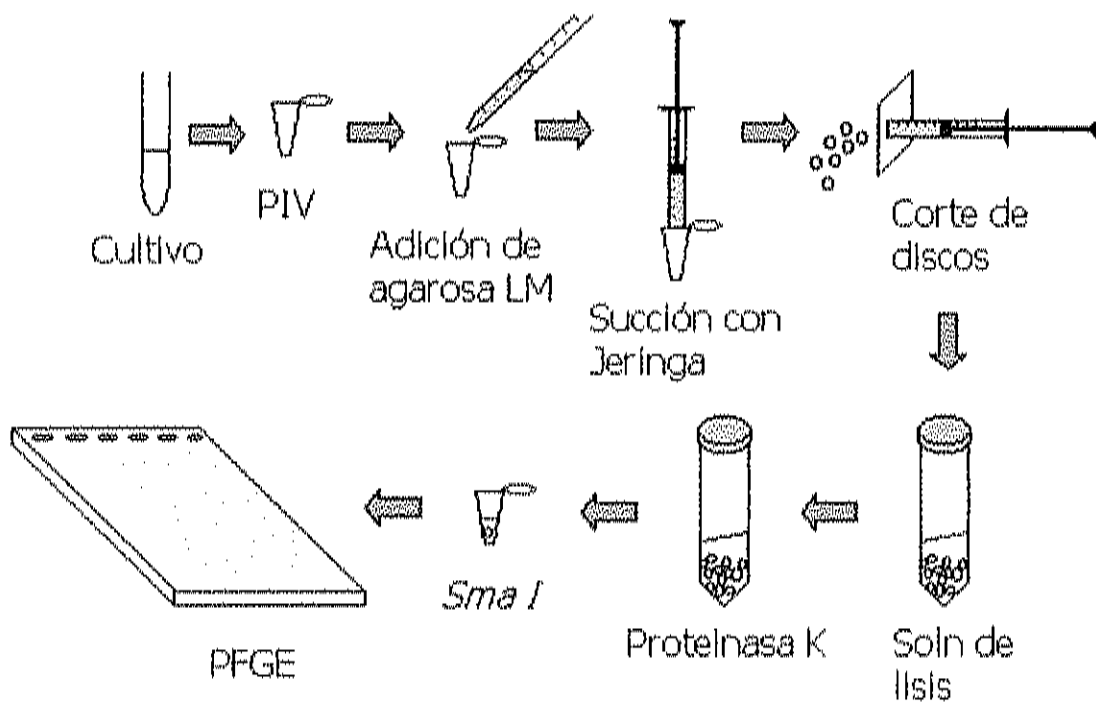


Figura 7. Esquema general del procedimiento de la técnica de PFGE.

La mezcla homogenizada se incubó a 37 °C durante 4 horas. Finalmente se llevó a cabo la electroforesis en condiciones similares a la descritas para RAPD (Acedo y cols., 2003). Se probó también una digestión con las enzimas de restricción: *Hap* II, *Sau* 3AI y *Afu* I todas ellas en concentración de 5 U y siguiendo las especificaciones proporcionadas por el fabricante.

Análisis Estadístico

Se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey-Kramer (con un nivel de confianza del 95%) entre los porcentajes de resistencia a ácido, tolerancia a sales biliares y el porcentaje de antagonismo bacteriano contra cada uno de los patógenos de cada una de las especies identificadas de cerdo. También se realizó una comparación entre los mismos parámetros anteriormente mencionados, pero comparando las cepas de diferentes orígenes (cerdo, conejo y referencia). Se realizó análisis de varianza y parámetros estadísticos descriptivos. Estos análisis se realizaron en el sistema NCSS 6.0.

Para el análisis de RAPD, así como los perfiles de bandas obtenidos a través de PFGE y ARDRA, se elaboraron dendrogramas de correlación en el sistema NTsys 2.0 (Net Technology Systems).

En la elaboración de dendrogramas, se utilizó el procedimiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) que permite llevar a cabo asociaciones de bacterias por conglomerados y análisis polimórfico sin considerar los

pesos moleculares. Se utilizó el coeficiente DICE para la elaboración de los mismos, ya que dicho coeficiente se basa en el análisis en la presencia o ausencia de bandas en perfiles electroforéticos, sin considerar el grosor de las bandas ni los criterios de peso molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento Primario

Cepas Utilizadas

Se aislaron 195 cepas a partir de las vísceras de cerdo. 42 de estómago, 71 de intestino delgado y 82 de intestino grueso. Adicional a estas 195 cepas se reactivaron las 5 cepas de conejo (IATA, CSIC) y las 5 de referencia donadas por la Colección Española de Cultivos Tipo de la Universidad de Valencia.

Pruebas Preliminares

Las bacterias de género *Enterococcus* presentaron una morfología de cocos gram positivos agrupados en cadena cuando fueron teñidos con la tinción de Gram (Figura 8). No presentaron actividad de catalasa (Figura 9), hidrolizaron la esculina en el medio BEM (Figura 10) y sobrevivieron en BHI salado después de 24 horas de incubación (Figura 11). Estas características se observaron en todos los aislamientos obtenidos en el presente estudio y coinciden con las características reportadas por diferentes autores para los aislamientos de este género (Forbes y cols, 1998; Koneman y cols., 1994).

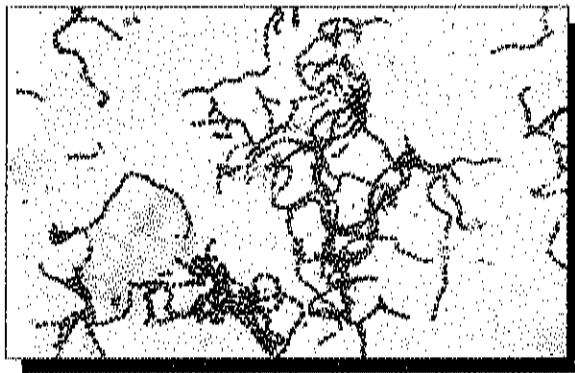


Figura 8. Observación microscópica de *Enterococcus*. Puede observarse la morfología de cocos gram positivos agrupados en cadenas. La muestra fue tomada de una preparación realizada a partir de un medio líquido M17 después de presentar una turbidez equivalente al nefelómetro de MacFarland número 3, fijada con calor y teñida con la técnica de Gram (Anexo I). Amplificación 100X

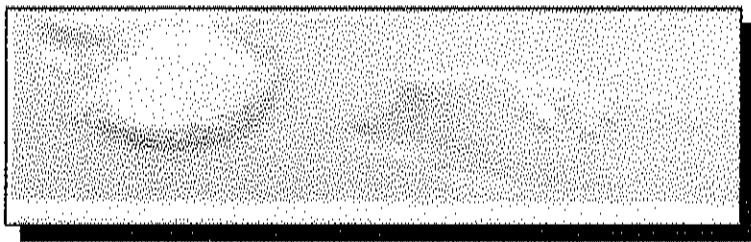


Figura 9. Prueba de Catalasa. A la derecha del portaobjetos se puede ver la reacción negativa a la prueba de la cepa de *Enterococcus*, mientras que a la izquierda se ve una reacción positiva de una cepa de *Staphylococcus* sp utilizada como control. La prueba se realizó siguiendo la técnica que aparece en el Anexo I

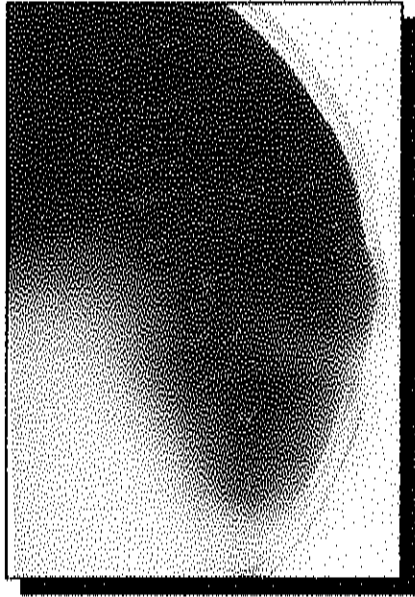


Figura 10. Hidrólisis de Esculina. Se observa la coloración negra alrededor de las colonias de *Enterococcus*, la cual indica una reacción positiva para esta prueba. Ver Anexo 1

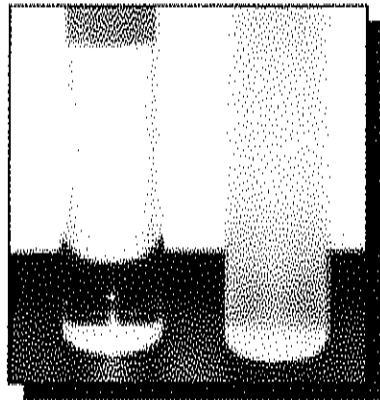


Figura 11. Supervivencia en BHI salado. Se puede observar al lado derecho el crecimiento que se presenta en el tubo, mientras que a la izquierda se observa un tubo sin crecimiento. Consultar Anexo I

Resistencia al Tránsito Gastrointestinal

Recuperación

A pesar de que en otros estudios de caracterización probiótica no se realiza una prueba cualitativa de resistencia al tránsito gastrointestinal, en el presente estudio, se diseñó dicha prueba con el fin de optimizar recursos. Las cepas de cerdo fueron a las que se les realizó dicha prueba puesto que tanto las cepas de conejo como las de referencia se conservaron en el estudio, aunque no cumplieran con los criterios de resistencia como se verá más adelante.

En la Figura 12 se muestra una gráfica del comportamiento de las cepas sometidas a diferentes pruebas. Al inicio del estudio se contaba con 195 cepas de *Enterococcus*, al concluir la fase I del estudio cualitativo de resistencia, se pudo observar, que solamente 77 cepas pudieron sobrevivir a esa condición. Cuando se realizó la prueba cualitativa de tolerancia a sales biliares solamente 58 de las 77 cepas sometidas a la prueba lograron sobrevivir. Con las 58 cepas supervivientes al estudio cualitativo se inició el estudio cuantitativo. De las 58 cepas únicamente 25 presentaron un porcentaje de resistencia superior al 20% y por lo tanto, se incluyeron en el estudio. Finalmente, de las 25 cepas que resistieron el pH ácido con un porcentaje de supervivencia mayor al 20%, solamente 11 lograron tolerar las sales biliares porcinas, en un porcentaje también superior al 20%.

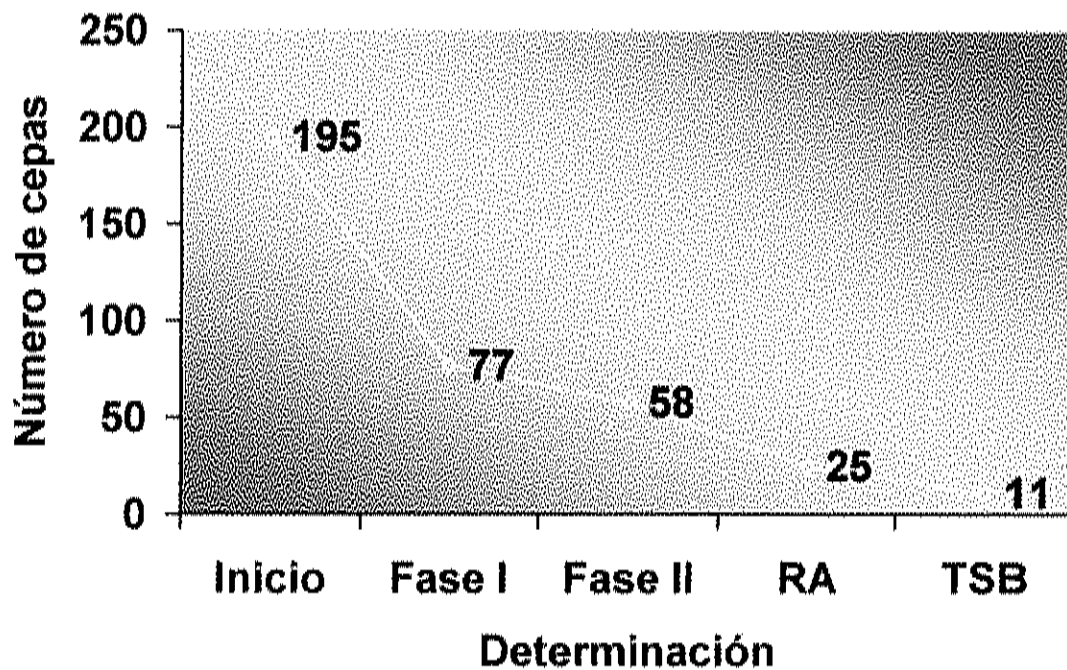


Figura 12. Selección de cepas de cerdo basándose en la resistencia al tránsito gastrointestinal. *Inicio* representa el número total de cepas de cerdo estudiadas, *Fase I*, y *Fase II* indican las fases de la prueba cualitativa de resistencia al tránsito gastrointestinal, *RA* es la prueba de resistencia a pH ácido y *TSB* indica la prueba de tolerancia a sales biliares

El porcentaje de resistencia a pH ácido, así como el porcentaje de tolerancia a sales biliares de las 11 cepas de cerdo incluidas en el estudio se puede observar en la Figura 13. Es importante recordar que las cepas tanto de referencia como de conejo no fueron sometidas al estudio cualitativo, pues independientemente de las características que éstas presentaran, para fines de comparación estadística y de género bacteriano se incluyeron en el estudio, así que a estas cepas se les determinó directamente el porcentaje de resistencia a pH ácido y tolerancia a sales biliares. Los resultados de las pruebas para dichas cepas se presentan en las Figuras 14 y 15.

El porcentaje de cepas candidatas a probiótico obtenidas del tracto gastrointestinal del cerdo en el presente estudio fue 6% (11 de 195 cepas), el cual es más bajo comparado con los porcentajes obtenidos para cepas de otros géneros aislados también de cerdo. Un estudio en el que se aislaron cepas del género *Bifidobacterium* tuvo un porcentaje de recuperación del 13% (16 de 123 cepas) (Corona, 2001). Mientras que otro estudio realizado también a partir del tracto gastrointestinal del cerdo, pero en el que se buscaron cepas con potencial probiótico del género *Lactobacillus* tuvo un porcentaje de recuperación del 20% (28 de 140 cepas) (Pacheco, 2002).

Las especies de *Bifidobacterium* presentan requerimientos nutricionales para su desarrollo más estrictos que los que presentan las cepas de *Enterococcus* (Beerens, 1991; Forbes y cols., 1998), lo cual podría invalidar la idea de que el bajo porcentaje de recuperación logrado en este estudio se pueda explicar basándose en las necesidades primarias de los cultivos.

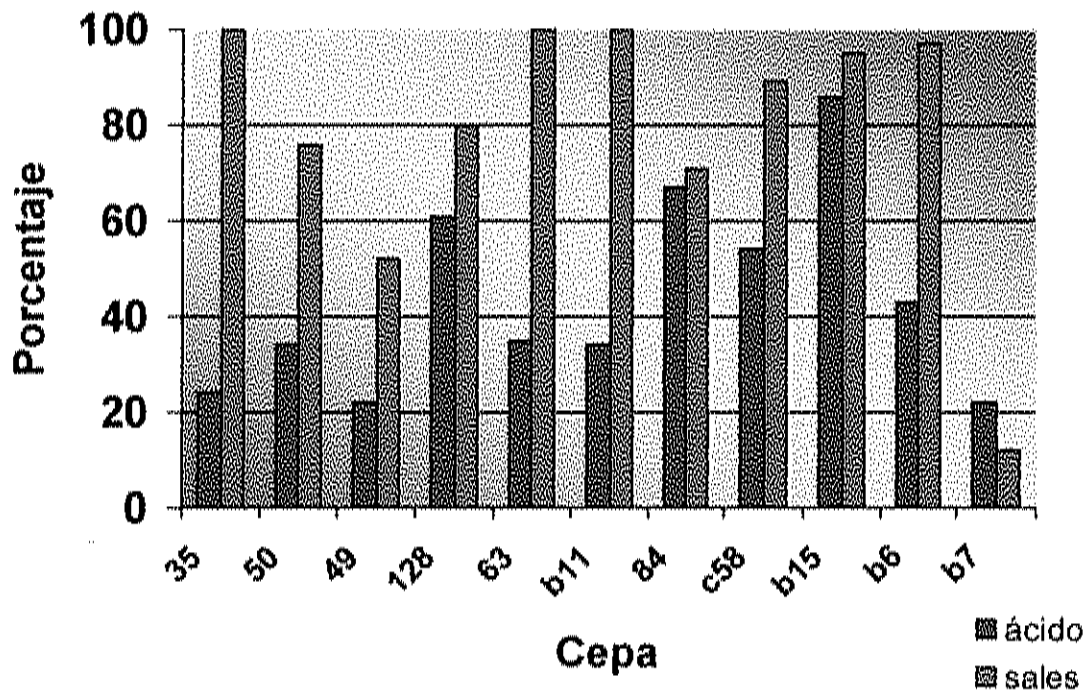


Figura 13. Porcentajes de resistencia a pH ácido y tolerancia a sales biliares en las cepas aisladas de cerdo. En la imagen se grafica el porcentaje obtenido en la prueba cuantitativa de resistencia al tránsito gastrointestinal

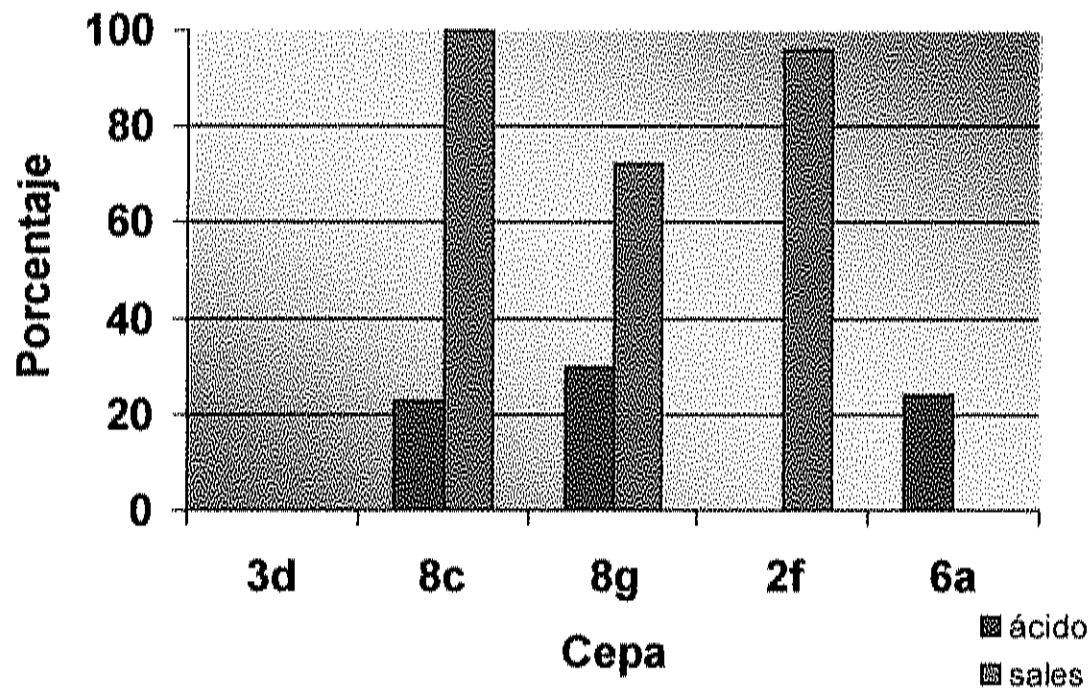


Figura 14. Porcentajes de resistencia a pH ácido y tolerancia a sales biliares en las cepas provenientes de conejo. En la imagen se grafica el porcentaje obtenido en la prueba cuantitativa de resistencia al tránsito gastrointestinal

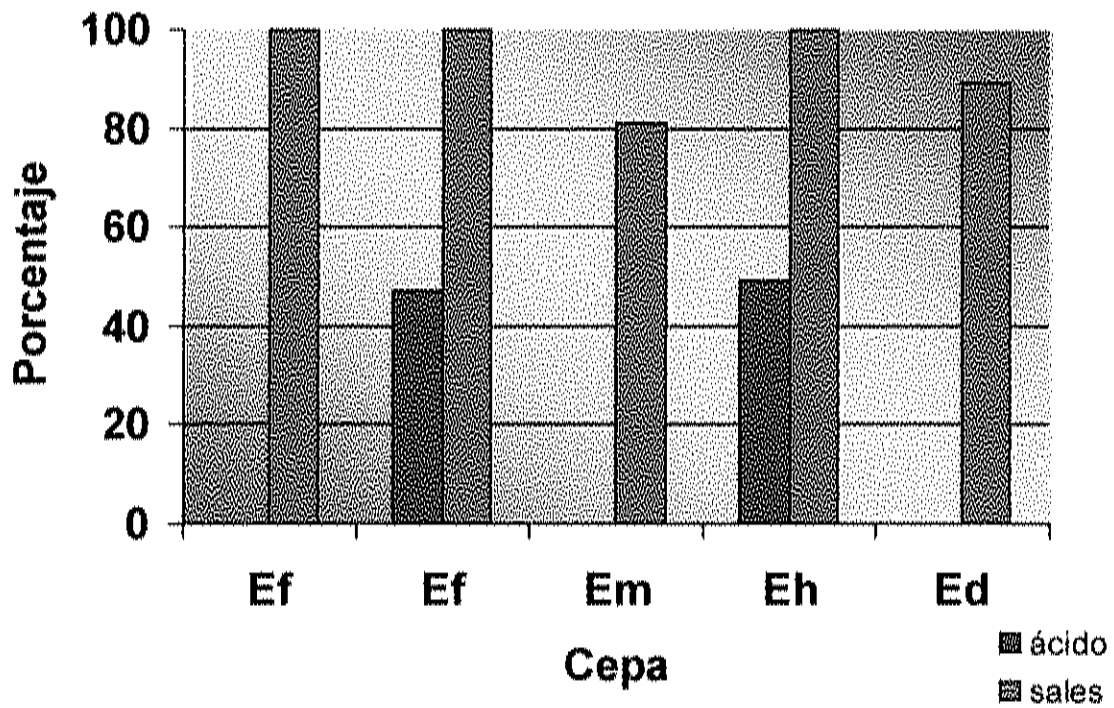


Figura 15. Porcentajes de resistencia a pH ácido y tolerancia a sales biliares en las cepas de referencia. *Ef* es *E. faecalis*, *Em* es *E. faecium*, *Eh* es *E. hirae* y *Ed* es *E. durans*. En la imagen se grafica el porcentaje obtenido en la prueba cuantitativa de resistencia al tránsito gastrointestinal

Una posible explicación para el bajo porcentaje de recuperación puede ser el hecho de que las cepas de *Enterococcus* no fueron aisladas en un medio especialmente diseñado para el género, los medios que actualmente existen en el mercado y que fueron los utilizados en este estudio, están diseñados para *Enterococcus* fecales y para el género *Streptococcus*, mientras que sí existe un medio especialmente diseñado para el aislamiento de *Bifidobacterium* y otras bacterias ácido lácticas como lo es el medio MRS (Corona, 2001, Beerens, 1991).

Resistencia a pH ácido

Antes de llegar a ejercer sus funciones benéficas en el huésped, las bacterias probióticas deben sobrevivir a dos defensas naturales del organismo. La primera de estas defensas es el pH ácido del estómago de los cerdos. El pH óptimo para el desarrollo de las bacterias de este género, es cercano a la neutralidad. Sin embargo, al poseer características fermentativas de producción de ácidos sin gas, estos microorganismos puede permanecer viables hasta en un pH de 4.0 (Koneman y col., 1994). En el presente estudio se intentó simular la condición ácida del estómago, en el cual se presenta un pH cercano a 3 (Yen, 2001, Gómez y col., 1998) y este valor está por debajo del valor reportado para la supervivencia del género, sin embargo 25 cepas lograron sobrevivir a esta condición con una resistencia superior al 20%. A pesar de que no se conoce el mecanismo a través del cual algunas cepas bacterianas pueden resistir el bajo pH, se ha establecido que es un criterio fundamental que debe cubrir una cepa para ser considerada un buen agente probiótico (Collins y cols, 1998)

Se ha recomendado una concentración de células microbianas viables de $10^6 - 10^8$ UFC/g de alimento consumido que deberán estar presentes en el producto probiótico para que este sea efectivo (Svensson y col., 1999). Esta cantidad ha sido sugerida para compensar la reducción en la concentración de la cepa probiótica a su paso por el estómago e intestino delgado (Gómez y col., 1999; Shah, 1999; Shortt, 1999). El porcentaje de resistencia al ácido superior al 20% es útil para asegurar que las células administradas en el alimento lleguen viables a enfrentarse con la siguiente barrera natural de las sales biliares en el intestino delgado.

Tolerancia a sales biliares

La segunda barrera natural que enfrentan los microorganismos al ingresar al tracto gastrointestinal son las sales biliares. Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado a partir del colesterol y son secretados por la vesícula biliar al duodeno en forma conjugada. Los ácidos sufren varias modificaciones químicas en el intestino grueso debido a la actividad de las bacterias ahí presentes. Los ácidos biliares en forma conjugada o deconjugada presentan actividad antimicrobiana (Dunne y col., 1999).

La bilis porcina es más inhibitoria contra las bacterias que la bilis humana y bovina (Thornton y col., 1993). Las cepas aisladas en el presente estudio se pretende que a futuro sean administradas como probióticos en cerdos, por lo cual se decidió que la prueba de sales biliares se realizara utilizando sales biliares porcinas, para crear una situación más real. De las 25 cepas supervivientes al ácido, solamente 11 lograron sobrevivir a esta segunda condición.

Identificación de Especie Bacteriana

Una vez que se habían seleccionado las bacterias que poseían características probióticas básicas (resistencia al ácido y tolerancia a las sales biliares) y que presuntivamente eran *Enterococcus* (de acuerdo a las pruebas de Gram, catalasa, esculina y BHI salado), se llevó a cabo la prueba confirmatoria de género (Prueba de PYR) y la identificación de especie bacteriana.

Se realizó la prueba de PYR a todas las cepas y se pudo observar que las 11 cepas aisladas de cerdo, las 5 provenientes de conejo y las 5 cepas de referencia presentaron una reacción positiva. Con esta prueba se confirmó que el género de las bacterias en el estudio era *Enterococcus*. Una vez realizadas las pruebas de fermentación de carbohidratos se lograron identificar las siguientes especies: en el cerdo, 2 cepas de *E. faecalis*; 2 cepas de *E. mundii* y 7 cepas de *E. faecium*. En el conejo, 1 cepa de *E. faecalis*, 2 cepas de *E. mundii* y 2 cepas de *E. faecium*. Los resultados de las pruebas de fermentación de carbohidratos aparecen en la Tabla 4. Una vez que se obtuvieron los resultados de fermentación, estos se correlacionaron con los patrones de fermentación reportados para las diferentes especies de *Enterococcus* (Koneman y cols., 1994). Los resultados de dicha correlación para identificar a la especie, aparecen en la Tabla 5.

Tabla 4. Resultado de las pruebas de fermentación de carbohidratos. En el eje superior de la tabla se ve el carbohidrato: 1 adonitol, 2 arabinosa, 3 galactosa, 4 glucosa, 5 manitol, 6 melesitoza, 7 melibiosa, 8 rafinosa, 9 ribosa, 10 sacarosa, 11 sorbitol, 12 sorbosa, 13 trehalosa, 14 xilosa, 15 arginina y 16 lactosa mientras que en el eje izquierdo se ve el número asignado por el laboratorio para cada cepa. Las primeras 11 corresponden a cerdos, las siguientes 5 son las cepas de referencia y las últimas 5 a conejo

Clave	Carbohidrato Probado															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
35	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
49	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
50	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
63	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
b11	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
84	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
128	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
b6	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
b7	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
b15	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
c58	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
184	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
279	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
410	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
481	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
411	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
2f	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
3d	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
6a	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
8c	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
8g	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+

Tabla 5. Identificación de especie de las cepas de *Enterococcus* en base a el patrón de fermentación de carbohidratos. También se indica el origen de la cepa

Cepa	Identificación bioquímica	Origen de aislamiento
35	<i>E. faecalis</i>	Intestino delgado de cerdo
49	<i>E. mundii</i>	Intestino delgado de cerdo
50	<i>E. faecalis</i>	Intestino delgado de cerdo
63	<i>E. faecium</i>	Intestino grueso de cerdo
b11	<i>E. faecium</i>	Intestino grueso de cerdo
84	<i>E. faecium</i>	Intestino grueso de cerdo
128	<i>E. mundii</i>	Estómago de cerdo
b6	<i>E. faecium</i>	Intestino grueso de cerdo
b7	<i>E. faecium</i>	Intestino grueso de cerdo
b15	<i>E. faecium</i>	Intestino grueso de cerdo
c58	<i>E. faecium</i>	Intestino grueso de cerdo
184	<i>E. faecalis</i>	Cepa de referencia
279	<i>E. hirae</i>	Cepa de referencia
410	<i>E. faecium</i>	Cepa de referencia
481	<i>E. faecalis</i>	Cepa de referencia
411	<i>E. durans</i>	Cepa de referencia
2f	<i>E. faecium</i>	Tracto intestinal de conejo
3d	<i>E. faecium</i>	Tracto intestinal de conejo
6a	<i>E. faecalis</i>	Tracto intestinal de conejo
8c	<i>E. mundii</i>	Tracto intestinal de conejo
8g	<i>E. mundii</i>	Tracto intestinal de conejo

Por otra parte, se ha observado que la resistencia a bilis está relacionada con la especie bacteriana (Kociubinski y col., 1999). Sin embargo en el presente trabajo, a pesar de ser 3 especies distintas las obtenidas en el tracto gastrointestinal del cerdo, no hubo diferencia significativa en cuanto a los porcentajes de resistencia al ácido, y tampoco en cuanto a la tolerancia a sales biliares. Incluso al comparar las especies aisladas en el cerdo, con las especies aisladas en el conejo, se pudo observar que no existía diferencia significativa en cuanto a la resistencia de ninguno de los dos parámetros anteriores. Lo anterior puede sugerir que independientemente del origen, las cepas de *Enterococcus* poseen capacidades similares para sobrevivir a su paso por el tracto gastrointestinal.

Antagonismo Bacteriano

Determinación Cualitativa

Se realizó la prueba de antagonismo cualitativo y se pudo observar que en todas las muestras, tanto las de cerdo, como las de conejo y referencia se obtuvieron halos de inhibición de un diámetro aproximado a los 10 mm frente a los dos patógenos. Es importante mencionar que se probaron varios medios de cultivo para tratar de visualizar el halo de inhibición como son los agares Luria, BHI, M17, Endo, Nutritivo, EMB, MacConkey, PDA, Hecktoen Enteric y MRS. Solo se lograron apreciar halos de inhibición considerables en el agar MRS, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Hernández (2003), ya que el medio que utilizó para observar el antagonismo microbiano fue MRS. Es importante hacer notar que a pesar de que MRS es un agar

considerado como selectivo para bacterias lácticas, el desarrollo tanto de *Escherichia coli* K88 como de *Salmonella choleraesuis* fue bueno.

Se llevó a cabo una medición de los halos obtenidos en el agar MRS y se observó que no hubo diferencia significativa entre las diferentes dimensiones de los halos según un análisis de varianza con un nivel de confiabilidad del 95%. En la Figura 16 se puede observar una placa con los pocillos y los halos de inhibición alrededor de los mismos.

Determinación cuantitativa

Se determinó el porcentaje de antagonismo microbiano a través de la técnica de cultivo mixto previamente descrita. Todas las cepas de cerdo, así como las de conejo y referencia presentaron un porcentaje de inhibición superior al 80% frente a ambos patógenos.

Se realizó una comparación estadística con los porcentajes de inhibición de las 3 especies aisladas de cerdo y se observó que no existía diferencia significativa entre los mismos frente a *E. coli* K88. Se comparó también el porcentaje de antagonismo entre las especies aisladas en cerdo contra las especies aisladas en conejo y las cepas de referencia y tampoco se logró detectar diferencia significativa. Resultados similares se obtuvieron cuando se realizó el estudio con *S. choleraesuis*.

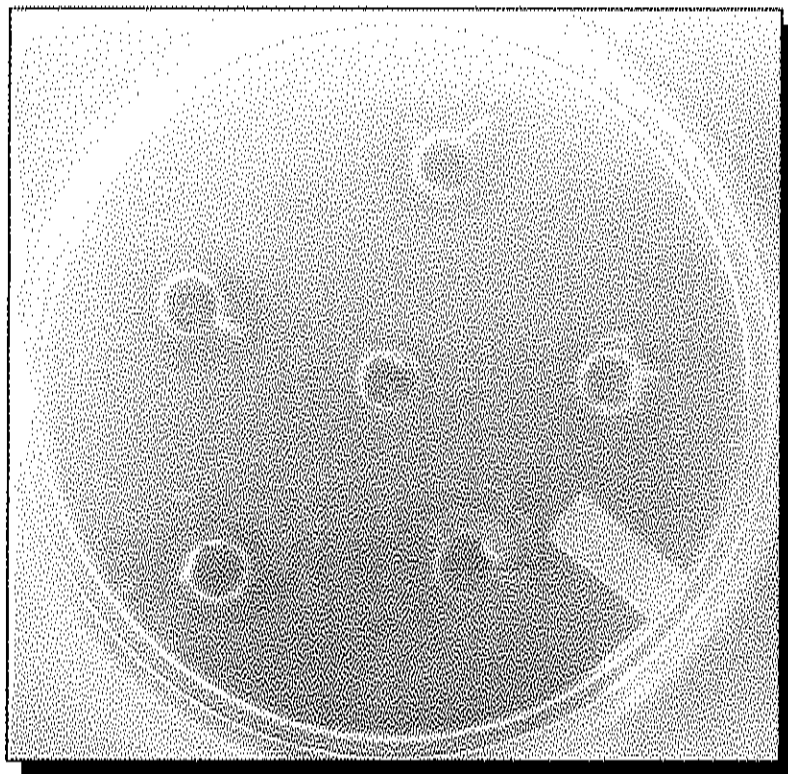


Figura 16. Placa de medio MRS en el cual se observa el antagonismo manifestado por los halos de inhibición alrededor de los pocillos. El patógeno inoculado fue *E. coli* K88 y las muestras inoculadas en los pocillos son las cepas de conejo. El pocillo central fue inoculado únicamente con solución salina estéril.

Lo anterior es de suma importancia, ya que esto podría constituir una alternativa para la solución de los problemas diarreicos en cerdos. El patógeno *E. coli* K88, así como *S. choleraesuis* pueden provocar diarreas muy severas en los cerdos (Izeta, 1992). Considerando que los lechones ingieren alimento hasta 7 veces al día sería sumamente fácil administrar las cepas en el alimento o en el agua (fermentado o solo suplementado con las cepas de *Enterococcus*), para ejercer un efecto protector. Además se ha reportado que en ocasiones para mantener un alimento más estéril en los cerdos, éste se acidifica con ácidos orgánicos, si se utilizan cepas probióticas los alimentos se pueden acidificar por la acción metabólica de las mismas cepas (Yen, 2001).

Debido a que algunas cepas poseen baja resistencia al tránsito gastrointestinal (como las cepas de conejo y de referencia que algunas de ellas presentan porcentajes de resistencia a pH ácido o tolerancia a sales biliares inferiores al 20%), puede fácilmente suponerse que los efectos antagónicos prometidos por éstas, no se alcancen a presentar en el cerdo ya que no llegan viables al intestino. Sin embargo, se ha postulado que las infecciones intestinales surgen por la ingesta de alimentos contaminados con patógenos (Forbes y cols., 1998), de esta forma, si los alimentos son previamente fermentados con cepas antagónicas a los patógenos, como las cepas de *Enterococcus* de conejo y referencia caracterizadas en el presente estudio, aunque dichas cepas mueran a su paso por el tracto gastrointestinal, ya habrán ejercido su poder antagónico sobre las bacterias contenidas en el alimento. Es decir, que el alimento estará libre de patógenos gracias a la presencia de cepas antagónicas a los mismos. Existen estudios que demuestran que la

aplicación de alimentos fermentados disminuye la población de microorganismos patógenos como pueden ser los coliformes en el huésped (Demeckova y cols, 2002).

En la Figura 17 se pueden observar los porcentajes de inhibición frente a los patógenos *E. coli* K88 y *S. choleraesuis* de las cepas aisladas en cerdo. En las Figuras 18 y 19 se pueden observar los mismos porcentajes, pero de las cepas obtenidas de conejo y las cepas de referencia respectivamente.

Resistencia a los antimicrobianos

En la tabla 6 aparecen los diámetros de inhibición que se presentaron para cada una de las cepas de *Enterococcus*, así como la interpretación de dicho halo. Se utilizan abreviaturas para los nombres de los antibióticos. Amikacina AN, ampicilina AM, carbencilina CB, cefalotina CF, cloranfenicol C, eritromicina E, gentamicina G, kanamicina K, nitrofurantoina NF, tetraciclina TC, tobramicina NN y vancomicina VA.

Como puede observarse, el único antibiótico al cual fueron completamente susceptibles todas las cepas de *Enterococcus* de las diferentes fuentes, fue la nitrofurantoina. Lo anterior nos podría hacer pensar que al ser multiresistentes, las cepas aisladas en el presente estudio son patógenos potenciales (Franz y cols, 1999). Sin embargo, esto no es necesariamente cierto ya que algunos estudios han revelado que las bacterias del género *Enterococcus* poseen afinidad hacia su huésped y por lo tanto, como estas cepas son aisladas en cerdos difícilmente podrán llegar a afectar al ser humano (Willems y cols, 1994).

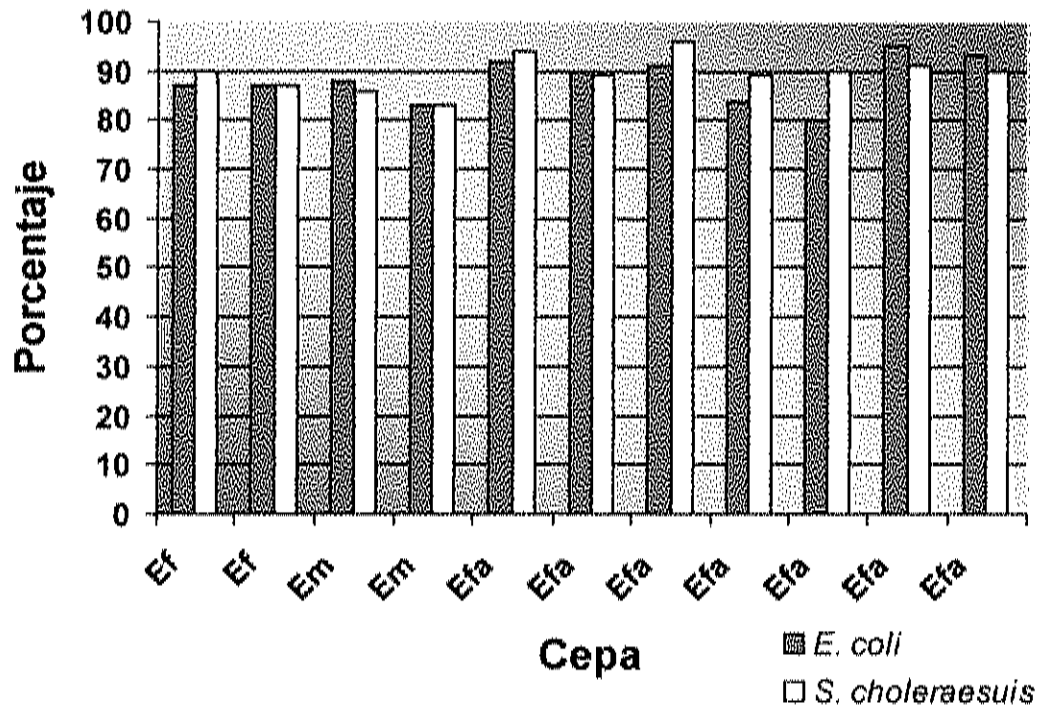


Figura 17. Porcentaje de inhibición de las cepas de *Enterococcus* aisladas de cerdo frente a los dos patógenos probados. Ef es *Enterococcus faecalis*, Em es *E. mundii* y Efa es *E. faecium*

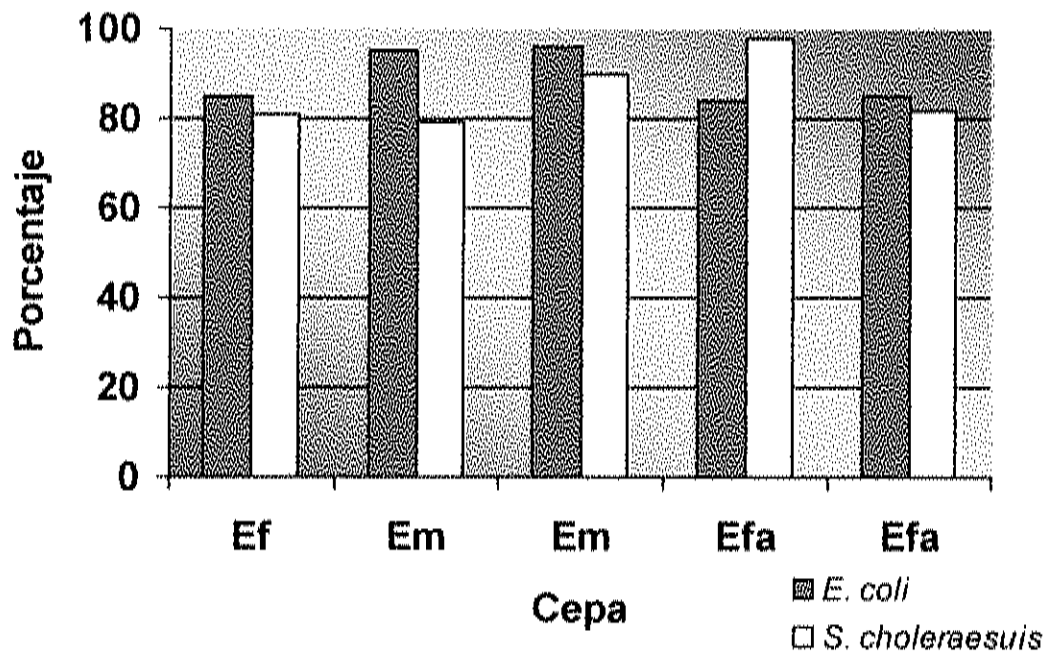


Figura 18. Porcentaje de inhibición de las cepas de *Enterococcus* provenientes de conejo frente a los dos patógenos probados. Ef es *Enterococcus faecalis*, Em es *E. mundii* y Efa es *E. faecium*

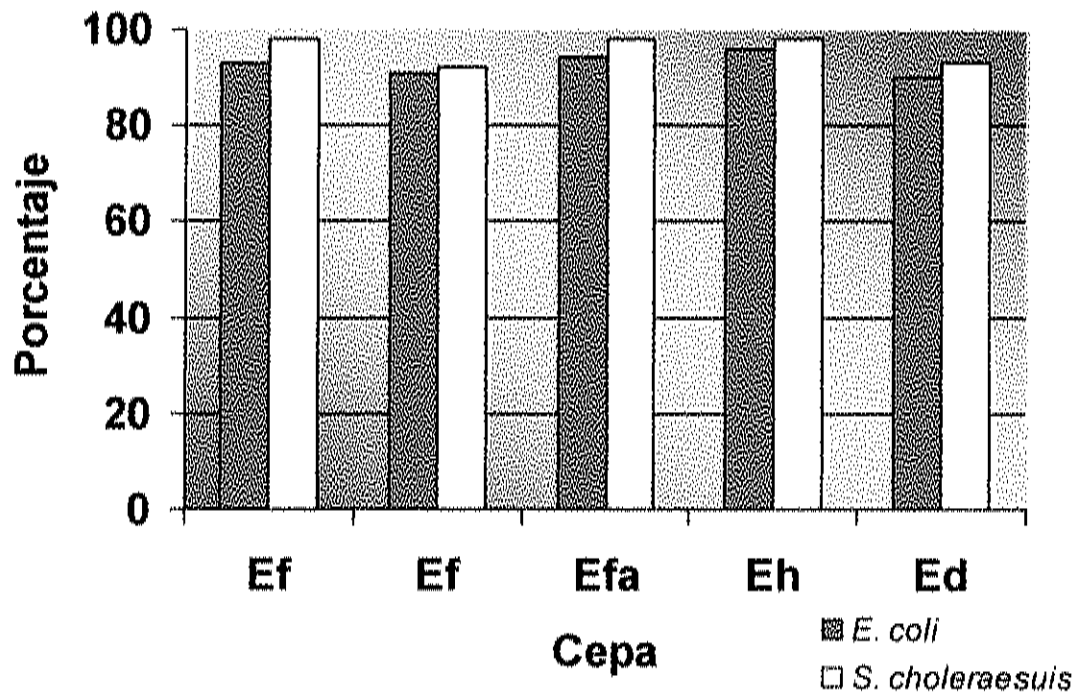


Figura 19. Porcentaje de inhibición de las cepas de *Enterococcus* de referencia frente a los dos patógenos probados. Ef es *E. faecalis*, Efa es *E. faecium*, Eh es *E. hirae* y Ed es *E. durans*

Por otra parte, la multirresistencia también puede ser de beneficio para las cepas probióticas ya que, aunque son prácticas que deben realizarse con un control muy estricto, en ocasiones se comenten abusos en la adición de antibióticos a los alimentos de los animales, pues éstos son utilizados como promotores de crecimiento o con fines profilácticos. Por lo anterior, es muy probable que varias cepas probióticas que son administradas a cerdos en el alimento no tengan efecto, puesto que mueren ante la presencia del antibiótico tanto en la matriz del alimento con el cual son suministradas, como ante los metabolitos que se encuentran en el organismo del animal (McKellar, 1998). Al ser los *Enterococcus* multirresistentes, la condición adversa de presencia de antibióticos o sus metabolitos difícilmente afectará la viabilidad de la bacteria y la cepa probiótica llegará viva al intestino del cerdo para ejercer su acción benéfica (McKellar, 1998; Trieu-Cuot y cols, 1999).

Es muy importante hacer notar, que uno de los principales factores de patogenicidad que se les atribuye a los *Enterococcus* es la resistencia a vancomicina (Lund y cols., 2001). Sin embargo como puede verse en la Tabla 6, solo dos especies de las aisladas en el presente estudio presentan resistencia intermedia. Todas las demás son susceptibles y ninguna de ellas es resistente a vancomicina. Esto es muy importante, ya que este hecho refuerza la idea de utilizar estas cepas aisladas como posibles agentes probióticos, ya que además de sus múltiples características benéficas la principal característica de patogenicidad no la manifiestan.

Tabla 6. Resistencia a los antimicrobianos de las cepas aisladas en el estudio. El fondo del recuadro indica: **resistencia** al fármaco, resistencia intermedia o **sin efecto**. El número representa el diámetro del halo de inhibición alrededor del disco en mm. En el eje superior se señala el antibiótico utilizado, mientras que en el eje de la izquierda, el número de laboratorio de la cepa estudiada

Clave	Antibiótico											
	AN	AM	CB	CF	C	E	G	K	NF	TC	NN	VA
35	10			15		15	9	9		15	7	
49	14			7	13	7		15		9	10	16
63	12			8		12	10	8		10	7	
50	15			12	12	7		9		7	7	
b11	14			7	7	12		15		7	8	
84	14			10	12	8		11		16	7	
128	15			10	15	7	9	16		7	10	16
b6	14			7		14		17		7	7	
b7	16			9	20	20		14		10	13	
b15	16			9	7	16		16		7	7	
c58	15			11	7	16		16		7	7	
2f	16			12	8	14		7		10	7	
3d	15			13	8	7		10		10	7	
6a	7			11	11	3		11		7	7	
8c	15			11	13	7		12		7	7	
8g	15			12	14	7		10		7	7	
184	7			10		18		12		10	10	
279	12			12	18	18		7		12	7	
410	12			10		13		7		10	7	
411	12	16	12	10		18		16		10	10	
481	12			15		7		7		10	9	

RAPD

Una vez completado el esquema propuesto para la caracterización fenotípica, se llevó a cabo el estudio de caracterización molecular de las cepas. El primer análisis que se llevó a cabo fue el análisis de RAPD. Se probaron 20 iniciadores OPA con 3 cepas de *Enterococcus* una de cerdo, una de conejo y una de referencia para seleccionar aquellos iniciadores que presentaran mejores perfiles electroforéticos frente a dichas cepas. Se seleccionaron 5 iniciadores con los cuales se realizó el análisis a las 21 cepas y los resultados obtenidos con ellos, se presentan a continuación.

Con el iniciador OPA 3 se obtuvieron 15 perfiles de bandas distintos con amplificación de 3 a 6 bandas en un rango de peso molecular de 0.1 a 1.6 Kb. Se realizó el dendrograma de asociación y se obtuvo un coeficiente de similitud de 0, pero esto considerando que una de las cepas no presentó ninguna banda de amplificación con este iniciador (Figura 20).

Con el iniciador OPA 10 se obtuvieron 15 perfiles de bandas distintos, amplificándose de 1 a 3 bandas de peso molecular entre 0.1 a 0.7 Kb. El dendrograma mostró un coeficiente de similitud de 0.11, aunque en esta ocasión todas las cepas si presentaron amplificación con el iniciador en cuestión (Figura 21).

Con el iniciador OPA 13 se obtuvieron 15 perfiles de bandas distintos, se amplificaron de 2 a 5 bandas (0.1 a 0.6 Kb de peso molecular). El coeficiente de similitud mostrado en el dendrograma fue de 0.17, nuevamente todas las cepas presentaron amplificación con este iniciador (Figura 22).

Al utilizar el iniciador OPA 15 se obtuvieron 15 perfiles de bandas distintos amplificándose de 1 a 6 bandas con pesos moleculares de 0.06 a 0.8 Kb. El coeficiente de similitud fue de 0 ya que nuevamente una de las cepas no amplificó con el iniciador en cuestión (Figura 23).

Finalmente, con el iniciador OPA 16 se obtuvieron 15 perfiles de bandas distintos y se amplificaron de 2 a 6 fragmentos de peso molecular entre 0.1 y 1.8 Kb. En el dendrograma se presentó un coeficiente de similitud de 0.17, una de las cepas tampoco amplificó con este iniciador (Figura 24).

Nota: En las siguientes figuras en las cuales se presentan geles y dendrogramas, en lo sucesivo a menos que se indique lo contrario, el acomodo de los carriles en los geles será siempre el mismo respetando la siguiente tabulación.

Carril	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	
Cepa	2f	3d	6a	8c	8g	184	279	410	411	481	
Origen	Conejo					Referencia					
Carril	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21
Cepa	35	49	50	63	b11	84	128	b6	b7	b15	C58
Origen	Cerdo										

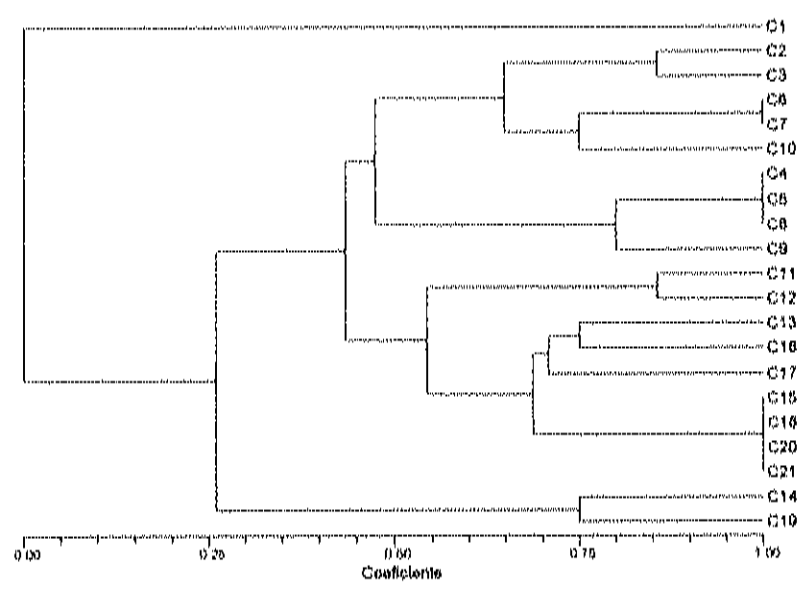
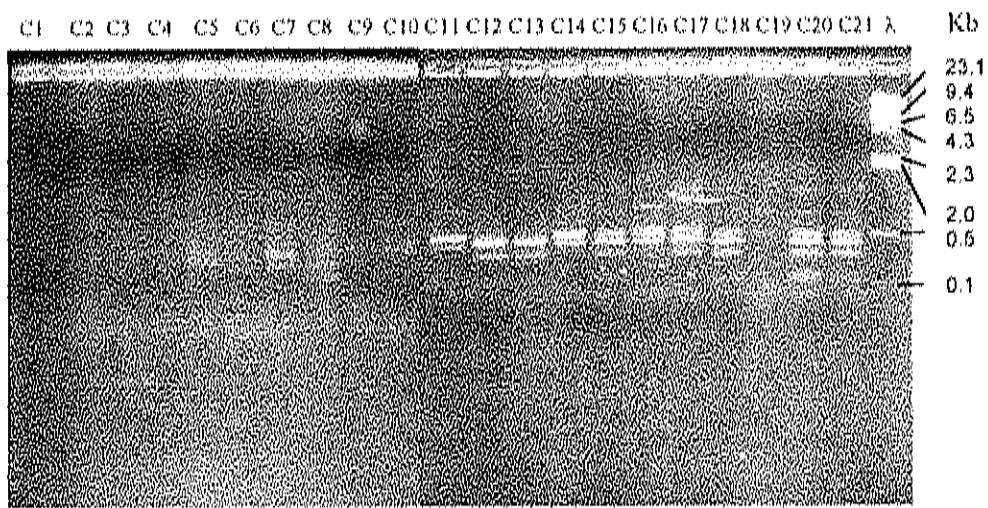


Figura 20. Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud utilizando UPGMA de las cepas de *Enterococcus* estudiadas con el iniciador OPA 3. Ver Nota en página 90

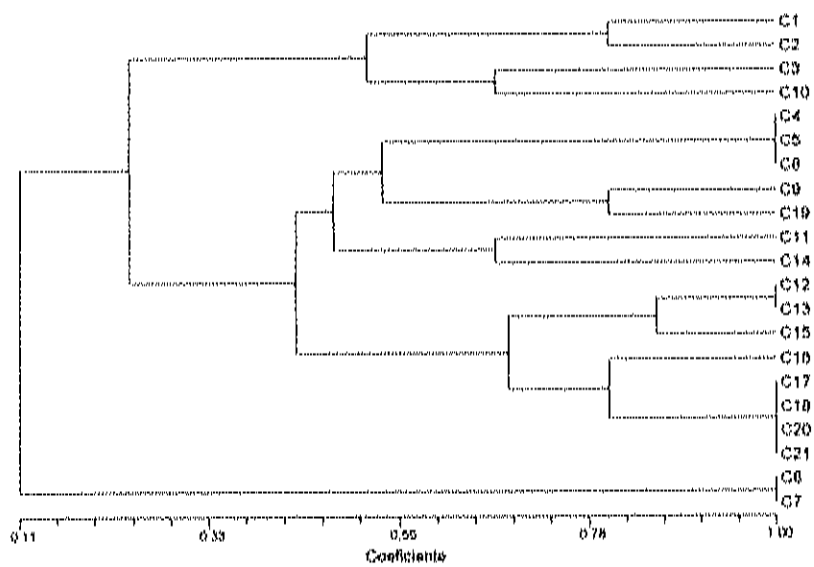
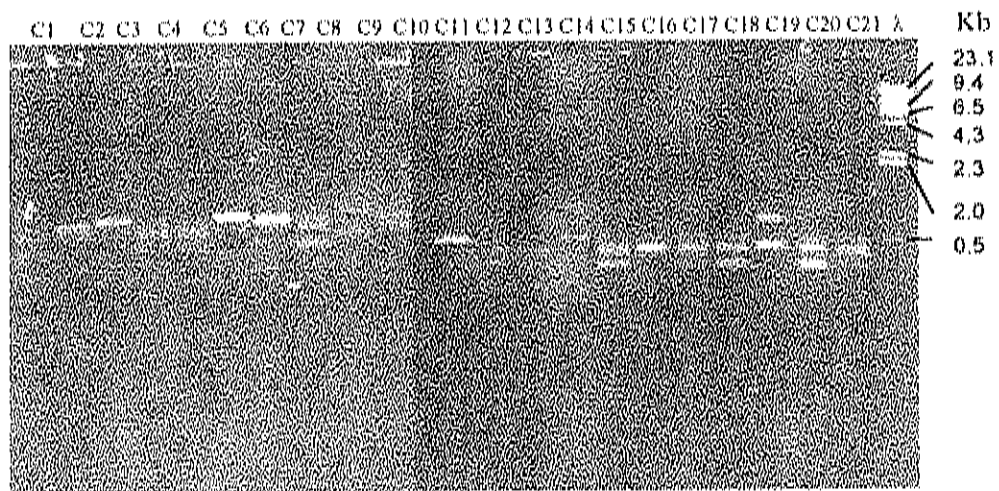


Figura 21. Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud, utilizando UPGMA de las cepas de *Enterococcus* estudiadas con el iniciador OPA 10. Ver Nota en página 90

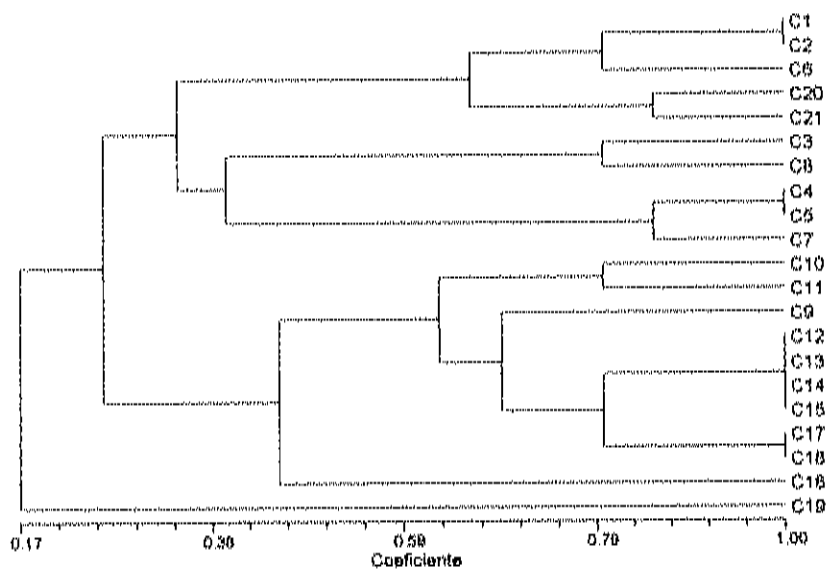
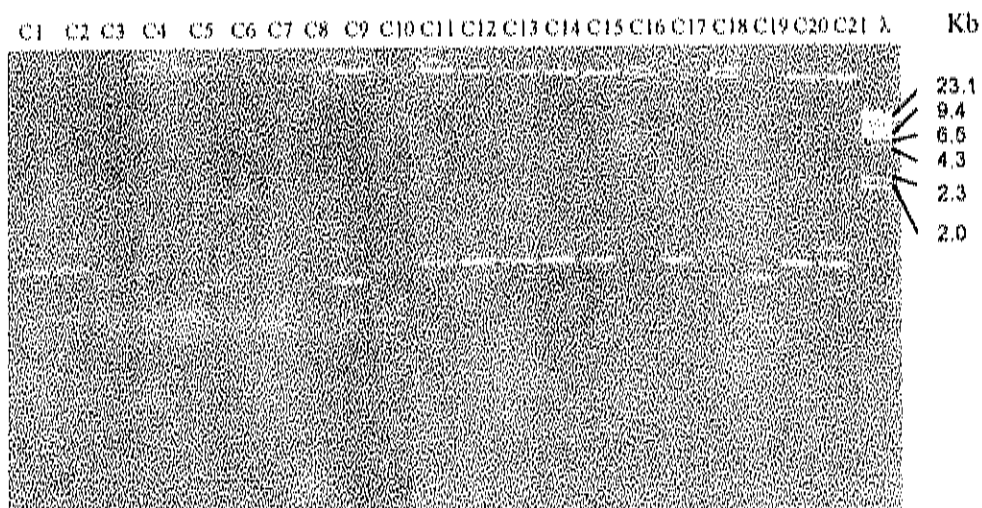


Figura 22. Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud, utilizando UPGMA de las cepas de *Enterococcus* estudiadas con el iniciador OPA 13. Ver Nota en página 90

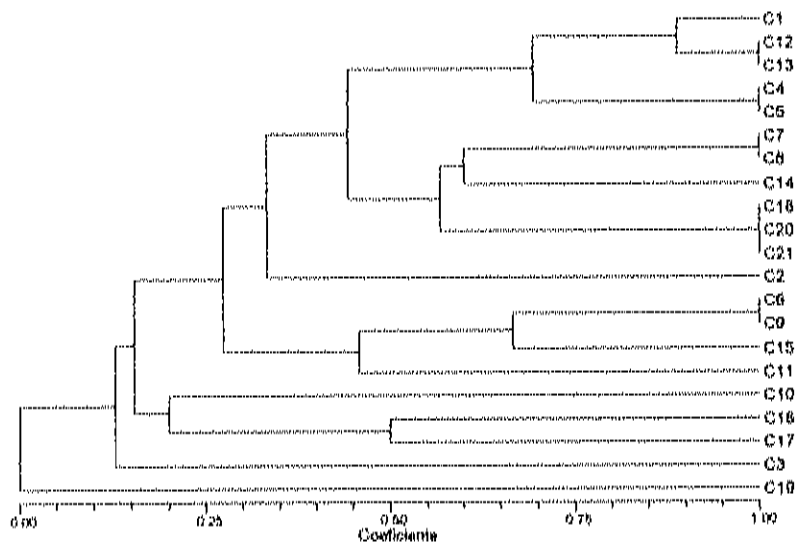
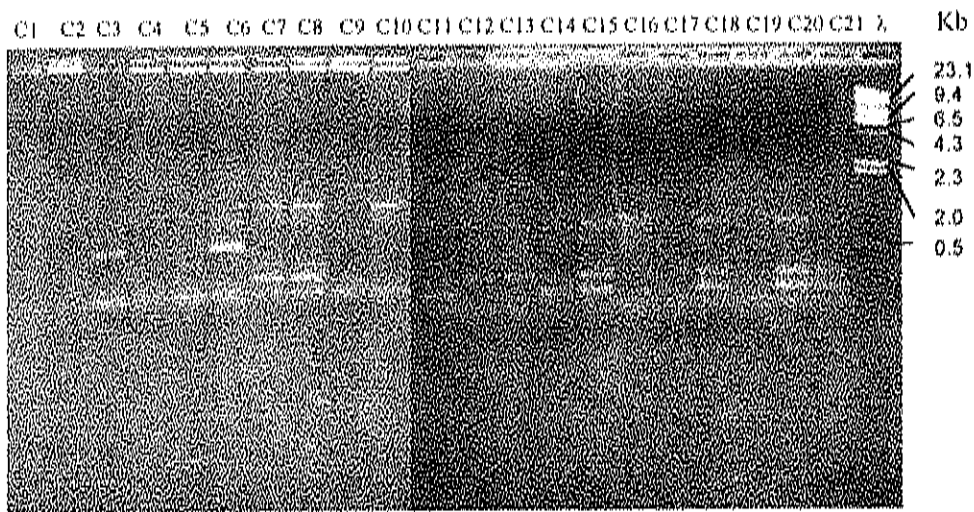


Figura 23. Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud, utilizando UPGMA de las cepas de *Enterococcus* estudiadas con el iniciador OPA 15. Ver Nota en página 90

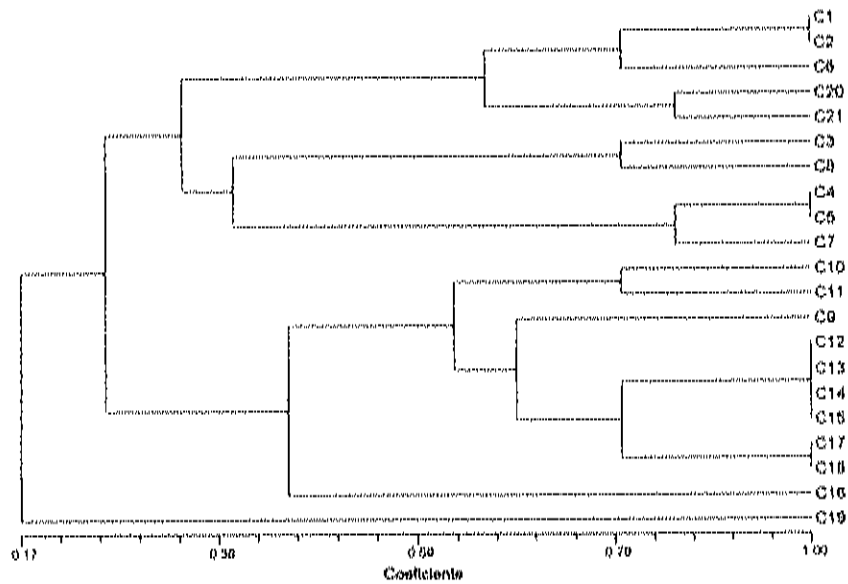
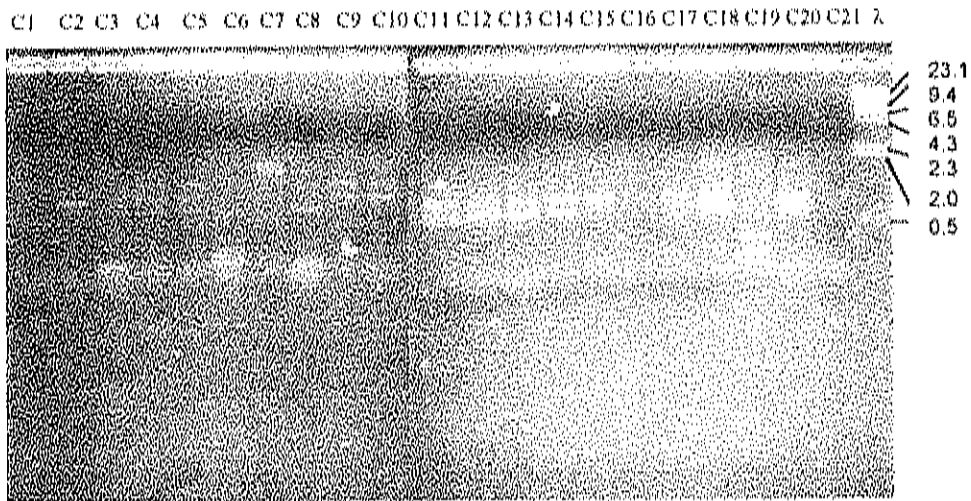


Figura 24. Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud, utilizando UPGMA de las cepas de *Enterococcus* estudiadas con el iniciador OPA 16. Ver Nota en página 90

Tratando de buscar un coeficiente de similitud mayor se relizaron varias combinaciones con las matrices de similitud de cada uno de los iniciadores. Cuando se mezclaron las matrices de todos los iniciadores, se obtuvo un dendrograma con un coeficiente de similitud de 0.22. Sin embargo al combinar las matrices de los iniciadores OPA 10 y OPA 13 que son los iniciadores con los que todas las cepas presentaron al menos la amplificación de una banda, se obtuvo un coeficiente de similitud de 0.28 (Figura 25).

Algo importante que se debe hacer notar en ese dendrograma es la formación de dos grupos principales que se presentan entre las cepas y se puede ver claramente la tendencia de las cepas de cerdo de agruparse en el primer grupo (árbol superior, excepto una cepa de *E. faecium*), mientras que las cepas de conejo y referencia presentan una tendencia a agruparse en el segundo grupo (árbol inferior).

En el dendrograma de la Figura 25 se presentan también las especies identificadas bioquímicamente y puede observarse como las mismas especies aisladas, incluso de la misma fuente en el análisis genómico, caen en diferentes árboles cuando esperaríamos que fuesen similares. Por un lado podemos ver que dentro de las mismas especies bacterianas existen diferencias genéticas (Becerril y cols., 1998), así mismo es importante recordar que las características fenotípicas no siempre se expresan adecuadamente (Madigan y cols., 2000). Por lo anterior, pudiendo ser especies diferentes podrían estar expresando características fenotípicas que las hicieran parecer similares, como se puede ver también en el mismo dendrograma, cómo especies identificadas bioquímicamente como diferentes aparecen genómicamente similares.

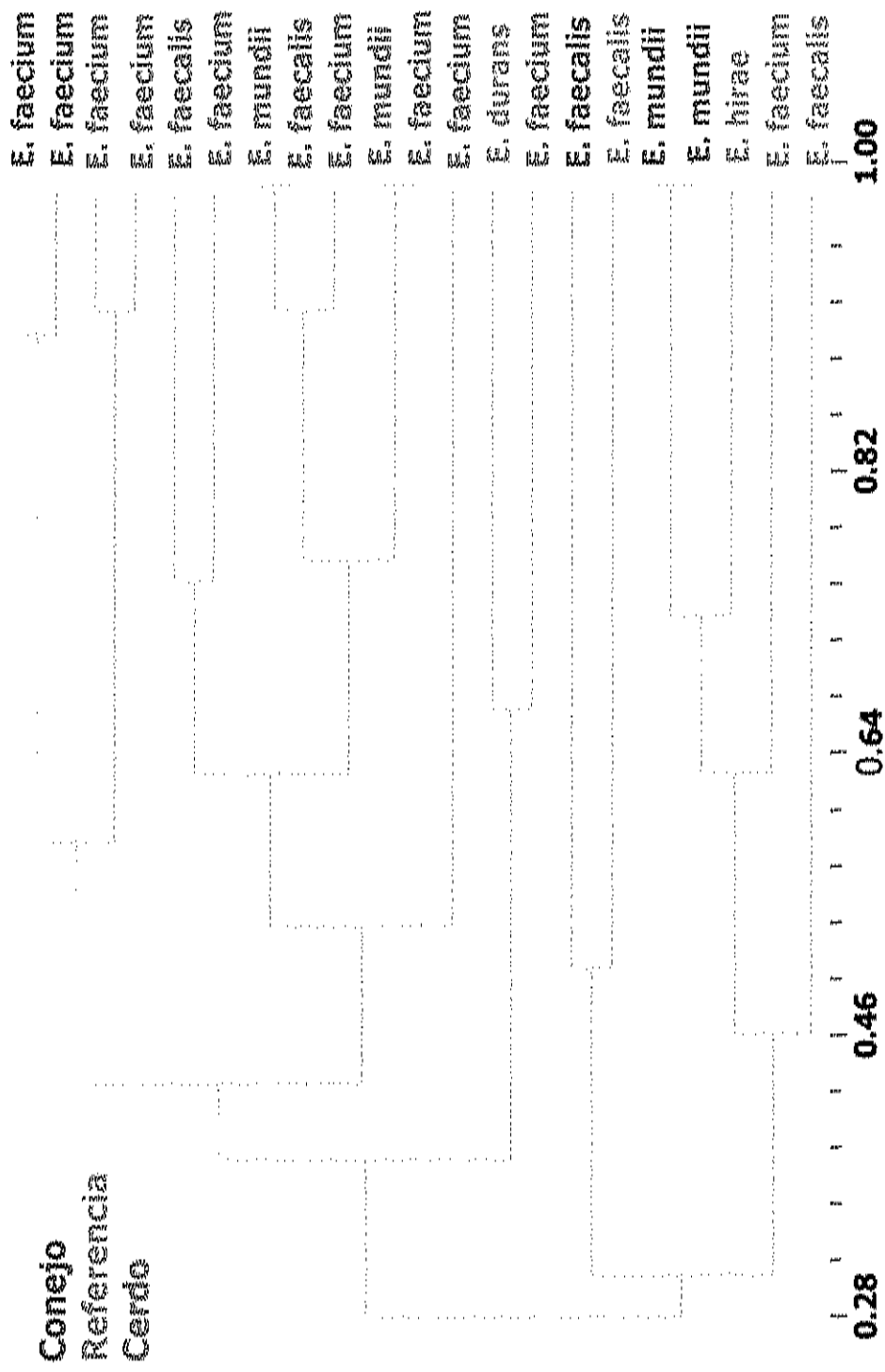


Figura 25. Dendrograma de las cepas de *Enterococcus* elaborado con las matrices combinadas de los iniciadores OPA 10 y 13

Un trabajo previamente realizado por Granillo (2003) con las mismas cepas pero utilizando un iniciador OPA 4 mostró un coeficiente de similitud semejante al obtenido con la combinación de las matrices de los iniciadores OPA 10 y 13.

En estudios previos se ha utilizado la técnica de RAPD para identificar *Enterococcus* y se ha establecido que es un método bastante confiable para la identificación de los mismos (Carreto y cols., 2000).

Esta técnica también ha sido utilizada para fines de localización taxonómica en otras bacterias lácticas como *Lactobacillus* (Acedo, 1999) y ha demostrado ser un buen criterio parcial para la identificación molecular.

De hecho, la técnica de RAPD ha sido utilizada desde hace mucho tiempo pues ha demostrado ser muy eficaz para amplificar fragmentos genómicos al azar y tener una reproducibilidad muy elevada entre una y otra corrida electroforética. Claro está que se debe llevar a cabo en condiciones exactamente iguales entre una corrida y otra (Caetano y cols., 1991). Es importante mencionar que la repetibilidad de la técnica en el presente estudio fue muy alta ya que se realizó RAPD por duplicado a todas las cepas con los mismos iniciadores y los resultados que se obtuvieron fueron similares entre una corrida y otra.

PFGE

La segunda técnica que se utilizó para la caracterización molecular de las cepas de *Enterococcus* obtenidas en el estudio fue la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés).

Para determinar cual seria la enzima de restricción que se utilizaría para el análisis, se realizaron digestiones a 3 cepas de *Enterococcus* (una de cerdo, una de conejo y una de referencia) con las siguientes enzimas: *Sfi* I, *Sma* I, *Spe* I, *Not* I, *Pst* I y *Xba* I. La enzima que presentó un perfil electroforético más adecuado para el análisis fue *Sma* I. Y dicha selección coincide con la realizada por otros autores que también utilizaron esta enzima para llevar a cabo la macrorrestricción en bacterias lácticas (McClelland y cols., 1987).

En la figura 26 aparecen los perfiles electroforéticos así como el dendrograma de asociación obtenido de dicha macrorrestricción para las cepas tanto de cerdo como de conejo y referencia utilizando la enzima *Sma* I.

Como puede observarse se forman 16 perfiles de bandas distintos, de los cuales sobresalen dos grupos principales y de uno de esos grupos (el grupo que aparece en la parte inferior) junto con una rama del grupo principal reúnen a las cepas de conejo y referencia. Mientras que en el grupo superior dos ramas albergan a las cepas provenientes de cerdo.

ARDRA

La última técnica molecular que se utilizó para la caracterización de las cepas de *Enterococcus* fue la de ARDRA. Se siguió la misma rutina para la selección de una enzima de restricción apropiada para el análisis que la rutina seguida para la selección de la enzima en PFGE. Las enzimas que se probaron fueron: *Eco* R1, *Hap* II, *SaU* 3AI y *Alu* I. La enzima que presentó un mejor patrón de bandas fue *Eco* R1 y por lo tanto fue la que se utilizó para realizar el análisis.

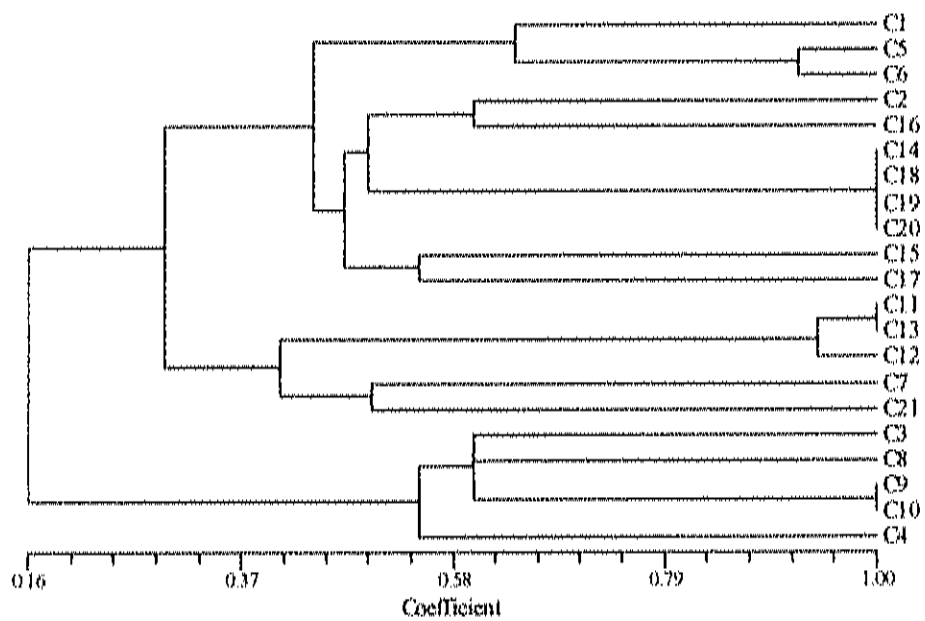
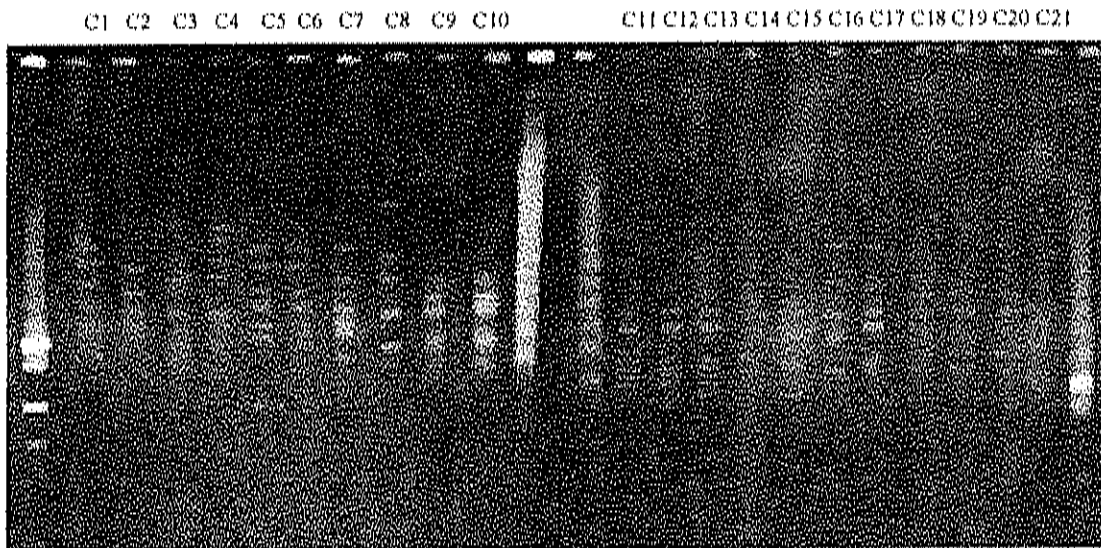


Figura 26. Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud de las cepas de *Enterococcus* en la electroforesis de campo pulsado. Ver Nota en página 90

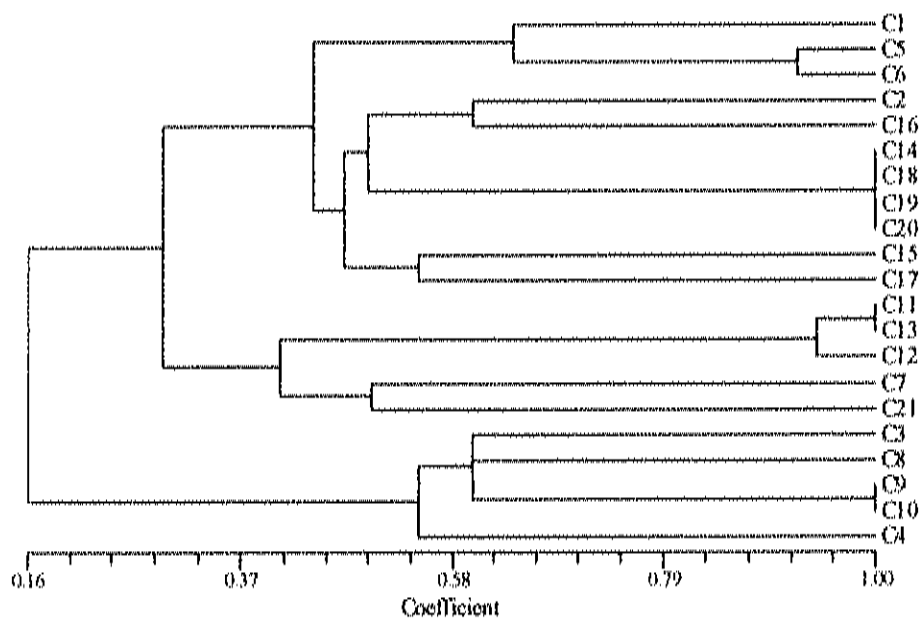
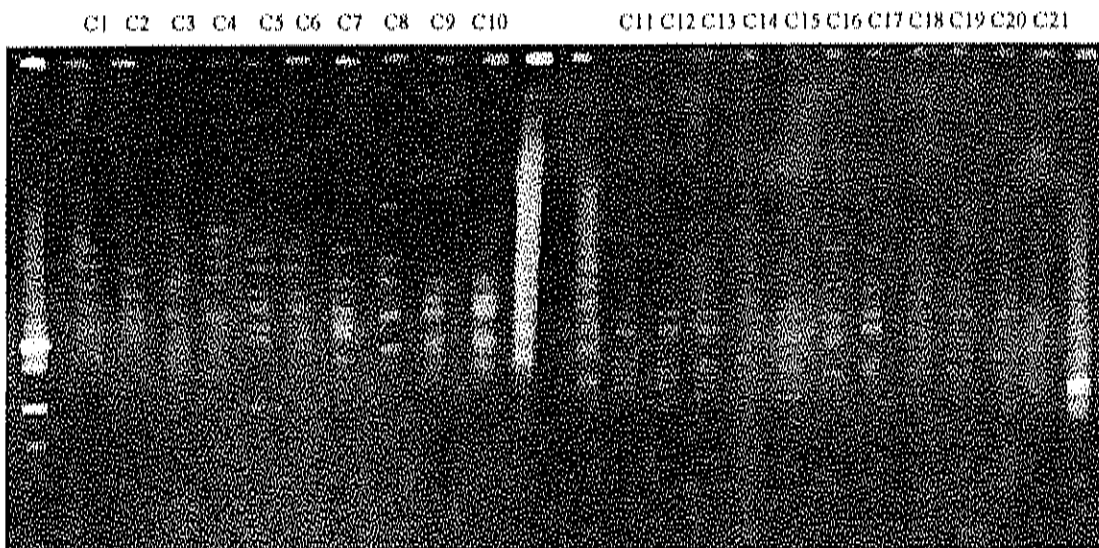


Figura 26. Perfiles electroforéticos y dendrograma de similitud de las cepas de *Enterococcus* en la electroforesis de campo pulsado. Ver Nota en página 90

En la Figura 27, se pueden observar los geles que muestran los perfiles electroforéticos de las cepas de *Enterococcus* utilizando la enzima de restricción *EcoRI*. No se muestra ningún dendrograma de asociación porque todos los perfiles electroforéticos fueron similares y eso implica que el dendrograma daría una sola línea recta con un coeficiente de similitud de 1.

El análisis de ARDRA permitió más que nada verificar que las cepas pertenecían al mismo género ya que se ha observado que la secuencia del ADN ribosomal es muy conservada dentro de las especies de un mismo género y las bases variables, que hacen la diferencia entre especies, no están en los sitios de reconocimiento de la enzima *EcoRI*. Se realizó una regresión lineal con el marcador de peso molecular fago λ digerido con *Hind III*, para determinar el peso molecular de los fragmentos que se obtuvieron como producto de la digestión con *EcoRI* y se observó que la suma de los pesos (980, 300 y 240 Kb) de las tres bandas fue de 1520 pb, lo cual es bastante similar al fragmento correspondiente al ADN ribosomal 16S de alrededor de 1600 pb.

Correlaciones Generales

Se correlacionaron todas las características fenotípicas que se estudiaron en las cepas de *Enterococcus* (pruebas de fermentación de carbohidratos, resistencia al ácido, tolerancia a las sales biliares, antagonismo bacteriano frente a *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*) y se obtuvo el dendrograma que aparece en la Figura 28.

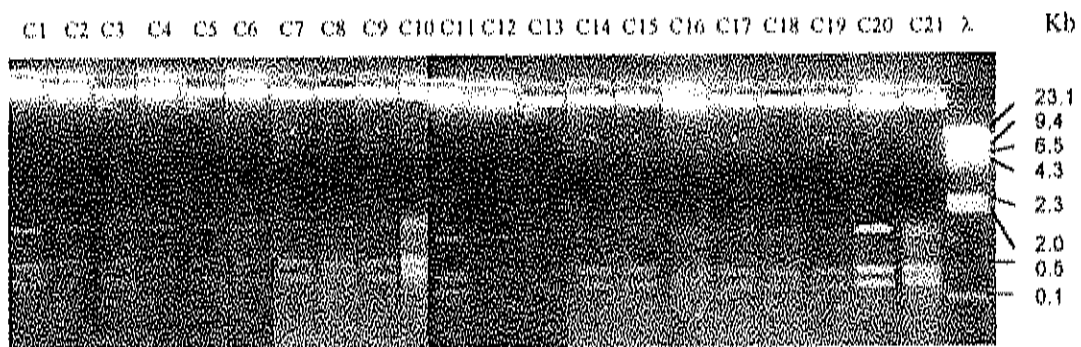


Figura 27. Perfiles electroforéticos de las cepas de *Enterococcus* estudiadas por medio de la técnica de ARDRA utilizando la enzima de digestión *Eco* RI. Ver Nota en página 90

Posteriormente se relacionaron las características genómicas que se observaron en las cepas (RAPD con los 5 iniciadores diferentes, PFGE y ARDRA) y se logró obtener el dendrograma que aparece en la Figura 29. Finalmente se correlacionaron todas las características tanto fenotípicas como genotípicas y se logró obtener el dendrograma que aparece en la Figura 30.

Como puede observarse, cuando las cepas son estudiadas a nivel fenotípico algunas de ellas resultan tener una similitud del 100%, y un coeficiente de similitud entre todas ellas de 0.71. Sin embargo, cuando se estudian las cepas considerando solo las características genómicas se puede observar que ninguna alcanza un 100% de similitud, llegan solo a presentar una homología del 95% y un coeficiente de similitud entre todas ellas de 0.42. Lo anterior evidencia el hecho de que en muchas ocasiones cuando se estudian bacterias a un nivel fenotípico se puede establecer que dos cepas son iguales, sin embargo si se llevan a cabo estudios genómicos es muy difícil llegar a establecer esa conclusión. Hay que recordar que las características fenotípicas no siempre se expresan igual y eso se hace evidente en el presente trabajo.

Como puede observarse en la Figura 30, cuando se mezclan los criterios tanto fenotípicos como genotípicos para llevar a cabo una correlación, el coeficiente que se obtiene es un coeficiente que prácticamente es el promedio del coeficiente que se obtiene cuando se lleva a cabo la correlación por separado de cada una de las características (fenotípicas y genotípicas).

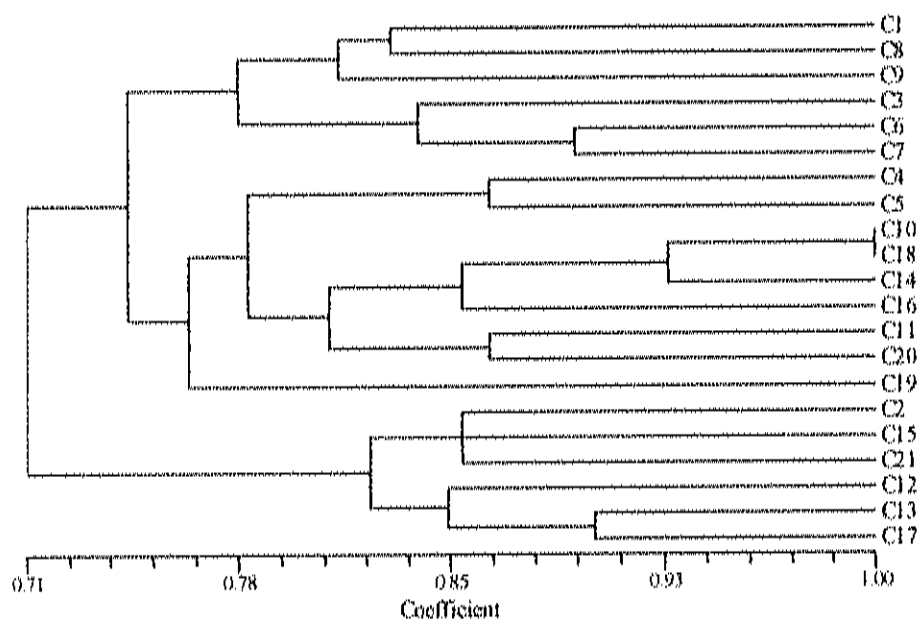


Figura 28. Dendrograma de las cepas de *Enterococcus* con base en las características fenotípicas que muestra la asociación entre las mismas. Ver Nota en página 90

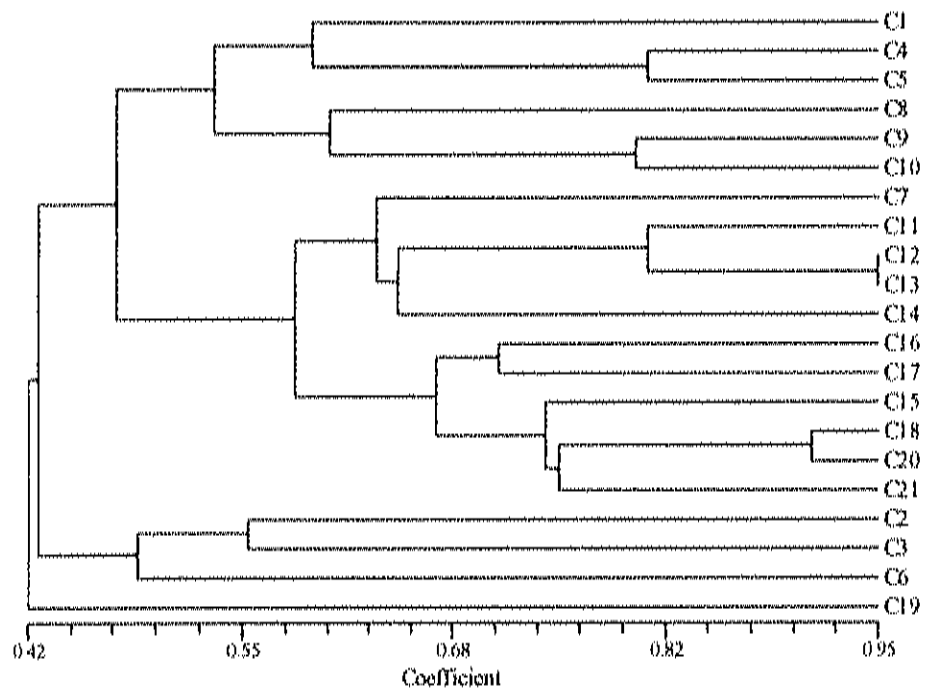


Figura 29. Dendrograma de las cepas de *Enterococcus* con base en las características genotípicas que muestra la asociación entre las mismas. Ver Nota en página 90

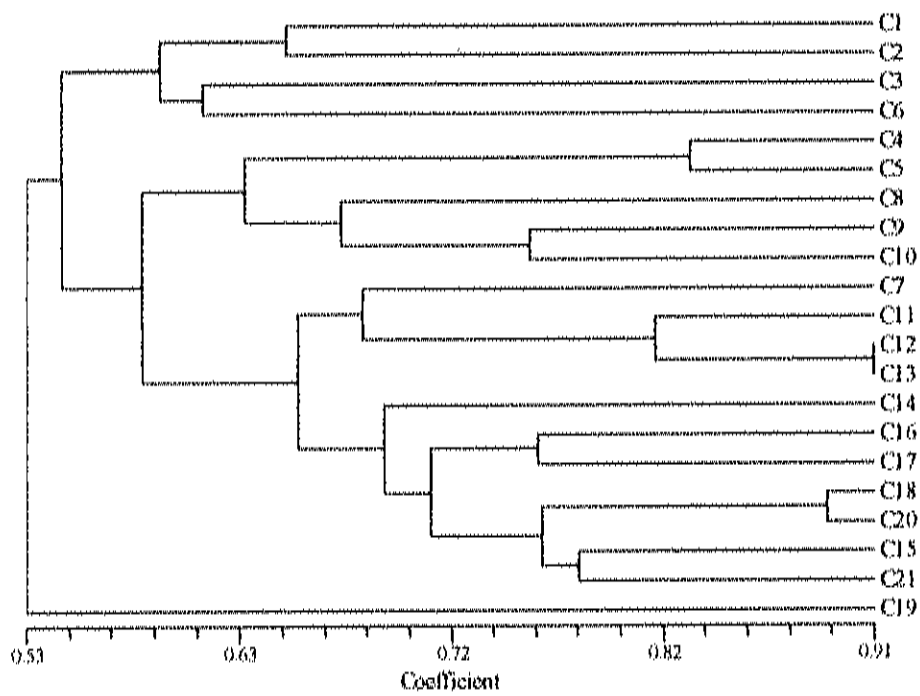


Figura 30. Dendrograma de las cepas de *Enterococcus* con base en las características fenotípicas y genotípicas que muestra la asociación entre las mismas. Ver Nota en página 90

En los últimos años, se ha observado que para tener una caracterización confiable de las cepas, es necesario realizar estudios polifásicos, que incluyen la caracterización fenotípica y genotípica (De Andrade, 1995), tanto para las cepas de interés industrial, como para la designación taxonómica correcta de nuevas cepas (Acedo, 1999).

A pesar de que existe mucha controversia en cuanto a la utilización de cepas del género *Enterococcus* como agentes probióticos, ya que por un lado se ha postulado por diferentes estudios que pueden poseer diferentes factores de virulencia (Koneman y cols., 1994, Forbes y cols., 1998, Franz y cols., 1999). Mientras que por otra parte también se ha demostrado que pueden ejercer acciones que favorecen la salud humana en contra de algunos patógenos como *L. monocytogenes* (Laukova y cols, 1998), varios serotipos de *Salmonella* (Audisio y cols., 1999) o *E. coli* K88 (Jin y cols, 2000). Hay que considerar que dentro de un mismo género existe gran diversidad fenotípica y genotípica, incluso dentro de las mismas especies como se ha demostrado en el presente estudio. Por lo cual a pesar de los posibles efectos patógenos potenciales, si la caracterización de las cepas se realiza de manera polifásica podemos asegurarnos de seleccionar como probióticos aquellas cepas que presenten solo factores benéficos para el huésped, claro que eso implica un estudio polifásico más extenso que el realizado en el presente estudio.

CONCLUSIONES

Se aislaron 195 cepas a partir de vísceras de cerdo (42 de estómago, 71 de intestino delgado y 82 de intestino grueso).

De las 195 cepas estudiadas, solo 77 sobrevivieron a la prueba cualitativa de resistencia al ácido y de esas, únicamente 58 sobrevivieron a la prueba cualitativa de tolerancia a sales biliares.

Al realizar el estudio cuantitativo de resistencia al tránsito gastrointestinal se logró observar que solamente 25 fueron resistentes al ácido y de éstas solo 11 lograron tolerar las sales biliares.

Entre las 11 cepas de cerdo que resistieron la prueba cuantitativa de tránsito gastrointestinal a través de las pruebas de fermentación de carbohidratos, se lograron identificar tres especies. 2 cepas de *Enterococcus faecalis*, 2 cepas de *Enterococcus mundii* y 7 cepas de *Enterococcus faecium*.

De las 5 cepas de *Enterococcus* provenientes del tracto gastrointestinal de conejo se identificaron 2 cepas como *Enterococcus faecium*, 2 como *Enterococcus mundii* y 1 cepa de *Enterococcus faecalis*.

En las 11 cepas de *Enterococcus* provenientes de cerdo, las 5 cepas de conejo y 5 cepas de referencia, se logró observar una actividad antagónica contra *E. coli* K88 y *S. choleraesuis* superior al 80%.

El único antibiótico frente al cual todas las cepas de *Enterococcus* probadas fueron susceptibles fue la nitrofurantoína. Sin embargo, solamente dos cepas

provenientes de cerdo presentaron una resistencia intermedia a la vancomicina y el resto fue susceptible.

Existen cepas del género *Enterococcus* dentro del contenido gastrointestinal de cerdos sanos que pueden ser consideradas como potenciales probióticas.

En lo que corresponde a la resistencia la tránsito gastrointestinal no existe diferencia estadística si comparamos las cepas aisladas a partir de cerdo, las cepas aisladas de conejo y las cepas de referencia.

Tampoco existe diferencia estadística entre las cepas proveniente de cerdo, conejo o de referencia, en cuanto a su poder antagónico frente a los patógenos *Escherichia coli* K88 y *Salmonella choleraesuis*.

Independientemente de la fuente de donde fueron aisladas las cepas de *Enterococcus* se puede inferir, que el género posee buenas características antagónicas frente a los dos patógenos probados.

El análisis genómico a través de la técnica de RAPD permite conocer de manera presuntiva el origen del cual fue aislado la cepa en cuestión, es este caso, agrupa las cepas de cerdo y de conejo o referencia en diferente grupo.

La caracterización genómica de cepas a través de la técnica de PFGE al igual que la de RAPD resultó útil para correlacionar a las cepas de *Enterococcus* observándose, en dicha correlación, una tendencia para formar grupos dependiendo del origen del cual provienen las cepas.

La correlación de cepas en base a características fenotípicas resultó ser menos discriminatoria que la correlación en base a características genotípicas estableciéndose de

esta forma un grado de similitud del 100% en base al fenotipo, mientras que en base al genotipo las cepas que mayor similitud alcanzaron fue del 95%.

El criterio que mostró un mayor poder discriminatorio entre las cepas fue el que incluyo tanto las características fenotípicas como genotípicas, ya que de esta manera se pudo observar un buen coeficiente de correlación entre todas las cepas y al mismo tiempo se alcanzaron similitudes entre las cepas solo hasta el 91%.

Como pudo observarse, una bacteria cuando es estudiada solo desde el punto de vista fenotípico puede confundirse con otra cepa diferente pero que presenta el mismo fenotipo. Sin embargo cuando se lleva a cabo únicamente un análisis genómico muchas diferencias no se presentan tan marcadas, pero cuando se conjugan ambas características, se puede obtener una mejor diferenciación. Por lo anterior, es que este estudio es una evidencia más de la importancia de los estudios polifásicos para la caracterización bacteriana y con mayor énfasis en aquellas con posible valor industrial.

RECOMENDACIONES

Se recomienda el desarrollo de un medio de cultivo selectivo para el género *Enterococcus* que permita aislar a las cepas de este género de manera óptima, ya que los medios que actualmente existen en el mercado (y son los utilizados para aislar a estas bacterias) están diseñados para *Streptococcus* o para *Enterococcus* fecales.

Desarrollar estudios biológicos *in vivo* en la especie en la que serán utilizadas las diferentes cepas, así como ensayos de toxicidad y antagonismo bacteriano entre ellas mismas.

Continuar realizando los estudios de caracterización genómica para mejorar la protección de las cepas con posible valor industrial.

REFERENCIAS

- **Acedo, E.** 1999. Definición taxonómica de *Lactobacillus casei* por técnicas moleculares. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España.
- **Acedo-Félix, E., and G. Pérez-Martínez.** 2003. Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp *casei* ATCC 393 and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**:67-75.
- **Audisio, M. C., G. Oliver, and M. C. Apella.** 1999. Antagonistic effect of *Enterococcus faecium* J96 against human and poultry pathogenic *Salmonella* spp. *Journal of Food Protection*. **62**: 751-755.
- **Audisio, M. C., G. Oliver, and M. C. Apella.** 2000. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella Pullorum*. *Journal of Food Protection*. **63**: 1333-1337.
- **Audisio, M. C., G. Oliver, and M. C. Apella.** 2001. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology*. **63**: 235-241.
- **Axelsson, L.** 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology in Lactic acid bacteria. Edited by S. Salminen, and A. Von Wright. Marcel Dekker, USA.
- **Beerens, H.** 1991. Detection of Bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:2418-2419.
- **Benito, P., G.J. Nelson, D. S. Kelley, G. Bartolini, P. C. Schmidt, and V. Simon.** 2001. The effect of conjugated linoleic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans. *Lipids*. **36**: 229-236.
- **Bustamante, C., S. Gurrieri, and S. B. Smith.** 1993. Towards a molecular description of pulsed field gel electrophoresis. *Biotech*. **11**: 23-30.
- **Caetano, G., B. Bassam and P. Gresshoff.** 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology*. **9**: 553-557.
- **Carretto, E., D. Barbarini, F. Locatelli, E. Giraldi, N. Pellegrini, L. Perversi, P. Grossi, P. Marone, F. Bonetti.** 2000. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in three children given allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: clinical and microbiological features. *Haematologica* **85**:1158-1164.
- **Carro, M., and M. J. Ranilla.** 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: Situación actual y posibles alternativas. EXOPOL, Circular 90. <http://www.exopol.com/general/circulares/90circ.html>. Accesado:11-Dic-2002.
- **Collins, J. K., G. Thornton, and G. O. Sullivan.** 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*. **8**:487-490.

- **Collins, M. D., and G. R. Gibson.** 1999. Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*. **69(suppl)**: 1052-1057.
- **Cools, D., R. Merckx, K. Vlassak, and J. Verhaegen.** 2001. Survival of *E. coli* and *Enterococcus spp.* derived from pig slurry in soils of different texture. *Applied Soil Ecology*. **17**:53-62.
- **Corona, V.** 2001. Aislamiento y caracterización de *Bifidobacterium sp* a partir del contenido gástrico del cerdo. Tesis. Universidad de Sonora. México.
- **CSPI news.** 1999 FDA should ban the use of certain antibiotics to fatten farm animals. <http://www.cspinet.org/new/antibiotics.htm> Accessed: May 21, 2002
- **Dashkevich, M. P., and S. D. Feighner.** 1989. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus spp.* *Applied and Environmental Microbiology*. **55**:11-16.
- **De Andrade T., R.** 1995. Análise taxonómica em *Leuconostoc oenos*. Uma perspectiva polifásica. Tesis Doctoral. Lisboa.
- **De Martinis, E., V. Alves, and B. Franco.** 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International* **18**:191 – 208.
- **De Ross, N., and M. B. Katan.** 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *American Journal of Clinical Nutrition*. **71**:405-411.
- **Demeckova, V., D. Kelly, A. Coutts, P. Brooks and A. Campbell.** 2002. Modificación de las poblaciones bacterianas fecales y de la calidad del calostro mediante dietas fermentadas. *International Journal of Food Microbiology*. **79**:85 – 97.
- **Dunne, C., L. Murphy, S. Flinn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey.** 1999. Probiotic: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **76**:279 – 292.
- **Durant, J. A., C. R. Young, D. J. Nisbet, L. H. Stanker, and S. D. Ricke.** 1997. Detection and quantification of poultry probiotic bacteria in mixed culture using monoclonal antibodies in an enzyme-linked immunosorbent assay. *International Journal of Food Microbiology*. **38**:181-189.
- **Eaton, T. J., and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 1628-1635.
- **Falk, P. G., L. V. Hooper, T. Midtvedt, and J. I. Gordon.** 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62(4)**: 1157-1170.
- **Farber, J. M.** 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*. **59**: 1091-1101.

- **Forbes, B. A., D. F. Salm, and A. S. Weissfeld.** 1998. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 10th ed. Mosby. USA.
- **Franz, C. W. H. Holzapfel, and M. E. Stiles.** 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. International Journal of Food Microbiology. **47**: 1-24
- **García, A.** 2001. Caracterización parcial de cepas de *Escherichia coli* aisladas de agua y alimentos mediante detección de plásmidos. Tesis. Universidad de Sonora. México.
- **Gardiner, G., C. Stanton, P. B. Lynch, J. K. Collins, G. Fitzgerald, and R. P. Ross.** 1999. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. Journal of Dairy Science. **82**:1379-1387.
- **Gastelum, A.** 2002. Recuperación e incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida expandida en el mercado local. Tesis. Universidad de Sonora. México.
- **Gibson, G., D. Heber, S. Meydani, E. Postaire, and M. E. Sanders.** 2000. Functional Dairy Products. John Libbey Eurotext. France.
- **Gómez, A., G. Kociubinski, P. Pérez, and G. De Antoni.** 1998. Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation. Journal of Food Protection. **61**:865-873.
- **González, S. N., M. C. Apella, N. C. Romero, M. E. Nader de Macias, and G. Oliver.** 1993. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. Journal of Food Protection. **56**:773-776.
- **Granillo, F.** 2003. Caracterización de especies de bacterias ácido lácticas por medio de la técnica de amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD), utilizando PCR. Tesis en proceso. Universidad de Sonora. México
- **Hatakka, K., E. Savilahti, A. Pönkä, J. H. Meurman, T. Poussa, L. Näse, M. Saxelin, and R. Korpela.** 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centers: double blind, randomised trial. British Medical Journal. **322**:1-5.
- **Heidi, A., H. Sean, H. Siiri, M. Marika, and W. Torkel.** 2001. Characterization and differentiation of lactobacilli by lectin typing. The Journal of Medical Microbiology. **50**:1069-1074.
- **Hernández, F.** 2003. Algunos aspectos de investigación básica y aplicada sobre probióticos. Memoria Electrónica del 3er Simposio Mexicano de Probióticos. México, D.F.
- **Herrero, I. A., T. Teshager, J. Garde, M. A. Moreno, L. Domínguez.** 2000. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) in pig faeces from slaughterhouses in Spain. Preventive Veterinary Medicine. **47**:255-262.
- **Holt, J., N. R. Krieg, P. H. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams.** 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology 9th ed. William & Wilkins. USA.
- **Holzapfel, W. H., P. Haberer, R. Geissen, J. Björkroth, and U. Schillinger.** 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutrition. **73**(suppl): 365-373.

- **Houtsma, P. C., J. C. De Wit, and F. M. Rombouts.** 1996. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate and sodium chloride for spoilage organisms and pathogens at different pH values and temperatures. *Journal of Food Protection*. **59(12)**: 1300-1304.
- **Isolauri, E.** 2001. Probiotics in human disease. *American Journal of Clinical Nutrition*. **73(suppl)**: 1142-1146.
- **Izeta M., J.** 1992. Agentes etiológicos más comunes en el síndrome diarreico de los lechones. *Síntesis Porcina*. **11**:36-40.
- **Jin, L. Y., N. Abduliah, M. Ali, and S. Jalaludin.** 1996. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Letters in Applied Microbiology*. **23**:67-71.
- **Jin, L. Z., R. R. Marquardt, and X. Zhao.** 2000. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**:4200-4204.
- **Juntunen, M., P. V. Kirjavainen, A. C. Ouwehand, S. J. Salminen and E. Isolauri.** 2001. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **8**:293-296.
- **Karch, H.** 1987. A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infection and Immunity*. **55**:455-461.
- **Klaenhammer, T. R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **12**:39-86.
- **Klaenhammer, T., and M. Kullen.** 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of food microbiology*. **50**:45-57
- **Kociubinski, G., P. F. Pérez, M. C. Añon, and G. L. De Antoni.** 1996. A method of screening for highly inhibitory lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. **59**:739-745.
- **Kociubinski, G., P. Pérez, and G. De Antoni.** 1999. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Food Protection*. **62**:905-912.
- **Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, and W. C. Winn.** 1994. Introduction to diagnostic microbiology. Lippincott Company. USA.
- **Kullen, M., and T. Klaenhammer.** 1999. Genetic Modification of Intestinal lactobacilli and bifidobacteria. From Probiotics: A critical review.
- **Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chapter 6. Ed. By E. Stackebrandt and M. Goodfellow. John Wiley & Sons Ltd. Pp 115-175.
- **Laukova, A., S. Czilkova, Z. Vaslikova, P. Juris, and M. Marekova.** 1998. Occurrence of bacteriocin production among environmental enterococci. *Letters in Applied Microbiology*. **27**:178-182.

- **Levene, S. D., and B. H. Zimm.** 1987. Separations of open-circular DNA using pulsed-field electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Science*. **84**: 4054-4057.
- **Lewin, B.** 2002. *Genes VII*. Oxford Press University. USA.
- **Livesley, M. A., S. N. Smith, R. A. Armstrong, and G. A. Barker.** 1997. Analysis of plasmid profiles of *Aeromonas salmonicida* isolates by pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*. **146**:297-301.
- **Lund, B., and C. Edlund.** 2001. Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the *vanA* gene cluster. *Clinical Infectious Diseases*. **32**:1384-1385.
- **Lund, B., C. Edlund, L. Barkholt, C. E. Nord, M. Tvede, and R. L. Poulsen.** 2000. Impact on human intestinal microflora of an *Enterococcus faecium* probiotic and vancomycin. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. **32**:627-632.
- **MacFaddin, J. F.** 2000. *Biochemical Tests for Identification of Bacteria of Medical Importance*. Lippincott Williams & Wilkins. 3 edition. USA.
- **Madigan, M., J. Martinko y J. Parker.** 1998. *Brook: Biología de los microorganismos* 8^a ed. Prentice Hall. España.
- **Matsuzaki T., and J. Chin.** 2000. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunology and Cell Biology*. **78**:67-73.
- **McClelland, M., R. Jones, Y. Patel, and M. Nelson.** 1987. Restriction endonucleases by pulsed field mapping of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. **15**:5985-6005.
- **McIntosh, G. H., P. J. Royle, and M. J. Playne.** 1999. A probiotic strain of *L. acidophilus* reduces DMH-induced large intestinal tumors in male *Sprague dawley* rats. *Nutrition and Cancer*. **35**:153-159.
- **McKellar, Q.A.** 1998. Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. *British Medical Journal*. **317**:610-611.
- **McQuaid, K.** 2000. *Aparato digestivo en Diagnóstico clínico y tratamiento*. Editado por L. Tierney , S. McPhee y M. Papadakis. 38^a ed. Manual Moderno. México.
- **Méndez, S., V. Pavón, I. Esteve, R. Guerrero, N. Gaju.** 1995. Analysis of bacterial genomes by pulsed field gel electrophoresis. *Microbiología SEM*. **11**: 323-336.
- **Natren. The probiotic specialist.** 2001. Natren's Quality assurance program [online]. [http://www. Natren.com/pages/natashart1.html](http://www.Natren.com/pages/natashart1.html). Accesado: septiembre 16, 2001.
- **Netherwood, T., H. J. Gilbert, D. S. Parker, and A. G. O'donnell.** 1999. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**:5134-5138.
- **Nielsen, O. H., S. Jorgensen, K. Pedersen, and T. Justesen.** 1994. Microbiological evaluation of jejunal aspirates and faecal samples after oral

- administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. **76**:469-474.
- **NOM-092-SSA1-1994**, Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
 - **Pacheco, M.** 2002. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* sp del intestino y contenido intestinal del cerdo, por medio de técnicas bacteriológicas clásicas y caracterización parcial de sus propiedades probióticas. Tesis. Universidad de Sonora. México.
 - **Paludan, C., R. Valyasevi, H. H. Huss, and L. Gram.** 2002. Genotypic and phenotypic characterization of garlic-fermenting lactic acid bacteria isolated from *som-fak*, a Thai low-salt fermented fish product. *Journal of Applied Microbiology*. **92**:307-314.
 - **Prasad, J., H. Gill, J. Smart, and P. K. Gopal.** 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal*. **8**: 993-1002.
 - **Reid, G., A. W. Bruce, N. Fraser, C. Heinemann, J. Owen, and B. Henning.** 2001. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. **30**:49-52.
 - **Riserus, U., L. Berglund, and B. Vessby.** 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *International Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders*. **25**:1129-1135.
 - **Roberfroid, M. B.** 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *American Journal of Clinical Nutrition*. **71(suppl)**: 1682-1687.
 - **Rolfe, R. D.** 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*. **130**: 396-402.
 - **Rosenberg, C.** 1999. Probiotics continuing education module [online] www.nhfr.com/tests/probiotics.pdf Accesed: September 16, 2001.
 - **Roy, D., P. Ward, D. Vincent, and F. Mondou.** 2000. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. *Current Microbiology*. **40**:40-46.
 - **Saavedra, J. M.** 2001. Clinical applications of probiotic agents. *American Journal of Clinical Nutrition*. **73(suppl)**: 1147-1151.
 - **SAGAR.** 2002. Producción de carne de porcino en México. <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/propor.pdf>. Accesado: Mayo 21, 2002.
 - **Salminen, S., A. C. Ouwehand, and E. Isolauri.** 1998. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. **8**: 563-572.
 - **Salminen, S., A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W. M de Vos, R. Fondén, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S. Birkeland, T. Mattila.** 1998 (b). Demonstration of safety of probiotics – a review. *International Journal of Food Microbiology*. **44**: 93-106.
 - **Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA

- **Saxelin, M., B. Grenov, U. Svensson, R. Fondén, R. Reniero, and T. Mattila.** 1999. The technology of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. **10**: 387-392.
- **Scheleifer, K. and W. Ludwig.**1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Systematic Applied Microbiology*. **18**: 461-467.
- **Schleifer K., and W. Ludwig.** 1989. Phylogenetic relationships among bacteria. In *The Hierarchy of life*. Elsevier Science publishers. USA.
- **Schmidt, M.K., S. Muslimatun, W. Schultink, C. E. West and J. G. Hautvast.** 2002. Randomised double-blind trial of the effect of vitamin A supplementation of Indonesian pregnant women on morbidity and growth of their infants during the first year of life. *European Journal of Clinical Nutrition*. **56(4)**: 338-346.
- **Shah, H., J. Lee, J. Pestka, and Z. Ustund.** 1999. Viability of bifidobacteria in commercial dairy products during refrigerated storage. *Journal of food protection* **63**:327-331.
- **Shortt, C.** 1999. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science & Technology*. **10**: 411-417.
- **Sivan, Y. S., Y. Alwin, C. Arumughan, A. Sundaresan, A. Jayalekshmy, and K. P. Suja.** 2002. Impact of vitamin A supplementation through different dosages of red palm oil and retinol palmitate on preschool children. *Journal of Tropical Pediatric*. **48**:24-28.
- **St-Onge, M., E. R. Farnworth, and P. Jones.** 2000. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*. **71**: 674-681.
- **Svensson, U.** 1999. Industrial perspectives in probiotics. A critical review. Edited by Tannock, G. University of Otago, Dunedin, New Zealand.
- **Tejada, M. V., J. H. Lee, Z. Ustunol, and J. J. Pestka.** 1999. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *Journal of Dairy Science*. **82**: 649-660.
- **Thornton, G., M. O'Sullivan , G. O'Sullivan, and J. Collins.** 1993. Probiotic properties of Lactobacilli and Bifidobacteria. In Report of the second annual meeting of contractans. National Dairy Products Research Center.
- **Trieu-Cuot, P. y C. Poyart.** 1999. Visita con guía al centro del arsenal bacteriano. *Mundo Científico*. **197**: 46-50.
- **Vandenbergh, P. A.** 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic product and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. **12**: 221-238.
- **Vanderhoof, J. A.** 2001. Probiotics: future directions. *American Journal of Clinical Nutrition*. **73(suppl)**: 1152-1155.
- **Vaughan, E., H. Heilig, E. Zoetendal, R. Satokari, J. Collins, A. Akkermans, and W. De Voss.** 1999. Molecular approaches to study probiotic bacteria. *Trends in Food Science & Technology*. **10**: 400-404.

- **Whelan, K., G. R. Gibson, P. A. Judd, and M. A. Taylor.** 2001. The role of probiotics and prebiotics in the management of diarrhoea associated with enteral tube feeding. *Journal of Human Nutrition Dietetics*. **14**: 423-433.
- **Willems, R. J., and J. Top.** 1994. Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *The Journal of Infectious Disease*. **182**: 816-823.
- **Wollowski, I., G. Rechkemmer, and B. L. Pool.** 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*. **73(suppl)**: 451-455.
- **Yen, J.** 2001. Digestive System. In *Biology of the Domestic Pig*. Edited by W. Pond and H. Mersmann. Cornell University. Press USA.
- **Zhao, T., M. P. Doyle, B. G. Harmon, C. A. Brown, P. O. Eric, and A. H. Parks.** 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**:641-647.
- **Ziemer, C., and G. R. Gibson.** 1998. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*. **8**: 473-479.

ANEXO I. PRINCIPIO DE LAS TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Tinción Gram

La morfología celular y la estructura de la pared celular de las bacterias son un criterio básico de identificación. Toda colonia sospechosa de pertenecer a una especie determinada, debe observarse primero microscópicamente, para decidir si pertenece o no a un género o grupo específico, con base en su morfología. En la tinción Gram, un complejo insoluble de cristal violeta-yodo se forma en el interior de la célula. Este complejo es extraído de las bacterias Gram negativas, pero no de las gram positivas. Las bacterias gram positivas tienen una pared celular constituida por varias capas de peptidoglicano, que se deshidratan por acción del alcohol. Esto provoca que los poros de la pared se cierren evitando la salida del complejo insoluble. En las bacterias gram negativas, el alcohol penetra instantáneamente la capa externa rica en lípidos y la capa delgada de peptidoglicano no evita la entrada del solvente, de manera que el complejo cristal violeta-yodo es desechado fácilmente. De esta manera, la aplicación de un colorante de contraste, nos permite distinguir fácilmente unas formas bacterianas de otras. Generalmente el colorante de contraste utilizado en esta tinción es safranina y las bacterias gram positivas quedan teñidas de color morado, mientras que las gram negativas adquieren una coloración roja (Forbes y col, 1998). En la Figura 31 se pueden observar los pasos que se siguen en la tinción Gram así como los resultados que se obtienen a través de la observación al microscopio.

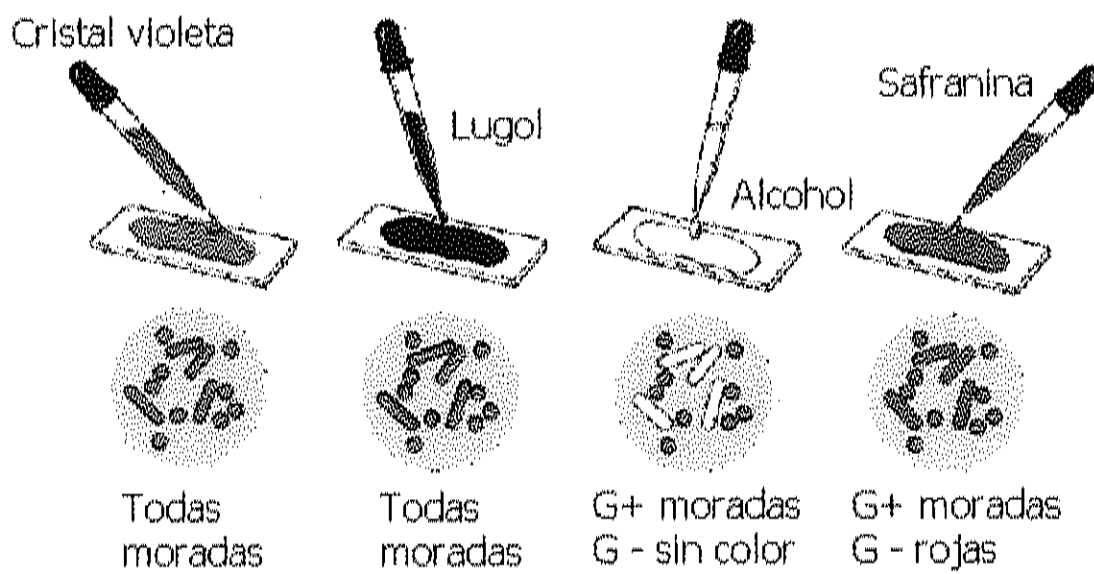
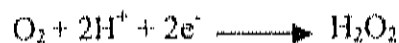


Figura 31. Pasos de la Tinción Gram (parte superior de la figura) y resultados que se observan en el microscopio (parte inferior de la figura)

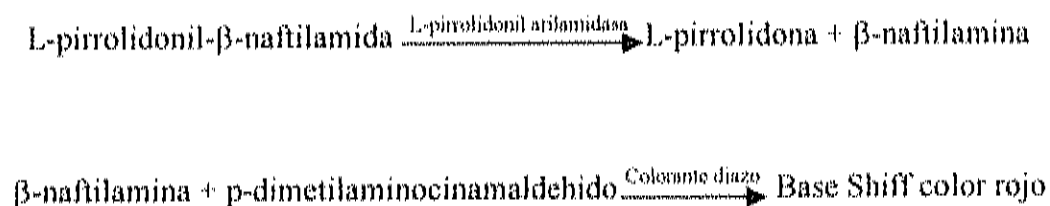
Prueba de Catalasa

Esta prueba generalmente se realiza para diferenciar *Staphylococcus* y *Enterococcus*, ya que el primer género es catalasa positivo. El principio de esta prueba es el siguiente: Cuando las flavoproteínas reducidas se unen con oxígeno y las oxidasas presentes en la cadena respiratoria de todas las bacterias, se forman dos compuestos tóxicos, peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y el radical superóxido (O_2^-). El H_2O_2 es un producto oxidativo final obtenido del rompimiento de los azúcares. Las flavoproteínas reducidas reaccionan directamente con oxígeno gaseoso a través de la reducción en la vía de los electrones para formar H_2O_2 , no por acción directa entre el Hidrógeno y el oxígeno molecular. La enzima catalasa rompe la molécula de peróxido, mientras que la enzima superóxido dismutasa rompe el anión superóxido. Como ya se mencionó, la acumulación de peróxido resulta tóxica para la bacteria y a través de la enzima catalasa la bacteria puede deshacerse de las moléculas de H_2O_2 convirtiéndolo en agua y oxígeno en estado gaseoso (el cual macroscópicamente se observa como burbujas) (MacFaddin, 2000). La reacción que cataliza la enzima catalasa es la siguiente:



Prueba de PYR

Esta prueba sirve para detectar la presencia de la enzima L-pirrolidonil arilamidasa (PYR). Es una prueba presuntiva, altamente específica para *Streptococcus* β -hemolíticos del grupo A y la mayoría de los *Enterococcus* del grupo D. Es una prueba tan específica que reemplaza a la prueba de crecimiento en NaCl al 6,5%. La enzima L-pirrolidonil arilamidasa rompe el sustrato L-pirrolidonil- β -naftilamida para formar L-pirrolidona y β -naftilamina libre. Esta última reacciona con el reactivo de PYR (p-dimetilaminocinamaldehído) para formar una base de Schiff, color rojo (MacFaddin, 2000). La reacción de la enzima es la siguiente:



Hidrólisis de Esculina

La esculina se deriva del árbol de castaña, es un glucósido derivado acetal de un monosacárido simple. Cuando una molécula que no es carbohidrato se enlaza a un azúcar por un enlace acetal, la molécula resultante es llamada glucósido y la parte de esta molécula que no es el azúcar se llama aglicógeno. Las moléculas acetales son fácilmente hidrolizadas por ácidos. Una vez que se da la ruptura del glucósido se obtiene glucosa y el aglicógeno que se llama esculetina.

La molécula de esculetina puede posteriormente reaccionar con iones férricos (generalmente se encuentran en el medio como la sal férrica de citrato), formando un precipitado de color marrón a negro.

Para esta prueba la cepa bacteriana debe crecer en presencia de una concentración particular de bilis y producir esculinasa para hidrolizar la esculina (MacFaddin, 2000). La reacción de hidrólisis de Esculina, es la siguiente:



Supervivencia en BHI salado

Esta prueba permite conocer la habilidad de las bacterias para sobrevivir en un medio halófito. Generalmente son pocas las bacterias que logran sobrevivir, a estas condiciones. La prueba consiste en añadir NaCl a un medio basal BHI hasta alcanzar una concentración de 6.5%. Posteriormente en este medio salino se inocula el microorganismo y se incuba el tubo durante 24 horas. La presencia de turbidez en el medio indica una prueba de supervivencia positiva de la bacteria. La supervivencia en este medio es característica de las bacterias del género *Enterococcus*.

Fermentación de Carbohidratos

Esta prueba se basa en el principio de la producción de metabolitos ácidos a partir de la utilización de carbohidratos para la obtención de energía, que resulta en una disminución del pH del medio de cultivo (caldo o agar) y se manifiesta mediante el cambio de color de un indicador, que varía entre los distintos medios disponibles para efectuar estas pruebas. Los más utilizados son rojo de fenol, rojo neutro, púrpura de bromocresol y azul de bromotimol (Koneman y col., 1994; MacFaddin, 2000).

ANEXO II. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Caldo M17

Composición por litro:

Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Peptona de soya	5.0
Extracto de res	5.0
Extracto de levadura	2.5
Ácido ascórbico	0.5
Sulfato de magnesio	0.25
β -glicerofosfato disódico	19.0

Preparación:

Suspender 37.25 g del polvo en 950 mL de agua purificada. Autoclave a 121° C por 15 minutos. Enfríe a 50° C. Agregue 50 mL de una solución estéril de lactosa al 10% y mezcle bien.

Agar M17

Composición por litro:

Digerido pancreático de caseína	5.0 g
Peptona de soya	5.0
Extracto de res	5.0
Extracto de levadura	2.5

Ácido ascórbico	0.5
Sulfato de magnesio	0.25
β -glicerofosfato disódico	19.0
Agar	11.0

Preparación:

Suspender 48.25 g del polvo en 950 mL de agua purificada. Autoclave a 121° C por 15 minutos. Enfríe a 50° C. Agregue 50 mL de una solución estéril de lactosa al 10% y mezcle bien.

Caldo MRS

Composición por litro:

Peptona	10.0 g
Polvo "Lab-lemco"	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Tween 80	1 mL
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio 3H ₂ O	5.0
Citrato triamónico	2.0
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.2
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0.05

Preparación:

Añadir 52 g a 1 litro de agua destilada. Mezclar bien hasta disolución. Distribuir en recipientes estériles y autoclavar a 121° C, 15 minutos.

Agar MRS

Composición por litro:

Peptona	10.0 g
Extracto de res	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	20.0
Tween 80	1 mL
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio 3H ₂ O	5.0
Citrato triamónico	2.0
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	0.2
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0.05
Agar	15

Preparación:

Suspenda 70 g del polvo en 1 L de agua purificada. Mezele fuertemente. Caliente con agitación constante y hierva por 1 minuto hasta disolver completamente el polvo. autoclavar a 121° C, 15 minutos.

Caldo Mueller Hinton

Composición por litro:

Extracto de res	2.0 g
Digerido ácido de caseína	17.5
Almidón soluble	1.5

Preparación:

Suspenda 21 g del polvo en 1 L de agua purificada y caliente ligeramente hasta disolver. Autoclavar a 121° C, 15 minutos.

Agar Mueller Hinton

Composición por litro:

Extracto de res	2.0 g
Digerido ácido de caseína	17.5
Almidón soluble	1.5
Agar	17.0

Preparación:

Suspenda 38 g del polvo en 1 L de agua purificada y caliente ligeramente hasta disolver. Autoclavar a 121° C, 15 minutos.

Agar Endo

Composición por litro:

Peptona	10.0 g
---------	--------

Lactosa	10.0
Fosfato dipotásico	3.5
Sulfito de sodio	2.5
Agar	12.0
Fucsina fenicada	0.4

Preparación:

Suspenda 41.5 g del polvo en 1 L de agua purificada y caliente ligeramente hasta disolver. Autoclavar a 121° C, 15 minutos.

Agar Hektoen Enteric

Composición por litro:

Peptona de proteasa	12.0 g
Extracto de levadura	3.0
Sales biliares No. 3	9.0
Lactosa	12.0
Sacarosa	12.0
Salicina	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Tiosulfato de sodio	5.0
Citrato de amonio férrico	1.5
Agar	14.0
Azul de bromotimol	0.065

Fucsina ácida 0.1

Preparación:

Suspenda 76 g del polvo en 1 L de agua purificada y caliente ligeramente hasta disolver. Hierva durante un minuto. No autoclavar.

Caldo TPY

Composición por litro:

Triptona 10.0 g

Peptona de soya 5.0

Extracto de levadura 2.5

Tween 80 1.0

K_2HPO_4 2.0

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25

$CaCl_2$ 0.15

Preparación:

Aforar la mezcla anterior a un volumen final de 1 L de agua purificada y caliente ligeramente hasta disolver. Autoclavar a 121° C, 15 minutos.

ANEXO III. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.

Enzima	Secuencia de Reconocimiento 5' → 3'
<i>Sma</i> I	CCC*GGG
<i>Sfi</i> I	GGCCNNNN*NGGCC
<i>Spe</i> I	A*CTAGT
<i>Not</i> I	GC*GGCCGC
<i>Pst</i> I	CTGCA*G
<i>Xba</i> I	T*CTAGA
<i>Eco</i> RI	G*AATTC
<i>Hap</i> II	C*CGG
<i>Sau</i> 3AI	*GATC
<i>Afu</i> I	AG*CT

* Sitio de corte