



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis multilocus de *Enterococcus faecium* aislados del queso de Ocosingo

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

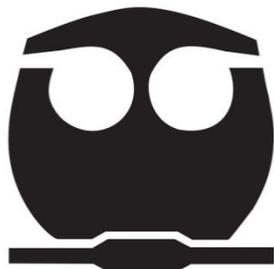
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

JAZMÍN URRIETA VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

MARICARMEN QUIRASCO BARUCH



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri

VOCAL: Profesor: Gloria Díaz Ruiz

SECRETARIO: Profesor: Maricarmen Quirasco Baruch

1er. SUPLENTE: Profesor: Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: Profesor: Aleida Mina Cetina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Se reconoce el apoyo percibido por el proyecto DGAPA PAIIT IN222717: “Estudio y aplicaciones de las proteínas y péptidos obtenidas del metagenoma y bacterias de quesos tradicionales mexicanos”, junto con el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) con la clave 5000-9102.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

SUPERVISOR TÉCNICO:

Myrna Elena Olvera García

SUSTENTANTE:

Jazmín Urrieta Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por cuidarme en cada laboratorio y durante los años que pase en la facultad; por darme fuerza y valor para terminar una etapa más de mi vida.

A **mis padres**, por ser mi alegría, mi motivación, por estar siempre a mi lado ayudándome a superar cada desafío, y alcanzar mis objetivos, por su apoyo, sus consejos, su amor, su paciencia, colaboración, ánimo y esfuerzos para que juntos termináramos esta carrera.

A mi hermano, **Ángel**, por no permitir que me rindiera frente a los problemas, por escuchar, y enseñarme a que el estudio no es lo único importante.

A **Yazmín**, por ser mi amiga de toda la vida, por tu apoyo, enseñanzas y consejos.

A **Alejandro**, por tu amistad, comprensión a lo largo de la licenciatura, por tu paciencia y alegría.

A **Jesús**, por tu amistad, consejos y especial apoyo en el término de la carrera.

A mis **amigos y compañeros de la facultad**. Gracias por las recomendaciones, ánimos, y momentos alegres que hicieron posible sobrellevar tantos años.

Al **Dr. Díaz**, por su tiempo, apoyo, consejos, disposición e interés en este trabajo.

A la **Dra. Maricarmen Quirasco Baruch**, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por la realización de esta Tesis y por enseñarme que la vida no siempre es fácil.

A **Myrna**, por ser mi maestra, por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por estar siempre dispuesta a ayudarme y contestar mis preguntas por más obvias que fueran.

A los profesores, **José Pedraza Chaverri** y **Gloria Díaz Ruíz**, que formaron parte de mi jurado de examen, por su tiempo, recomendaciones y correcciones hechas para mejorar la presentación de este trabajo.

A mis compañeros del **laboratorio 312** por hacer que mi estancia fuera agradable, por ayudarme siempre y brindar al laboratorio su esencia.

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1 Bacterias ácido lácticas	5
1.2 El género <i>Enterococcus</i>	6
1.3 El género <i>Enterococcus</i> en alimentos y sus aplicaciones biotecnológicas	8
1.4 Enfermedades intrahospitalarias.....	9
1.5 Factores de virulencia	10
1.6 Resistencia a antibióticos	12
1.7 Tipificación por secuencias multilocus (MLST)	14
2. Antecedentes.....	17
2.1 Queso	17
2.2 Quesos mexicanos genuinos	17
2.3 Queso bola.....	18
2.4 <i>Enterococcus</i> en el queso Cotija.....	20
3. Justificación	22
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	23
5.1 General.....	23
5.2 Particulares	23
6. Metodología	24
6.1 Caracterización del microorganismo objeto de estudio	25
6.2 Conservación de la cepa	25
6.3 Caracterización fenotípica	25
6.4 Extracción del ADN	26
6.5 Amplificación de 7 genes altamente conservados por PCR punto final.....	27
6.6 Análisis de MLST de <i>Enterococcus faecium</i>	29

6.7 Detección de genes de virulencia por PCR punto final	29
6.8 Prueba de resistencia a antibióticos por inhibición.....	31
7. Resultados	32
7.1 Caracterización de las cepas de <i>E. faecium</i>	32
7.2 Análisis MLST.....	39
7.3 Estructura poblacional de <i>E. faecium</i> (Análisis de las ST obtenidas de las cepas aisladas del queso bola).....	46
7.4 Factores de virulencia	55
7.5 Resistencia a los antibióticos.....	57
8. Reflexión final.....	61
9. Conclusiones.....	63
12. Bibliografía.....	64
13. Anexo.....	71

Índice de figuras y tablas

Figuras

Figura 1. Distribución epidemiológica de los 3197 aislados que conforman la base de datos de <i>E. faecium</i> hasta Octubre del 2017.....	5
Figura 2. Queso bola de Ocosingo, Chiapas.....	19
Figura 3. Diagrama de flujo para la elaboración del queso bola.....	20
Figura 4. Diagrama general del trabajo.....	24
Figura 5. Crecimiento característico de <i>E. faecium</i> en medio KAA.....	33
Figura 6. Tinción de Gram de <i>E. faecium</i>	33
Figura 7. Crecimiento de las cepas <i>E. faecium</i> bajo tratamiento térmico a 60°C por 30 minutos.....	36
Figura 8. Evaluación de la capacidad de hidrolisis de sales biliares.....	38
Figura 9. Gel de agarosa al 1% (p/v) obtenido del ADN extraído para las cepas de <i>E. faecium</i>	38
Figura 10a Gel de agarosa de PCR punto final obtenido para los genes: <i>adk</i> , <i>purK</i> , <i>ddl</i> , <i>gyd</i> y <i>gdh</i> de la cepa 3 de <i>E. faecium</i>	40
Figura 11. Geles de agarosa de PCR punto final obtenidos para los genes: <i>purk</i> , <i>ddl</i> y <i>gdh</i> de las cinco cepas de <i>E. faecium</i>	41
Figura 12. Alineamiento de las secuencia para el gen <i>gdh</i> de la cepa 9 con su referencia (tomada de la base de datos).....	45
Figura 13. Alineamiento entre el alelo <i>gdh</i> perteneciente a la cepa 9, con el alelo existente designado por la base de datos como <i>gdh</i> 12.....	46
Figura 14. Dendograma de la estructura poblacional de <i>E. faecium</i> ; ubicadas las STs del queso bola y del queso Cotija.....	47
Figura 15. Fuentes de los aislamientos reportados por la base de datos que integran las STs que comparten 4 de los 7 alelos con la ST130 (Frecuencias- Porcentaje).....	50
Figura 16. Captura de pantalla de las variantes alélicas presentes para cada gen dentro de los aislados de alimentos de <i>E. faecium</i> el 1/11/2017.....	53
Figura 17. Productos de la reacción de PCR para los factores de virulencia evaluados: <i>cylA</i> , <i>esp</i> y <i>asa1</i>	56
Figura 18. Prueba de resistencia a antibióticos por difusión en disco de las cepas 9, 6 y 3 de <i>E. faecium</i>	60

Tablas

Tabla 1. Lista de cebadores para los genes a evaluar por MLST.	28
Tabla 2. Lista de cebadores para cada factor de patogenicidad.....	30
Tabla 3. Resultados de la tinción de Gram y prueba de catalasa de las cepas de <i>E. faecium</i>	34
Tabla 4. Evaluación del crecimiento de las cepas de <i>E. faecium</i> bajo condiciones extremas de temperatura, pH y osmolaridad.....	35
Tabla 5. Concentración de ADN de las cepas aisladas de <i>E. faecium</i>	39
Tabla 6. Concentración de los amplicones obtenidos, para los siete genes empleados en el MLST, de las cepas de <i>E. faecium</i> aisladas del queso bola.	42
Tabla 7. Alelos descritos por la base de datos del MLST con fecha de última actualización Octubre del 2017.	43
Tabla 8. Perfiles alélicos de las cepas de <i>E. faecium</i> aisladas del queso bola de Ocosingo.	43
Tabla 9. Secuencias tipo asignada a cada una de las cepas de <i>E. faecium</i>	44
Tabla 10. Secuencias tipo relacionadas con el CC5.....	49
Tabla 11. Secuencias tipo obtenidas de las cepas de <i>E. faecium</i> aisladas del queso Cotija y queso bola.	52
Tabla 12. Secuencias tipo y perfil alélico que conforman el CC17.	53
Tabla 13. Frecuencia de los alelos presentes en las secuencias tipo de ambos quesos en relación con los aislados de alimentos que integran la base de datos.	54
Tabla 14. Presencia de los genes (<i>cylA</i> , <i>esp</i> y <i>asa1</i>) que codifican para factores de virulencia en las cepas de <i>E. faecium</i> del queso Cotija y el queso bola.....	57
Tabla 15. Antibióticos evaluados en las cepas de <i>E. faecium</i> aisladas del queso bola y queso Cotija.....	59

Resumen

Las bacterias del género *Enterococcus* son microorganismos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y tienen como hábitat predominante el tracto gastrointestinal de seres humanos, animales e insectos; una vez liberados al medio ambiente a través de sus heces, son capaces de colonizar diversos nichos debido a su extraordinaria aptitud para resistir o crecer en ambientes hostiles extraentéricos, como condiciones extremas de pH, temperatura y osmolaridad. Además, se suelen encontrar en agua, en el suelo, en las plantas y vegetales, así como en alimentos de origen animal específicamente en alimentos fermentados, tales como embutidos y quesos (Giraffa, 2003).

Dentro del grupo de bacterias ácido lácticas (BAL), el género *Enterococcus* es el más controvertido, y contrario a las BAL más estudiadas no son reconocidos generalmente como seguros (GRAS) (Eaton y Gasson, 2001). Debido a su carácter dual, se pueden considerar de uso positivo en la elaboración de quesos; y por otra parte, patógenos para los seres humanos debido a su reciente surgimiento como causante de infecciones nosocomiales.

El objetivo del presente trabajo fue llevar a cabo una caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del queso bola proveniente de Ocosingo, municipio de Chiapas, México, por medio de un método de tipificación molecular, a fin de diferenciar cepas dentro de una misma especie debido al carácter dual que presentan. Se evaluaron cinco cepas de *E. faecium*, las cuales demostraron poseer las características de cultivo propias de la especie: ser poco tolerantes a pH ácidos, tolerantes a temperaturas de pasteurización (60°C por 30 minutos), capaces de crecer en presencia de sales biliares con baja capacidad de hidrólisis.

Por medio del análisis de tipificación por secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés), se determinó la presencia de nuevos alelos: para los genes *gyd* (53) y *pstS* (123 y 124) los cuales generaron tres nuevas secuencias tipo (STs): ST1293, ST1294 y ST1295. Asimismo, se obtuvo una ST previamente descrita en

la base de datos, la ST130; todas ellas no pertenecientes al complejo clonal de alto riesgo 17 (CC17). Del mismo modo, se evaluó su capacidad de resistencia a antibióticos, algunas cepas presentaron resistencia a eritromicina, penicilina, tetraciclina y vancomicina; antibióticos a los cuales se les considera como de resistencia adquirida. En cuanto a la presencia de genes que codifican para factores de virulencia evaluados: *esp*, *asa1* y *cyfA* fueron negativos.

En conclusión, se encontró relación alélica entre las STs del queso bola con las presentes en la base de datos asociadas a alimentos, así como con las del queso Cotija evaluado por Guzmán en 2015. Los perfiles alélicos de las cepas de origen alimentario por su tipificación genotípica, las hacen diferentes al CC17, atribuido a cepas causantes de infecciones en pacientes hospitalizados.

1. Introducción

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL); éste incluye cerca de 50 especies, entre las que *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus durans* son las especies más frecuentemente encontradas en alimentos y hábitats relacionados (Giraffa, 2003; Bonacina *et al.*, 2016). Son microorganismos que forman parte importante de la microbiota ambiental, alimentaria y clínica. De acuerdo con la cepa, se consideran como iniciadores o adjuntos, probióticos, causantes de deterioro u organismos patógenos (Bhardwaj *et al.*, 2008). Los enterococos desempeñan un importante papel benéfico en el desarrollo de características organolépticas propias de diversos productos fermentados tradicionales europeos, como quesos artesanales y productos cárnicos. Además, son productores de un grupo de péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente (bacteriocinas), conocidas como enterocinas, las cuales pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas lo que les otorga un efecto como agentes bioconservadores de alimentos. Este género posee capacidades promotoras de la salud, al estimular el sistema inmunitario, ayudar a la digestión y mantener la microbiota intestinal balanceada. A ello se debe su uso como probiótico (Franz *et al.*, 2007; Bonacina *et al.*, 2016).

Sin embargo, durante las dos últimas décadas, los enterococos que anteriormente eran considerados como organismos de impacto clínico mínimo, han surgido como importantes patógenos nosocomiales (Giraffa, 2002). El creciente interés en la epidemiología de estas bacterias se debe a la presencia y expresión de factores de virulencia, así como de la resistencia a los antibióticos de algunas cepas capaces de colonizar y / o causar enfermedades en pacientes hospitalizados en todo el mundo (Gomes *et al.*, 2008). Los enterococos no sólo son intrínsecamente resistentes a varios antibióticos, sino que también se caracterizan por su capacidad única y potente de transferir material genético (Giraffa, 2002). El surgimiento de cepas de enterococos resistentes a glicopéptidos y otros antibióticos, así como el hallazgo de características de virulencia tanto en los

aislados clínicos como en cepas aisladas de alimentos, hacen cuestionable la presencia de este género en los alimentos (Foulquié-Moreno et al., 2006).

Existe una base de datos internacional de linajes genéticos de *E. faecium*, la cual es un poderoso recurso para el estudio epidemiológico a nivel mundial, para el reconocimiento y seguimiento de la propagación interhospitalaria de cepas virulentas, clonas multirresistentes así como de las epidemias. La técnica empleada para conformar la base de datos es la tipificación por secuencias multilocus (MLST por sus siglas en inglés), la cual se basa en la identificación de alelos de secuencias de ADN pertenecientes a fragmentos internos de genes altamente conservados (Homan et al., 2002). En el caso de *E. faecium*, la mayoría de los aislados recuperados del medio hospitalario se agruparon dentro de un linaje designado como complejo clonal 17 (CC17), el cual está conformado por tres linajes procedentes de secuencias tipo (ST) 17, 18, y 78; éstos han adquirido progresivamente diferentes resistencias a los antibióticos como: ampicilina y vancomicina, además de factores de virulencia (Homan et al., 2002; Willems et al., 2012).

Cabe mencionar, que más de la mitad de los aislados que conforman la base de datos del MLST de *E. faecium* se han identificado a partir de muestras con un origen epidemiológico no clínico, como: de seres humanos sanos, cerdos, aves y animales domésticos (**Figura 1**) (Willems et al., 2009; Freitas et al., 2010).

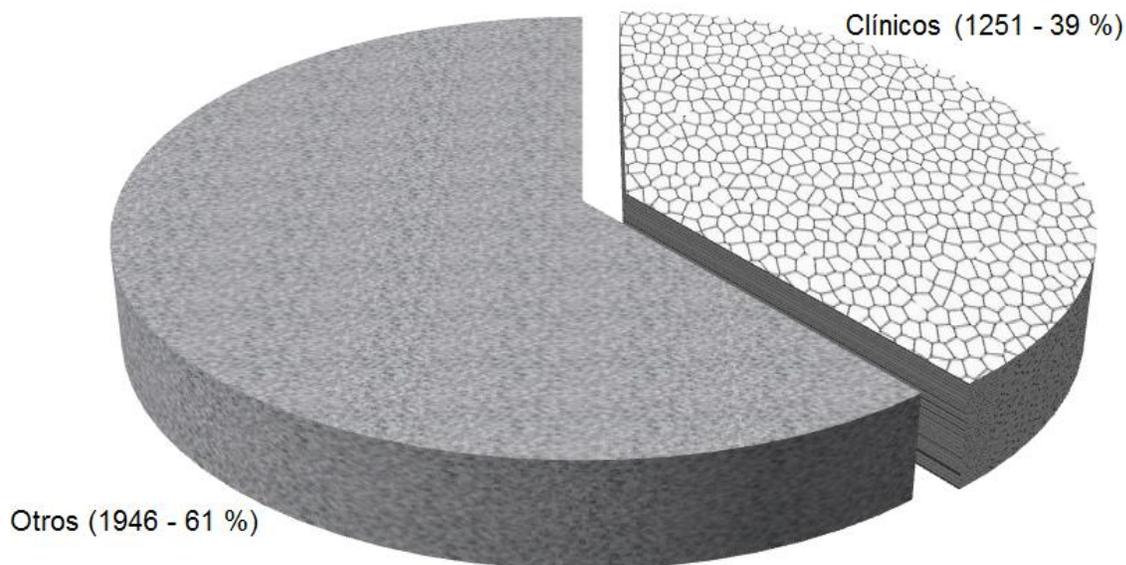


Figura 1. Distribución epidemiológica de los 3197 aislados que conforman la base de datos de *E. faecium* hasta Octubre del 2017.

Fuente: https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_efaecium_isolates.

1.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacilos y cocos Gram-positivos, principalmente quimioorganótrofos, no formadoras de endoesporas, catalasa negativas y productoras de ácido láctico como único o principal producto de fermentación. Los miembros de este grupo carecen de transportadores de electrones, por lo que no llevan a cabo fosforilación oxidativa, y por lo tanto obtienen su energía exclusivamente mediante fosforilación a nivel de sustrato. Se denominan anaerobias aerotolerantes debido a que todas crecen anaeróbicamente y la mayoría no son sensibles al O₂ por lo que pueden crecer en su presencia. Los diversos géneros de BAL se definen con base en su morfología celular, filogenia y tipo de metabolismo fermentativo (Madigan *et al.*, 2009). El grupo está compuesto por: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Salmínen *et al.*, 1998).

Una importante diferencia entre los subgrupos de BAL es el patrón de productos que genera como consecuencia de la fermentación de azúcares. Uno de estos

subgrupos, el denominado homofermentativo, produce ácido láctico como único producto de fermentación. El otro, denominado heterofermentativo, produce otros compuestos, fundamentalmente etanol y CO₂, así como lactato (Madigan *et al.*, 2009).

1.2 El género *Enterococcus*

En 1930, Rebecca Lancefield ubicó a los enterococos como *Streptococcus* del grupo D, y en 1984 Schleifer y Kilpper-Bälz demostraron mediante estudios de hibridación DNA-DNA, DNA-RNA y secuenciación del rRNA16S, que *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* manifestaban características diferentes a otros miembros del género *Streptococcus*, y que por lo tanto tendrían que formar parte de otro género, al que finalmente denominaron *Enterococcus* (Garza-Velasco, 2015).

El género *Enterococcus* es el grupo más controvertido dentro de las BAL. Son bacterias esféricas Gram-positivas, de entre 0.6 a 2.0 µm, con una temperatura óptima de crecimiento de 35°C; son cocos catalasa-negativa, no formadoras de esporas, oxidasa negativos, anaerobios facultativos, homofermentativos que se reproducen individualmente, en parejas o en cadenas. Los enterococos se consideran comensales del tracto gastrointestinal y se les aísla a partir de ambientes adversos, debido a su diseminación a través del excremento de humanos y animales. Algunos factores intrínsecos permiten su supervivencia durante períodos prolongados, *E. faecalis* y *E. faecium* son capaces de crecer en medios que contienen hasta un 6.5% de NaCl, a temperaturas entre 10 y 45°C y soportar su exposición a 60°C hasta por 30 minutos. Adicionalmente, se desarrollan en medios con sales biliares al 4%, en amplios intervalos de pH, entre 4-9, y se adaptan con relativa facilidad a niveles comúnmente letales de detergentes, lo que les permite desarrollarse en sitios insólitos, inclusive los nosocomios (Garza-Velasco, 2015). La mayoría de las especies de enterococos puede hidrolizar la esculina en presencia de sales biliares al 40% (Franz *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). La pared celular de la mayoría de las especies contiene un ácido glicerol teicoico, conocido como antígeno D. Sin

embargo, no todas las especies de *Enterococcus* poseen el antígeno del grupo D (Garza-Velasco, 2015; Franz *et al.*, 1999).

Dentro de las diferentes especies de *Enterococos* presentes en los productos lácteos, *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies de mayor importancia (Giraffa, 2002; Giraffa, 2003). Éstas pueden establecerse y sobrevivir en ambientes de procesado de alimentos durante largos periodos.

El recuento de enterococos tiene pocas aplicaciones a la hora de establecer criterios microbiológicos para garantizar la seguridad sanitaria de los alimentos, pero puede aplicar en casos específicos como indicador de eficiencia germicida, aplicable para conocer la calidad higiénica de productos tratados de manera moderada con calor, congelación y salazón; indicador de contaminación fecal. En playas, es de 200 enterococos en 100 mililitros de agua, criterios de calidad establecidos como rangos de protección a la población usuaria; indicador de manejo higiénico para identificar prácticas deficientes de fabricación. La presencia de gran número de enterococos en los alimentos, excepto en los fermentados por cepas específicas de estos microorganismos, implica prácticas sanitarias inadecuadas o bien exposición del producto a condiciones que pudieran permitir la multiplicación masiva de bacterias no deseables (Doyle *et al.*, 2001; Hernández, 2016).

En general, actualmente se considera que no existe un criterio fenotípico definido para diferenciar de manera confiable el género *Enterococcus* y el de otros microorganismos Gram positivos. Por razones prácticas, la identificación presuntiva del género *Enterococcus* suele fundamentarse en la suma de los siguientes resultados (Garza-Velasco, 2015):

- a) Cocos Gram positivos.
- b) Catalasa negativa.
- c) Capacidad para desarrollarse en un medio con un 6.5% de NaCl.
- d) Capacidad de crecimiento en un medio con azida de sodio al 0.04%.
- e) Capacidad de hidrólisis de esculina.

1.3 El género *Enterococcus* en alimentos y sus aplicaciones biotecnológicas

Los *Enterococos* poseen aplicaciones importantes en la industria láctea, están presentes en una gran variedad de quesos como cultivos no iniciadores, especialmente en quesos artesanales producidos en el sur de Europa y elaborados con leche bronca o pasteurizada. Participan en el desarrollo de características sensoriales durante su maduración, así mismo se han usado como cultivos adjuntos.

La influencia positiva de los enterococos en los quesos se debe a aspectos bioquímicos específicos como la actividad lipolítica, proteolítica y utilización del citrato, los cuales dan origen a la generación de compuestos aromáticos volátiles. Además, en algunos enterococos de origen lácteo se ha descrito la producción de bacteriocinas (enterocinas) promotoras de la inhibición de patógenos y control del deterioro de alimentos, como son: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp. y *Bacillus* spp. (Giraffa, 2003).

La presencia de enterococos en productos lácteos se ha considerado por largo tiempo como el resultado de las condiciones antihigiénicas durante su procesamiento; sin embargo, en general no están relacionadas de manera directa con la contaminación fecal (Giraffa, 2003). Su presencia se puede explicar, debido a su amplia capacidad de crecimiento y tolerancia en condiciones adversas, su incorporación al alimento a través del agua, equipos y tanques de almacenamiento (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

Algunas cepas de *E. faecium* con aplicaciones de uso probiótico, incluyen a *E. faecium* SF 68, la cual parece ser clínicamente eficaz en el diagnóstico y la prevención de diarrea asociada al uso de antibióticos y en el tratamiento de la diarrea en niños, acortando la duración del cuadro agudo en adultos. Por otro lado, la cepa *E. faecium* CRL 183 en combinación con *Lb. helveticus* subsp. Jugurti se aplicó en el desarrollo de un nuevo producto fermentado a base de soya con algunas propiedades potenciales, una de ellas la disminución del 43% en la

síntesis del colesterol en estudios in vitro. Además, estudios de la cepa probiótica de *E. faecium* PR88 en ensayos clínicos humanos, condujo al alivio de los síntomas del síndrome del intestino irritable. Esta misma cepa fue usada en la elaboración de queso Cheddar como cultivo adjunto, y al ser comparada con el control, se observó una mayor proteólisis y niveles de compuestos volátiles durante todo el proceso de maduración a 8°C, así como una viabilidad del queso por 9-15 meses (Folquie-Moreno *et al.*, 2006; Giraffa, 2003).

Sin embargo, la selección de cepas de enterococos para formar parte en la elaboración de alimentos es una tarea difícil. Si bien algunas cepas están bien caracterizadas, la aparición y el aumento de enterococos asociados a enfermedades humanas y sus múltiples resistencias a los antibióticos plantean gran preocupación con respecto a su uso como probióticos (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

1.4 Enfermedades intrahospitalarias

Los datos epidemiológicos revelan que la gran mayoría de las infecciones hospitalarias asociadas a enterococos fueron causadas por *E. faecalis*, pero desde comienzos de los años noventa la presencia de *E. faecium* en infecciones nosocomiales alcanzó casi su paridad. Dichas cepas muestran con mayor frecuencia multirresistencia y resistencia adquirida a antibióticos que incluyen la ampicilina y vancomicina (Willems *et al.*, 2012). Han surgido como importantes patógenos de adquisición intrahospitalaria, especialmente en pacientes inmunocomprometidos y en unidades de cuidados intensivos. En numerosos estudios epidemiológicos se ha demostrado que los enterococos pueden transmitirse de persona a persona, frecuentemente a través de las manos de trabajadores sanos del hospital o del instrumental clínico. Se les ha asociado con infecciones nosocomiales, tales como bacteremia, endocarditis, infecciones intraabdominales, de vías urinarias y del sistema nervioso central. (Giraffa, 2002; Cercenado, 2011; Garza-Velasco, 2015; Kim *et al.*, 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en colaboración con la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad de Tübingen, Alemania, clasifica a *E. faecium* como un microorganismo de prioridad elevada, dentro del listado elaborado de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos, esto es debido a su resistencia creciente a los antimicrobianos; clasificación basada en una técnica de análisis de decisiones de múltiples criterios. Los criterios tomados para esta asignación fueron: el grado de letalidad provocado por la infección; el requerimiento o no de hospitalización larga, debida al tratamiento; la frecuencia con que se presenta resistencia a los antibióticos existentes; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones provocadas pueden o no prevenirse (por ejemplo, mediante una buena higiene y vacunación); cuántas opciones terapéuticas quedan; y si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan (OMS_(a)).

Cabe mencionar, que para que las cepas de enterococos sean consideradas seguras y de uso probiótico, deben presentar ausencia de factores de virulencia y no ser capaces de adquirirlos (Bhardwaj *et al.*, 2008).

1.5 Factores de virulencia

Un factor de virulencia es una molécula que le permite a un microorganismo patógeno causar una enfermedad al hospedero a través de la toxicidad e invasividad (Madigan *et al.*, 2009). Los factores de virulencia están presentes en aislados clínicos; sin embargo, estudios realizados en aislados de alimentos revelan que algunos los albergan (Bhardwaj *et al.*, 2008).

Dentro de los factores de virulencia descritos para los enterococos se encuentran: la sustancia de agregación (SA), gelatinasa, citolisina / hemolisina, proteína superficial enterocócica (Esp) y recientemente la hialuronidasa las primeras cuatro son encontradas principalmente en *E. faecalis*, mientras que las dos últimas son específicas de *E. faecium* (Vankerckhoven *et al.*, 2004). Los rasgos de virulencia en los enterococos incluyen la adherencia al tejido del huésped, invasión y

formación de abscesos, resistencia y modulación de los mecanismos de defensa del huésped y producción de enfermedad (Giraffa, 2002). La presencia de enterococos en una infección está asociada a la terapia antimicrobiana; ya que ésta favorece la selección de clones resistentes (Garza-Velasco, 2015).

La SA codificada por el gen *asa1*, se aloja en el plásmido (pAD1), es una proteína que permite la transferencia de plásmidos, facilita la adhesión y supervivencia en las células humanas (Vankerckhoven *et al.*, 2004; Garza-Velasco, 2015).

Su participación en la conjugación de plásmidos inicia cuando las bacterias que fungen como receptoras potenciales liberan al medio ciertos péptidos, denominados feromonas, que promueven la movilización de diversos plásmidos, desde los enterococos donadores hacia ellas. Las células enterocócicas que ya poseen un determinado plásmido, detienen la elaboración de la feromona específica homóloga, pero continúan secretando otras que inducen su apareamiento con las clones que cuentan con moléculas plasmídicas de las que aquéllas carecen. Entre los plásmidos inducibles por las feromonas, destaca el pAD1 uno de los principales generadores de SA y el pCF10 que confiere, además, resistencia a tetraciclina (Garza-Velasco, 2015).

La citolisina es la única enterocina de tipo lantibiótico; es una bacteriocina de dos péptidos y ambas subunidades estructurales contienen residuos de lantionina. La citolisina actúa frente a células eucariontes (eritrocitos) y bacterias Gram positivas. Los genes que la codifican están albergados en plásmidos e integrados al cromosoma bacteriano. Constituidos por dos componentes: *cyl* (L) y el activador (A). El operón de citolisina lo integran cinco genes: *cyl* (L1), *cyl* (L2), *cyl* (M) y *cyl* (B) necesarios para la expresión del componente (L); por otro lado, *cyl* A es necesario para la expresión del componente (A). Este último desempeña funciones patogénicas relevantes, provocando la ruptura de las membranas pertenecientes a glóbulos rojos y otras células de mamíferos, e inclusive de otras bacterias, fungiendo como bacteriocinas (Vankerckhoven *et al.*, 2004; Garza-Velasco, 2015). El fenotipo hemolítico se asocia más frecuentemente con

enterococos de aislados clínicos que ambientales, considerando a la hemolisina como contribuyente de la virulencia bacteriana (Franz *et al.*, 2007).

La proteína de superficie enterocócica (Esp), es una proteína asociada a la pared celular; factor de virulencia presente tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium*. Favorece la adhesión a células epiteliales, la formación de biopelículas y la evasión de la respuesta inmune. Es codificada por un gen localizado en una isla de patogenicidad, la cual puede albergar múltiples factores de virulencia (Torres *et al.*, 2009; Quiñones *et al.*, 2009).

Se ha observado relación entre la presencia del gen *esp* y una variación en el gen de mantenimiento *purK* (subunidad deshidrogenasa); variación empleada por el MLST para tipificar *E. faecium* vancomicina resistentes (Willems *et al.*, 2001). Este alelo puede ser usado como marcador epidemiológico en el control de infecciones (Camargo *et al.*; 2006).

En las diferentes fuentes de aislamiento: muestras clínicas, animales de granja y alimentos, los enterococos de origen clínico revelaron mayor presencia en cuanto a factores de virulencia que los de alimentos, de acuerdo con los estudios realizados por Sharifi *et al.* (2012).

1.6 Resistencia a antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos que matan o inhiben el crecimiento de otros microorganismos. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan, ya sea debido a una mutación en la secuencia de bases del genoma o mediante mecanismos de intercambio de material genético a través de plásmidos y transposones. Esta resistencia dificulta el tratamiento de las infecciones causadas, incrementando los costos médicos, la estancia hospitalaria y el aumento de la mortalidad (Madigan *et al.*, 2009; OMS^(b)).

El aumento de las infecciones enterocócicas adquiridas en los hospitales se puede deber al incremento del uso de antibióticos de amplio espectro y al uso indiscriminado de antibióticos como promotores del crecimiento en animales

utilizados para la alimentación. Éstos parecen haber creado grandes depósitos de resistencia a antibióticos transferible a diversos ecosistemas fuera de los hospitales (Giraffa, 2002).

Los *Enterococcus* presentan dos tipos de resistencia a los antibióticos tanto la resistencia natural (intrínseca) como la resistencia adquirida (extrínseca). Los antibióticos a los que poseen resistencia intrínseca son: cefalosporinas, β -lactámicos, sulfonamidas, aminoglucósidos y bajos niveles de clindamicina; mientras que los ejemplos de resistencia adquirida incluyen: resistencia al cloranfenicol, eritromicina, altos niveles de β -lactamamicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas y glicopéptidos tales como la vancomicina (Bhardwaj *et al.*, 2008).

Dentro de estas resistencias adquiridas a antibióticos, los enterococos resistentes a vancomicina son posiblemente la preocupación más grande que ha surgido dentro en las infecciones clínicas, como causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo, con incidencia variable según el área geográfica y las instituciones hospitalarias; ya que ésta es considerada como uno de los antibióticos de último recurso cuando la mayoría de los otros antibióticos fallan en el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias Gram positivas; y que por motivos de estrategia sólo debía recurrirse para combatir casos especiales de resistencia (Giraffa 2002; Khan *et al.*, 2005).

Actualmente, en el género *Enterococcus*, se conocen cinco genes que regulan la resistencia adquirida a vancomicina: *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG*. Los enterococos con genotipo *vanA* son generalmente resistentes a vancomicina y teicoplanina mientras que los genotipos *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG* suelen asociarse a grados moderados de resistencia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina, siendo los fenotipos VanA y Van B los de mayor importancia clínica (Giraffa, 2002; Bhardwaj *et al.*, 2008; Sharifi *et al.*, 2012).

No obstante, la presencia de resistencia a los antibióticos no es un suceso exclusivo de los ambientes clínicos, sino que también son fácilmente detectables en cepas de enterococos aislados de alimentos. Estudios epidemiológicos han

permitido establecer una fuerte relación entre el uso de antibióticos en las crías de animales y el brote de cepas resistentes en los alimentos derivado de los mismos, y posteriormente en el tracto gastrointestinal de humanos (Castro et al., 2004).

Por lo tanto, el control de la presencia de enterococos en los alimentos es importante, constituyendo un reto especial debido a su naturaleza, amplia distribución y estabilidad en el entorno extra entérico (Franz *et al.*, 1999).

1.7 Tipificación por secuencias multilocus (MLST)

El conocimiento alcanzado respecto a la epidemiología de los patógenos nosocomiales, revela que son unos pocos grupos clonales los responsables de la mayoría de los brotes en varios países. Por lo que, el control de las infecciones nosocomiales han dejado de ser una cuestión a resolver por un programa local, surgiendo la necesidad de tener en cuenta la colaboración entre laboratorios; se creó así el desarrollo de sistemas informáticos que permiten el monitoreo de patógenos con alta capacidad de diseminación y multirresistencia. Al ser de gran importancia, se requiere de una correcta identificación bacteriana a nivel de especie (López-Cerero *et al.*, 2013).

Los métodos más útiles incluyen el análisis del ADN cromosomal (con enzimas de restricción) y la técnica de PFGE (Electroforesis en gel de campo pulsado), así como la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RAPD-PCR (DNA polimórfico modificado al azar). Por su efectividad, las dos últimas técnicas se consideran las más adecuadas para el análisis de los brotes asociados a *Enterococcus* vancomicina resistentes; sin embargo, dentro de sus limitaciones están: el costo elevado del equipo, lo laborioso del estudio y el tiempo necesario de análisis, además de que no son adecuados para determinar el grado de relación epidemiológica.

El MLST, representa la técnica más adecuada para el estudio de especies a nivel cepa y el análisis de evolución genética. Esta técnica analiza la variabilidad alélica en secuencias conservadas, con la ventaja de asociar cada alelo a un código

numérico que es perfectamente exportable y almacenable. Además, se pueden generar algoritmos matemáticos (eBURST) que establezcan las relaciones entre las clonas. Actualmente se encuentran disponibles en línea 27 perfiles MLST de especies de bacterias, como: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*, por mencionar algunas (López-Cerero *et al.*, 2013; Garza-Velasco, 2015).

El MLST es un método de caracterización de distintas cepas dentro de una misma especie; implica la secuenciación de varios genes de mantenimiento básico celular de un organismo determinado y compara sus secuencias con los genes equivalentes de otra cepa del mismo organismo. Los genes de mantenimiento básico codifican funciones esenciales de las células y se localizan frecuentemente en el cromosoma y no en los plásmidos. De cada gen se amplifican por PCR entre 500 a 600 pb aproximadamente, a las que posteriormente se les realizará la secuenciación. Las secuencias de nucleótidos obtenidas se comparan y observan las diferencias, cada diferencia, o variante de secuencia, es considerada como un nuevo alelo del gen y se le asigna un número. Por tanto, a cada cepa se le asigna una serie de números que constituyen su perfil alélico; en otras palabras, su tipificación de secuencia *multilocus*. En la técnica del MLST dos cepas con secuencias idénticas en un determinado gen tendrán asignado el mismo número alélico para dicho gen, y dos cepas con secuencias idénticas en todos sus genes tendrán el mismo perfil alélico y, por tanto, se considerarán idénticas según este método. El grado de relación entre los distintos perfiles alélicos se representa en forma de un dendograma, gráfico representativo de este tipo de análisis (Madigan *et al.*, 2009).

En microbiología clínica, la técnica del MLST ha permitido diferenciar entre cepas de un mismo patógeno. Esto es algo muy importante porque ciertas cepas de una misma especie pueden ser inofensivas, mientras que otras pueden ser patógenas e incluso mortales. El MLST también es muy importante para estudios epidemiológicos, para rastrear una cepa virulenta de un determinado patógeno conforme se extiende por una población, y para estudios medio ambientales; definir la distribución geográfica de las distintas cepas. Sin embargo, el MLST no

es útil para comparar organismos más allá del nivel de especie; su nivel de resolución es excesivo para proporcionar información significativa respecto a grupos de mayor nivel, es decir, género o familia. (Madigan *et al.*, 2009).

Los análisis mediante MLST también han revelado algunos patrones interesantes en bacterias, donde se muestran muy pocas variaciones en el análisis y en otros organismos una gran variabilidad, lo cual implica que han experimentado un flujo mayor de transferencia horizontal de genes, o bien que sus genes acumulan mutaciones a un ritmo mayor (Madigan *et al.*, 2009).

El estudio de la estructura poblacional de *E. faecium* ha revelado la asociación del complejo clonal 17 (CC17), con distintos huéspedes y nichos ecológicos; siendo la mayoría provenientes de aislados clínicos resistentes a antibióticos. Se propuso que estos linajes genéticos se originaron por la presión selectiva de los hospitales y se han ido seleccionando de otras poblaciones (Torres *et al.*, 2009; Burgos *et al.*, 20014).

2. Antecedentes

2.1 Queso

El queso es un alimento universal que se produce a partir de leche de diversas especies de mamíferos. Es una forma de conservación de los dos componentes insolubles de la leche: la caseína y la materia grasa (Alais, 1985). El queso es el resultado de la concentración selectiva de la leche por coagulación de las caseínas. Estas atrapan a la mayor parte de la grasa y una pequeña porción del azúcar de la leche (lactosa), el agua y de las proteínas del suero (albúminas y globulinas); la mayor parte del agua y de las sustancias solubles en la misma se eliminan con el suero durante la manipulación que se efectúa con la cuajada, en una proporción distinta en cada variedad de quesos (Dumais, 1991).

El agua que queda retenida en el queso desempeña un papel muy importante: es esencial para el desarrollo de microorganismos y determina la velocidad de las fermentaciones y de la maduración, el tiempo de conservación, la textura del queso y el rendimiento del proceso de elaboración. La materia grasa influye en la textura, el sabor, el rendimiento y en el color del queso. La lactosa es el sustrato para la formación de ácido láctico y, por lo tanto, interviene en la coagulación de la leche, el desuerado y la textura de la cuajada, y también en el crecimiento de los microorganismos. La caseína coagulada constituye la base de la pasta quesera y en su degradación se originan diversos compuestos aromáticos. Las proteínas del suero que quedan incluidas en la cuajada contribuyen al valor nutritivo del queso y tienen mucha importancia en el proceso de maduración. Los minerales participan en la coagulación de la leche e influyen sobre el desuerado y la textura del queso (Dumais, 1991).

2.2 Quesos mexicanos genuinos

En la actualidad, se producen en México cerca de cuarenta variedades de quesos genuinos, de los cuales el queso Cotija y el queso bola de Ocosingo forman parte.

Algunos gozan de una amplia difusión y altos volúmenes de producción, otros solamente se conocen y consumen en ciertas regiones.

Se denominan quesos mexicanos genuinos, a aquellos que derivan de México y poseen una fuerte raíz histórica nacional, ya que se elaboran desde los tiempos de la colonia, o datan de décadas más recientes; fabricados dentro del territorio nacional por mexicanos y elaborados a partir de leche de vaca o de cabra, fundamentalmente cruda, con el empleo mínimo de aditivos: cuajo, sal y eventualmente CaCl_2 . Son el resultado de su propia historia, cultura y saber-hacer.

El queso Cotija de la Sierra de Jalmich (Jalisco y Michoacán), es el primer queso mexicano genuino que logró una marca colectiva, la cual se denomina queso Cotija “Región de Origen”. Por otro lado, los quesos que han obtenido una marca colectiva territorial son: el queso bola de Ocosingo (Chiapas), el queso poro de Tabasco y, recientemente (2013), el queso crema de Chiapas.

Muchos quesos genuinos, en la actualidad, no tienen patrones muy claros de elaboración, no están estandarizados, ni pueden usarse como referencia o prototipo de los quesos de su especie para producirse de manera independiente. Aún más, en la mayoría de los casos, ni siquiera existe una norma técnica oficial que se aplique en el ámbito nacional. Así, la variabilidad en los productos y en los procesos de elaboración es la regla.

Es claro entonces que la mayor parte de los quesos mexicanos genuinos tiene su origen en la producción artesanal; es decir, en un proceso de manufactura que emplea relativamente mucha mano de obra y escasa maquinaria, cuyos procesos no son estandarizados, los cuales manejan bajos volúmenes de producción y cuya tecnología normalmente es obsoleta, aunque funcional (Cervantes, *et al.*, 2013).

2.3 Queso bola

El queso bola es un queso atípico dentro de los quesos mexicanos; y se elabora en el municipio de Ocosingo en el estado de Chiapas. Es una bola dura, con diámetro de entre 8 y 12 cm, y un peso entre 400 g y 1 Kg aproximadamente; se

elabora con leche cruda de vaca de doble propósito, cruza de cebú y pardo suiza. Es considerado como un queso doble, integrado por una pasta resultado del cuajado mixto (por cuajo y acidez natural) madurado por 21 días; y un forro creado a partir de dos capas de pasta hilada caliente de leche descremada, que al enfriarse forma una corteza de caseína muy consistente, a manera de una dura cáscara, que encierra la pasta del queso propiamente dicho (**Figuras 2 y 3**) (Cervantes *et al.*, 2013).



Figura 2. Queso bola de Ocosingo, Chiapas.
(Villegas de Gante *et al.*, 2014).

Este queso es fabricado solamente por unos cuantos queseros artesanales, cuyo conocimiento técnico ha pasado por tradición oral y práctica de generación en generación (Villegas de Gante *et al.*, 2014).

En el 2016, Grajales y Ramos en proceso de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas aislaron cepas de *Enterococcus faecium* del queso bola de Ocosingo, las cuales se identificaron mediante la secuenciación del gen ADNr 16S.

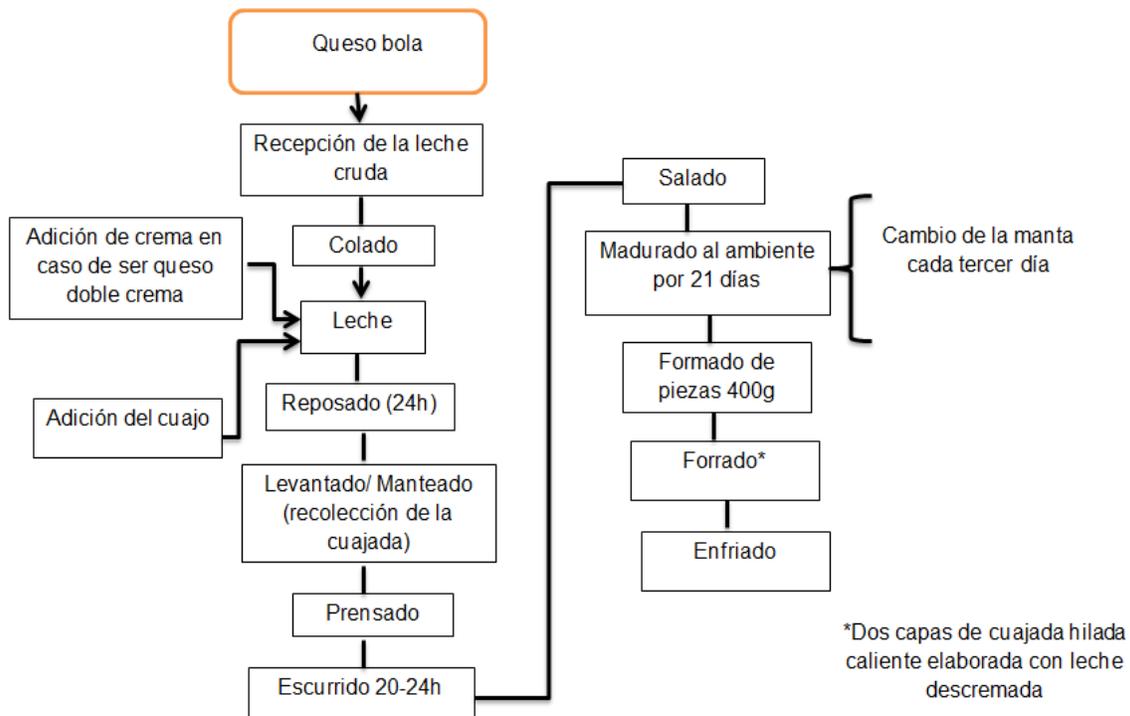


Figura 3. Diagrama de flujo para la elaboración del queso bola.
(Cervantes *et al.*, 2013).

2.4 *Enterococcus* en el queso Cotija

Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo se enfocaron en el análisis del queso Cotija, uno de los principales quesos mexicanos genuinos. Producto elaborado a partir de leche bronca y entera, no adicionado con cultivos iniciadores, sin la aplicación de tratamiento térmico y de mínimo 3 meses de maduración (Cervantes *et al.*, 2013).

Dentro de estos estudios, Guzmán en el 2015 realizó una caracterización de las cepas de *E. faecium* provenientes de queso Cotija “Región de Origen”, utilizando técnicas de tipificación MLST, con el fin de diferenciarlas de las STs que integran el complejo clonal asociado a hospitales, y determinar la existencia de un complejo clonal asociado a alimentos.

Los resultados obtenidos, además del enriquecimiento de la base de datos con aislados de alimentos, revelaron que las cepas aisladas del queso no se

encuentran relacionadas con las clonas asociadas a un origen hospitalario. Para este análisis se seleccionaron siete cepas, de las cuales tres se identificaron presuntivamente como *E. faecium* mediante PCR punto final especie – específica como: cepas QD-2, Q E-2 y QG-5. Las cuatro restantes se aislaron y se caracterizaron por otro miembro del grupo de trabajo (Bravo, 2008), se identificaron como: cepas B, C, D y G. Estas siete cepas fueron incluidas en el estudio de evaluación de inocuidad de *Enterococcus* spp. por Olvera-García en 2013; en éste, se llevó a cabo la evaluación del potencial de virulencia, mediante la detección y evaluación de la expresión de genes que codifican para factores de virulencia como: citolisina, proteína de superficie enterocócica y sustancia de agregación; enterocinas (A y AS-48) y peptidoglucano hidrolasas (*AtlA*); asimismo se evaluó la resistencia al antibiótico vancomicina usando la concentración mínima inhibitoria (MIC) recomendada por el Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) que es de 256 µg/mL, y una segunda concentración previamente descrita en el grupo de trabajo (20 µg/mL) por Bravo en 2008. Los resultados revelaron que ninguna cepa tiene capacidad de crecer en presencia de las concentraciones evaluadas del antibiótico vancomicina.

3. Justificación

E. faecium es una bacteria que puede vivir en condiciones ambientales adversas, lo que le permite prevalecer y estar ampliamente distribuido en la naturaleza, incluyendo en alimentos fermentados de manera natural. Sin embargo, es capaz de adquirir factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos, lo que ha generado cepas multirresistentes de origen nosocomial consideradas como un problema de salud emergente a nivel mundial.

Lo que se busca en el presente trabajo es encontrar las posibles semejanzas entre las cepas de *E. faecium* aisladas de quesos artesanales mexicanos, conocer si existe relación con otras cepas aisladas de alimentos y saber la relación de éstas con el complejo clonal de alto riesgo (CC17) asociado a aislados de origen nosocomial. Para lo cual cepas aisladas del queso bola de Ocosingo se evaluarán mediante un método de tipificación molecular (MLST) capaz de diferenciar cepas dentro de una misma especie.

4. Hipótesis

Los *Enterococcus faecium* aislados del queso bola de Ocosingo se encontrarán alejados del complejo clonal al que pertenecen las cepas patógenas, y en su lugar tendrán relación con las cepas aisladas de alimentos.

5. Objetivos

5.1 General

Tipificar cepas de *E. faecium* aisladas del queso bola de Ocosingo.

5.2 Particulares

- Caracterizar fenotípicamente las cepas de *E. faecium*, en términos de: capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas, valores de pH, concentración de NaCl y de sales biliares.
- Caracterizar genotípicamente, mediante la amplificación y purificación de siete genes de mantenimiento (*atpA*, *ddl*, *purk*, *gyd*, *pstS* y *adk*) para realizar la tipificación por MLST. Análisis para definir estructura poblacional.
- Evaluar la presencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos.

6. Metodología

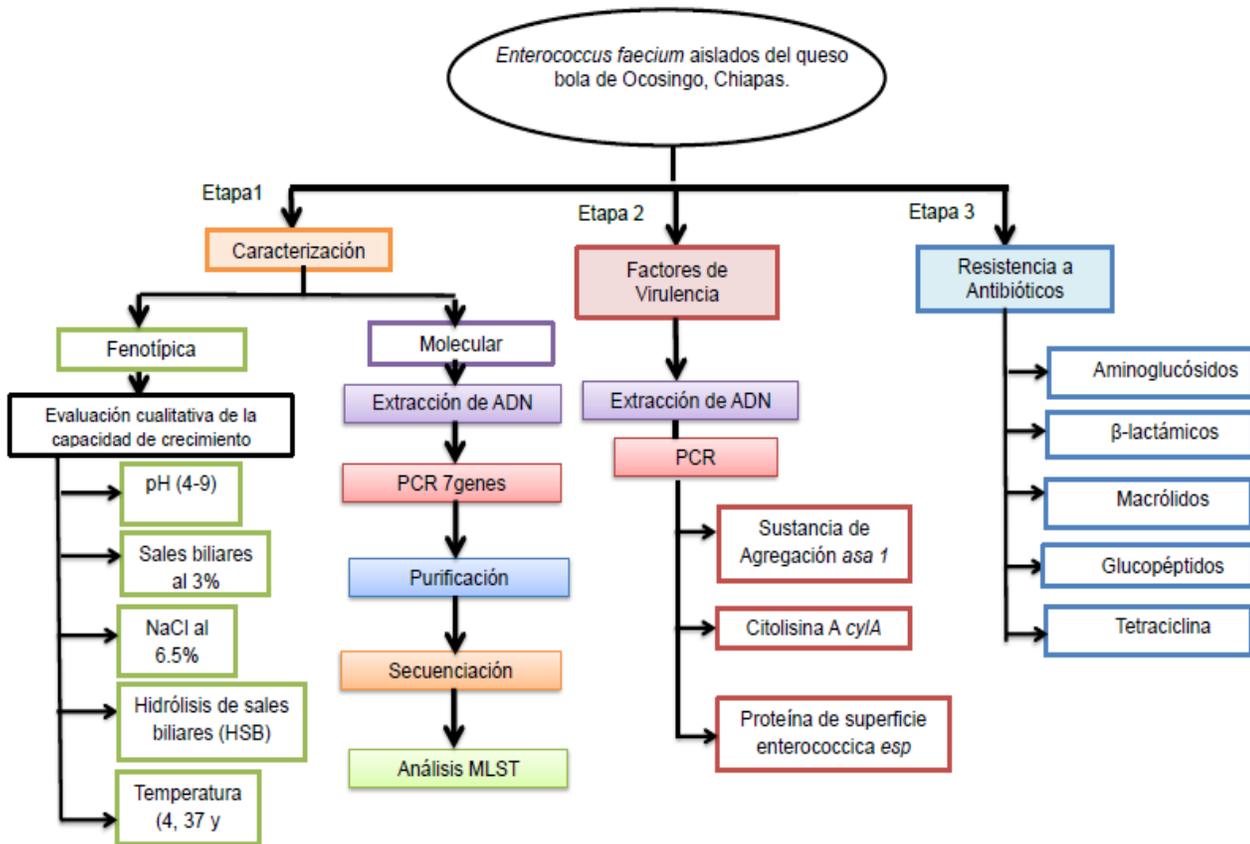


Figura 4. Diagrama general del trabajo.

La metodología planteada se divide en tres etapas (**Figura 4**): etapa 1) La caracterización fenotípica de las cepas, la cual se evaluó primeramente por la tinción de Gram, presencia de la enzima catalasa, capacidad de hidrolisis de sales biliares, capacidad de crecimiento bajo ciertas condiciones de temperatura, salinidad y pH, así como la caracterización genotípica a través del análisis MLST basado en el análisis de secuencia de siete fragmentos de ADN; etapa 2) Se efectuó el análisis del potencial de patogenicidad a través de la amplificación de genes codificantes para factores de virulencia como son: *asa 1*, *esp* y *cyIA*; etapa 3) Se evaluó la resistencia a antibióticos.

6.1 Caracterización del microorganismo objeto de estudio

Se cuenta con cinco cepas aisladas del queso bola de Ocosingo Chiapas, secuenciadas e identificadas por el gen marcador ADNr 16S como *E. faecium* (cepas registradas como 10, 9, 6, 3 y 2), las cuales se reactivaron en medio selectivo MRS (de Man, Rogosa y Sharpe; Oxoid, Basingstoke) a 37°C por 24 h. Posteriormente se realizaron tinciones de Gram para verificar su morfología microscópica. Además, se cultivaron en placas de medio selectivo y diferencial, Kanamicina-esculina-azida de sodio (KAA-Oxoid), las cuales se incubaron a 37°C por 24 h. A partir del crecimiento de colonias características de *Enterococcus* (circulares, blancas o grises con un diámetro de alrededor de 2 mm, rodeadas de zonas negras de al menos 1 cm de diámetro), se realizó la prueba de catalasa usando peróxido de hidrógeno al 30% (v/v).

Fundamento del medio Kanamicina-Esculina-Azida de Sodio (KAA): el agar Esculina-Azida de Sodio es un medio selectivo cuando se usa un suplemento de kanamicina y se emplea para aislamiento de *Enterococcus* en alimentos. El medio contiene los componentes inhibitorios de kanamicina y azida de sodio. También contiene un sistema indicador para detectar el crecimiento de estreptococos hidrolizantes de esculina. Se forman colonias con áreas negras alrededor de las colonias debido a la formación de compuestos fenólicos de hierro, productos de la hidrólisis de esculina y Fe^{2+} (Mac Faddin, 2003; The OXOID Manual, 2006).

6.2 Conservación de la cepa objeto de estudio

Se reactivaron las cepas en tubos con 5 mL de MRS e incubaron por 5 h a 37°C y 250 rpm. Posteriormente se transfirieron a viales criogénicos con 600 µL de cultivo y 300 µL de glicerol al 80% (v/v), con una concentración final de glicerol del 27% y se almacenaron a -20°C.

6.3 Caracterización fenotípica

De las cajas con medio KAA se tomó una asada y las bacterias se inocularon en medio MRS para evaluar su capacidad de crecimiento: a 37°C, 45°C y 4°C, así

como en 6.5 % de NaCl, 3% de sales biliares y un rango de pH 4 a 9, el cual se ajustó con HCl y NaOH concentrados. Se incubaron en estático a 37°C y se midieron a las 24 y 48 h, estos experimentos se realizaron por triplicado, la presencia de turbidez en el medio de cultivo indicaba un crecimiento positivo.

Por otro lado, se evaluó la capacidad de hidrólisis de sales biliares en placas de MRS con agar a una concentración de 0.5% (m/v) de sales biliares (glicolato de sodio y taurocolato de sodio) y CaCl₂ 0.37% (m/v), incubadas en jarra bajo condiciones de anaerobiosis (oxid anaerobic system; Basingstoke Reino Unido) por 48 h a 37°C. Para ello, se reactivaron las cepas objeto de estudio, tomando 20 µL de cada glicerol, con el propósito de llevar a cabo un cultivo en 5 mL de MRS a 37°C por 24 h. De estos tubos se tomaron alícuotas de 100 µL para su crecimiento final en 5 mL de MRS a 37°C por 4 h; preparación de la cual se tomaron 20 µL para su absorción en el agar dispuesto para la prueba de la hidrólisis de sales biliares. Se cuantificó cualitativamente su capacidad de hidrólisis con base al tamaño de la zona de precipitación alrededor de las colonias (Franz *et al.*, 2001). Asimismo se verificó su capacidad de supervivencia al calentamiento a 60°C por 30 min en un baño maría (Stabletemp); posterior a ello se realizó extensión en placa, para la cual se tomaron 50 µL de cultivo y se incubó a 37°C durante 48 horas, tiempo al cual se realizó una cuenta de UFC (unidades formadoras de colonia) / mL presentes en la placa, para determinar las células viables.

6.4 Extracción del ADN

Cada una de las cepas se reactivó en 5 mL de medio MRS durante 24 h a 37°C, posteriormente se tomó 1 mL de cada cultivo y se inoculó en matraces con 50 mL de medio MRS para después incubar por 16 h a 37°C. Para la extracción de ADN se empleó el estuche Fast ID Genomic DNA Extraction (Genetic ID, EUA), siguiendo las instrucciones del proveedor. Una vez obtenido el ADN de cada cepa se cuantificó y se evaluó su calidad, mediante la relación de la absorbancia 260 y 280 nm, utilizando el espectrofotómetro con el uso de microplacas Take3 Epoch (Bio Tek, EUA). Para verificar la integridad del ADN extraído se realizó

electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), teñido con bromuro de etidio al 0.1%. Para aquellas extracciones cuya concentración era baja, se empleó el concentrador de ADN (Modelo DNA plus-VRMini, marca Heto), para reducir su volumen a la mitad.

6.5 Amplificación de 7 genes altamente conservados por PCR punto final

Para cada cepa se amplificaron siete genes altamente conservados: *atpA* (ATP sintasa, subunidad alfa), *ddl* (Ligasa D-alanina:D-alanina), *purK* (subunidad deshidrogenasa), *gyd* (gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa), *pstS* (transportador ABC), *adk* (adenilato cinasa) y *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa); usando los cebadores respectivos (**Tabla 1**) (Homan *et al.*, 2002).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL con las siguientes concentraciones finales: amortiguador Phusion (1x), cebador directo y reversa (0.2 µM), desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (0.2 mM), Phusion High Fidelity polimerasa 0.625 u/ µL y ADN 100 ng/µL.

La polimerasa Phusion HighFidelity es una enzima de alta fidelidad usada para aplicaciones que requieren alta precisión durante la amplificación del ADN, tales como clonación, secuenciación o mutagénesis sitio dirigidas (<http://www.thermofisher.com>); en este estudio fue necesaria su aplicación debido a la amplificación y posterior secuenciación de genes, en busca de mutaciones puntuales, por lo que se requería de bajas tasas de error durante la amplificación.

Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 98°C durante 30 s, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 98°C durante 10 s, alineamiento o hibridación a 50°C durante 30 s, y polimerización o extensión a 72°C durante 15s; y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla 1. Lista de cebadores para los genes a evaluar por MLST.

Gen	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño de amplicón (pb)
<i>adk</i> (adenilato cinasa)	<i>adk</i> ₁ <i>adk</i> ₂	TATGAACCTCATTTTAATGGG GTTGACTGCCAAACGATTTT	437
<i>atpA</i> (ATP sintasa, subunidad alfa)	<i>atpA</i> ₁ <i>atpA</i> ₂	CGGTTTCATACGGAATGGCACA AAGTTCACGATAAGCCACGG	556
<i>ddl</i> (Ligasa D-alanina: D-alanina)	<i>ddl</i> ₁ <i>ddl</i> ₂	GAGACATTGAATATGCCTTATG AAAAAGAAATCGCACCG	465
<i>gdh</i> (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)	<i>gdh</i> ₁ <i>gdh</i> ₂	GGCGCACTAAAAGATATGGT CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	530
<i>gyd</i> (gliceraldehido- 3fosfato deshidrogenasa)	<i>gyd</i> ₁ <i>gyd</i> ₂	CAAAGTCTTAGCTCCAATGGC CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395
<i>purK</i> (subunidad deshidrogenasa)	<i>purK</i> ₁ <i>purK</i> ₂	CAGATTGGCACATTGAAAG TTCATTACATATAGCCCG	492
<i>pstS</i> (transportador <i>ABC</i>)	<i>pstS</i> ₁ <i>pstS</i> ₂	TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG CGTGATCACGTTCTACTTCC	538

(Homan *et al.*, 2002).

Después de la amplificación, los productos de la PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), teñidos con bromuro de etidio al 0.1%, empleando como marcador de peso molecular una escala de ADN de bajo peso molecular (Thermo Fisher Scientific). Una vez corroborada la amplificación y peso correspondiente, se realizó una purificación con el estuche DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research, Irvine, CA, EUA). Para los genes que presentaron más de una banda, se realizó su purificación de banda con el estuche Gene Jet Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific; Lituania, Unión Europea), en

ambos casos se siguieron las indicaciones del proveedor. La concentración de los productos se cuantificó utilizando el espectrofotómetro para microplacas Epoch Take3 (Bio Tek, EUA); para su posterior secuenciación en MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur), mediante el método Sanger.

6.6 Análisis de MLST de *Enterococcus faecium*

Una vez recibidos los resultados de la secuenciación, se llevó a cabo el alineamiento utilizando el programa en línea MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Cada amplicón obtenido se alineó con el cebador directo e indirecto y la secuencia de referencia provista por la base de datos en (<http://efaecium.mlst.net/>), con el fin de obtener una secuencia consenso.

Obtenida la secuencia consenso, se comparó con las presentes en la base de datos la cual asignó un número de alelo en caso de coincidir con alguna ya existente. En caso contrario, es necesario consultar al curador para la asignación e incorporación del nuevo alelo a la base. A la combinación de los siete valores de los alelos agrupados en un orden determinado (*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purk*, *gyd*, *pstS*, *adk*) se le denomina perfil alélico (genotipo), al cual le es asignado un número de secuencia tipo (ST). Una vez determinada la ST para cada cepa, se realizó el diagrama de estructura poblacional bajo el algoritmo eBURST, el cual está diseñado para datos generados por MLST. Éste se representa como un diagrama radial, centrado en el genotipo fundador, donde todos los miembros asignados al mismo grupo comparten alelos idénticos en 6 de los 7 loci.

6.7 Detección de genes de virulencia por PCR punto final

La detección de los genes que codifican para factores de virulencia se realizó a través de reacciones de PCR punto final con los cebadores específicos descritos por Vankerckhoven *et al.* (2004), para los siguientes genes: *asa 1*, *esp* y *cylA*, los cuales codifican para sustancia de agregación, proteína de superficie de enterococos y citolisina A del operón *cyl*, respectivamente (**Tabla 2**). Las cepas

que se emplearon como control positivo son: la cepa ATCC 29212 para el gen *asa1*, *Enterococcus faecalis* cepa A para el gen *esp*, y la cepa de *Enterococcus faecalis* NCIMB-700585 para *cylA*.

Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, alineamiento o hibridación, dependiendo de la T_m del gen a amplificar durante 45 s (**Tabla 2**) y polimerización o extensión a 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C durante 10 min.

Tabla 2. Lista de cebadores para cada factor de patogenicidad.

Gene	Cebador	Secuencia 5'-3'	T. de hibridación °C	Tamaño del amplicón (pb)
<i>asa1</i> (Sustancia de Agregación)	<i>asa</i> ₁ <i>asa</i> ₂	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	46	375
<i>cylA</i> (Citolisina)	<i>cylA</i> ₁ <i>cylA</i> ₂	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	49	517
<i>esp</i> (Proteína de superficie enterococcica)	<i>esp</i> ₁ <i>esp</i> ₂	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	41	510

(Eaton y Gasson, 2001; Vankerckhoven *et al.* 2004).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL usando (1x) de amortiguador Pfu+ MgSO₄, (0.2 mM) de dNTPs, 50 ng de ADN para cada muestra, 0.625 U/µL de Pfu polimerasa (Thermo Fisher Scientific), (0.2 µM) de cebadores para *cylA*, *esp*, y (0.1 µM) para *asa*.

Después de la amplificación, los productos de PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) teñidos con bromuro de etidio 0.1%. Los geles se examinaron en un transiluminador (Hoefer UVTM, EUA).

6.8 Prueba de resistencia a antibióticos por inhibición

Se reactivaron las cepas objeto de estudio, y de cada una se realizó una dilución de 10^{-1} con solución salina (NaCl al 0.85%), de éstas se tomaron 20 μ L, respectivamente y se inocularon en 10 mL de MRS con agar al 0.8%; esto se vertió sobre cajas petri previamente preparadas con 15 mL de MRS al 1% de agar. Se realizó la evaluación de resistencia y susceptibilidad a cada antibiótico mediante la técnica de difusión de disco; para ello, se añadieron concentraciones conocidas del antibiótico en discos de papel filtro, que se colocaron en la superficie del agar. Las cajas se dividieron de acuerdo al número de antibióticos a evaluar.

Los antibióticos evaluados fueron: aminoglucósidos (kanamicina 8 μ g/mL, espectinomicina 1 mg/mL, estreptomycinina 1 mg/mL), macrólidos (eritromicina 8 μ g/mL), β -lactámicos (ampicilina 16 μ g/mL, penicilina 8 μ g/mL), glucopéptido (vancomicina 32 μ g/mL) y tetraciclina 16 μ g/mL se incubaron a 37°C durante 24 h. Estas concentraciones son específicas e inhibitorias para *E. faecium*, reportadas por el CLSI (2015).

Durante la incubación, el agente difunde desde el papel filtro al agar, estableciendo un gradiente; la concentración del agente disminuye a medida que aumenta la distancia al papel filtro y alcanzando a una determinada distancia del disco, a la que se le conoce como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI); y es a partir de este punto que se presenta crecimiento microbiano, pero en la proximidad del disco se presenta una inhibición, esto en caso de ser el microorganismo susceptible. Método útil para ensayar la sensibilidad en patógenos a los antibióticos, basado en el crecimiento microbiano (Madigan *et al.*, 2009).

7. Resultados

7.1 Caracterización de las cepas de *E. faecium*

A partir de las 5 cepas aisladas del queso bola de Ocosingo, Chiapas, identificadas como *E. faecium*, mediante el análisis de ADNr 16S, por Grajales y Ramos (2016) se procedió a su reactivación en caldo MRS, medio selectivo para el crecimiento abundante de bacterias ácido lácticas, debido a que éstas se encontraban crioconservadas a -20°C. Posteriormente, se comprobó su pureza mediante su aislamiento en un medio selectivo y diferencial (KAA). Este medio es selectivo dada la presencia del antibiótico kanamicina, y diferencial debido a la capacidad de hidrólisis de la esculina formando un halo negro alrededor de las colonias con crecimiento característico de *Enterococcus* (colonias puntiformes, convexas, de color gris a blanco, con textura butirosa) (**Figura 5**). Como parte de la caracterización fenotípica, se realizó una tinción de Gram para cada una de las cepas, observando cocos y diplococos Gram positivos (**Figura 6**). Otra de las pruebas realizadas comprobó la ausencia de la enzima catalasa, dando negativo al entrar en contacto con el peróxido de hidrogeno (30% v/v) por parte de todas las cepas; prueba característica de este género y de las BAL. Esta enzima entra en contacto con el (H₂O₂), forma oxígeno y agua, en caso de ser positiva su presencia (Madigan *et al.*, 2009) (**Tabla 3**).

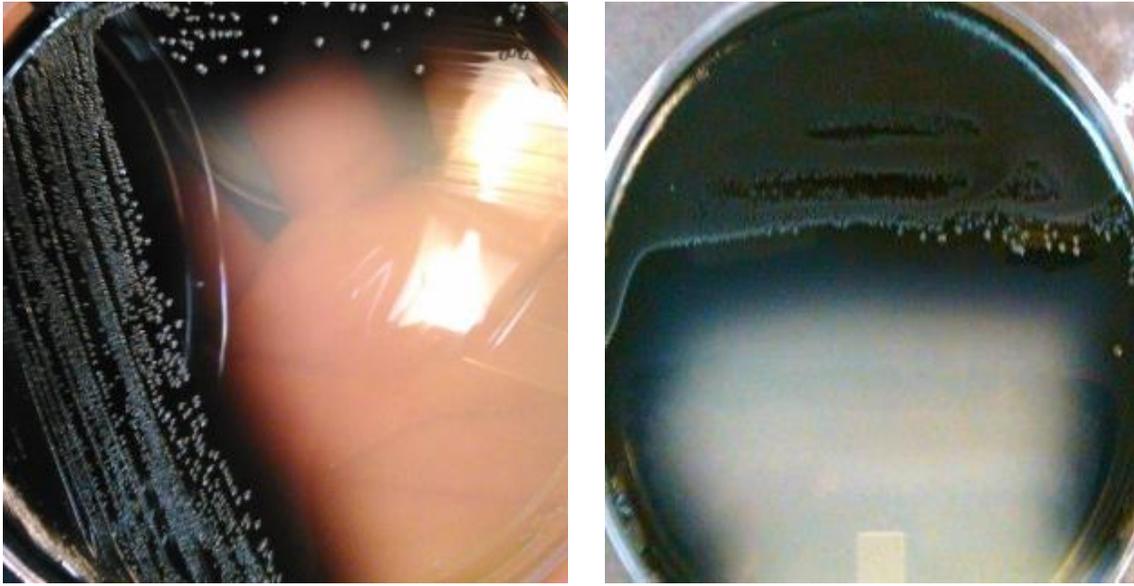


Figura 5. Crecimiento característico de *E. faecium* en medio KAA.

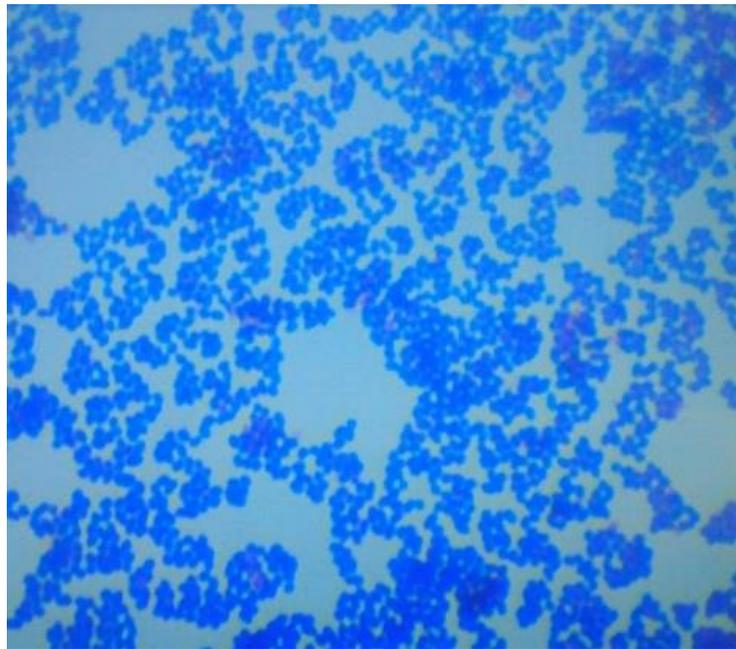


Figura 6. Tinción de Gram de *E. faecium*.

Tabla 3. Resultados de la tinción de Gram y prueba de catalasa de las cepas de *E. faecium*.

Cepa	Morfología microscópica	Prueba catalasa	Gram
10	Cocos	Negativo	G+
9	Cocos	Negativo	G+
6	Cocos	Negativo	G+
3	Cocos	Negativo	G+
2	Cocos	Negativo	G+

Los *Enterococcus* se caracterizan por tener la capacidad de crecer en ambientes desfavorables (entre 10 y 45°C) además, pueden sobrevivir por lo menos 30 minutos a 60°C. Asimismo pueden proliferar en un intervalo de pH entre 4.0 y 9.0, así como en NaCl al 6.5%, y tener la capacidad de hidrolizar la esculina en presencia de 3 % de sales biliares (Giraffa, 2003; Foulquie-Moreno *et al.*, 2006). Características que los distinguen de otros cocos Gram positivos como los estreptococos y lactococos. Estas características justifican su continua presencia en una amplia variedad de alimentos fermentados (Giraffa, 2003).

Por lo anterior, se evaluó cualitativamente su capacidad de crecimiento bajo dichas condiciones. Para los rangos de temperatura y concentración de sales se obtuvieron resultados positivos; sin embargo, en cuanto a su crecimiento en el rango de pH evaluado, se observó una disminución de éste a pH 5 con ausencia del mismo a pH 4, con un crecimiento más favorable a pH básico (**Tabla 4**).

Tabla 4. Evaluación del crecimiento de las cepas de *E. faecium* bajo condiciones extremas de temperatura, pH y osmolaridad.

Cepa /Condición	10	9	6	3	2
45°C	+	+	+	+	+
4°C (48 h.)	+	+	+	+	+
Sales Biliares al 3%	+	+	+	+	+
NaCl al 6.5%	+	+	+	+	+
pH9	+	+	+	+	+
pH8	+	+	+	+	+
pH7	+	+	+	+	+
pH6	+	+	+	+	+
pH5	+	+	+	+	+
pH4	-	-	-	-	-

Se muestra el análisis por triplicado. Crecimiento a 24 h a menos que se indique lo contrario.

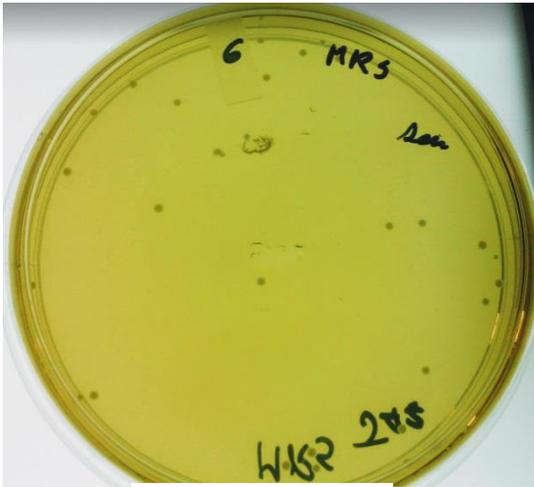
Así mismo, se evaluó cualitativamente su tolerancia a una temperatura de pasteurización lenta (60°C por 30 minutos); prueba en la que, posterior a la extensión en placa e incubación, se observó la supervivencia de todas las cepas (**Figura 7**). Además, se realizó un conteo de colonias en el que se obtuvieron 3000, 1320, 520, 400 y 180 UFC/mL para las cepas 3, 10, 6, 2 y 9, en el orden respectivo.



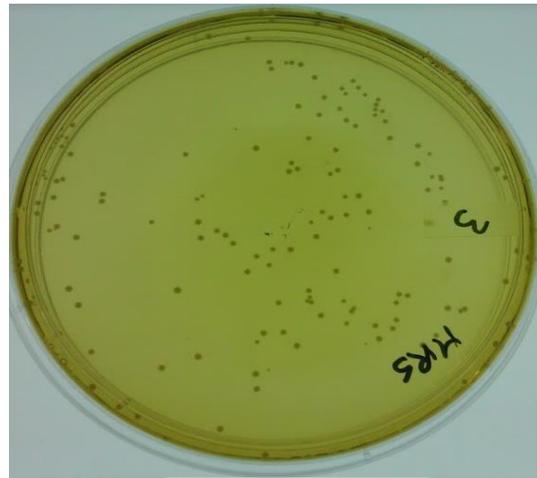
Ceba 10



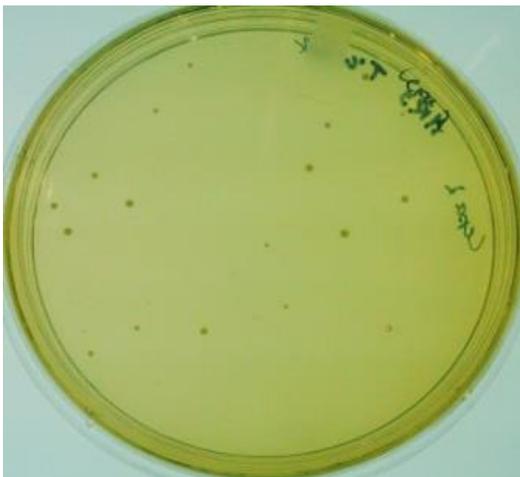
Ceba 9



Ceba 6



Ceba 3



Ceba 2

Figura 7. Crecimiento de las cepas *E. faecium* bajo tratamiento térmico a 60°C por 30 minutos.

Las cepas con capacidades probióticas incluyen características fisiológicas y propiedades funcionales promotoras de la salud, como son la inhibición de microorganismos patógenos, el fortalecimiento de la mucosa intestinal, el aumento de la respuesta inmune y la reducción de los niveles de colesterol en sangre. Estos últimos se han relacionado con la capacidad de las bacterias de hidrolizar las sales biliares (HSB). Esta actividad está mediada por varias bacterias intestinales Gram positivas, incluyendo miembros del género *Enterococcus*. La desconjugación de las sales biliares por acción de la enzima coloilglicina hidrolasa (E.C. 3.5.1.24), liberan glicina y/o taurina de la cadena lateral del núcleo esteroide. Se plantea que la desconjugación de las sales biliares puede contribuir a reducir los niveles de colesterol debido a que los ácidos biliares libres pueden ser excretados más fácilmente del tracto gastrointestinal que las sales biliares conjugadas. Si se produce una mayor pérdida fecal de ácidos biliares como resultado de la HSB, puede aumentar la demanda de colesterol como precursor de la nueva síntesis de sales biliares, lo que a su vez puede reducir los niveles de colesterol (Franz *et al.*, 2001).

Debido a lo anterior, se realizó una evaluación en cuanto a la capacidad de hidrólisis de sales biliares (HSB) de las cepas del queso bola, las cuales fueron capaces de crecer en presencia de las sales biliares (excepto la cepa 9) y tuvieron baja capacidad HSB, al mostrar un ligero precipitado (**Figura 8**).

Estos resultados preliminares indican que poseen una baja actividad HSB. Se tomó como referencia el estudio realizado por Franz *et al.* (2001), el cual muestra la capacidad e incidencia de la HSB; en él participaron 117 cepas de enterococos aislados de alimentos y se clasificaron en función al tamaño de la zona de precipitación generada, con la mayor incidencia de actividad por parte de *E. faecalis* (81%) seguida por *E. faecium* (50%) y *E. durans* (44%).



Figura 8. Evaluación de la capacidad de hidrolisis de sales biliares.

Se sugiere confirmar estos resultados por un método analítico, como la determinación de taurina o glicina por HPLC.

Una vez verificada la pureza y características fenotípicas propias de las cepas de *E. faecium*, se realizó la extracción del ADN, (**Figura 9**); mostrando rendimientos suficientes en cuanto a calidad y cantidad (**Tabla 5**).

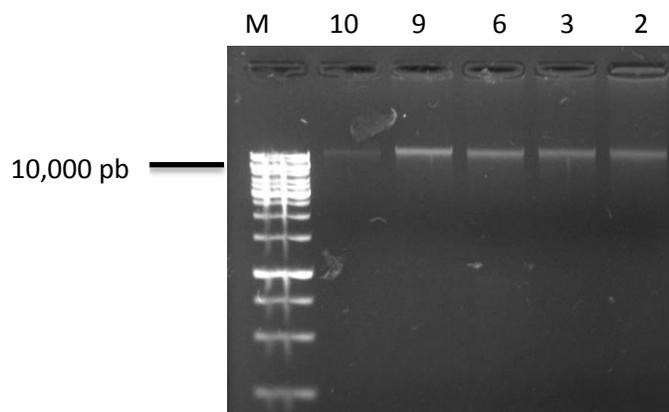


Figura 9. Gel de agarosa al 1% (p/v) obtenido del ADN extraído para las cepas de *E. faecium*. La M denota el marcador molecular (GeneRuler 1 kb), a continuación, las cepas 10, 9, 6, 3 y 2.

Tabla 5. Concentración de ADN de las cepas aisladas de *E. faecium*.

Cepa	ng/ μ L	Relación A 260 / A 280
10	44.979	2.238
9	71.602	2.236
6	34.901	2.012
3	99.815	2.091
2	13.829	1.981

7.2 Análisis MLST

Las cinco cepas aisladas del queso bola se analizaron mediante el método de tipificación molecular MLST enfocado a *E. faecium* (<http://efaecium.mlst.net/>); (Homan *et al.*, 2002); para ello, se llevaron a cabo las reacciones de PCR punto final con los cebadores reportados en <http://efaecium.mlst.net/misc/info.asp>, a fin de amplificar siete genes de mantenimiento básico celular. En todas las cepas, cada gen fue amplificado y secuenciado con el cebador directo e inverso. Las secuencias obtenidas se subieron a la base de datos de *E. faecium* (<http://efaecium.mlst.net/>) para la asignación de alelos a cada locus y generar así la secuencia tipo (ST). El análisis de agrupación de las STs fue desarrollado a partir de la base de datos del MLST y el algoritmo eBURST.

Para saber si la reacción había transcurrido eficientemente, los amplicones se visualizaron a través de electroforesis en geles de agarosa. Cuando los amplicones son corridos en el gel, deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número de segmentos de ADN conocidos, lo que facilitará su identificación y si su tamaño corresponde. El tamaño se otorga debido al número de pares de bases (pb) del amplicón (Tamay *et al.*, 2013).

Se obtuvieron los amplicones esperados para cada gen, se observó la presencia de una banda de tamaño correspondiente al número de pares de bases (pb) de referencia (**Figura 10(a, b, c) y 11a**). En caso de observarse más de una banda, se procedió a purificar la banda de interés, seleccionada por su tamaño (**Figuras 11b y 11c**).

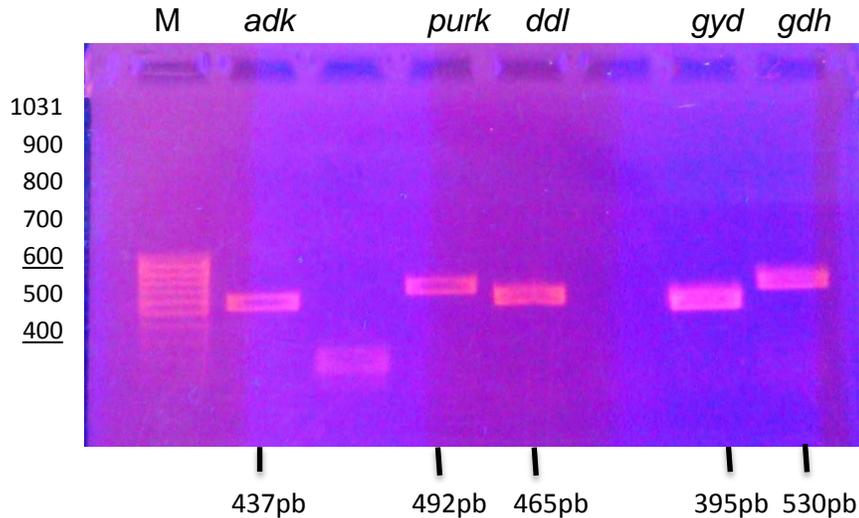


Figura 10a Gel de agarosa de PCR punto final obtenido para los genes: *adk*, *purK*, *ddl*, *gyd* y *gdh* de la cepa 3 de *E. faecium*.

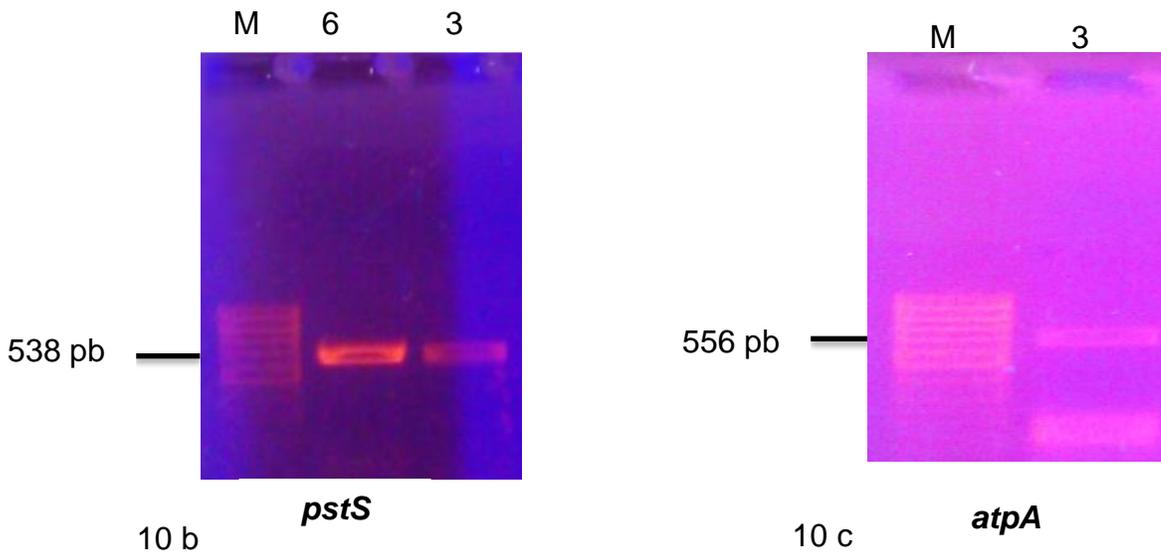


Figura 10b y 10c. Geles de agarosa de PCR punto final obtenidos para los alelos: *pstS* y *atpA* de la cepa 3 de *E. faecium*.

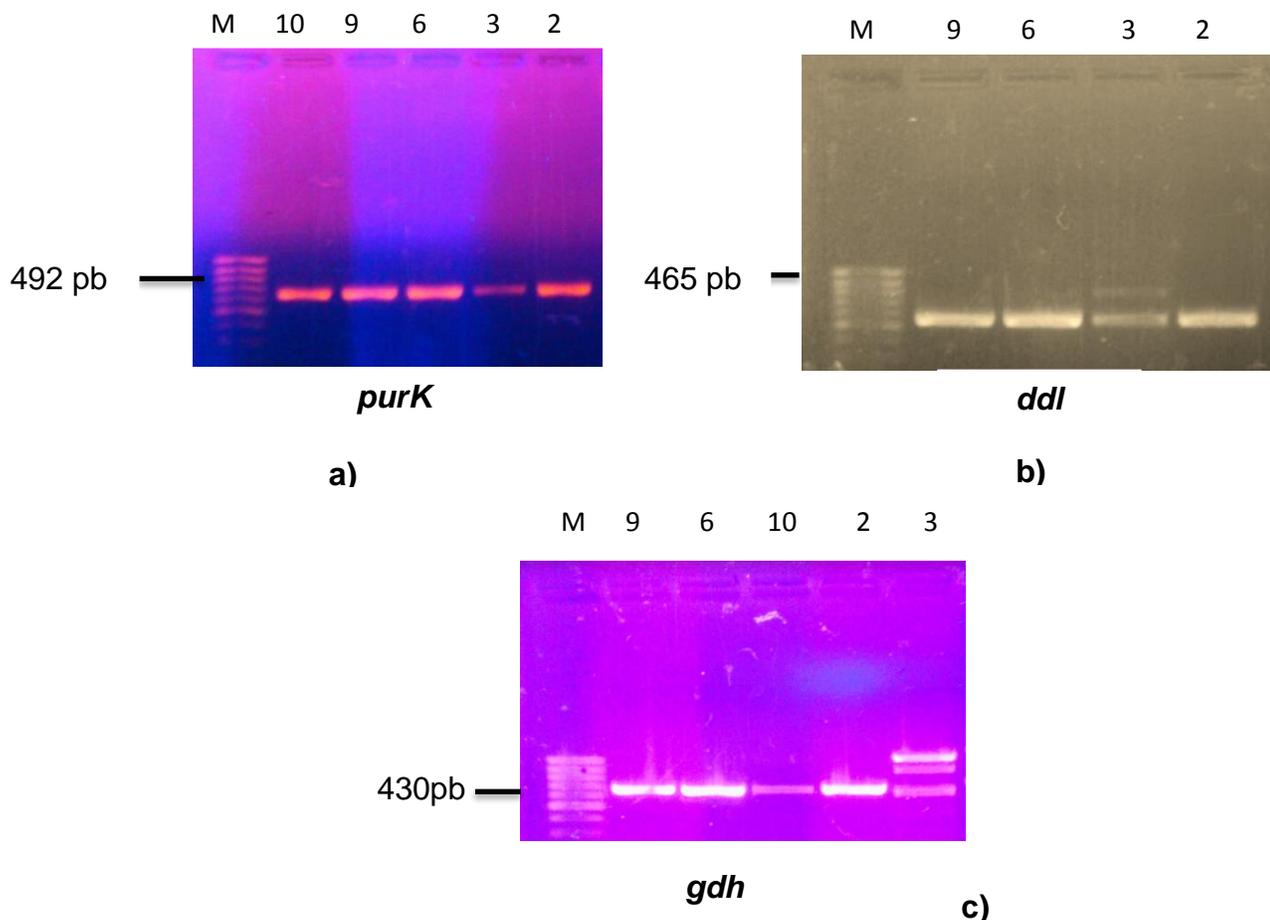


Figura 11. Geles de agarosa de PCR punto final obtenidos para los genes: *purK*, *ddl* y *gdh* de las cinco cepas de *E. faecium*.

Se puede observar en la **Figura 11a** el gel de agarosa para el amplicón del gen *purK* con un peso de 492 pb; posteriormente en la **Figura 11b** se muestra el gel de agarosa para el amplicón del gen *ddl* de 465 pb; finalmente en la **Figura 11c** se puede visualizar el gel de agarosa para el amplicón del gen *gdh* de 530pb.

Una vez obtenidos los amplicones, se realizó una purificación con el propósito de eliminar los subproductos de la reacción efectuada, como son: cebadores y dNTPs; en caso de realizar purificación de banda, ésta sirve además para eliminar la agarosa, todos ellos factores que afectan la secuenciación. Las concentraciones obtenidas se muestran en la **Tabla 6**, las cuales fueron adecuadas en cantidad y calidad para la secuenciación.

Tabla 6. Concentración de los amplicones obtenidos, para los siete genes empleados en el MLST, de las cepas de *E. faecium* aisladas del queso bola.

Gen	Cepa	ng/μl	Gen	Cepa	ng/μl	Gen	Cepa	ng/μl
<i>purK</i>	10	81.090	<i>adk</i>	10	51.641	<i>pstS</i>	10	44.807
	9	88.463		9	95.791		9	45.981
	6	873.322		6	83.228		6	41.257
	3	52.984		3	29.616		3	28.421
	2	100.842		2	129.005		2	39.521
<i>gdh</i>	10	39.861	<i>ddl</i>	10	68.363			
	9	43.551		9	34.548			
	6	52.504		6	54.714			
	3	13.665		3	18.053			
	2	49.005		2	37.592			
<i>atpA</i>	10	47.914	<i>gyd</i>	10	44.127			
	9	16.618		9	52.557			
	6	39.737		6	35.023			
	3	20.262		3	36.851			
	2	27.520		2	37.353			

Obtenida la secuencia de los fragmentos internos de los siete genes: *atpA* (ATP sintasa, subunidad alfa), *ddl* (Ligasa D-alanina: D-alanina), *purK* (subunidad deshidrogenasa), *gyd* (gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa), *pstS* (transportador ABC) y *adk* (adenilato cinasa), se realizó su alineamiento con una secuencia de referencia tomada de la base de datos respectiva al gen a alinear, para mantener el tamaño del amplicón marcado por la referencia, ya que las secuencias obtenidas son más grandes a las marcadas por la base de datos y el programa limita su reconocimiento. Cabe mencionar que para cada gen existen un número limitado de alelos, los cuales se identifican con un número (**Tabla 7**).

Tabla 7. Alelos descritos por la base de datos del MLST con fecha de última actualización Octubre del 2017.

Locus	Alelos
<i>atpA</i>	105
<i>ddl</i>	97
<i>gdh</i>	86
<i>purK</i>	98
<i>gyd</i>	54
<i>pstS</i>	127
<i>adk</i>	49

La base de datos verifica una coincidencia exacta entre cada loci y las coincidencias más cercanas se identifican otorgando un número de alelo. Al conjunto de alelos ordenados de forma específica se les conoce como perfil alélico; cada perfil alélico obtenido se comparó con la base de datos (<http://efaecium.mlst.net/>), ésta asignó un número de secuencia tipo (ST) producto del conjunto de números otorgados a los siete alelos (**Tablas 8 y 9**). Estas ST nos permiten la rápida comparación entre aislados de diferentes ambientes y la asociación a complejos clonales.

Tabla 8. Perfiles alélicos de las cepas de *E. faecium* aisladas del queso bola de Ocosingo.

Cepa	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
10	8	4	12	9	1	1	5
9	8	4	12	9	1	1	5
6	8	4	12	9	1	123	5
3	8	4	12	9	53	124	5
2	8	4	12	6	53	1	5

Sombreados los nuevos alelos obtenidos.

Tabla 9. Secuencias tipo asignada a cada una de las cepas de *E. faecium*.

Cepa	Secuencia Tipo (ST)
10	130
9	130
*6	1293
*3	1294
*2	1295

*La STs obtenida para las cepas 6, 3 y 2 no habían sido previamente reportadas.

De las ST obtenidas, la ST130 de la base de datos presenta tres aislados de dos fuentes distintas, la primera en ser reportada el 20 /01 /2015, pertenece a un aislado de sangre de un paciente hospitalizado de Alemania, la cual no especifica las razones de ingreso o si sufría de algún padecimiento. Las otras fuentes corresponden a nuestros aislados, a las cepas 10 y 9 obtenidas en el presente trabajo.

En la **Figura 12** se observa el alineamiento de ambas hebras de la secuencia obtenida para el gen *gdh*, pertenecientes a la cepa 9 con su referencia. Los nucleótidos en color rojo muestran el inicio y final del alelo de referencia; las bases marcadas de color negro al inicio del alineamiento indican el tamaño real de la secuencia experimental. Dentro de la secuencia delimitada en color rojo, la base color negra ubicada entre los nucleótidos 300 y 310, indica una diferencia con la referencia, y las marcadas en azul, muestran igualdad entre ambas hebras. Se muestra la secuencia consenso por debajo de la referencia.

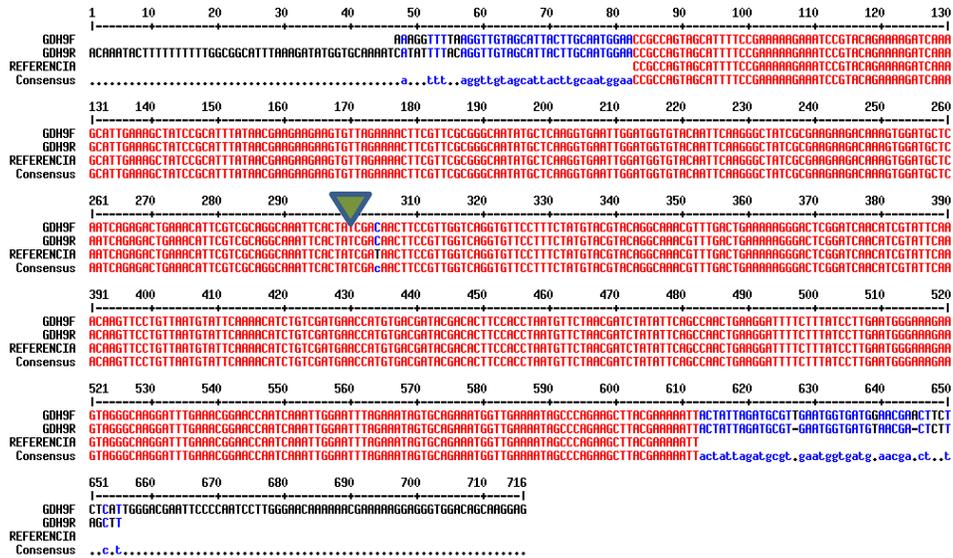


Figura 12. Alineamiento de la secuencia para el gen *gdh* de la cepa 9 con su referencia (tomada de la base de datos).

La secuencia consenso del gen *gdh* que pertenece a la cepa 9, se sube a la base de datos, y ésta otorga el número de alelo al que pertenece, en cuyo caso nos indica homología con el alelo *gdh* 12. Al alinear ambos se confirma su igualdad no observando nucleótidos diferentes (**Figura 13**); en caso contrario es necesario contactar al curador para que le sea otorgado un nuevo número de alelo y con ello la nueva secuencia tipo.

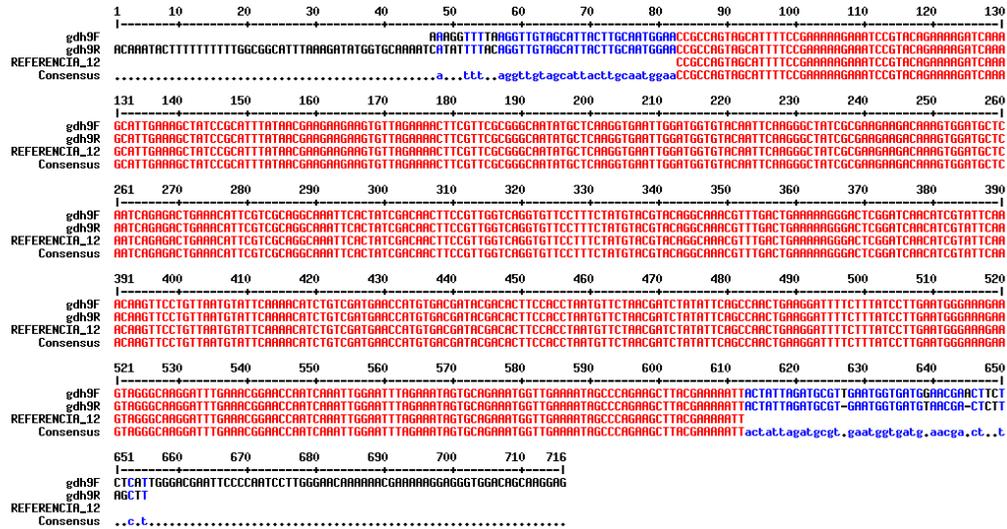


Figura 13. Alineamiento entre el alelo *gdh* perteneciente a la cepa 9, con el alelo existente designado por la base de datos como *gdh* 12.

En el presente estudio se identificaron tres nuevos alelos: dos para el gen *pstS* (cepas 6, 3) y uno para *gyd* (cepa 3, 2). Tras contactar al curador se otorgaron los siguientes números de alelo: *pstS* 123 y 124; *gyd* 53 respectivamente; como parte de la identificación de los nuevos alelos, se asignaron tres nuevas secuencias tipo ST1293, ST1294 y ST1295.

7.3 Estructura poblacional de *E. faecium* (Análisis de las ST obtenidas de las cepas aisladas del queso bola)

Una vez obtenidas las STs de cada una de las cepas, se elaboró el dendograma de la estructura poblacional de *E. faecium* mediante el uso del algoritmo eBURST, útil para ubicar y relacionar cada ST dentro de los complejos clonales, particularmente con el CC17 asociado a aislados de origen nosocomial. Como primer paso, el algoritmo eBURST divide las STs en grupos; el usuario define el número de alelos en común que presentará cada ST dentro de un grupo. En este trabajo fue necesario ajustar la definición de grupo con la especificación de agrupamiento más relajada a un valor de 4 de los 7 loci. (Figura 14).

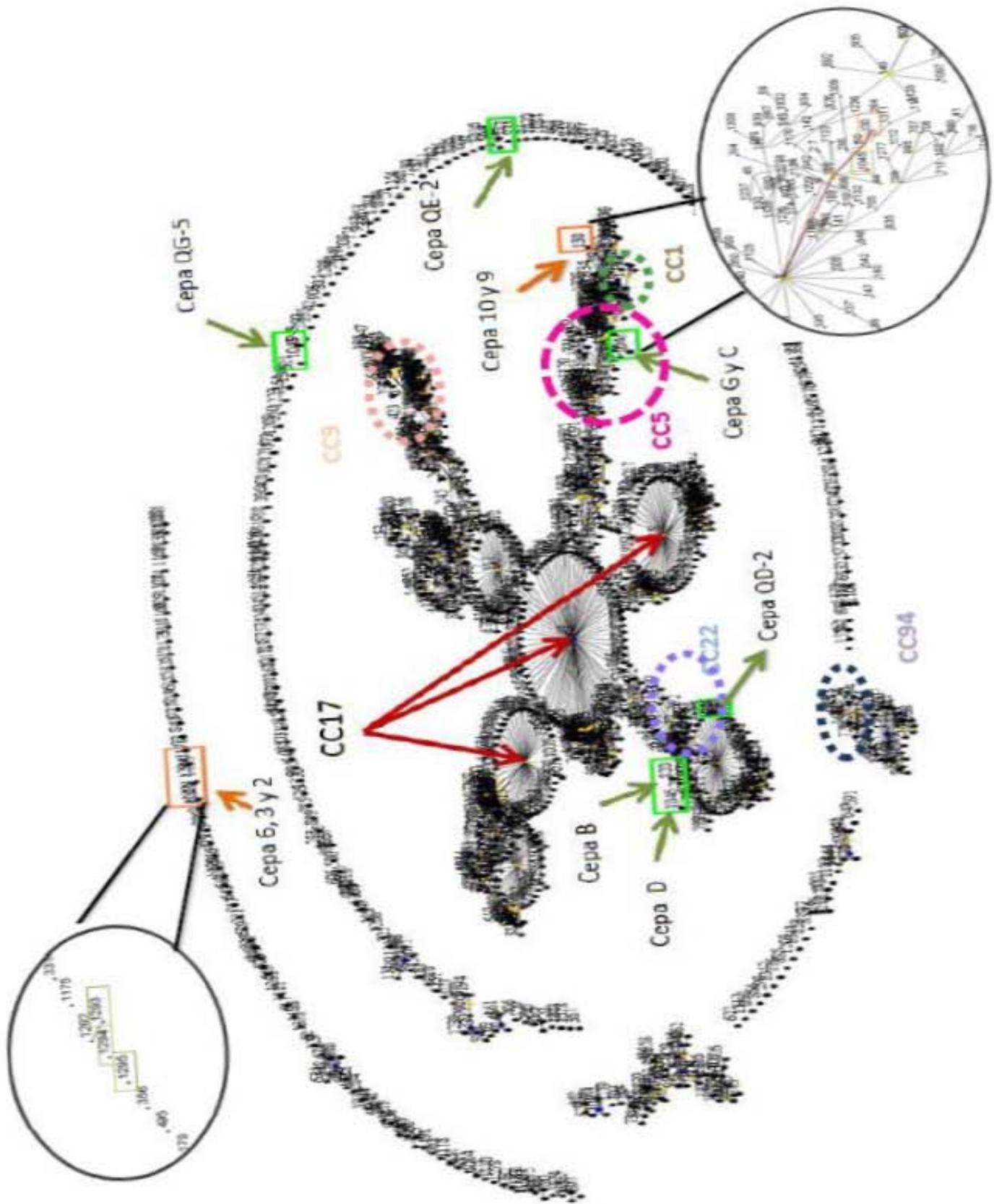


Figura 14. Dendrograma de la estructura poblacional de *E. faecium*; ubicadas las STs del queso bola y queso Cotija.

Enmarcadas y con flechas naranjas las STs del queso bola de Ocosingo; en color verde las del queso Cotija. Señaladas con flechas rojas las STs (78, 17 y 18) que integran el CC17.

En el dendograma se puede observar que las STs correspondientes a las cepas de los quesos mexicanos analizadas, se encuentran lejos de las STs que integran el CC17. Agrupándose cuatro de las doce secuencias dentro del complejo clonal cinco (CC5). Las restantes se ubican como secuencias aisladas.

La estructura poblacional de *E. faecium* comprende una amplia diversidad de STs las cuales se agrupan en complejos clonales como son: el CC5 asociado a cerdos; CC9, a aves de corral; CC1, a terneras; y los CC17, CC22, CC94 asociados a los seres humanos. Se consideran como riesgosas aquellas ST que en su mayoría son provenientes de aislados clínicos, como es el caso de las secuencias tipo agrupadas por el CC17.

Un complejo clonal se define como el conjunto de STs relacionados entre sí, descendientes de un mismo genotipo fundador, que comparte al menos 5 de los 7 alelos con otras STs. Los CC llevan implícito un concepto evolucionista ya que estas STs se han diversificado a partir de un ancestro común; considerándose como posible secuencia tipo fundadora de un CC a aquella que presenta un mayor número de ST dentro de un mismo grupo que se diversifican entre sí, en un sólo alelo Single Locus Variant (SLV). A las ST que no pueden ser asignadas a algún CC se les denomina solitarias (Singletones). Los grandes CC contienen subgrupos y, por lo tanto, tienen fundadores primarios y subgrupos; por ejemplo, un SLV del fundador principal puede haber aumentado en frecuencia y diversificado para generar un número de sus propios SLV, convirtiéndose así en fundador de subgrupos. La promoción de una ST a fundador de un subgrupo depende de la cantidad de SLV (Feil *et al.*, 2004; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007).

El estudio realizado por Freitas *et al.* (2009) describe la estructura poblacional de *E. faecium* aislados de diferentes orígenes y localidades dentro de Portugal. Señala que las cepas aisladas cuyas STs pertenecen al CC5, no contienen los factores de virulencia putativos probados: proteína de superficie enterocócica (codificada por *esp*), hialuronidasa (codificada por *hyl*), citolisina (codificada por *cyl*), gelatinasa (codificada por *gel*); sin embargo, exhiben varios fenotipos de

resistencia como: vancomicina, ampicilina, eritromicina, teicoplanina y tetraciclina. Cabe mencionar que la asociación entre los cerdos y aves de corral como reservorios y fuente de transmisión de cepas patógenas de *E. faecium* a los seres humanos, vinculan en ciertos casos a personas relacionadas con actividades en las que es necesario su contacto.

Las ST1045 del queso Cotija y ST130 del queso bola están relacionadas con el CC5 a través de las ST156, con la que comparte 6 alelos, y con la ST150 con 5 alelos en común (**Tabla 10**).

Tabla 10. Secuencias tipo relacionadas con el CC5.

ST	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
**5	5	2	1	9	1	1	5
*156	5	2	12	9	1	1	5
1045	51	2	12	9	1	1	5
*150	5	4	12	9	1	1	5
130	8	4	12	9	1	1	5

** ST5 del CC5; *ST156 (SLV) del CC5; *ST150 (DLV) del CC5.

En la **Figura 15** se presentan las STs que comparten 4 alelos en común con la ST130; de las cuales se tiene identificadas 137 STs. En conjunto las STs aisladas no poseen origen de hospitales en un 79%; de las 11 cepas que provienen de los alimentos, 2 de ellas fueron aisladas del queso Cotija ST1045 y 1048, cinco del queso bola, dos de Italia, una de Noruega y una de Alemania.

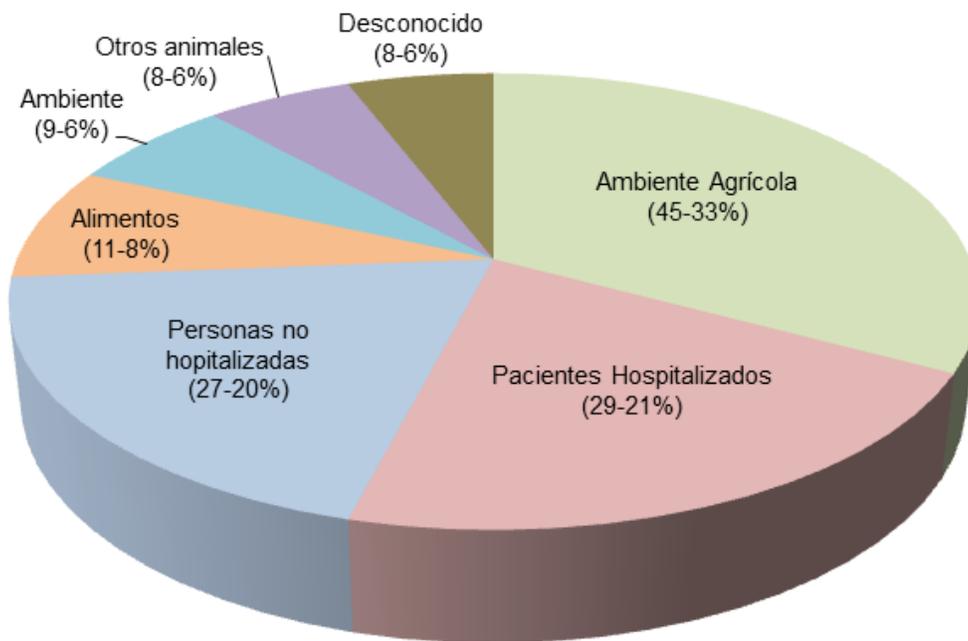


Figura 15. Fuentes de los aislamientos reportados por la base de datos que integran las STs que comparten 4 de los 7 alelos con la ST130 (Frecuencias-Porcentaje).

Consultado en octubre del 2017 en: https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_efaecium_isolates&page=profiles.

De las 7 cepas aisladas del queso Cotija —ente Bravo en 2008 y Guzmán en 2015, y tipificadas mediante el MLST por éste último— se observó que comparten únicamente un alelo (*gyd*), con cierta relación entre las cepas que provenían de una misma colecta. Las cepas C y G presentaron la misma ST (1045); las cepas B y D se encontraron estrechamente relacionadas, al compartir 6 de los 7 alelos (*ddl*, *gdh*, *purK*, *pstS*, *gyd*, *adk*). Estas cepas fueron aisladas de dos quesos distintos, uno de la ranchería “La Tinaja” en Michoacán y otro de Santa María del Oro en Jalisco durante una misma colecta en el 2005; entre ellas comparten dos alelos en común (*gyd* y *pstS*). Las cepas QD-2 y QE-2 aisladas de dos quesos provenientes de una mismo lugar, pero elaborados por productores diferentes, comparten 5 alelos entre sí (*atpA*, *ddl*, *purK*, *gyd*, *adk*). La cepa QG-5, aislada de un queso de Santa María del Oro en 2011, comparte 4 alelos (*gdh*, *gyd*, *pstS*, *adk*) con las cepas C y G, y solamente un alelo (*gyd*) con las cepas QD-2 y QE-2 aisladas el mismo año.

El análisis MLST de las siete cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija “Región de Origen” reveló cuatro secuencias tipo nuevas (ST1045, ST1046, ST1047 y ST1048), el hallazgo de un nuevo alelo para el gen *ddl* (74) y dos cepas reportadas en la base de datos: la cepa B (ST820) y la cepa QD-2 (ST135). Los

resultados sugieren que las cepas de *E. facecium* no están relacionadas directamente con el complejo clonal 17 (CC17) (Guzmán, 2015).

Las cepas aisladas del queso bola se encuentran mayormente relacionadas que las del queso Cotija, puesto que entre ellas comparten 5 de 7 alelos (*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK* y *adk*) a excepción de la cepa 2, que no comparte el mismo alelo en el gen *purK*.

Al comparar los alelos de las STs asignadas a las cepas aisladas del queso Cotija, con las del queso bola, se encontró que comparten alelos entre sí. Este es el caso de la ST1045 (cepas G, C) y ST1048 (cepa QG-5) aisladas del queso Cotija, las cuales comparten seis y cuatro de los siete alelos en común con los de la ST130 (cepas 10 y 9) del queso bola en los genes: *gdh*, *adk*, *gyd*, *pst*, *purK* y *atpA*. La ST1048 es la de mayor relación alélica con la ST1295 (cepa 2) con 6 alelos en común (**Tabla 11**). Las ST de las cepas aisladas de ambos quesos tienen en común el alelo *gyd*, a excepción de la nuevas secuencias tipo (ST1294 y ST1295) cuyo alelo (*gyd* 53).no había sido previamente reportado.

Tabla 11. Secuencias tipo obtenidas de las cepas de *E. faecium* aisladas del queso Cotija y queso bola.

Queso	Cepa	ST	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
Queso Cotija "Región de Origen" (Guzmán 2015)	B	820	5	7	5	7	1	1	1
	C	1045	51	2	12	9	1	1	5
	D	1046	3	7	5	7	1	1	1
	G	1045	51	2	12	9	1	1	5
	QD-2	135	27	3	1	2	1	1	1
	QE-2	1047	27	3	25	2	1	12	1
	QG-5	1048	8	74	12	6	1	1	5
Queso bola de Ocosingo	10	130	8	4	12	9	1	1	5
	9	130	8	4	12	9	1	1	5
	6	1293	8	4	12	9	1	123	5
	3	1294	8	4	12	9	53	124	5
	2	1295	8	4	12	6	53	1	5

Se resaltan los alelos homólogos entre sí. En marco rojo el gen *purK* definido como marcador epidemiológico.

Los alelos que integran los perfiles alélicos de las ST de cada una de las cepas en ambos quesos, presentan diferencias con los alelos que conforman las ST que integran al CC17 (Tabla 12). Específicamente con el alelo *purK* (1), definido como marcador epidemiológico de tipificación dentro del grupo de *E. faecium* resistentes a vancomicina, asociado a los genotipos Van A y Van B. Algunos estudios han observado la relación del alelo *purK* (1) con la presencia del gen *esp*; puesto que las cepas que presentan este alelo pertenecen en su mayoría a aislados de origen hospitalario. Su empleo sirve así, diferenciador de aquellas cepas de origen distinto (Willems *et al.*, 2001; Camargo *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2009; Galloway-Peña *et al.*, 2012).

Tabla 12. Secuencias tipo y perfil alélico que conforman el CC17.

ST	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purKn</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
17	1	1	1	1	1	1	1
18	7	1	1	1	5	1	1
78	15	1	1	1	1	1	1

Reportado por la base de datos del MLST de *E. faecium*.

Los números alélicos 9 y 6 obtenidos para el gen *purK* por parte de las cepas del queso bola, comparado con el análisis informado por Biavasco *et al.* (2007), se les asocian con cepas provenientes de aves de corral y puerco respectivamente.

La base de datos del MLST integra hasta ahora 51 secuencias tipo aisladas de alimentos; éstas a su vez expresan la presencia de determinados alelos para cada gen reiteradamente, con 42 valores únicos. En la **Figura 16**, se presentan los alelos presentes para cada gen dentro de aislados de alimentos. Los alelos asignados que conforman los perfiles alélicos de las secuencias tipo de las cepas aisladas de ambos quesos artesanales mexicanos, se encuentran entre los más recurrentes dentro de las secuencias tipo de la base de datos que comprenden los 51 aislados de alimentos (**Tabla 13**).

The screenshot shows the MLST database interface. It features a table with two main sections: 'Fields' and 'Alleles'. The 'Fields' section lists the locus name and the number of unique values. The 'Alleles' section lists the locus name, the number of unique alleles, and provides options to analyze (represented by a pie chart icon) and download (represented by a download icon) the data for each locus.

Fields			Alleles			
Field name	Unique values	Analyse	Locus	Unique alleles	Analyse	Download
ST	42		<i>atpA</i>	11		
			<i>ddl</i>	10		
			<i>gdh</i>	11		
			<i>purK</i>	10		
			<i>gyd</i>	5		
			<i>pstS</i>	13		
			<i>adk</i>	8		

Figura 16. Captura de pantalla de las variantes alélicas presentes para cada gen dentro de los aislados de alimentos de *E. faecium* el 1/11/2017.

Fuente: https://pubmlst.org/bigfdb?db=pubmlst_efaecium_isolates&page=query

Tabla 13. Frecuencia de los alelos presentes en las secuencias tipo de ambos quesos en relación con los aislados de alimentos que integran la base de datos.

Alelo	Genes							
	<i>atpA</i>		Alelo	<i>ddl</i>		Alelos	<i>gdh</i>	
	Frecuencia	Porcentaje %		Frecuencia	Porcentaje %		Frecuencia	Porcentaje %
5 _{QC}	12	23.53	2 _{QC}	21	41.8	1 _{QC}	17	33.33
8 _{QB}	7	13.73	*4 _{QB}	10	41.18	12 _{QB y QC}	9	17.65
3 _{QC}	4	7.84	3 _{QC}	8	15.69	5 _{QC}	2	3.92
51 _{QB}	1	1.96	7 _{QC}	1	1.9	25 _{QC}	1	1.96
27 _{QB}	1	1.96	74 _{QC}	1	1.96			
Alelo	<i>gyd</i>		Alelo	<i>pstS</i>		Alelos	<i>adk</i>	
	Frecuencia	Porcentaje %		Frecuencia	Porcentaje %		Frecuencia	Porcentaje %
1 _{QB y QC}	42	82.35	1 _{QB y QC}	20	39.22	1 _{QC}	29	56.86
53 _{QB}	2	3.92	12 _{QC}	1	1.96	*5 _{QB y QC}	13	25.49
Alelos	<i>purK</i>		123 _{QB}	1	1.96			
	Frecuencia	Porcentaje %	124 _{QB}	1	1.96			
*6	12	23.53						
2	7	13.73						
9	7	13.73						
7	2	3.92						

QC queso Cotija; QB queso bola. Sombreados aquellos alelos más frecuentes en la base de datos originarios de alimentos y con * el segundo lugar.

Mediante este análisis fue posible observar que las secuencias tipo de las cepas aisladas de ambos quesos artesanales mexicanos presentan relación entre ellas; así como con otras secuencias tipo con alelos en común, las que en su mayoría forman parte de aislados agrícolas, alimentos y en menor frecuencia de origen hospitalario. Además tiene alelos en común con todas los aislados de alimentos presentes en la base de datos.

7.4 Factores de virulencia

Los genes que codifican para factores de virulencia son generalmente detectados en aislados clínicos; sin embargo, los estudios realizados sobre su prevalencia en alimentos sugieren que algunas cepas de estos aislados las albergan (Bhardwaj *et al.*, 2008). Eaton y Gasson en 2001 demostraron la presencia de factores de virulencia en cepas de enterococos proveniente de aislados clínicos y de alimentos, encontraron que el mayor contenido de dichos factores está presente en *E. faecalis*, con una incidencia mayor en cepas clínicas que en cepas de alimentos. Las cepas *E. faecium* están generalmente libres de factores de virulencia, pero hay notables excepciones cuya presencia puede estar relacionada con la transformación de cepas inocuas a patógenas.

Debido a la presencia de factores de virulencia en algunas cepas aisladas de alimentos, y su capacidad para transferirlos a otras, se evaluó la presencia de tres factores de virulencia que en conjunto potencian su patogenicidad en relación con cualquiera de los factores de forma individual (Gilmore, 2002). El gen *cyIA* que codifica para la citolisina / hemolisina, es una enterocina de tipo lantibiótico de gran importancia debido a su capacidad de lisis celular, y agravamiento de la infección (Franz *et al.*, 2003); por otro lado, se evaluó la presencia del gen *esp* que codifica para la proteína de superficie y el gen *asa1* para la sustancia de agregación. Ambos relacionados con la capacidad de colonizar (Franz *et al.*, 2003; Vankerckhoven *et al.*, 2004). Para ello se realizaron reacciones de PCR punto final empleando los cebadores específicos de cada gen, y como control positivo se emplearon cepas de colección bajo la presencia de dicho factor.

Los resultados revelaron la ausencia de estos factores de virulencia al no obtenerse algún producto de amplificación. Las bandas que se observan en los genes *cyIA* y *esp* son de carácter inespecífico pues no comparten el peso molecular esperado para el factor de virulencia analizado (**Figura 17**).

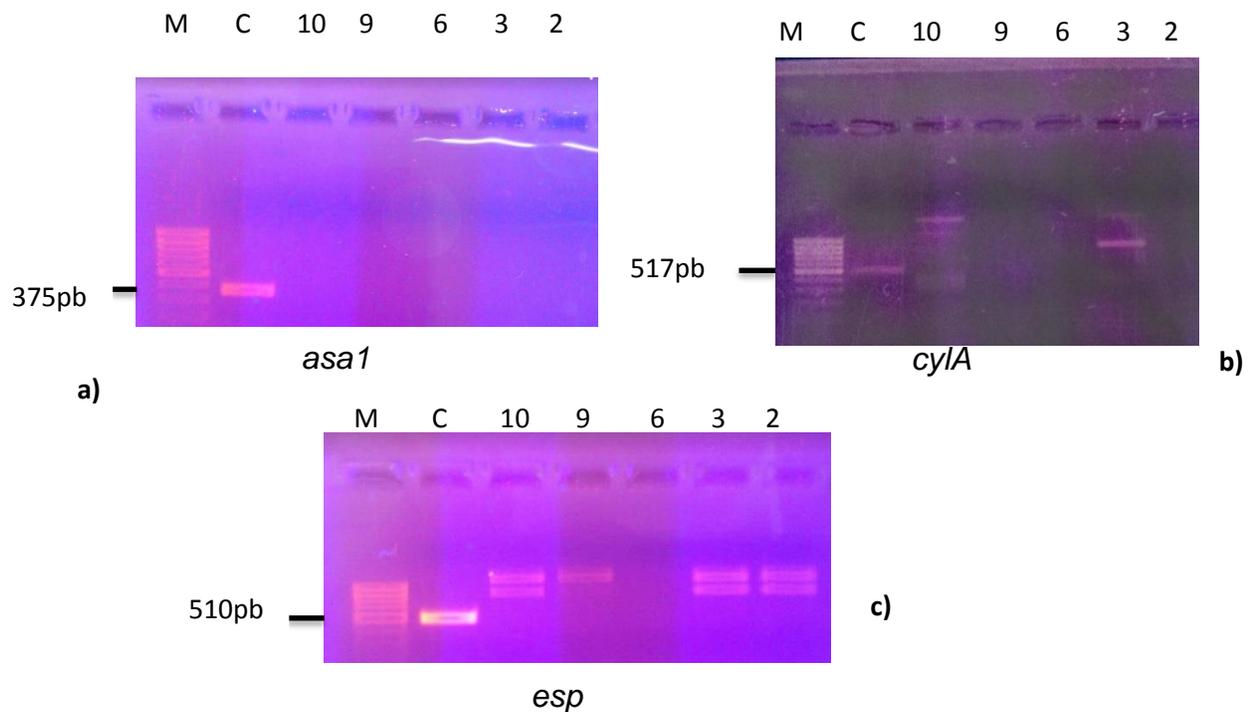


Figura 17. Productos de la reacción de PCR para los factores de virulencia evaluados: *cyIA*, *esp* y *asa1*.
 Inciso a) Presencia del gen *asa1* por parte de la cepa control (ATCC 29212) en 375pb; inciso b) Presencia del gen *cyIA* por la cepa control de *E. faecalis* (NCIMB-700585); e inciso c) Presencia del gen *esp* dado por la cepa A de *E. faecalis*. La M, denota el marcador y la C, la cepa control.

Olvera-García en el 2013, analizó la relación del potencial de virulencia y del efecto antimicrobiano, sin detectar el gen que codifica para la citolisina A (*cyIA*) en las cepas aisladas del queso Cotija. Las cepas B, QD-2, QE-2 y QG-5 amplificaron para el gen que codifica a la sustancia de agregación (*asa*) y la proteína de superficie (*esp*). Olvera-García concluyó que los factores de virulencia detectados se relacionan con la capacidad de colonizar y no existe riesgo de una infección producida por estas cepas (Doman, *et al.*, 2007). Además del papel protagónico que los enterococos pueden desarrollar en la inocuidad del producto, hace que el riesgo de una infección enterococal por el consumo de queso Cotija, sea baja (**Tabla 14**) (Gilmore, 2002).

A pesar de lo que puede representar la detección de factores de virulencia en cepas aisladas de alimentos, no se ha mostrado relación alguna entre el consumo de alimentos que los contengan, y la aparición de infecciones producidas por ellos. Además, la presencia de genes de virulencia no asegura su funcionalidad, pues

los factores ambientales influyen en su expresión genética, y las condiciones utilizadas para las pruebas fenotípicas son diferentes de las que se encuentran en el cuerpo humano (Eaton y Gasson, 2001; Castro *et al.*, 2004; Ogier y Serror *et al.*, 2008).

Tabla 14. Presencia de los genes (*cylA*, *esp* y *asa1*) que codifican para factores de virulencia en las cepas de *E. faecium* del queso Cotija y el queso bola.

Queso	Cepa	<i>cylA</i>	<i>asa1</i>	<i>esp</i>
Queso Cotija (Olvera-García), 2013)	B	-	+	+
	C	-	-	-
	D	-	-	-
	G	-	-	-
	QD-2	-	+	+
	QE-2	-	+	+
	QG-5	-	+	+
Queso bola	10	-	-	-
	9	-	-	-
	6	-	-	-
	3	-	-	-
	2	-	-	-

7.5 Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos es un aspecto relevante en microbiología clínica debido a que este género es ampliamente reportado dentro de los microorganismos resistentes, lo cual afecta no sólo a pacientes vulnerables, sino a todos los seres humanos, ya que limita el uso a ciertos antibióticos.

Se realizó una evaluación cualitativa basada en la capacidad de resistencia o susceptibilidad expresada por las cepas de estudio. Se entiende por resistencia a la capacidad adquirida de un microorganismo para crecer en presencia de un antibiótico, al que habitualmente es sensible, y por susceptibilidad a la ausencia del gen que lo hace resistente (Madigan *et al.*, 2009).

Para ello se realizó una prueba por difusión de disco, en ella se puede observar la generación de un halo inhibitorio generado por el antibiótico en caso de susceptibilidad; de no ser así se observa crecimiento normal.

Todas las cepas del queso bola presentaron resistencia a aminoglucósidos como: kanamicina (8 µg/mL), estreptomina (1 mg/mL) y espectinomicina (1mg/mL); por el contrario para los beta lactámicos todas fueron susceptibles a ampicilina (16 µg/mL), pero las cepas 9 y 3 presentaron resistencia a penicilina (8 µg/mL) con inhibición parcial por parte de la cepa 2; para el macrólido evaluado (Eritromicina 8 µg/mL) únicamente la cepa 9 presentó inhibición parcial; en el caso de la tetraciclina (16 µg/mL) las cepas 10 y 9 fueron resistentes. La cepa 9 fue la única resistente a vancomicina (32 µg/mL) (**Figura 18**); lo cual significa muy probablemente que adquirió un gen de resistencia, ya sea mediante plásmidos o transposones, inhibiendo de esta manera sus capacidad de uso como probiótica o cultivo adjunto (**Tabla 15**). Las cepas aisladas del queso bola mostraron mayor resistencia variable a los antibióticos que las del queso Cotija (Guzmán, 2015).

Del estudio realizado por Olvera-García en el 2013 sobre la evaluación de la inocuidad de *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija, los resultados revelaron que ninguna cepa poseía la capacidad de crecer en presencia de las concentraciones evaluadas del antibiótico vancomicina.

La detección frecuente de resistencia a los antibióticos entre los enterococos de origen lácteo probablemente se deba a los mecanismos de transferencia de los genes de resistencia a través de plásmidos conjugativos y transposones. Convirtiendo a los alimentos en fuentes de diseminación tanto de factores de virulencia, como de genes resistentes a antibióticos sin ser causa directa de infección (Ogier y Serror, 2008).

Tabla 15. Antibióticos evaluados en las cepas de *E. faecium* aisladas del queso bola y queso Cotija.

		Antibióticos							
		*Aminoglucósidos			Glucopéptido	βlactámicos			
Queso	Cepa	Kanamicina	Espectinomicina	Estreptomina	Vancomicina	Ampicilina	Penicilina	Eritromicina	Tetraciclina
QC (Olvera-García, 2013)		8µg/mL	1mg/mL	1mg/mL	32µg/mL	16µg/mL	8µg/mL	8µg/mL	16µg/mL
	B	R		R				R	
	C	R		R				R	
	D	R		R				R	
	G	R		R				R	
	QD-2	R	R	R					
	QE-2	R	R	R					
	QG-5	R	R						
QB	10	R	R	R				R	R
	9	R	R	R	R		R	IP	R
	6	R	R	R				R	
	3	R	R	R			R	R	
	2	R	R	R			IP	R	

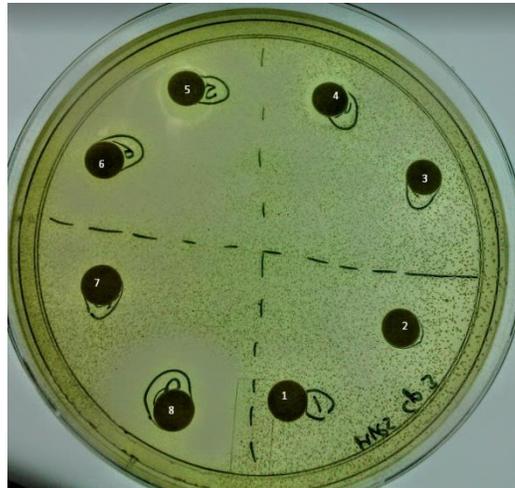
R= Resistencia *Resistencia intrínseca; S= Susceptible; IP= Inhibición Parcial



Ceba 9



Ceba 6



Ceba 3

Figura 18. Prueba de resistencia a antibióticos por difusión en disco de las cepas 9, 6 y 3 de *E. faecium*.

Los antibióticos enumerados kanamicina (1); eritromicina (2); estreptomicina (3); vancomicina (4); penicilina (6); Espectinomicina (7); tetraciclina (8).

8. Reflexión final

Si bien, algunas cepas aisladas de queso presentaron resistencia a los antibióticos evaluados, estas concentraciones son bajas en comparación a las toleradas por cepas de hospitales. Esta resistencia confiere una propiedad ventajosa, la cual ejerce una presión selectiva y favorece a la cepa portadora del plásmido: capacidad adquirida que facilita la oportunidad de causar enfermedad por aquellas cepas que además poseen factores de virulencia; por lo que a nivel mundial el brote de estas cepas es importante (Ryan et al., 2010).

El aumento de las infecciones por enterococos adquiridas en el hospital ha sido, en parte, debido al aumento del uso de antibióticos de amplio espectro por el creciente número de pacientes gravemente enfermos y en alimentos para animales. Los enterococos no sólo son intrínsecamente resistentes a varios antibióticos, también se caracterizan por una capacidad potente y única para transferir material genético, debido a que los determinantes genéticos de resistencia de estas bacterias se encuentran generalmente en plásmidos conjugativos o transposones, propensos a transferencia genética (Gomes *et al.*, 2008). El incremento de la presencia de cepas resistentes a la ampicilina, aminoglucósidos y glucopéptidos (vancomicina) plantea serias dificultades en la terapia clínica. Además, la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en animales destinados al consumo humano, parece haber creado grandes reservas de resistencia a los mismos, transferibles a diversos ecosistemas. Por lo tanto, la barrera que separa los enterococos como contaminantes inofensivos de cepas patógenas parece más frágil. En el caso de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina, la mayor amenaza es la posibilidad de transferir sus genes de resistencia a bacterias Gram-positivas patógenas, lo que podría producir agentes infecciosos verdaderamente atemorizantes (Giraffa, 2002).

Afortunadamente, estas características importantes son dependientes de la cepa. Por estas razones, la selección de cepas de *Enterococcus* de interés en la industria alimentaria, como probiótico o cultivo iniciador, debe basarse en la

ausencia de cualquier posible propiedad patogénica, o de genes de resistencia a antibióticos transferibles (Foulquié *et al.*, 2006).

9. Conclusiones

- Las cepas de *E. faecium* aisladas del queso bola de Ocosingo presentaron colonias típicas en medio KAA, morfología propia (cocos y diplococos), Gram positivos, catalasa negativos, así como el crecimiento en intervalos de temperatura, pH y concentración de NaCl que los diferencia de otros cocos Gram positivos.
- La caracterización genotípica realizada mediante el MLST a cada cepa, dieron origen a tres alelos nuevos *gyd* (53) y *pstS* (123 y 124), los cuales originaron tres nuevas secuencias tipo (ST) 1293, 1294 y 1295; y la ST 130 previamente descrita por la base de datos.
- Existe relación alélica entre las STs del queso bola con las presentes en la base de datos asociadas a alimentos, como con las del queso Cotija evaluado por Guzmán en 2015.
- Los perfiles alélicos de las cepas analizadas, resultado de su tipificación genotípica, las hacen diferentes al CC17 atribuido a cepas causantes de infecciones en pacientes hospitalizados.
- Considerando la ausencia de factores de virulencia y baja resistencia adquirida a los antibióticos, se podría considerar que las cepas aisladas del queso bola de Ocosingo no representan un riesgo para la salud del consumidor.

12. Bibliografía

- **Alais, C., Lacasa, A. (1985).** *Ciencia de la Leche: principios de técnica lechera*. Cuarta edición. París: Reverte.p.p. 617.
- **Bhardwaj, A., Malik, R. K. & Chauhan, P. (2008).** Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. *Indian Journal Microbiology*. 48, 317–325.
- **Biavasco, F., Foglia, G., Paoletti, C., Zandri, G., Magi, G., Guaglianone, E., Sundsfjord, A., Pruzzo, C., Donelli, G., Facinelli, B. Facinelli. (2007).** VanA-type enterococci from humans, animals, and food: Species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3307–3319.
- **Bonacina, J., Suarez, N., Hormigo, R., Fadda, S., Lechner M. & Saavedra, L. (2016).** A genomic view of food-related and probiotic Enterococcus strains. *DNA Research*, 24(1), 11–24.
- **Bravo, A. (2008).** “Estudio de las Poblaciones Microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- **Burgos, M. J. G., Aguayo, M. C. L., Pulido, R. P., Gálvez, A. & López, R. L. (2014).** Multilocus sequence typing and antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* isolates from fresh produce. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105, 413–21.
- **Camargo, I. L. B. C., Gilmore, M. S., Darini, A. L. C. (2006).** Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(11), 1123–1130.
- **Castro, A., Nabil, O., Lucas, R., Abriouel, H., Gutiérrez, Ma. T., Martínez-Cañamero, M., Pérez-Pulido, R., Grande, Ma. J., Gálvez del Postigo, A. (2004).** *El género Enterococcus en microbiología de los Alimentos*. Universidad de Jaén. ISBN 84-8439-229-5, p.p. 9-49.

- **Cercenado, Emilia. (2011).** Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 59–65.
- **Cervantes, E. F., Villegas de gante, A., Cesín, V. A. y Espinoza, O. A. (2013).** Los quesos mexicanos genuinos (Patrimonio cultural que debe rescatarse). Guadalajara Jalisco: bba. p.p. 89-92.
- **CLSI—Clinical & Laboratory Standards Institute. (2015).** Tablas 2A–2J. Zone Diameter and Minimal Inhibitory Concentration Interpretive Standards for: Enterococcus spp. M100-S25. Wayne, Pennsylvania.
- **Domann, E., Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C., Zimmermann, K. y Chakraborty T. (2007).** Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *International Journal of Medical Microbiology*. 297, 533–539.
- **Doyle, P.M., Beauchat, R.L, Monteville J.T. (2001).** *Microbiología de los alimentos (fundamentos y fronteras)*. Zaragoza: Acríbia.p.p.79.
- **Dumais, R. (1991).** *Ciencia y tecnología de la leche (Principios y aplicaciones)*. Zaragoza: Acríbia. p.p. 249.
- **Eaton, T. J. & Gasson, M. J. (2001).** Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates Appl. *Environmental Microbiology*, 67, 1628–1635.
- **Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P. & Spratt, B. G. (2004).** eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, 186 (5), 1518–1530.
- **Foulque-Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006).** The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106 (1), 1–24.
- **Franz, M.A.P., Holzapfel, W. H., Stiles M.E. (1999).** Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1–24.

- **Franz, C. M., Specht, I., Haberer, P. & Holzappel, W. H. (2001).** Bile salt hydrolase activity of Enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. *Journal Food Protection*, 64 (5), 725–729.
- **Franz, C.M.A.P., Stilesb, M.E., Schleiferc, K.H., Holzapfela, W.H., (2003).** Enterococci in foods - A conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2–3), pp.105–122.
- **Franz, C. M. A. P., Van Belkum, M. J., Holzappel, W. H., Abriouel, H. & Gálvez, A. (2007).** Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology*, 31, 293–310.
- **Freitas, A. R., Novais, C., Ruiz-Garbajosa, P., Coque, T. M. & Peixe, L. (2009).**Dispersion of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to major clonal complexes in different Portuguese settings. *Environmental Microbiology*, 75 (14), 4904–4908.
- **Freitas, A. R., Tedim, Ana P., Novais C., Ruiz-Garbajosa, P., Werner, G., Laverde-Gomez, J., Canto, R., Peixe, L., Baquero, F. & Coque, M.T. (2010).** Global spread of the hylEfm colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (6), 2660–2665.
- **Galloway-Peña, J., Roh, J. H., Latorre, M., Qin, X. & Murray, B. E., (2012).** Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of enterococcus faecium. *Hospital and Community Clades of E. faecium*, 7.
- **Garza-Velasco, R. (2015).** *Principales patógenos bacterianos que presentan forma esférica cocobacilar o curva.* Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, p.p. 62-80.
- **Giraffa, G. (2002).** Enterococci from foods. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews*, 26 (2),163–171.
- **Giraffa, G. (2003).** Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of food microbiology*, 88 (2–3), 215–222.
- **Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I. C.V., Darini, A.L.C., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franco, D. G. M. B., De Martinis, E.C.P. (2008).** Prevalence

and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*. 25, 668–675.

- **Gilmore, Michael S. (2002).** *The Enterococci. Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Ass Press. Washington, D.C, U.S.A. ISBNI 55581-2347.
- **Grajales S. (2016).** Informe de Estancia Estudiantil. Ciudad de México.
- **Guzmán, A. (2015).** Estudio Genético Poblacional de Cepas de *Enterococcus faecium* Aisladas de queso Cotija artesanal madurado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química .UNAM.
- **Hernández, M. A. (2016).** *Microbiología de los alimentos: Fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud*: Panamericana. p.p. 149-152.
- **Homan, W.L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., van Embden, J.D.A & Willems, R.J.L. (2002).** Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 1963–71.
- **Khan, S. A., Nawaz, M. S., Khan, A. A., Hopper, S. L., Jones, R. A., Cerniglia, C. E. (2005).** Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: Detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 19 (19), 27–34.
- **Kim, E. B., Jin, G-D., Lee, J-Y., Choi, Y-J. (2016).** Genomic Features and Niche-Adaptation of *Enterococcus faecium* Strains from Korean Soybean-Fermented. *Genomes of Soybean E. faecium*, 11(4), 1–13.
- **López-Cerero, L., Fernández-Cuenca, F. & Pascual, A. (2013).** El laboratorio de Microbiología en la vigilancia y el control de las infecciones nosocomiales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 44–51.
- **Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. Brock. (2009).** *Brock Biología de los Microorganismos*. 12ª edición. Prentice-Hall. Madrid, p.p. 310-430.
- **Mac Faddin, J. F. (2003).** Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia Clínica. 3a edición, Madrid: Panamericana. p.p. 8.

- **Ogier, J. C. & Serror, P. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126, 291–301.
- **Olvera-García, M. (2013).** Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus ssp.* Aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- **OMS_(a) Organización Mundial de la salud. (2017).** La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [En línea] (Actualizado al 26 de Abril de 2017). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>).
- **OMS_(b) Organización Mundial de la salud. (2017).** Resistencia a los antibióticos [En línea] (Actualizado al 26 de Abril de 2017). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>).
- **Quiñones, D., Kobayashi, N. & Nagashima, S. (2009).** Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. *Microbial Drug Resistance*, 15, 287–93
- **Ramos V. (2016).** Informe de Estancia Estudiantil. Ciudad de México.
- **Ruiz-Garbajosa, P., Coquea, T. M., Cantóna, R., Willemsb, Rob J.L., Baqueroa, F., Del Campo, Rosa. (2007).** Los complejos clonales de alto riesgo CC2 y CC9 están ampliamente representados en cepas hospitalarias de *Enterococcus faecalis* aisladas en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25, 513–518.
- **Ryan, Kenneth J., Ray, C. Gorse., Ahmad, Nafees., Drew, W. C., Plorde, James J. (2010).** Sherris *Microbiología Médica*. 5ta edición: MC Graw Hill.
- **Salminen, S., Lahtinen S., Ouwehand, A.C., Wright, A. von. (1998).** Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Edt.CRC-PRESS.
- **Sharifi, Y., Hasani, A., Ghotaslou, R., Varshochi, M., Hasani, A., Aghazadeh, M., Milani, M. (2012).** Survey of Virulence Determinants among Vancomycin Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus*

faecium Isolated from Clinical Specimens of Hospitalized Patients of North west of Iran. *The Open Microbiology Journal*, 6, 34–9.

- **Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013).** Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2, (2) 70-78.
- **Thermo Fisher scientific.** En línea, <http://www.thermofisher.com> (consultado el 3 enero de 2018).
- **The OXOID Manual. (2006).** 9th Ed. United Kingdom.
- **Torres, E., Pérez, S., Vindel, A., Rodríguez-Bañod, J., Camba V., Villanueva, R., Coque, T.M. & Bou G. (2009).** *Enterococcus faecium* resistente a glucopéptidos en un hospital del norte de España. Caracterización molecular y epidemiológica clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27, 511–517.
- **Vankerckhoven, V., Van Outgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D. & Goossens, H. (2004).** Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 4473–4479
- **Villegas de Gante, Abraham; Cervantes Escoto, Fernando; Cesín Vargas, Alfredo; Espinoza Ortega, Angélica; Hernández Montes, Arturo; Santos Moreno, Armando y Martínez Campos, Ángel. (2014).** *Atlas de los Quesos Mexicanos Genuinos*. Texcoco, Estado de México: Colegio de Postgraduados. ISBN 978-607-715-205-7.p.p. 53-60.
- **Willems, R. J. L., Homan, W., Top, J., van Santen-Verheuevel, M., Tribe, D., Manzioros, X., Gaillard, C., Vandenbroucke-Grauls., M.J.E.C., Mascini, E., van Kregten, E., van Embden, J., Bonten, M. (2001).** Variant *esp*. gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *The Lancet*, 357, 853–855.

- **Willems, Rob JL. & Willem van Schaik. (2009).** Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiology*, 4(9), 1125-1135
- **Willems, R.J.L., Top, J., van Schaik, W., Leavis, H., Bonten, M., Sirén, J., Hanage, W.P. & Coranderb, J. (2012).** Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *mBio*, 3 (4), pp.1–10.

Fuentes de Internet

- Base de datos **MLST**

Esta publicación hizo uso del sitio web *Enterococcus faecium* MLST (<https://pubmlst.org/efaecium/>) ubicado en la Universidad de Oxford (Jolley & Maiden 2010, BMC Bioinformatics, 11: 595). El desarrollo de este sitio ha sido financiado por Wellcome Trust.

(<http://efaecium.mlst.net/>)

- **MultAlin**

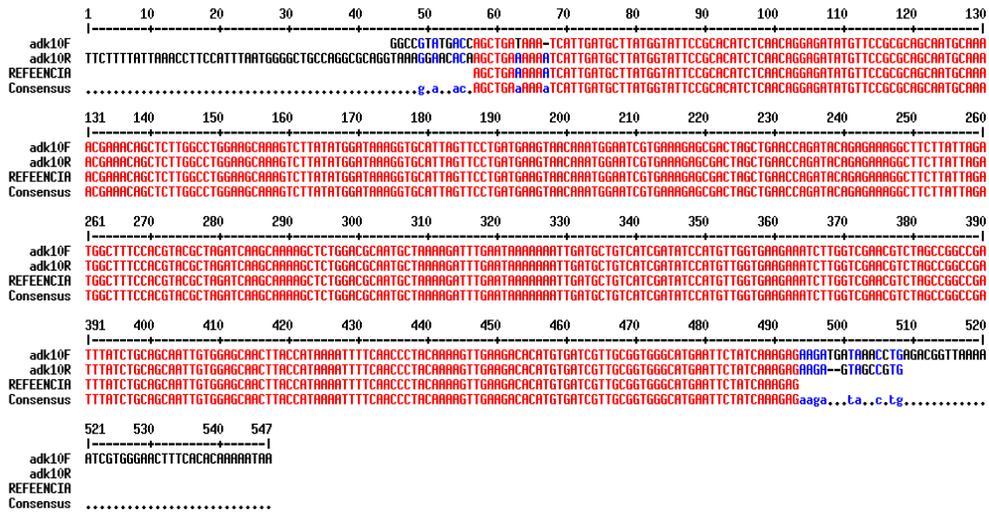
(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)

13. Anexo

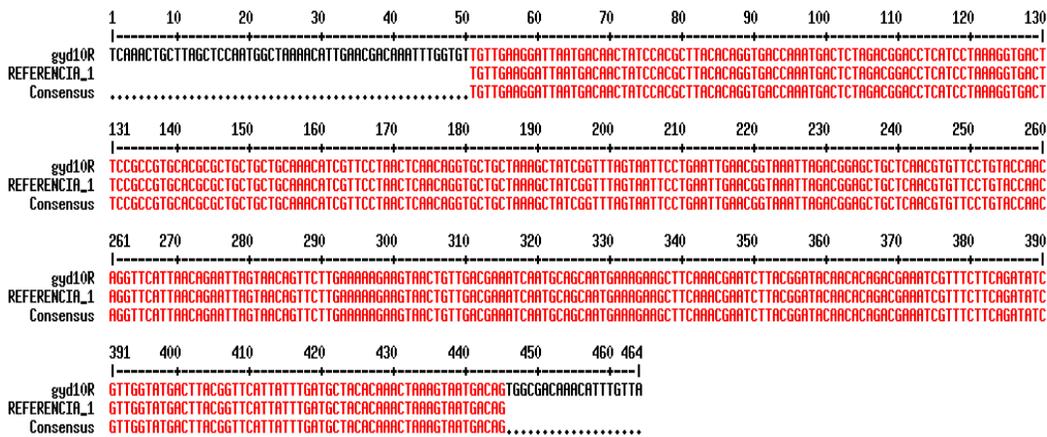
Secuenciación y alineamiento de los siete genes de mantenimiento necesarios para la tipificación por secuenciación multilocus (MLST), procedentes del aislamiento de las cinco cepas evaluadas en el presente estudio. Todas alineadas con el alelo presente por la base de datos.

Cepa 10

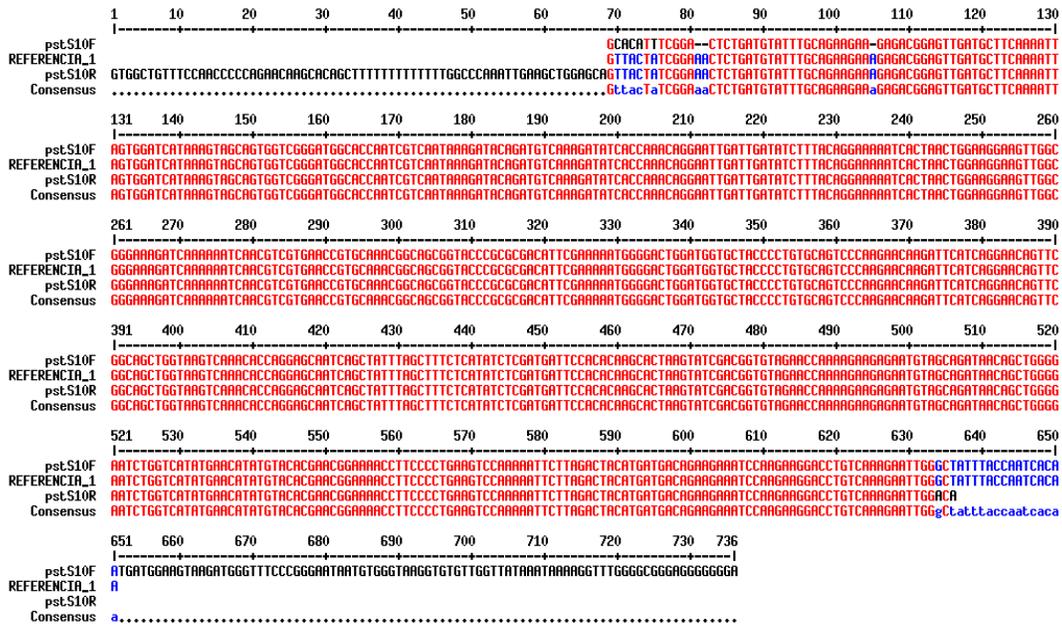
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *adk* de la cepa 10



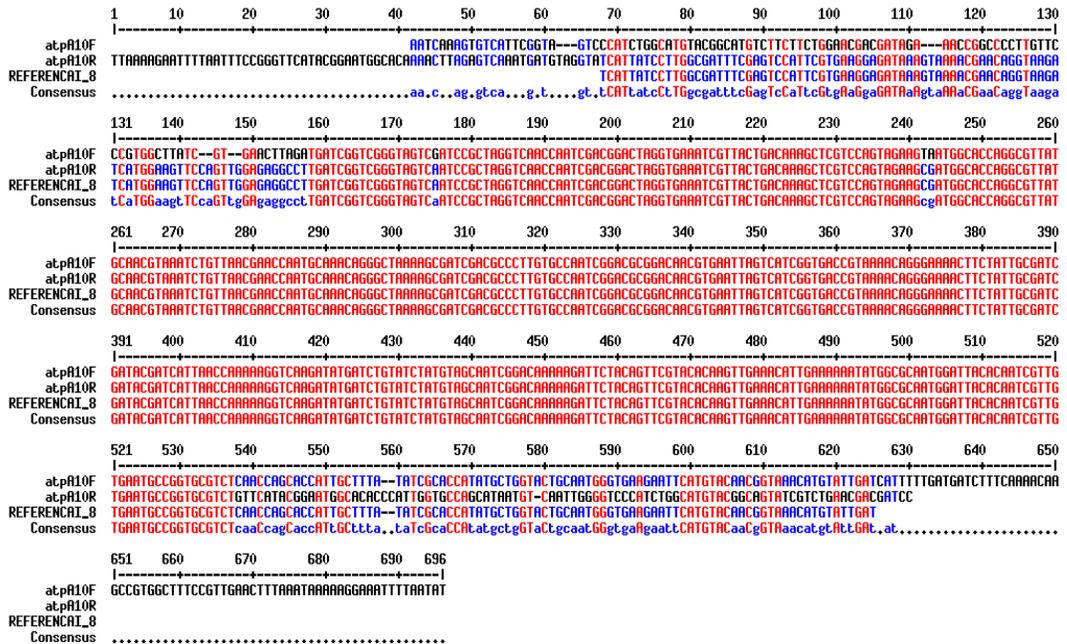
Alineamiento de las secuencias (reversa) del gen *gyd* de la cepa 10



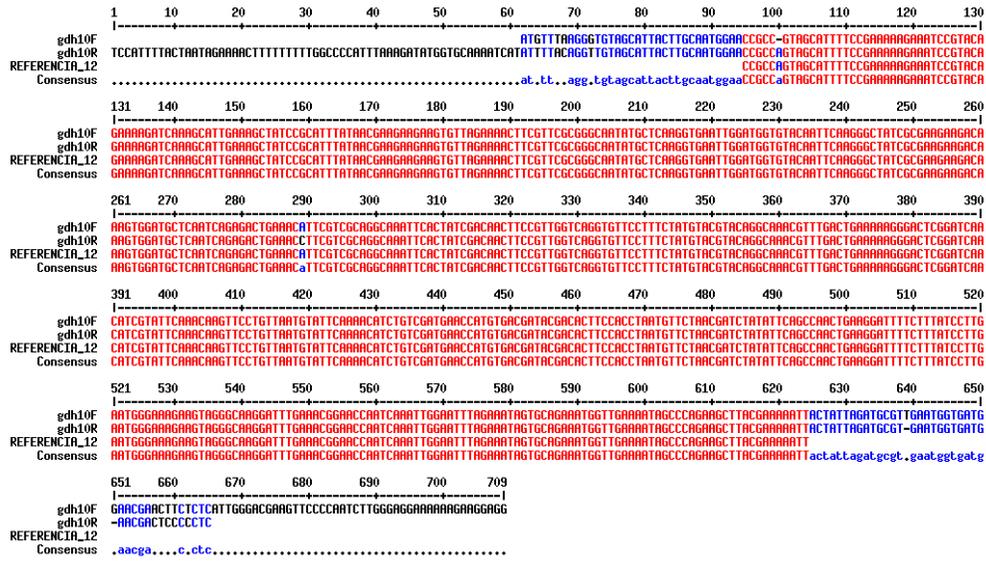
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *psts* de la cepa 10



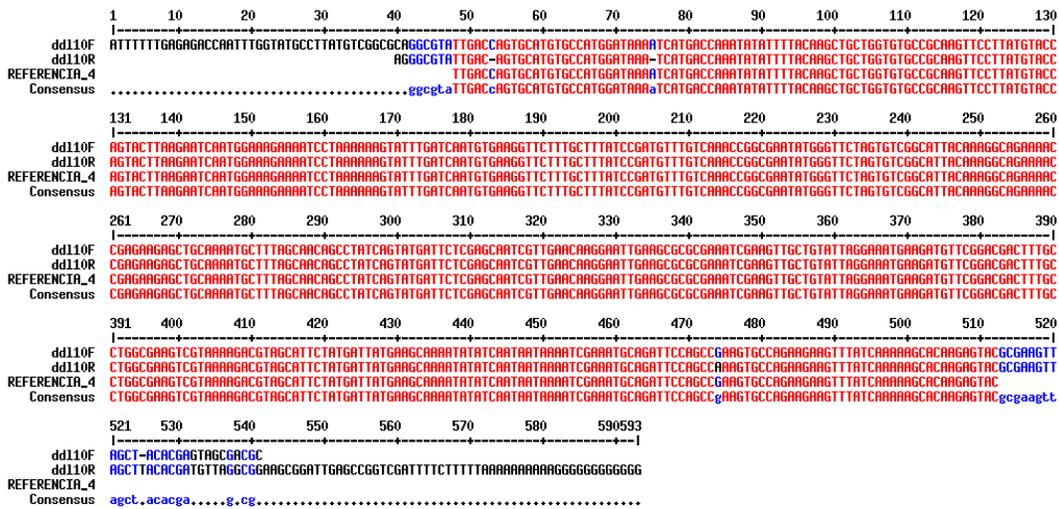
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *atpA* de la cepa 10



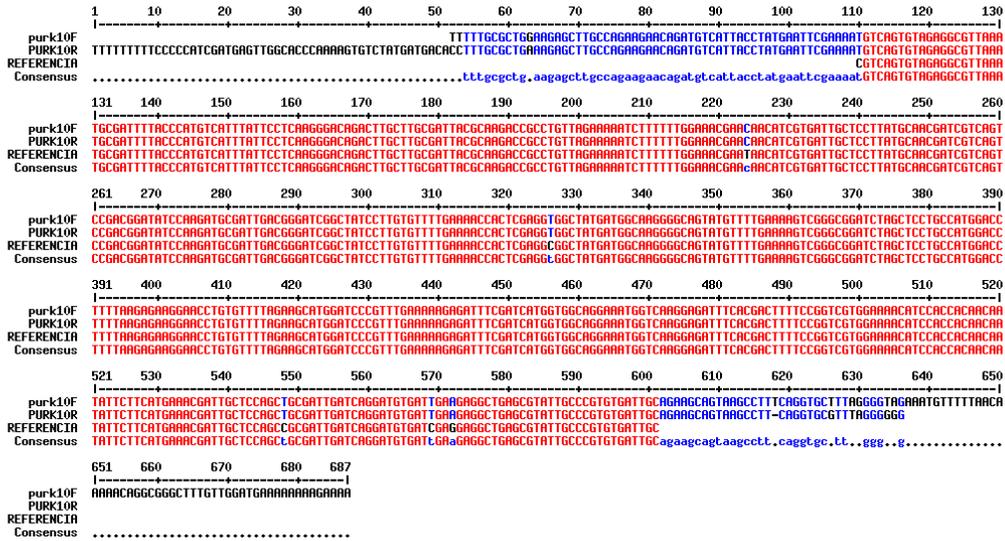
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *gdh* de la cepa 10



Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *ddl* de la cepa 10

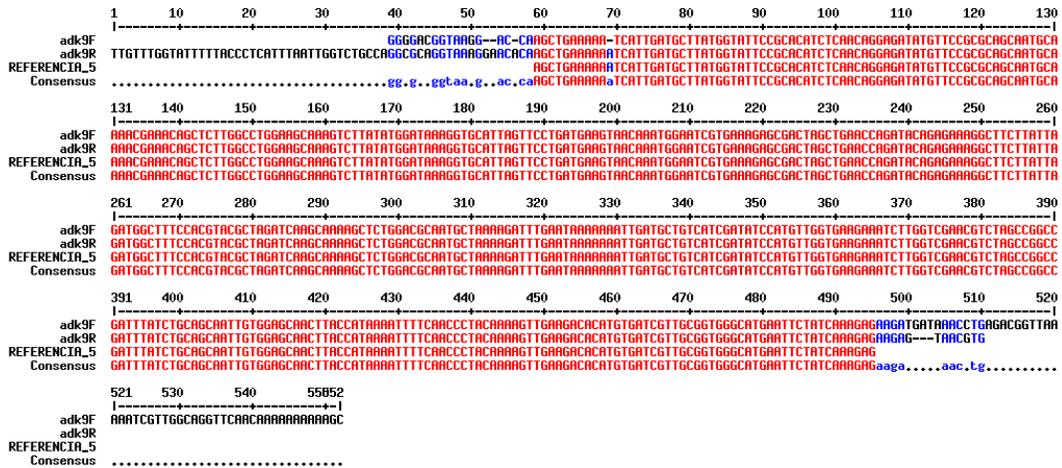


Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *purk* de la cepa 10

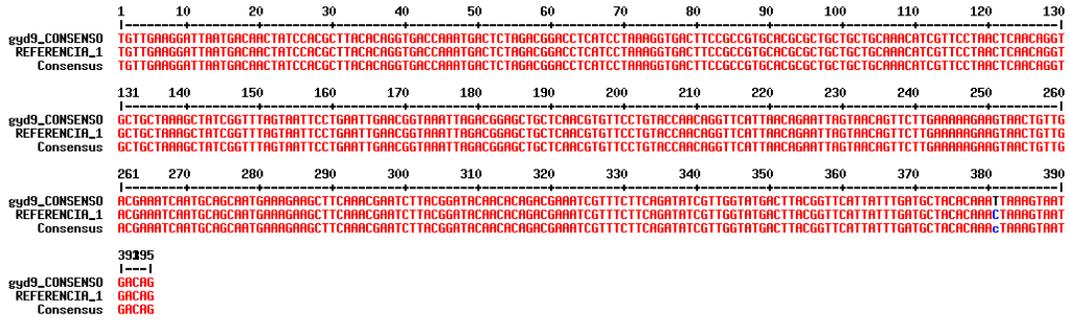


Cepa 9

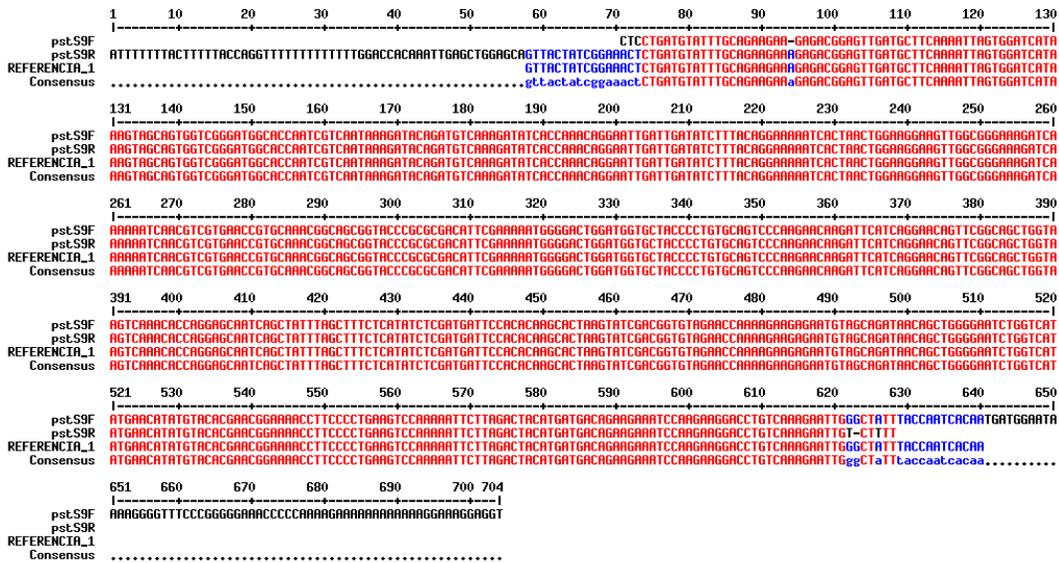
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *adk* de la cepa 9



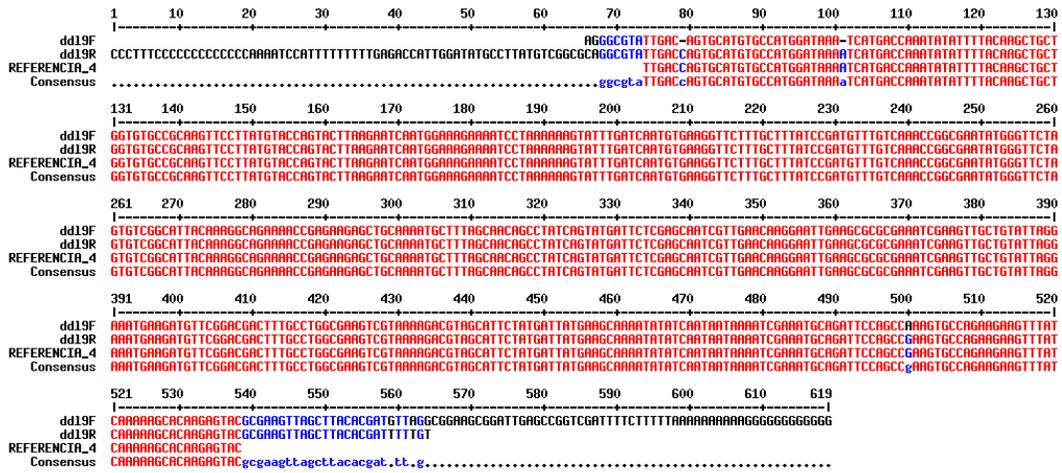
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *gyd* de la cepa 9



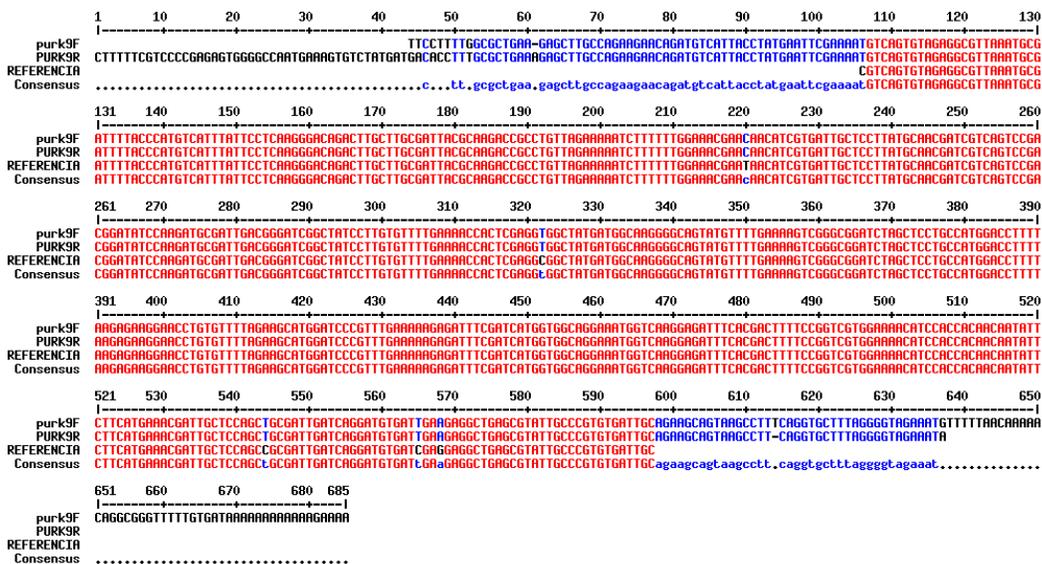
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *pstS* de la cepa 9



Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *ddl* de la cepa 9

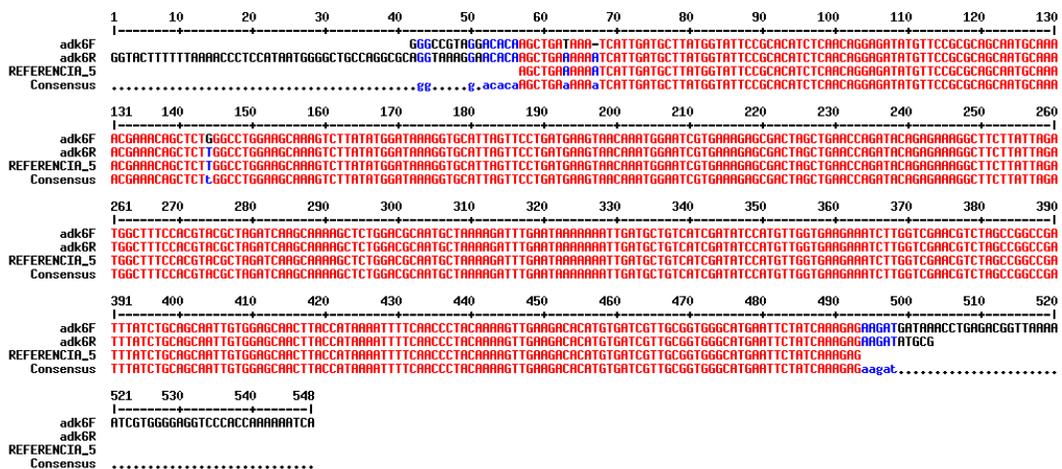


Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *purk* de la cepa 9

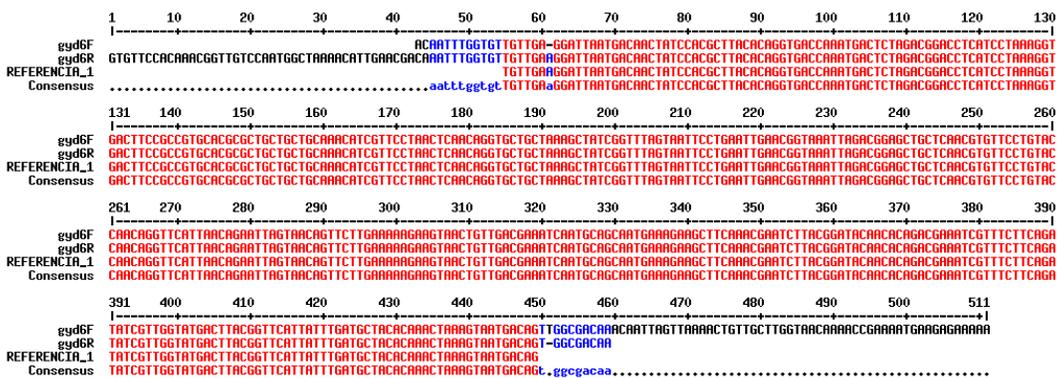


Cepa 6

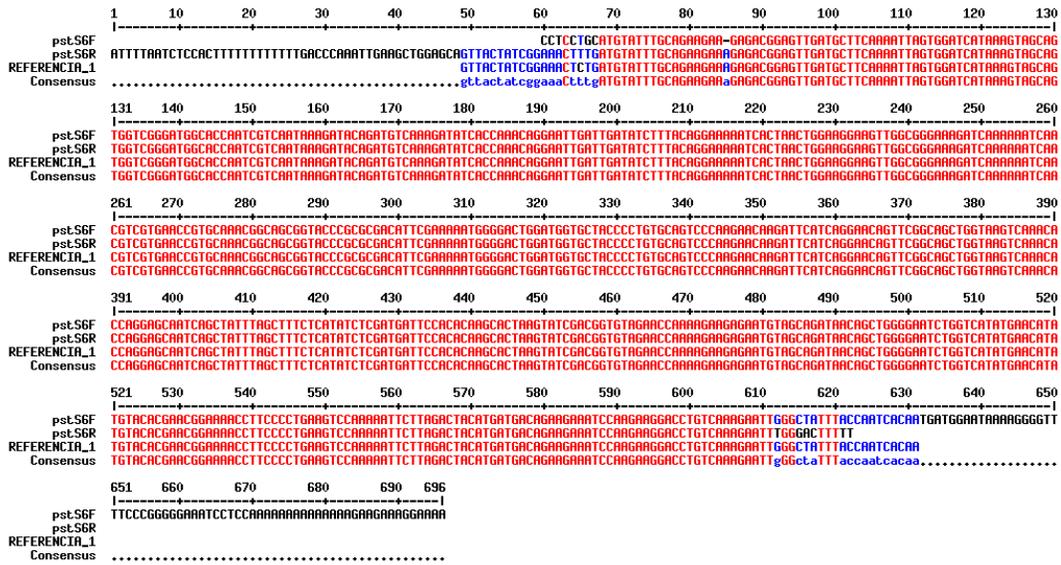
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *adk* de la cepa 6



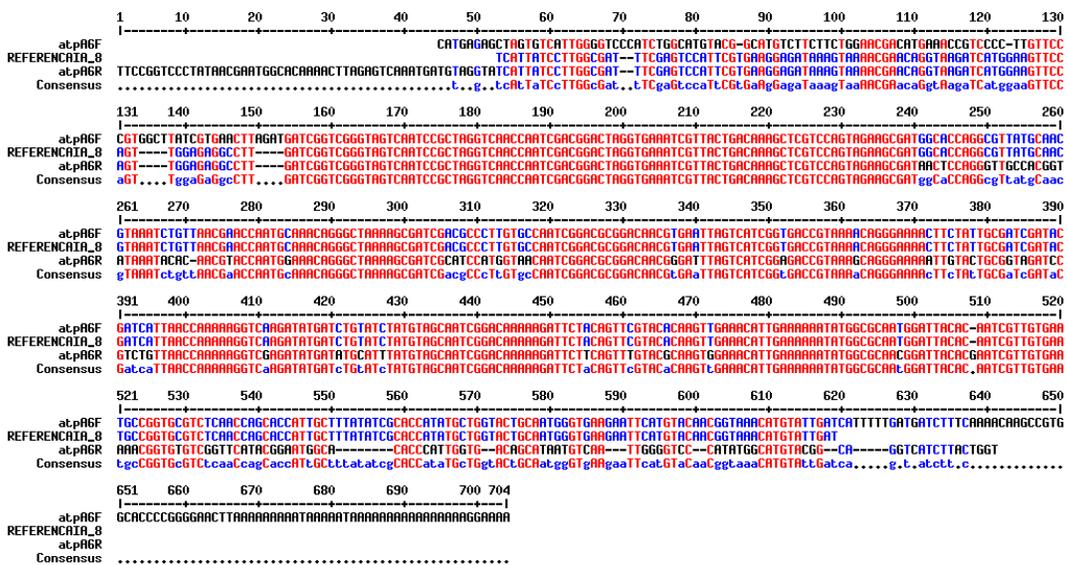
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *gyd* de la cepa 6



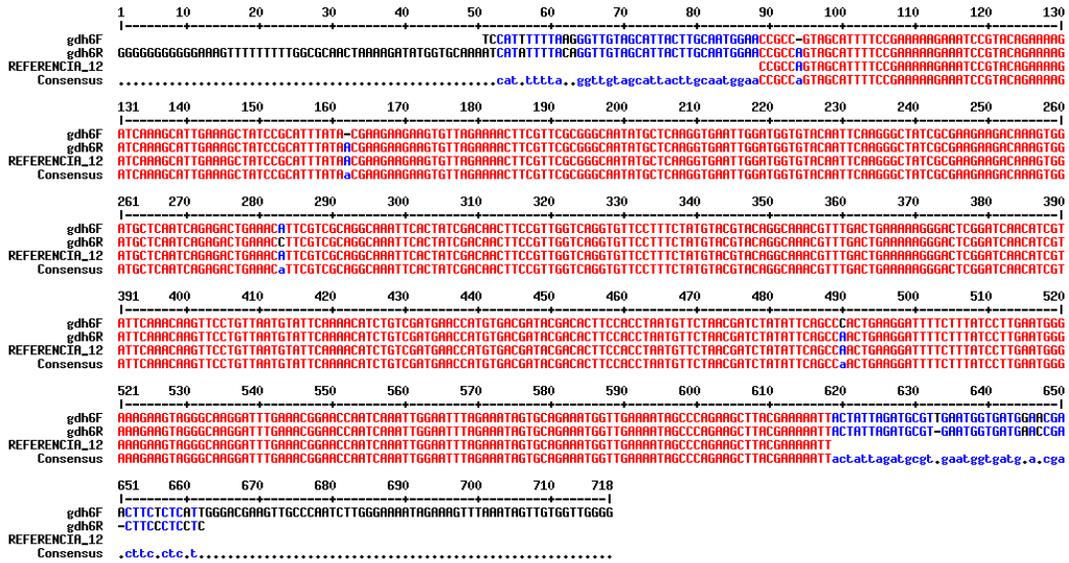
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *pstS* de la cepa 6



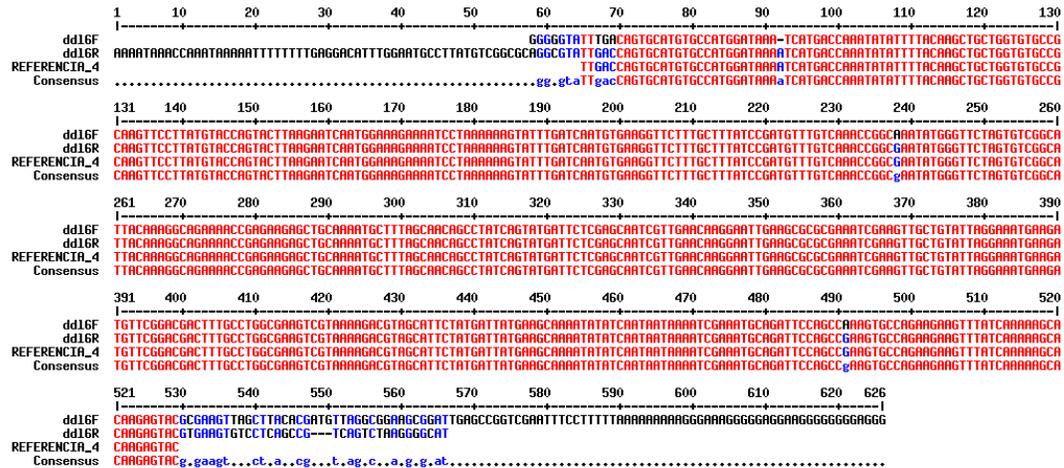
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *atpA* de la cepa 6



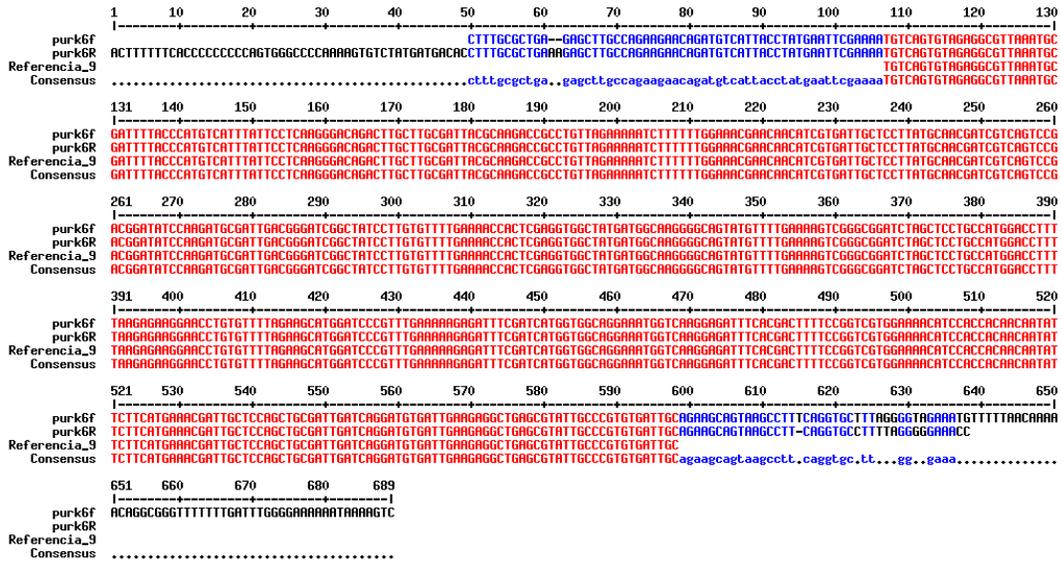
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *gdh* de la cepa 6



Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *ddl* de la cepa 6

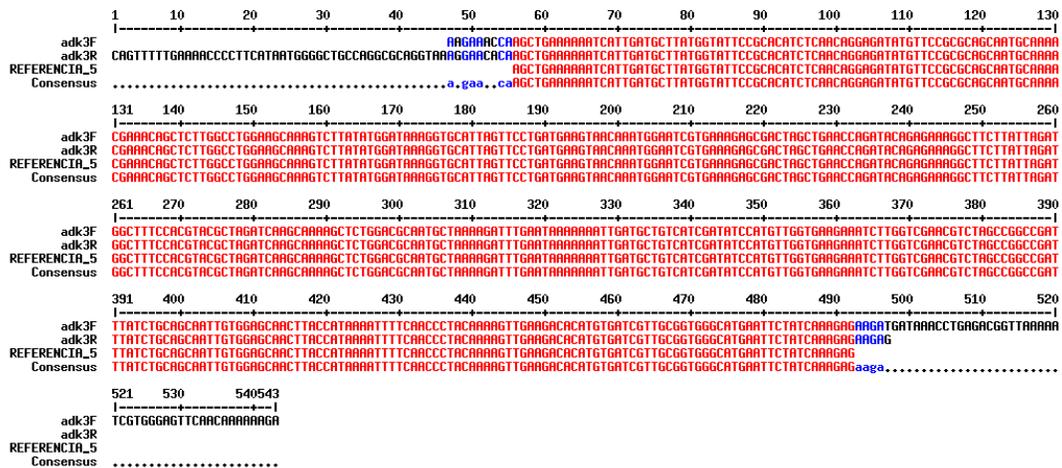


Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *purk* de la cepa 6

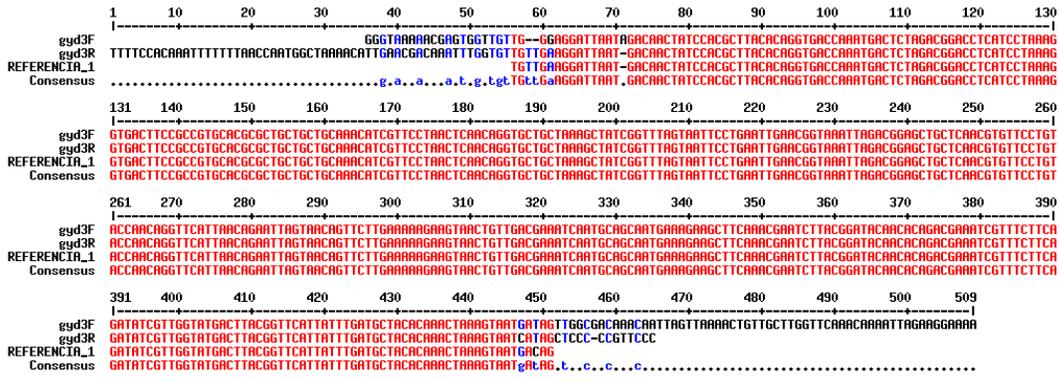


Cepa 3

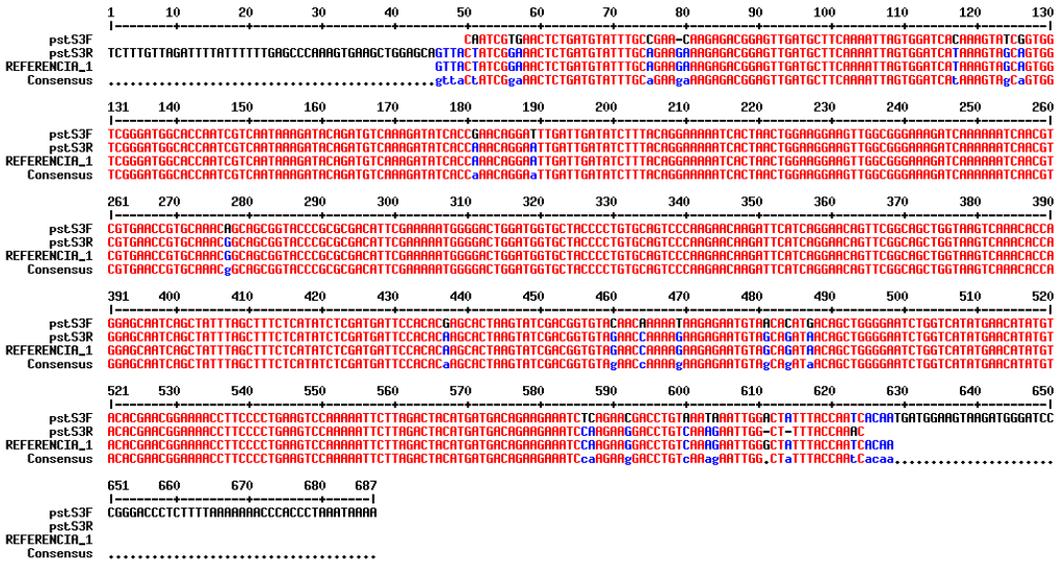
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *adk* de la cepa 3



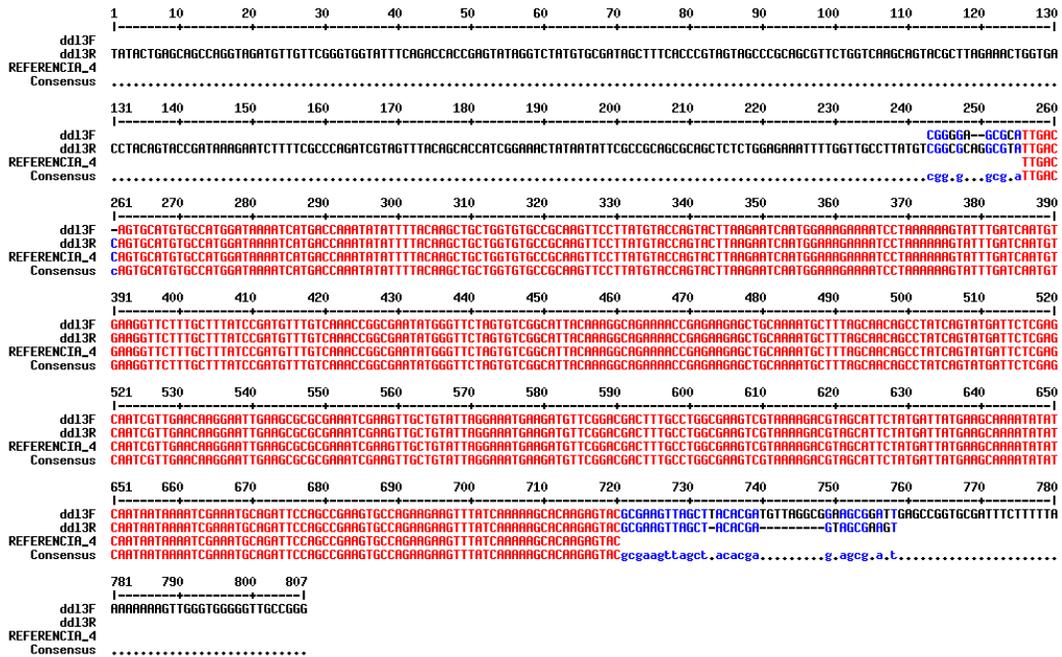
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *gyd* de la cepa 3



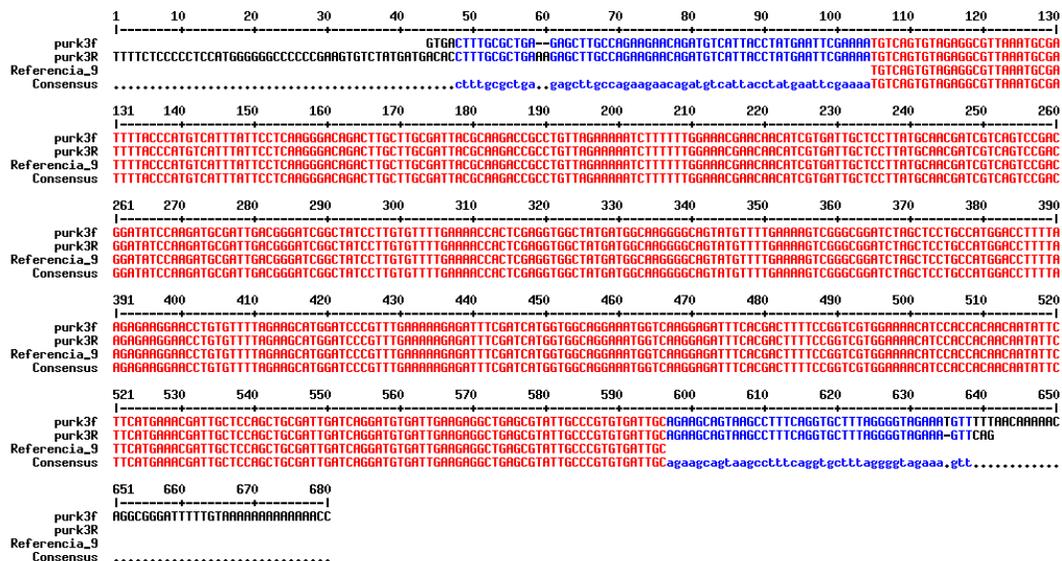
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *pstS* de la cepa 3



Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *ddl* de la cepa 3

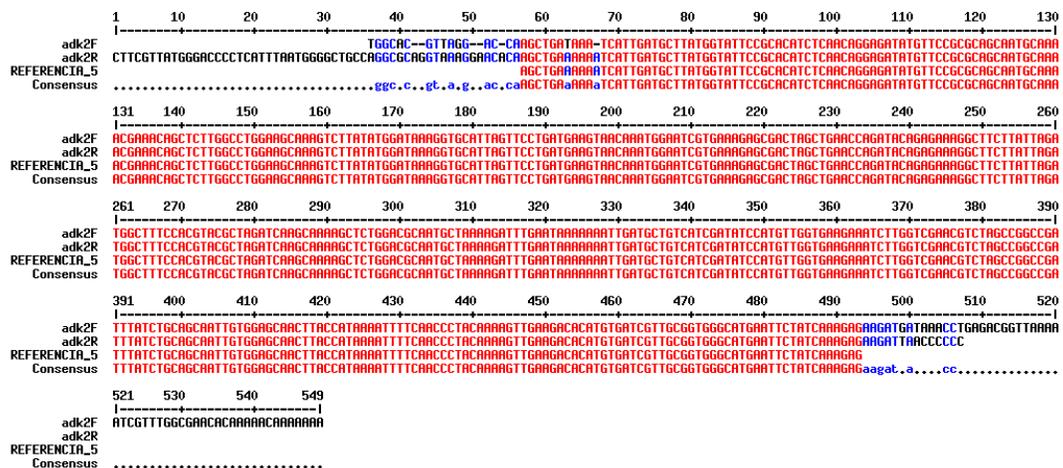


Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *purk* de la cepa 3

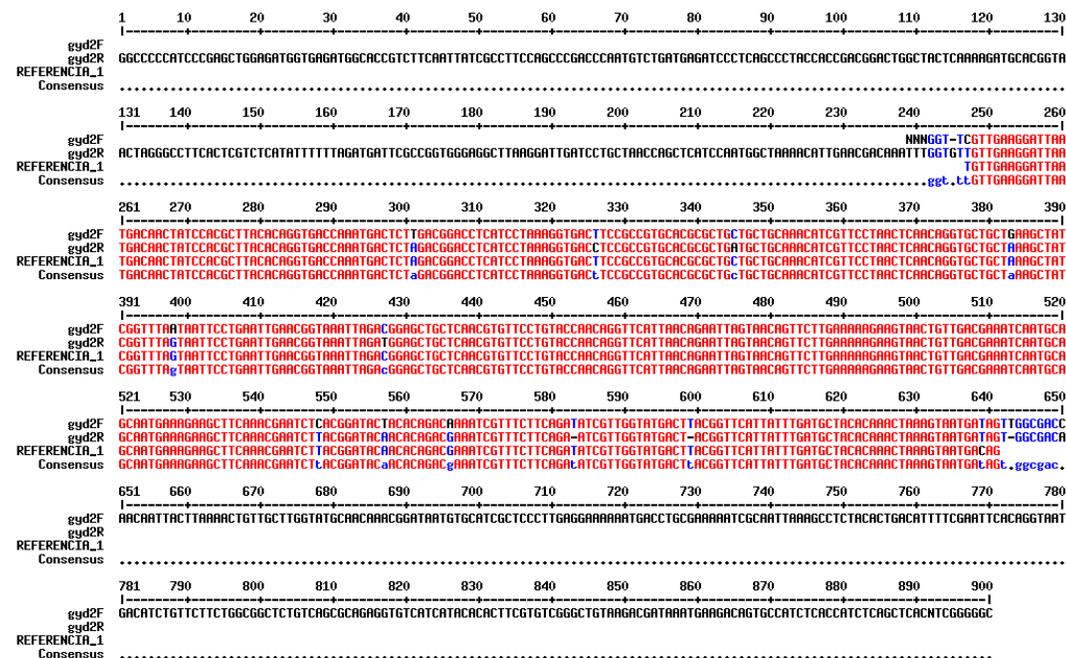


Cepa 2

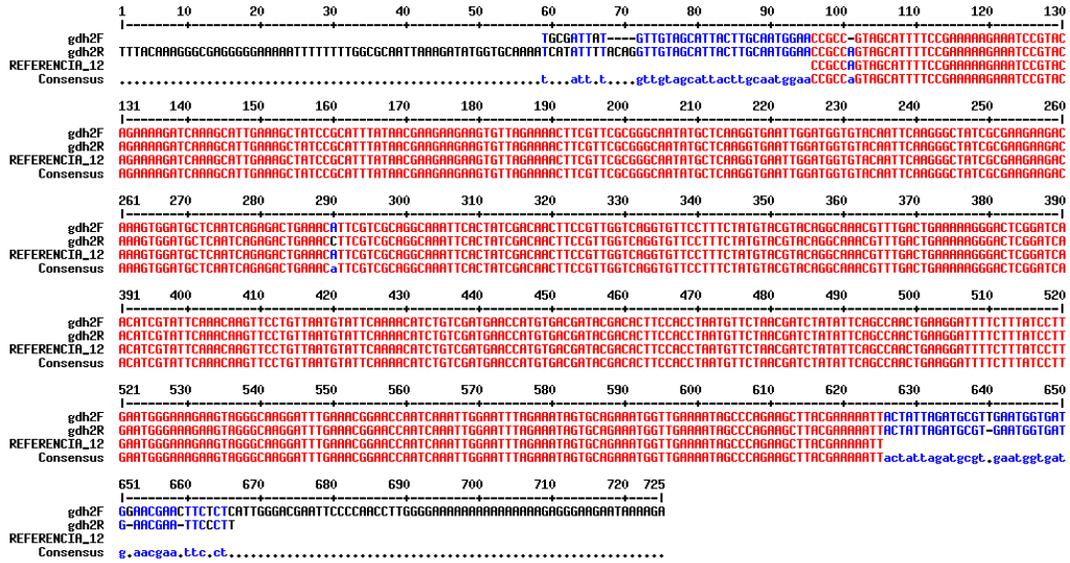
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *adk* de la cepa 2



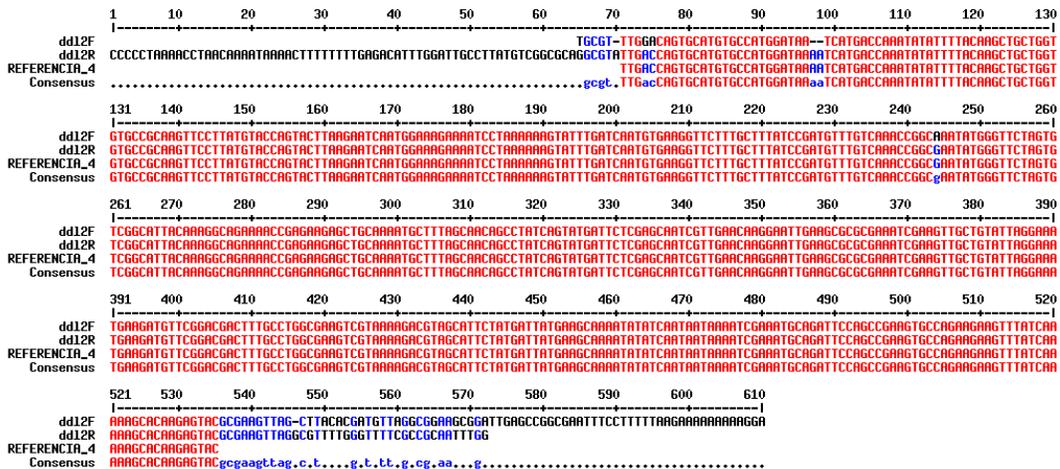
Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *gyd* de la cepa 2



Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *gdh* de la cepa 2



Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *ddl* de la cepa 2



Alineamiento de las secuencias (directa y reversa) del gen *purk* de la cepa 2

