



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE
CEPAS DE *ENTEROCOCCUS* DE ORIGEN ALIMENTARIO.**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

CARLOS MENDOZA ESLAVA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: GLORIA GUTIEREZ VENEGAS
VOCAL:	Profesor: MARTHA GILES GOMEZ
SECRETARIO:	Profesor: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
1er. SUPLENTE:	Profesor: ANA LILIA CRUCES MARTINEZ
2° SUPLENTE:	Profesor: FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

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.

Esta tesis fue financiada por el proyecto DGAPA PAPIIT IN222717 “Estudio y aplicaciones de las proteínas y péptidos obtenidos del metagenoma y bacterias de quesos tradicionales mexicanos” y por el programa de apoyo a la investigación y el posgrado (PAIP-FQ), con la clave 5000-9102. El alumno recibió beca del proyecto PAPIIT IN222717.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Cindy Adriana Estrada Hernández

SUSTENTANTE:

Carlos Mendoza Eslava

INDICE

1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCION.....	3
3.- MARCO TEORICO	4
3.1.- El género <i>Enterococcus</i>	4
3.2.- Participación de <i>Enterococcus</i> en los alimentos fermentados.....	5
3.3.- Producción de compuestos antibacterianos	6
3.3.1.- Peptidoglucano-hidrolasas	7
3.3.2.- Bacteriocinas	8
3.4.- <i>Enterococcus</i> patógenos	11
3.4.1.- Factores de virulencia	11
3.4.1.1.- Resistencia a antibióticos	11
3.4.1.2.- Sustancia de agregación (SA)	12
3.4.1.3.- Proteínas de superficie	13
3.4.1.4.- La citolisina	13
4.- ANTECEDENTES	17
4.1.- El queso Cotija	17
4.1.1.- Papel de los enterococos en el queso	17
4.2.- Diferenciación de los <i>Enterococcus</i> aislados de alimentos.....	18
5.- JUSTIFICACIÓN	25
6.- HIPOTESIS	26
7.- OBJETIVOS	26
7.1.- Objetivo general.....	26

7.2.- Objetivos particulares.....	26
8.- METODOLOGÍA.....	27
8.1.- Evaluación genotípica	27
8.1.1.- Reactivación de las cepas	27
8.1.2.- Extracción de ADN	28
8.1.3.- Amplificación de los genes	29
8.2.- Evaluación fenotípica	33
8.2.1.- Prueba de hemólisis en agar sangre.....	33
8.2.2.- Evaluación de la actividad contra <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	34
8.2.2.1.- Producción de la bacteriocina	34
8.2.2.2.- Difusión en agar	35
8.2.2.3.- Geles SDS-PAGE y zimografía	35
9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
9.1.- Resultados para el marcador de citolisina	40
9.1.1.- Resultados genotípicos.....	40
9.1.2.- Resultados fenotípicos.....	46
9.2.- Resultados para el marcador de enterocina A	50
9.2.1.- Resultados genotípicos.....	50
9.2.2.- Resultados fenotípicos.....	53
10.- CONCLUSIONES.....	60
11.- PERSPECTIVAS	60
12.- REFERENCIAS	61
13.- ANEXOS	66

13.1.- Metodología de adsorción-desorción	66
13.2.- Metodología para el ensayo de difusión en agar	68
13.3.- Metodología de los geles SDS-PAGE y los zimogramas.....	68
13.4.- Metodología para la elaboración de los geles de agarosa.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de bacteriocinas y su clasificación de acuerdo a distintos autores.....	9
Tabla 2. Contribuciones de la citolisina de <i>E. faecalis</i> a la virulencia.....	14
Tabla 3. Cepas de <i>Enterococcus faecium</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> con las que se trabajó a lo largo del proyecto.....	28
Tabla 4. Reactivos y volúmenes a utilizar por cada reacción de PCR.....	30
Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR para <i>cylA</i>	30
Tabla 6. Condiciones de la reacción de PCR para <i>cylL_L</i>	30
Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR para <i>cylL_S</i>	31
Tabla 8. Condiciones de la reacción de PCR para <i>entA</i>	31
Tabla 9. Secuencias y temperaturas de alineamiento de los cebadores a utilizar.....	31
Tabla 10. Composición del agar sangre (Biomérieux).....	34
Tabla 11. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 1% para cada muestra de ADN extraído con el kit.....	39
Tabla 12. Resultados del análisis genético para evaluar la presencia del gen <i>cylA</i> en <i>E. faecium</i> y <i>faecalis</i>	41
Tabla 13. Resultados del análisis genético para evaluar la presencia del gen <i>cylL_L</i> en <i>E. faecium</i> y <i>faecalis</i>	43
Tabla 14. Resultados del análisis genético para evaluar la presencia del gen <i>cylL_S</i> en <i>E. faecium</i> y <i>faecalis</i>	45
Tabla 15. Resultados del análisis fenotípico para citolisina.....	50

Tabla 16. Resultados del análisis genético para evaluar la presencia del gen <i>entA</i> en <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i>	52
Tabla 17. Concentración de proteína de los concentrados de adsorción-desorción medida por el método de Bradford.....	56
Tabla 18. Concentración de proteína de los concentrados de adsorción-desorción del segundo lote medida por el método de Bradford.....	56
Tabla 19. Reactivos y cantidades a utilizar para un gel de poliacrilamida Tris-Tricina al 12%.....	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de la lisosima.....	8
Figura 2. Ejemplos de diferentes tipos de bacteriocinas y PGHs.....	10
Figura 3. Mecanismo de síntesis y producción de la citolisina.....	15
Figura 4. Ensayo de adherencia de línea celular HT-29.....	19
Figura 5. Alineamiento de seis genomas de <i>E. faecalis</i>	21
Figura 6. Alineamiento de cinco genomas de <i>E. faecium</i>	22
Figura 7. Análisis de la estructura poblacional de <i>E. faecalis</i>	23
Figura 8. Análisis de la estructura poblacional de <i>E. faecium</i>	24
Figura 9. Diagrama general de trabajo.....	27
Figura 10. Imagen de la herramienta Primer Quest Tool del IDT.....	32
Figura 11. Evaluación de la integridad del ADN extraído con el kit.....	38
Figura 12. Evaluación de la amplificación del gen ribosomal 16S.....	38
Figura 13. Evaluación de la presencia del gen <i>cyIA</i>	40
Figura 14. Evaluación de la presencia del gen <i>cyIL_L</i>	42
Figura 15. Evaluación de la presencia del gen <i>cyIL_S</i>	44
Figura 16. Evaluación de la producción de hemolisina de <i>S. pyogenes</i>	46
Figura 17. Evaluación de la producción de citolisina de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i>	47
Figura 18. Evaluación de la producción de citolisina de las cepas control.....	48
Figura 19. Evaluación de la presencia del gen <i>entA</i>	51
Figura 20. Evaluación de la actividad lítica de las cepas control contra <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	53

Figura 21. Evaluación de la actividad lítica de las cepas problema contra <i>L. monocytogenes</i>	54
Figura 22. Segunda evaluación de la actividad lítica de las cepas problema contra <i>L. monocytogenes</i>	56
Figura 23. Evaluación del perfil proteínico del extracto por adsorción-desorción.....	57

1.- RESUMEN

Las bacterias del género *Enterococcus* pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales poseen la capacidad de convertir los azúcares del medio en el que se desarrollan en ácido láctico como producto metabólico principal. De todas las BAL este género es el más controversial debido a la existencia de cepas patógenas de origen nosocomial lo que limita en gran medida su estudio y aplicación en alimentos, así como su posible aplicación biotecnológica.

En el grupo de trabajo se han aislado cepas de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* provenientes de quesos artesanales mexicanos. Se ha demostrado que las cepas aisladas de estos alimentos poseen características que pueden permitir su aplicación como probióticos. Además hay evidencia de que demuestra su relación filogenética con otras cepas originarias de ambientes diversos, incluyendo la microbiota intestinal de humanos, animales y como parte de los alimentos; se ha demostrado en distintas ocasiones que estas cepas no están relacionadas con las cepas patógenas responsables de infecciones nosocomiales.

En un estudio previo se realizó un análisis de genómica comparativa de cepas de alimentos con respecto a las de interés clínico, con base en los resultados obtenidos se propuso que ambos grupos podrían tener marcadores genéticos que se podrían utilizar como herramientas para su diferenciación (Olvera, 2018). Se propone que las cepas patógenas contienen los genes *cylA*, *cylL_L* y *cylL_S*, que forman parte de una isla de patogenicidad que codifica para la citolisina; ésta bacteriocina provoca lisis celular en eucariontes y se considera el factor de virulencia más importante del género *Enterococcus*. Por otra parte, se propone que las cepas aisladas de alimentos contienen el gen *entA*, el cual codifica para la enterocina A, una bacteriocina que provoca lisis celular de bacterias patógenas, particularmente de *Listeria* spp., por lo que también se les denomina antilisteriales.

Para comprobar dichas hipótesis se analizaron cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* obtenidas del queso Cotija y cepas de referencia (aislados clínicos), que forman parte de la colección del laboratorio, a través de técnicas moleculares (PCR

punto final), así como análisis fenotípicos (cultivo en agar sangre, difusión en agar y zimografía).

Los resultados indicaron que las cepas de origen alimentario no poseían los genes correspondientes a *cyIA* ni *cyLL*, mientras que solo algunas de las cepas si presentaron los genes *cyLLs* y *entA*. Realizando las pruebas para la evaluación fenotípica de los marcadores propuestos se encontró que ninguna de las cepas es capaz de producir la citolisina, pues ninguna cepa (salvo las cepas patógenas de colección) fue capaz de hemolizar los eritrocitos de la placa. Por otro lado, se observó que sólo una de las cepas que sí presentaron el genotipo para la producción de la enterocina A fue capaz de producirla en cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, mientras que el resto de las cepas no lograron dicha inhibición.

Con lo anterior hay evidencia de que todas las cepas que fueron aisladas del queso son genéticamente distintas a las cepas de origen nosocomial y que únicamente los genes *cyIA* y *cyLL* pueden ser utilizados como marcadores para distinguir unas de la otras.

2.- INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen en común la capacidad de degradar azúcares sencillos en ácido láctico como producto principal de su metabolismo, en este grupo existen una gran variedad de géneros entre los cuales se encuentra *Enterococcus*.

Enterococcus sp. forma parte de la microbiota nativa de mamíferos y habita una gran cantidad de nichos ecológicos como los alimentos fermentados. Dependiendo de la cepa y de las condiciones en que se encuentren en los alimentos pueden ser consideradas como cultivo iniciador o como cultivos no iniciadores, como sucede en la mayoría de los casos e incluso como cultivos conjuntos. Suelen encontrarse en productos lácteos fermentados, en productos cárnicos y en vegetales fermentados.

A pesar de ello, es el único género de bacterias perteneciente a las BAL que no es considerado GRAS (generalmente reconocidas como seguras por sus siglas en inglés) debido a la aparición, en recientes años, de cepas de origen nosocomial que han provocado infecciones en pacientes hospitalizados, lo que ha traído como consecuencia una gran limitación en cuanto a su estudio y aplicación biotecnológica (Eaton y Gasson, 2001).

Si a lo anterior se le agrega el hecho de que el género es intrínsecamente resistente a una amplia gama de antibióticos (lo cual dificulta su tratamiento), que tiene la capacidad de sobrevivir y colonizar tejidos humanos y que suele infectar principalmente a pacientes inmunocomprometidos, entonces se puede concluir que se trata de bacterias patógenas sumamente peligrosas, se debe tener especial cuidado en su tratamiento y es indispensable prevenir infecciones por parte de este microorganismo.

Por esto es de suma importancia realizar estudios que permitan establecer una diferencia entre los *Enterococcus* de origen nosocomial y los de origen distinto al nosocomial, pues estos últimos suelen ser inocuos para los seres humanos.

3.- MARCO TEÓRICO

3.1.- El género *Enterococcus*

En un inicio las bacterias del género *Enterococcus* eran consideradas como parte del grupo de *Streptococcus* debido a sus características morfológicas y fenotípicas, se encontraban clasificados dentro del grupo D de estreptococos, que se caracterizan, entre otras cosas, por ser γ -hemolíticos. Sin embargo, fue hasta la década de los 80 cuando se diseñaron y realizaron estudios moleculares como hibridación DNA-DNA, DNA-RNA y secuenciación del gen ribosomal 16S, y se descubrió que las características genotípicas de estas cepas eran muy distintas a las de los demás estreptococos y fue así que se clasificaron dentro de un género distinto al que se le llamó *Enterococcus* (Garza-Velasco, 2015).

De manera general el género *Enterococcus* sp. está conformado por bacterias Gram (+), catalasa, reductasa y oxidasa negativos, crecen en un intervalo de temperatura desde 10°C hasta 45°C, y en un intervalo de pH de 4 a 9.6. Son heterofermentativos para pentosas y homofermentativos para hexosas. Pueden sobrevivir a concentraciones de hasta 6.5% de NaCl y 40% de sales biliares (Giraffa, 2003; Olvera, 2013). Estas características le han permitido ser un género ubicuo, pues su alta capacidad de resistencia a condiciones adversas le permite desarrollarse en todo tipo de nichos ecológicos como por ejemplo agua, suelo, superficies de plantas, etc. También se encuentran como parte de la microbiota nativa de mamíferos (incluyendo al ser humano), y de algunos alimentos fermentados como quesos, productos cárnicos, entre otros (Murray 1990; Martin-Platero, *et al.*, 2009).

Dentro de los alimentos fermentados las especies *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans* son consideradas de mayor importancia, pues está demostrado que poseen la capacidad de fungir como probióticos en los humanos gracias a su habilidad para colonizar el tracto gastrointestinal y ayudar a la digestión de los alimentos, también ayudan a mantener un equilibrio en la microbiota intestinal nativa y además son capaces de producir compuestos que otorgan sabores y aromas deseables en los alimentos en los que se desarrollan (Bonacina *et al.* 2016; Olvera-García *et al.*, 2018).

En adición a todo lo anterior, estos microorganismos ayudan a la bioconservación de los productos debido a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos tales como peptidoglucano hidrolasas (PGHs) y bacteriocinas, ambas en conjunto poseen un amplio espectro de inhibición en contra de microorganismos patógenos de importancia en alimentos tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* y *E. coli*, por mencionar algunos.

3.2.- Participación del género *Enterococcus* en los alimentos fermentados

A lo largo del tiempo se han realizado una gran variedad de estudios que se han dedicado a aislar y caracterizar microorganismos responsables de la fermentación en alimentos y en muchos de ellos se han encontrado bacterias pertenecientes al género *Enterococcus*, principalmente en los siguientes grupos de alimentos:

- Quesos: Se han encontrado en quesos elaborados con leche bronca tanto de vaca como de otras especies como búfala y cabra, por ejemplo; pero también se han encontrado en quesos hechos a partir de leche pasteurizada, lo cual se atribuye a la capacidad de los enterococos de resistir las condiciones de pasteurización (60°C/30 min). En los quesos se ha observado que *Enterococcus* es capaz de incrementar la concentración final de aminoácidos libres, ácidos grasos libres (tanto de cadena corta como larga), y de compuestos que otorgan aroma (como el diacetilo) los cuales contribuyen de manera positiva a las características organolépticas del producto (Giraffa, 2014; Bravo, 2017). Entre los quesos en los que se han encontrado se encuentran el queso Manchego, Mozzarella, Feta, Picante, Cebreiro, Ferra, entre otros (Giraffa, 2003).
- Embutidos: Se han encontrado en una gran variedad de productos cárnicos embutidos tales como chorizos españoles, en productos como el fuet, que es un embutido muy popular en varias zonas de España, y el salami, por mencionar algunos. Se cree que su principal participación en estos productos es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de hexosas aunque también podría jugar un papel importante en la proteólisis de la carne. También se ha demostrado que en estos productos son capaces de producir bacteriocinas que tiene una

importante actividad contra *Listeria monocytogenes*, microorganismo patógeno de gran importancia en productos cárnicos (Álvarez-Cisneros, 2016).

- Vegetales: Aunque se han aislado cepas de *Enterococcus* de productos como las aceitunas, su origen no es claro. Se cree que en la fermentación de aceitunas contribuye a la inocuidad del producto final (De Castro *et al.*, 2002).

Aunque la mayoría de los alimentos antes mencionados son de origen europeo, también se han encontrado y aislado cepas de *Enterococcus* de una gran variedad de productos fermentados de origen mexicano como por ejemplo el queso Cotija de Oaxaca, el queso bola de Ocosingo de Chiapas, también en chorizos mexicanos e inclusive en productos como el pozol (bebida obtenida a partir de la fermentación de maíz nixtamalizado) (Becerril, 2012).

Hay cierta controversia acerca de la presencia de enterococos en los alimentos, pues una gran variedad de cepas son de origen intestinal y logran llegar a las heces fecales, por lo tanto su presencia puede estar ligada a malas prácticas de higiene en la elaboración de los productos en los que se encuentran, pero también es muy probable que dichas cepas provengan del ambiente en el que se elaboren los alimentos y sean de origen distinto al fecal; por ejemplo, cepas que se encuentren en el agua o en los utensilios utilizados para fabricar y/o almacenar los alimentos así como las materias primas, esto aunado al hecho de que se trata de un género bacteriano ubicuo y altamente resistente a condiciones adversas, da como resultado el hecho de que sea muy complicado asegurar que su presencia en alimentos se deba a malas prácticas de higiene y de manufactura (Girraffa 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

3.3.- Producción de compuestos antibacterianos

Muchas cepas del género *Enterococcus* resultan de gran interés biotecnológico debido a su capacidad de producir compuestos antibacterianos como las Peptido-Glucano Hidrolasas (PGHs), y las bacteriocinas. Ambas sustancias actúan en la pared y membrana celular, respectivamente, provocando alteraciones en sus estructuras, lo que trae como consecuencia una alteración en el gradiente de concentración de los nutrimentos y eventualmente provoca la

lisis celular. Se ha demostrado que la actividad conjunta de ambas sustancias influye en la inocuidad de los alimentos en que se presentan pues ayudan a la bioconservación de los mismos (García-Cano *et al.*, 2014).

3.3.1.- Peptidoglucano-hidrolasas

Las PGHs son un grupo de enzimas que tienen como principal sustrato a la pared de peptidoglucano bacteriana, pared que está conformada por unidades de N-acetil glucosamina (NAG) y ácido N-acetil murámico (NAM), ambos monómeros se enlazan químicamente entre sí de manera alternada por medio de enlaces β (1-4), además están entrecruzados por péptidos pequeños, lo que, en conjunto con todo lo anterior le otorga a la pared (y a la célula que recubre) una gran resistencia contra factores externos.

Existen cuatro tipos de PGHs clasificados según su actividad:

Amidasas: Rompen el enlace amino entre NAM y L-alanina del péptido de entrecruzamiento.

Peptidasas: Hidroliza el último aminoácido del extremo carboxilo del péptido de entrecruzamiento, o en su defecto también hidrolizan los puentes de entrecruzamiento entre los péptidos.

N-acetil glucosaminidasas: Hidrolizan el enlace β (1-4), dejando un extremo NAG reductor.

N-acetil muramidasas: También hidrolizan el enlace β (1-4), pero éstas dejan un extremo NAM reductor, o pueden también formar un anillo 1,6 anhidro en NAM.

Algunas cepas de *Enterococcus* poseen el genotipo y fenotipo para la producción de algunas PGHs, por ejemplo, *E. faecium* D posee el genoma para la producción de endo- β -acetilglucosaminidasas y N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas, se ha observado también la aparición de bandas líticas desde 72kDa a 86kDa al realizar zimogramas en contra de *M. lysodeikticus* (Olvera-García *et al.*, 2018). Inclusive se ha logrado clonar y expresar genes de *E. faecalis* que codifican para N-acetilglucosaminidasas en *E. coli* para una posible producción comercial, para posteriormente ser aplicada en alimentos como un agente antibacteriano (Serrano *et al.*, 2018).

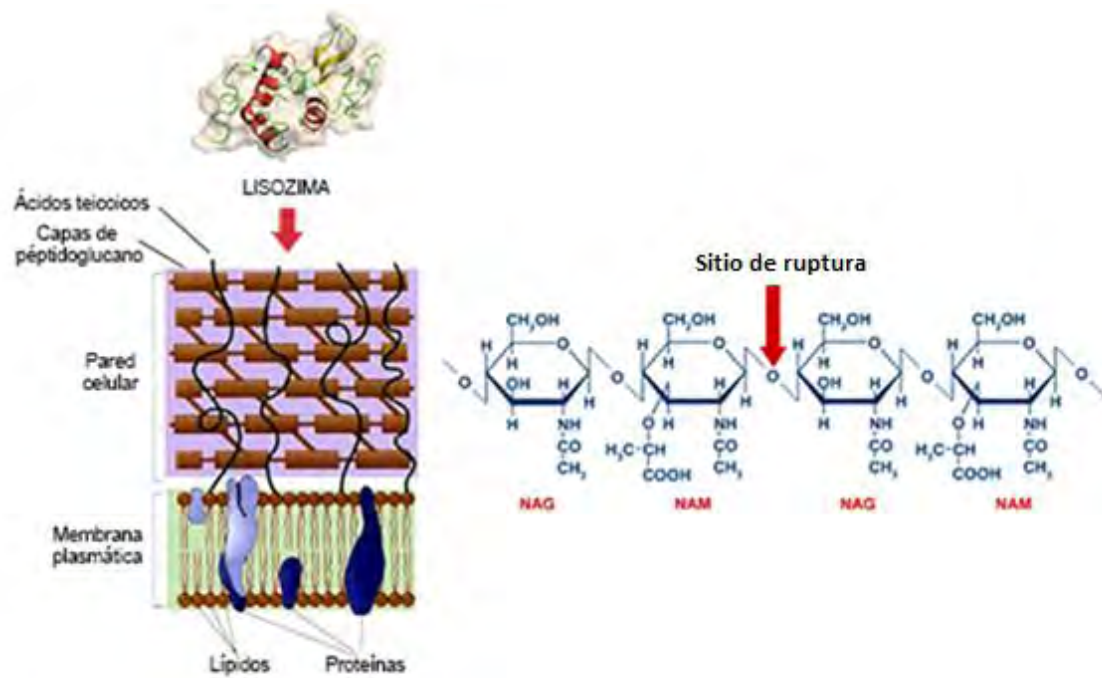


Figura 1. Mecanismo de acción de la lizosima. Se muestra cómo actúa la lizosima en la pared celular por medio de la hidrólisis del enlace β (1-4). NAG, N-acetil glucosamina; NAM, ácido N-acetil murámico (Adaptado de Lurueña, 2015)

3.3.2.- Bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos antimicrobianos de origen proteínico capaces de hidrolizar la membrana plasmática de bacterias, con base en su estructura y propiedades fisicoquímicas se dividen en cuatro clases principales, la clase I (enterocinas lantibióticas), la clase II (péptidos pequeños, menores a 10kDa, no lantibioticos), la clase III (enterocinas cíclicas, bacteriolíticas), y la clase IV (proteínas muy grandes mayores a 10kDa). Dentro del grupo de las bacteriocinas se encuentran las enterocinas, éstas son una familia de bacteriocinas producidas por varias cepas del género *Enterococcus* (principalmente por *E. faecium*). Se han aislado y estudiado distintas enterocinas entre las cuales se encuentran la enterocina A, P, B, L50A, L50B, I y Q, entre otras, la mayoría de las cuales suelen pertenecer a la clase II, algunos ejemplos de bacteriocinas se muestran en la Tabla 1. Las enterocinas actúan sobre la membrana plasmática de bacterias formando poros en ésta y trayendo como consecuencia la alteración del gradiente de concentración de los solutos y la lisis celular (Cleveland *et al*, 2001).

Tabla 1. Ejemplos de bacteriocinas y su clasificación de acuerdo a distintos autores. (Álvarez-Cisneros, 2011).

Clase	Klaenhammer (1993)	Cotter et al., 2005	Heng y Tagg (2006)	Franz et al., 2007	Ejemplos Bacteriocina/cepa productora (género y especie)
I	Lantibióticos	Lantibióticos	Lantibióticos	Enterocinas lantibióticas	Citolisina/ <i>E. faecalis</i>
IIa	Tipo pediocina o activos contra <i>Listeria</i> , secuencia consenso (YGNGVXC) cerca del N-terminal y péptido líder GG	Tipo pediocina o activos contra <i>Listeria</i> , secuencia consenso (YGNGVXC) cerca del N-terminal y péptido líder GG	Tipo pediocina o activos contra <i>Listeria</i> , secuencia consenso (YGNGVXC) cerca del N-terminal y péptido líder GG	Enterocinas de la familia de las pediocinas, activos contra <i>Listeria</i> , secuencia consenso (YGNGVXC) cerca del N-terminal y péptido líder GG	Enterocina A/ <i>E. faecium</i>
IIb	Dos péptidos, con péptido líder GG	Dos péptidos, con péptido líder GG	Dos péptidos, con péptido líder GG	Enterocinas sintetizadas sin un péptido líder	Enterocina L50A/ <i>E. faecium</i>
IIc	Péptidos con grupo tiol (SH) y péptido líder GG	Péptidos cíclicos	—	Otras enterocinas lineales no de la familia de pediocinas	Enterocina B/ <i>E. faecium</i>
IId	—	Bacteriocinas de un solo péptido y lineales (no pediocinas)	No pediocinas	—	—
IIIa	Grandes proteínas termolábiles	Bacteriolisinas	Bacteriolíticas	Péptidos cíclicos	Enterocina AS48/ <i>E. faecalis</i>
IIIb	—	—	No líticas	—	—
IV	Complejos de proteínas	—	Péptidos cíclicos	Grandes proteínas	Enterolisina A/ <i>E. faecalis</i>

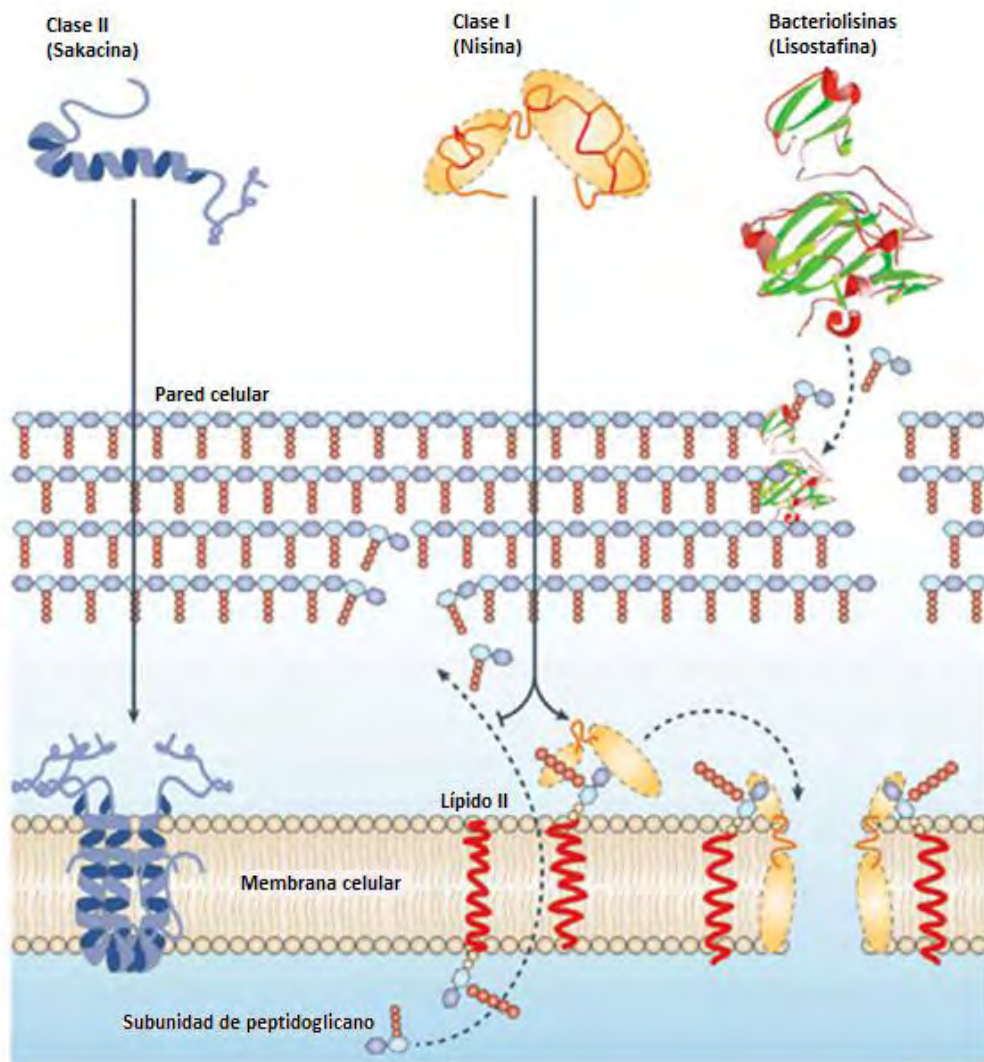


Figura 2. Ejemplos de diferentes tipos de bacteriocinas y PGHs. Se observa como actúan para atacar a la membrana o pared de la célula blanco (Adaptado de Cotter *et al.*, 2005).

Dentro de las enterocinas se encuentra la enterocina A, es una bacteriocina perteneciente a la clase II, es un péptido de aproximadamente 4 kDa de peso y es termorresistente. Se ha estudiado mucho y se ha observado que tiene una importante actividad antimicrobiana sobre todo contra *Listeria monocytogenes*, además también se ha reportado que es estable a bajas temperaturas, lo que podría permitir su aplicación como agente bactericida en una gran variedad de alimentos (Rehaiem *et al.*, 2010).

3.4.- *Enterococcus* patógenos

A pesar de su gran cercanía con el ser humano y de los beneficios que proporcionan en los alimentos en los que se desarrollan, su estudio y utilización como cultivo iniciador en los mismos es muy limitado debido a la reciente aparición de cepas de origen nosocomial; particularmente las especies *E. faecium* y *E. faecalis* han adquirido mucha importancia debido a su capacidad de adquirir, acumular y compartir material genético extracromosomal que puede codificar para factores de virulencia como la resistencia a antibióticos. Lo que ha provocado un incremento de estas cepas patógenas responsables de infecciones nosocomiales en pacientes hospitalizados y ha limitado su utilización en productos probióticos alimenticios (Semedo *et al*, 2003; Tyne, 2013).

3.4.1.- Factores de virulencia

La resistencia a antibióticos es uno de los factores de virulencia de mayor importancia en *Enterococcus*, presentan resistencia intrínseca así como pueden presentar resistencia adquirida por plásmidos. La resistencia a antibióticos dificulta el tratamiento de cepas patógenas. Además de la resistencia, existen tres tipos de proteínas que son producidas por los *Enterococcus* patógenos y que contribuyen a la infección por parte de estas cepas. A continuación, se explica de manera breve en que consiste cada factor de virulencia.

3.4.1.1.- Resistencia a antibióticos

Las cepas patógenas de *Enterococcus* son consideradas peligrosas debido a su capacidad de resistir una amplia gama de antibióticos. La mayor parte de estas resistencias se deben a la característica intrínseca del género a ser resistente a diversos antibióticos y que se explica por su origen, pues estas cepas evolucionaron y se adaptaron para poder sobrevivir en el tracto gastrointestinal de mamíferos, en donde se pueden encontrar sustancias con efecto antibiótico producidas por la bilis. Esta resistencia intrínseca incluye resistencia a las cefalosporinas, beta-lactámicos, sulfonamidas y bajos niveles de aminoglucósidos y clindamicina. Por otro lado, existe la llamada resistencia adquirida, esta es la más importante dentro de los *Enterococcus* patógenos pues a diferencia de la resistencia intrínseca que está codificada en cromosoma, la

resistencia adquirida se codifica a través de ADN extracromosomal como plásmidos o transposones (Clewell 1990; Murray 1990), esta información puede ser fácilmente transferida entre cepas de *Enterococcus*, pues una de sus principales características es la facilidad con la que pueden donar y recibir material genómico extracromosomal, lo cual resulta preocupante debido al alto riesgo que existe de que cepas no resistentes adquieran resistencia. Entre las resistencias adquiridas están la resistencia al cloranfenicol, eritromicina, clindamicina (en niveles altos), aminoglicosidos, tetraciclinas y glicopeptidos entre otros; particularmente la resistencia a glicopeptidos es preocupante pues glicopeptidos como la vancomicina son conocidos como “la última opción terapéutica” para el tratamiento de infecciones nosocomiales, la infección por enterococos resistentes a vancomicina (ERV) suele ser letal y suele reducir de manera importante la esperanza de vida del paciente infectado, pues estas infecciones presentan una mortalidad del 30-40% a falta de antimicrobianos eficientes para su tratamiento. (Labra, 2012). Cabe destacar que diversos estudios han demostrado que la prevalencia de esta resistencia adquirida a antibióticos es baja en cepas no patógenas, como por ejemplo cepas de alimentos que han demostrado ser sensibles a concentraciones relativamente bajas de vancomicina (Álvarez-Cisneros, 2011; Olvera, 2013; Urrieta, 2018).

3.4.1.2.- Sustancia de agregación (SA)

Esta proteína, en la mayoría de los casos, se encuentra codificada en el plásmido pAD1, específicamente en el gen *asa*. Su principal función es permitirle a la cepa productora adherirse a los tejidos para colonizarlos, este proceso es el primer paso en la infección por *Enterococcus*; pero también se ha visto que su producción puede potenciar la conjugación de plásmidos al formar agregados de células tanto donadoras como receptoras del material genético a transferir (Franz *et al.*, 2003; Kayser, 2003).

También se sugiere que participan en la diseminación de las bacterias en el interior del huésped y en la evasión del sistema inmune, ambos efectos por medio de un mecanismo que involucra a las SA, las células de *Enterococcus* logran adherirse a los macrófagos del sistema inmune e incluso les permite sobrevivir al proceso de fagocitosis; los macrófagos al contener células de

Enterococcus en su interior fungen como vehículos que les permiten a las bacterias llegar de tejidos, como el intestino, al torrente sanguíneo del paciente infectado (Vankerckhoven *et al.*, 2004; Labra, 2012).

3.4.1.3.- Proteínas de superficie

Varias cepas de *Enterococcus* son capaces de producir una sustancia conocida como proteína de superficie de enterococos (Esp) y que se encuentra codificada en el gen cromosomal *esp*. Dicha proteína de superficie tiene las mismas características que otras proteínas de superficie encontradas en Gram-positivos, como lo son una secuencia señal y un motivo de anclaje a la pared celular. Esta proteína es de importancia pues se cree que el dominio N-terminal está relacionado con la interacción entre el huésped y la célula, y que la región central de la proteína podría servir para retraer a la misma de la superficie, lo que trae como consecuencia una mayor facilidad para evitar su reconocimiento por parte de células del sistema inmune, incluso es posible que en personas con un sistema inmune debilitado la capacidad de retracción de la proteína de superficie garantice una evasión completa del sistema inmune y con ello se facilite aún más la infección (Shankar *et al.*, 1999).

3.4.1.4.- La citolisina

Se ha propuesto que la producción de la hemolisina conocida como citolisina es el principal factor de virulencia de estas cepas debido a que provoca la ruptura de la membrana celular de células eucariontes, de algunas bacterias y eritrocitos. Se ha demostrado que la presencia de esta hemolisina agravaba la infección en animales de laboratorio, entre otras contribuciones que se pueden observar en la Tabla 2 (Günter, 2003; Tyne, 2013).

La citolisina es una proteína conformada por dos subunidades, está codificada en un operón principalmente localizado en plásmidos, como por ejemplo el plásmido conjugativo, que responde a feromonas y dependiente de quórum, pAD1. Dicho plásmido está conformado por ocho genes de los cuales seis están relacionados con la síntesis de la toxina y dos están relacionados con la regulación de la síntesis. La citolisina requiere una serie de modificaciones post-

traduccionales para llegar a su estado maduro y tener actividad lítica. El mecanismo por el cual se sintetiza la citolisina se muestra en la Figura 3.

Tabla 2. Contribuciones de la citolisina de *E. faecalis* a la virulencia (Tyne, 2013).

Condición	Efecto de la citolisina
Bacteriemia en humanos	Hace que la infección sea hasta cinco veces más letal.
Endoftalmitis en conejos	Daña la retina y otras estructuras oculares.
Infección intraperitoneal en ratones	Hace que la infección sea aproximadamente cien veces más letal.
Endocarditis en conejos	Hace que la infección sea más letal en sinergia con sustancias de agregación.
Ingesta de <i>C. elegans</i>	Hace que la infección sea más letal después de la ingesta.

En primer lugar se expresan los genes *cyLI* y *cyLS* los cuales codifican para las subunidades proteicas del mismo nombre de 60 y 63 aminoácidos respectivamente, posteriormente ocurre una primera modificación post-traduccionales llevada a cabo por la enzima CylM que consiste en la formación de la β -metil-lantionina (aminoácido característico de las bacteriocinas de la clase I), dicha modificación les permite a estas subunidades ser reconocidas por el transportador transmembranal (y a su vez cistein-proteasa) CylB, el cual se encarga de remover la secuencia líder de 24 aminoácidos para la subunidad *cyLI* y de 36 aminoácidos para *cyLS*; tras esto se excretan ambas subunidades ahora nombradas *cyLI'* y *cyLS'* al exterior de la célula. En el exterior ambas subunidades son reconocidas por la serin-proteasa CylA, enzima que se va a encargar de llevar a cabo una segunda modificación que consiste en remover 6 aminoácidos del extremo amino terminal convirtiéndolas en las subunidades *cyLI''* y *cyLS''*, ambas en presencia de células blanco se ensamblarán y formarán a la citolisina activa. Al no haber células blanco cada subunidad formará agregados insolubles sin actividad lítica.

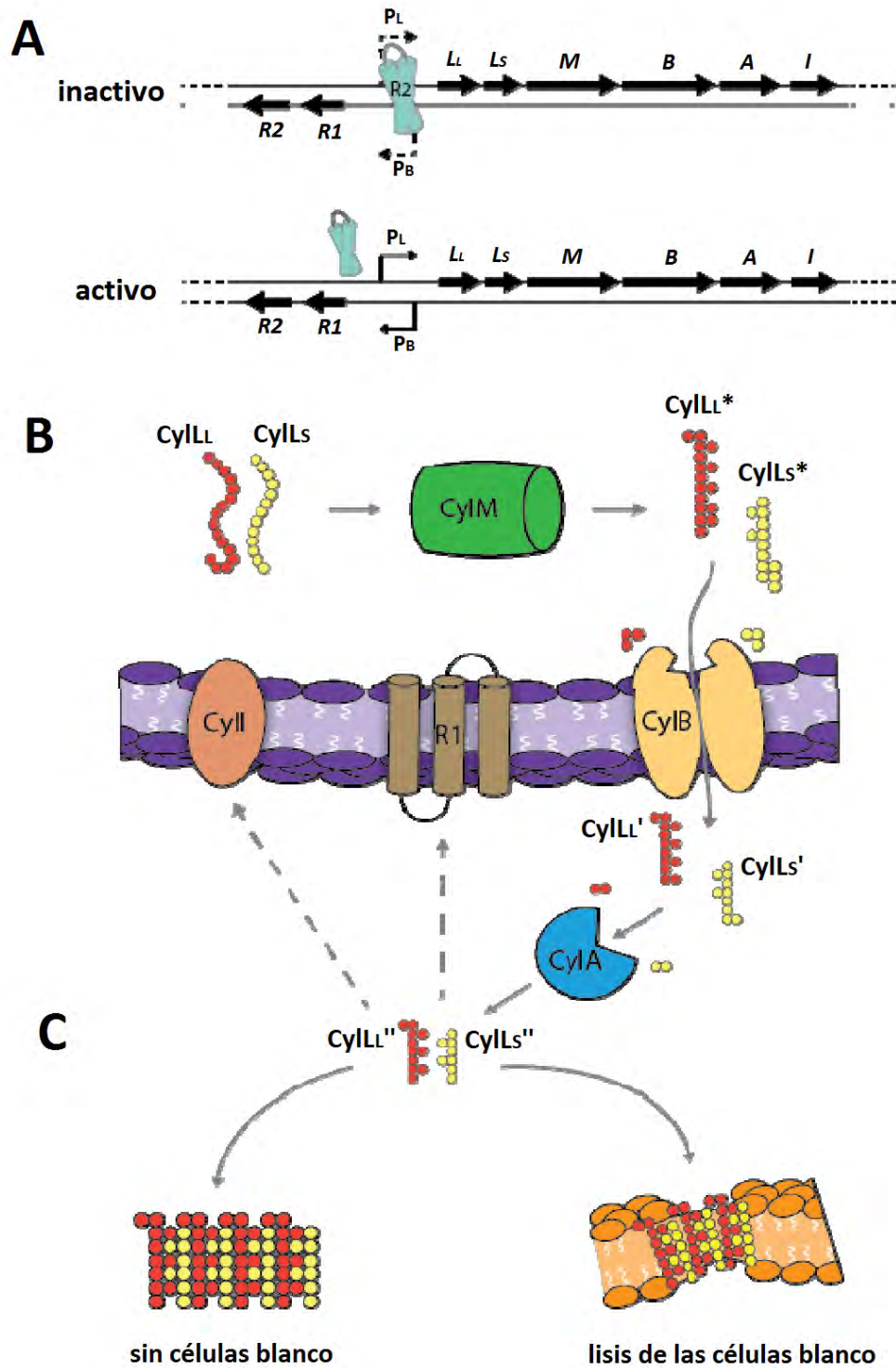


Figura 3. Mecanismo de síntesis y producción de la citolisina. (A) representa la forma inactiva y activa del operón de citolisina que dependerá de la concentración de $CyLS$ en el medio extracelular. (B) representa el mecanismo de producción y (C) representa el comportamiento de las subunidades en presencia y ausencia de células blanco.

(Tyne, 2013).

La subunidad *cy/LS*” además actúa como un autoinductor de la expresión de *cy/LI* y *cy/LS* al reconocida por la proteína transmembranal CylR1 (que puede encontrarse tanto en la célula productora como en células cercanas), ésta enviará una señal al represor CylR2 el cual permanece unido al promotor P_{Lys} en el operón, la señal de CylR1 provocará un cambio conformacional que le permitirá separarse del promotor e incrementará los niveles de expresión de la citolisina; los bajos niveles de *cy/LS*” promueven la acumulación de señales de quórum que activan la expresión de los mismos. En adición a todo lo anterior también se lleva a cabo la síntesis de la proteína de inmunidad CylI codificada en el gen *cy/LI*, y cuyo mecanismo de acción es aún desconocido (Olvera, 2013; Tyne, 2013).

4.- ANTECEDENTES

4.1.- El queso Cotija

El queso Cotija es un queso artesanal fabricado en la sierra Jalmich ubicada entre los estados de Jalisco y Michoacán en México. Se trata de un queso fermentado el cual se elabora a partir de leche bronca de vacas cebú o criollas. De acuerdo a sus características organolépticas y a la NOM-243-SSA1-2010 se puede clasificar como un queso madurado, prensado, de pasta dura y desmonorable. Su tiempo de maduración debe ser mínimo de tres meses.

4.1.1.- Papel de los enterococos en el queso

De acuerdo a los resultados de un estudio realizado por Bravo en 2017; los *Enterococcus* son parte importante de la microbiota del queso Cotija, pues se demostró que tenían actividad proteolítica y lipolítica (particularmente actividad esterasa y carecían de actividad de lipasa), y es gracias a estas actividades que tienen un papel importante en la formación de aromas y sabores, así como de la textura del queso.

Además de lo anterior también se encontró que cepas de *Enterococcus* aisladas del queso tenían actividad antagónica contra patógenos de interés en alimentos como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica*, dicha actividad se debió a la presencia de PGHs, principalmente, ya que las cepas que él analizó no presentaron bacteriocinas. Sin embargo, estudios realizados demuestran que sí hay cepas aisladas del queso Cotija que presentan el genotipo y fenotipo de bacteriocinas, ya que presentan actividad lítica en contra de *Listeria monocytogenes* (Olvera, 2013; Guzmán, 2015). Es posible que la acción conjunta de todos los *Enterococcus* en el queso tenga como resultado una mayor conservación, pues son capaces de producir compuestos que tienen actividad contra un amplio espectro de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos.

4.2.- Diferenciación de los *Enterococcus* aislados de alimentos

Lo anterior indica que los enterococos son microorganismos que tienen un papel importante en el desarrollo de características organolépticas deseables en el queso y que contribuyen además a la bioconservación; sin embargo, al igual que en otros alimentos, su presencia en el queso resulta controversial debido a la existencia de las cepas patógenas. Es por esto que muchos de los estudios que tienen como objetivo caracterizar a los *Enterococcus* de alimentos también se enfocan en la búsqueda de factores de virulencia, con el objetivo de dilucidar su potencial patogénico y demostrar si las cepas de alimentos son distintas a las cepas nosocomiales a nivel genético y fenotípico. Dichas diferencias, además, suelen demostrar que los *Enterococcus* de alimentos no son capaces de invadir ni de provocar daños a la salud de los consumidores.

Olvera (2013), realizó un estudio que consistió en evaluar la actividad antibacteriana que pudiera provenir de grupos de cepas de *Enterococcus* de origen alimentario. Como parte del proyecto se realizó una búsqueda de genes que codificaran para producción de compuestos antimicrobianos tales como PGHs y bacteriocinas; a su vez se buscaron genes que se sabe contribuyen a la virulencia de cepas patógenas, en particular se enfocó la búsqueda de tres tipos de genes: el gen *asa1* que codifica para la sustancia de agregación, el gen *cylA* que codifica para una enzima que forma parte del mecanismo de síntesis de la citolisina, y, por último, se buscó el gen *esp* que codifica para la proteína de superficie de *Enterococcus*.

Como resultado se obtuvo que ninguna de los grupos de enterococos estudiados presentó el gen *cylA*, siete de los doce grupos analizados presentaron el gen *asa1* y solo dos presentaron el gen *esp* (ambas presentaron tanto *asa1* como *esp*). Para corroborar lo anterior se realizó un ensayo de adherencia a las líneas celulares Caco-2 (adenocarcinoma colorectal humano), y HT-29 (adenocarcinoma de colon humano grado II) y los resultados se muestran en la Figura 4.

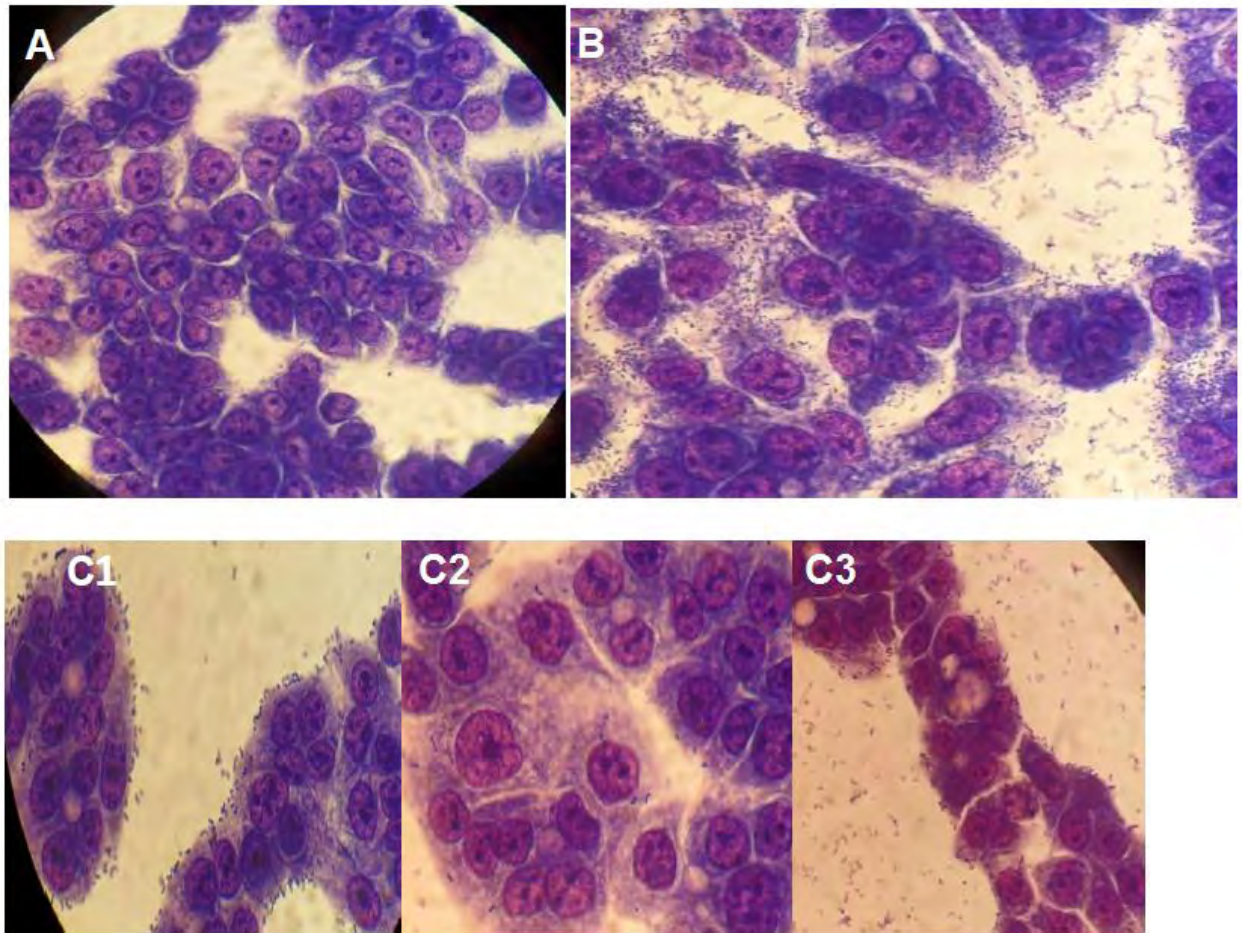


Figura 4. Ensayo de adherencia de línea celular HT-29 (adenocarcinoma de colon humano grado II), A: Control de células, B: Control positivo *E. coli* 49766-042, C: Población 1 de enterococos, cepa I (*E. faecalis* I) y cepa A (*E. faecalis* A) (Olvera, 2013).

En el control celular HT-29 (A) se encontraban las células enteras y formando una monocapa casi uniforme. El control positivo de *E. coli* 49766-042 (B) presentó un patrón de adherencia agregativa, se observan bacilos delgados formando pequeños tabiques adheridos alrededor de las células. La población 1 de bacterias (C1) presentó una adherencia en forma de tabiques similar a la presentada por *E. coli*, se observan cocos en pares y formando cadenas largas y cortas, también se observan algunas células dispersas en la monocapa, su adherencia es de tipo difusa/agregativa. La cepa I (C2) presentaba cocos en pares y cadenas cortas distribuidos a lo largo de toda la preparación, principalmente en la periferia de las células, su adherencia es del tipo difusa. La cepa A (C3) presentaba cocos en pares y cadenas cortas rodeando las células

y en algunos casos en el centro de las mismas, también formaban cúmulos de bacterias en sitios específicos variables, su agregación es de tipo difusa/agregativa y localizada. Cabe resaltar que en ningún caso se observa una alteración en la estructura de las células eucariontes.

Lo anterior permitió concluir que las cepas aisladas de alimentos únicamente presentan factores de virulencia relacionados con su capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal (deseable en microorganismos probióticos) y no con la capacidad de invasión al huésped, característica de los patógenos.

Guzmán (2015), realizó otro estudio que consistió en hacer un análisis genético poblacional de cepas de *Enterococcus* aislados del queso Cotija. De siete cepas aisladas de *Enterococcus* se obtuvieron los perfiles alélicos y las secuencias tipo con lo cual se logró realizar el análisis poblacional por MLST. Los resultados arrojaron que las cepas del queso no podían ser agrupadas ya que eran muy variables entre sí, pero también se encontró que dichas cepas se encuentran alejadas del complejo clonal 17 (grupo que abarca cepas de aislados clínicos y que se conoce como de alto riesgo).

Olvera (2018), realizó un estudio de genómica comparativa de una cepa de *E. faecium* y otra de *E. faecalis* aisladas del queso Cotija. Las Figuras 5 y 6 muestran parte de los resultados, en los que observó la distancia filogenética que existe entre las cepas patógenas y las aisladas de alimentos. Además, buscó diversas características genéticas de importancia, como factores de virulencia y producción de compuestos antibacterianos. Como parte de sus resultados encontró un grupo de genes únicos de las cepas *E. faecalis* F y *E. faecium* D, entre los cuales se encontraban genes para la producción de bacteriocinas de la clase IIa, por lo que propuso que estos genes podrían ser utilizados como biomarcadores de cepas asociadas a alimentos.

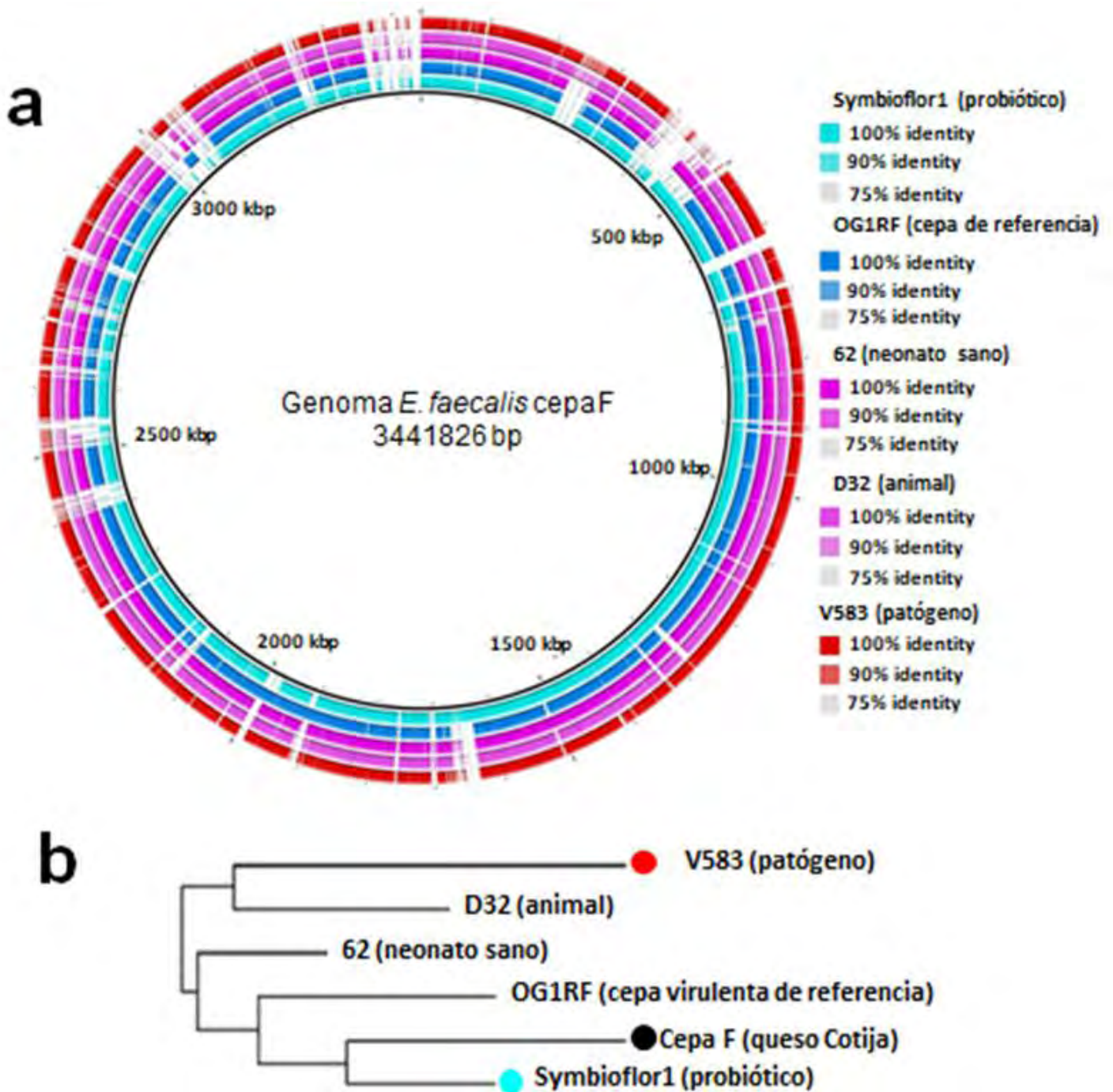


Figura 5. Alineamiento de los seis genomas de *E. faecalis*. (A) representa el alineamiento circular de los genomas de *E. faecalis* aislados de diferentes ambientes. Los espacios vacíos (blanco) representan genes presentes únicamente en la cepa F. (B) representa el árbol de parsimonia del pangenoma de las seis cepas, se observa la distancia que existe entre las cepas del queso y un aislado clínico (Olvera, 2018).

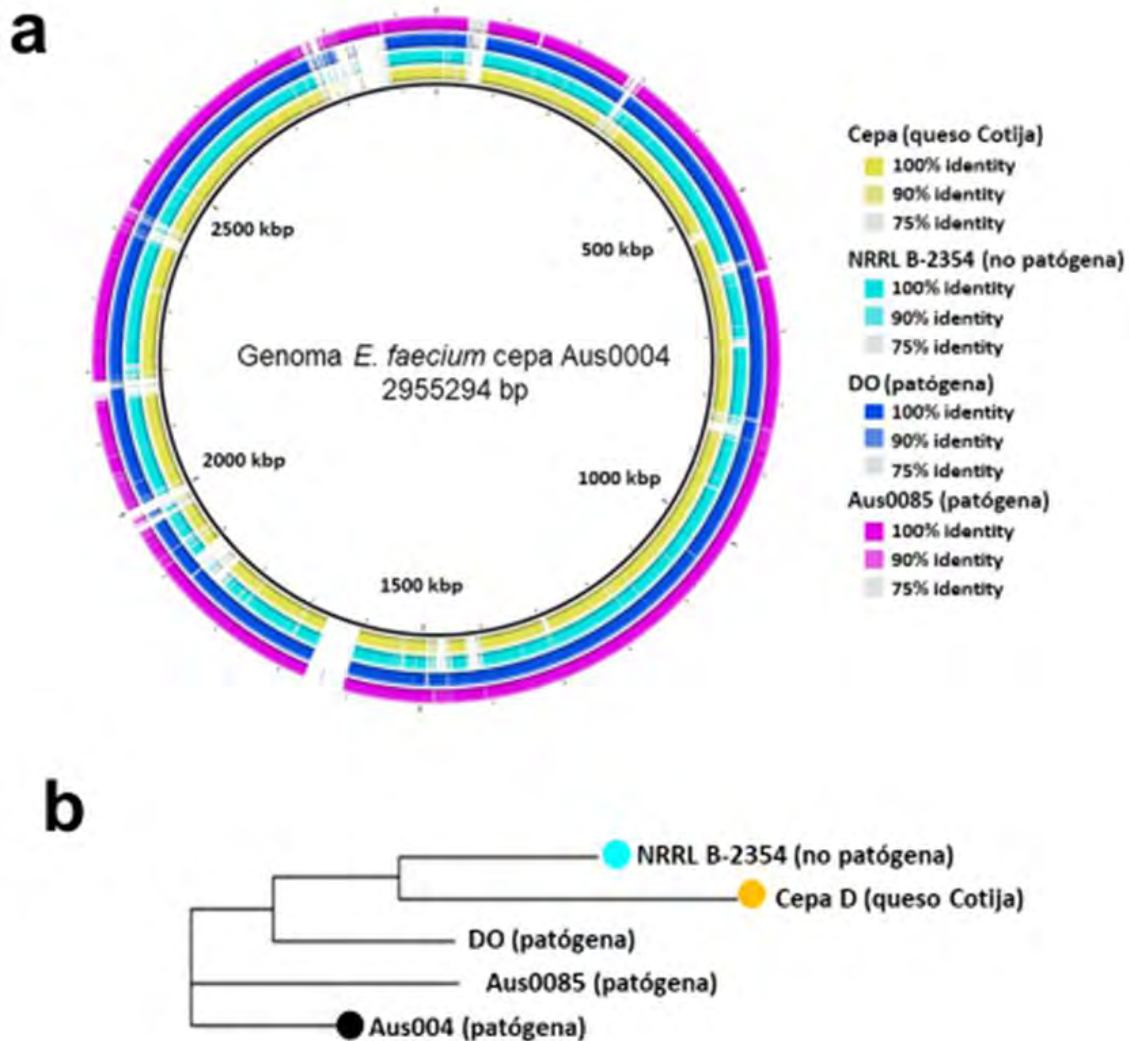
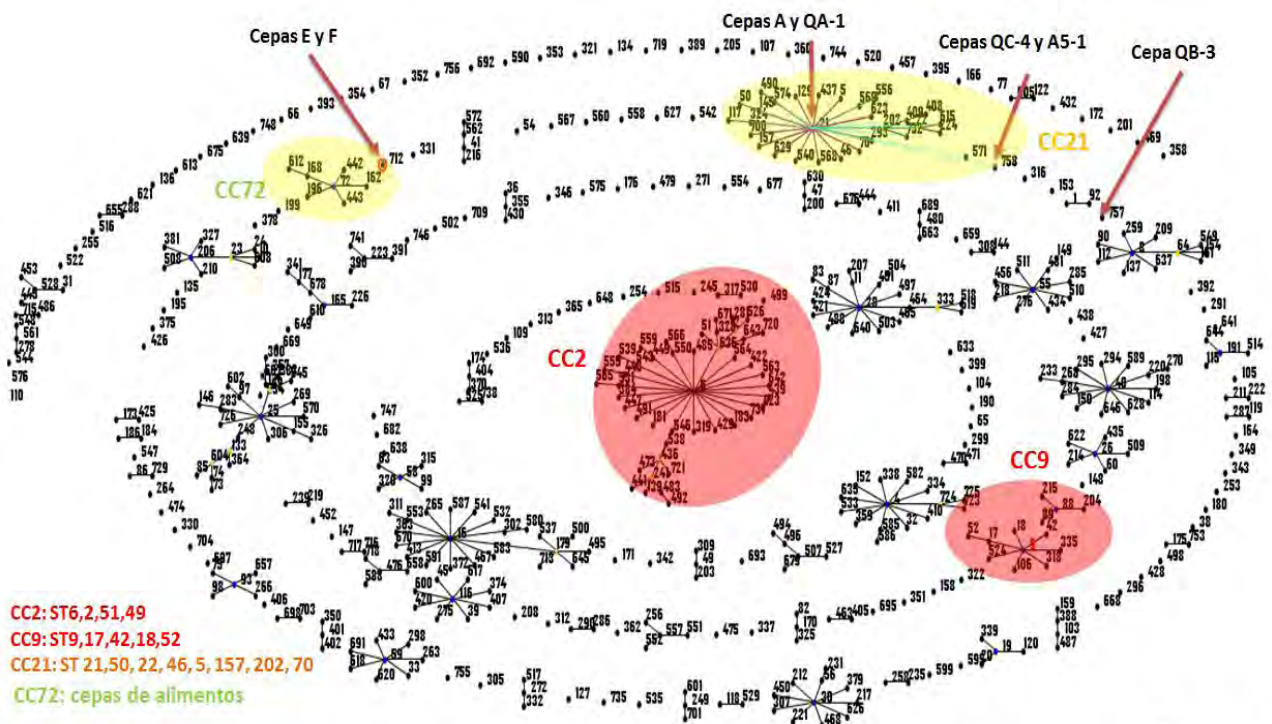


Figura 6. Alineamiento de cinco genomas de *E. faecium*. (A) representa el alineamiento circular de los genomas de *E. faecium* aislados de diferentes ambientes. Los espacios vacíos representan genes presentes únicamente en la cepa patógena Aus0004, (B) representa el árbol de parsimonia del pangenoma de las cinco cepas, se observa una gran distancia entre la cepa patógena y la cepa aislada del queso Cotija (Olvera, 2018).

También realizó un análisis multilocus por MLST de cepas de *E. faecalis*, pues se había propuesto la posibilidad de que dichas cepas pudieran pertenecer a un posible complejo clonal asociado a alimentos, en la Figura 7 se observa que las cepas aisladas del queso Cotija están muy alejadas entre sí como para poder ser consideradas dentro de un complejo clonal de alimentos, pero se observó que también se encuentran alejadas de los complejos clonales de alto riesgo (CC2 y CC9) que agrupan cepas de origen nosocomial.



No. STs = 752

Figura 7. Análisis de la estructura poblacional de *E. faecalis*. Las cepas aisladas del queso Cotija indicadas con flechas anaranjadas se encuentran alejadas de los complejos clonales de alto riesgo CC2 y CC9 indicados con color rojo (Olvera, 2018).

Urrieta (2018) realizó un análisis multilocus por MLST de cepas de *E. faecium* aisladas del queso bola de Ocosingo. En total se analizaron 5 cepas aisladas del queso bola, se amplificaron y secuenciaron 7 genes altamente conservados y se obtuvieron las secuencias tipo (ST), con esto fue posible realizar la comparación con la base de datos. Como resultado se obtuvo que las cepas aisladas del queso bola están relacionadas con cepas aisladas de otros alimentos (como cepas el queso Cotija) y que al igual que las cepas aisladas previamente, se encontraban alejadas del CC17 (Guzmán, 2015). Dichos resultados se muestran en la Figura 8.

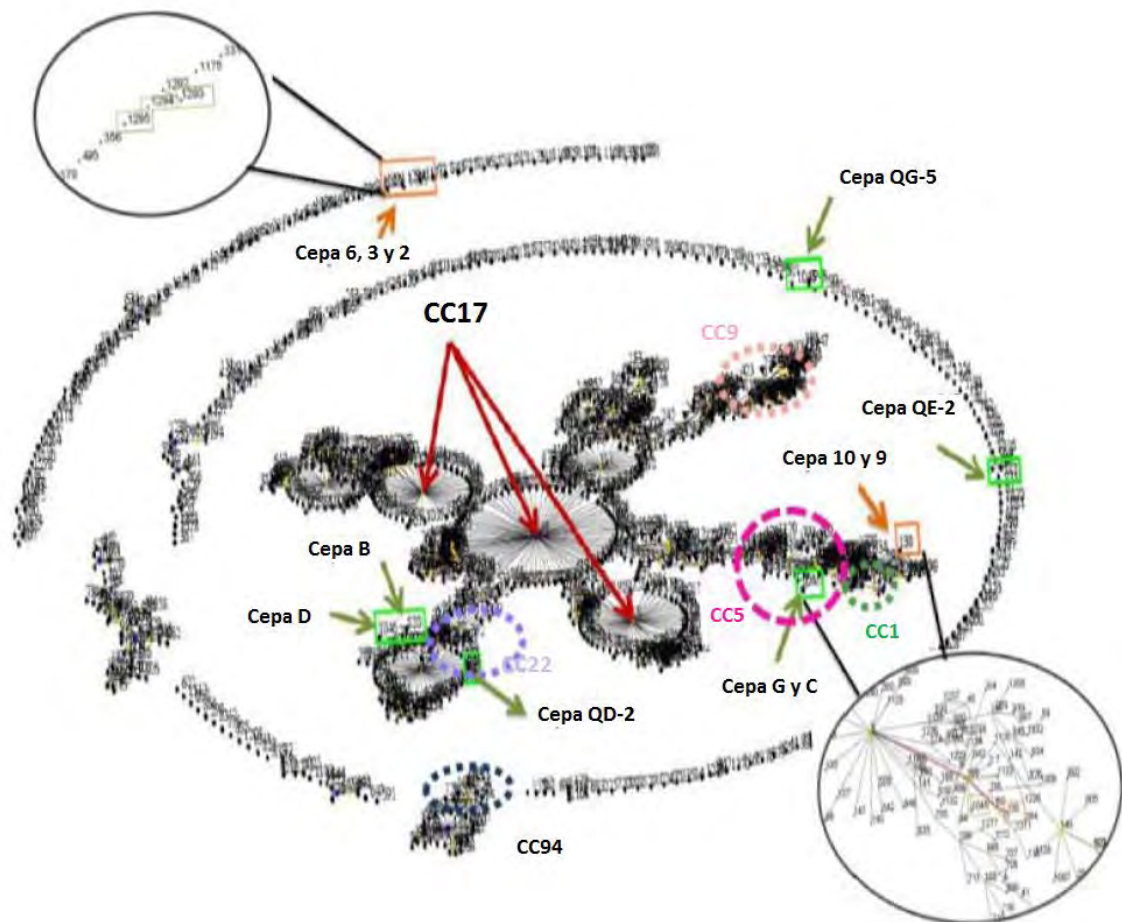


Figura 8. Análisis de la estructura poblacional de *E. faecium*. Se muestran aislados de queso Cotija (verde), del queso bola de Ocosingo (naranja) y el complejo clonal 17 (rojo). Se observa que las cepas aisladas de los quesos se encuentran alejadas del CC17 de alto riesgo (Urrieta, 2018).

También realizó una búsqueda en estas cinco cepas de los tres factores de virulencia que se habían buscado previamente en cepas del queso Cotija (Olvera, 2013), y encontró que los tres factores estaban ausentes en las cinco cepas que analizó del queso bola, lo que, aunado al resultado del análisis MLST, demuestra el bajo potencial patogénico de estas cepas.

5.- JUSTIFICACIÓN

En el grupo de trabajo se han aislado cepas de las bacterias *Enterococcus faecium* y *faecalis* provenientes de quesos artesanales mexicanos; se ha demostrado que estas cepas aisladas del queso poseen características que les pueden permitir ser aplicadas como probióticos en alimentos, por ejemplo, factores de adherencia a la pared intestinal, la producción de bacteriocinas de algunas cepas, entre otras propiedades. Además, se ha demostrado que estas cepas aisladas están filogenéticamente relacionadas con otras cepas de origen alimentario y que no están relacionadas con las cepas patógenas responsables de infecciones nosocomiales.

A pesar de estos estudios previos, tan solo una pequeña parte de las cepas aisladas de los quesos se ha estudiado a nivel genómico para demostrar su bajo potencial patogénico, mientras que la mayoría de las cepas de colección del grupo de trabajo aún no se han estudiado a este nivel, por lo que el objetivo de la investigación es analizar la mayor parte de las cepas de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* aisladas previamente del queso Cotija, para que, por medio de técnicas moleculares se pueda evaluar si las cepas de colección del laboratorio poseen al menos un marcador genético que pueda permitir su distinción de cepas patógenas, para esto se buscará la presencia de los genes *cylA*, *cylI* y *cylLs* que forman parte de una isla de patogenicidad que codifica para la citolisina, bacteriocina que provoca lisis celular en eucariontes y se considera el factor de virulencia más importante del género *Enterococcus*.

También se evaluará la presencia del gen *entA* que codifica para la enterocina A, bacteriocina que provoca lisis celular de bacterias patógenas. Por último se plantea hacer la evaluación fenotípica de las cepas de colección para evaluar la expresión de los genes que codifican para la citolisina.

6.- HIPOTESIS

Las cepas aisladas de alimentos no presentarán el genotipo relacionado a la síntesis de citolisina, mientras que sí presentarán el gen que codifica para la producción de la enterocina A, lo que permitirá diferenciar a nivel genético y fenotípico a las cepas de alimentos de las cepas de origen nosocomial.

7.- OBJETIVOS

7.1.- OBJETIVO GENERAL:

- Discriminar a nivel genético y fenotípico las cepas aisladas de alimentos de las cepas patógenas de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

7.2.- OBJETIVOS PARTICULARES:

- Discriminar a nivel genético entre las cepas aisladas de alimentos de colección y un control patógeno, a través de la amplificación de los genes *cylA*, *cylLI*, *cylLs* y *entA*.
- Evaluar fenotípicamente la capacidad hemolítica de las cepas patógenas de colección, y de las cepas aisladas de alimentos.
- Evaluar fenotípicamente la producción de bacteriocinas con actividad antilisterial por parte de *E. faecium* y *E. faecalis*.

8.- METODOLOGÍA

La figura 9 muestra un esquema que explica de manera resumida la metodología que se siguió a lo largo de este proyecto.

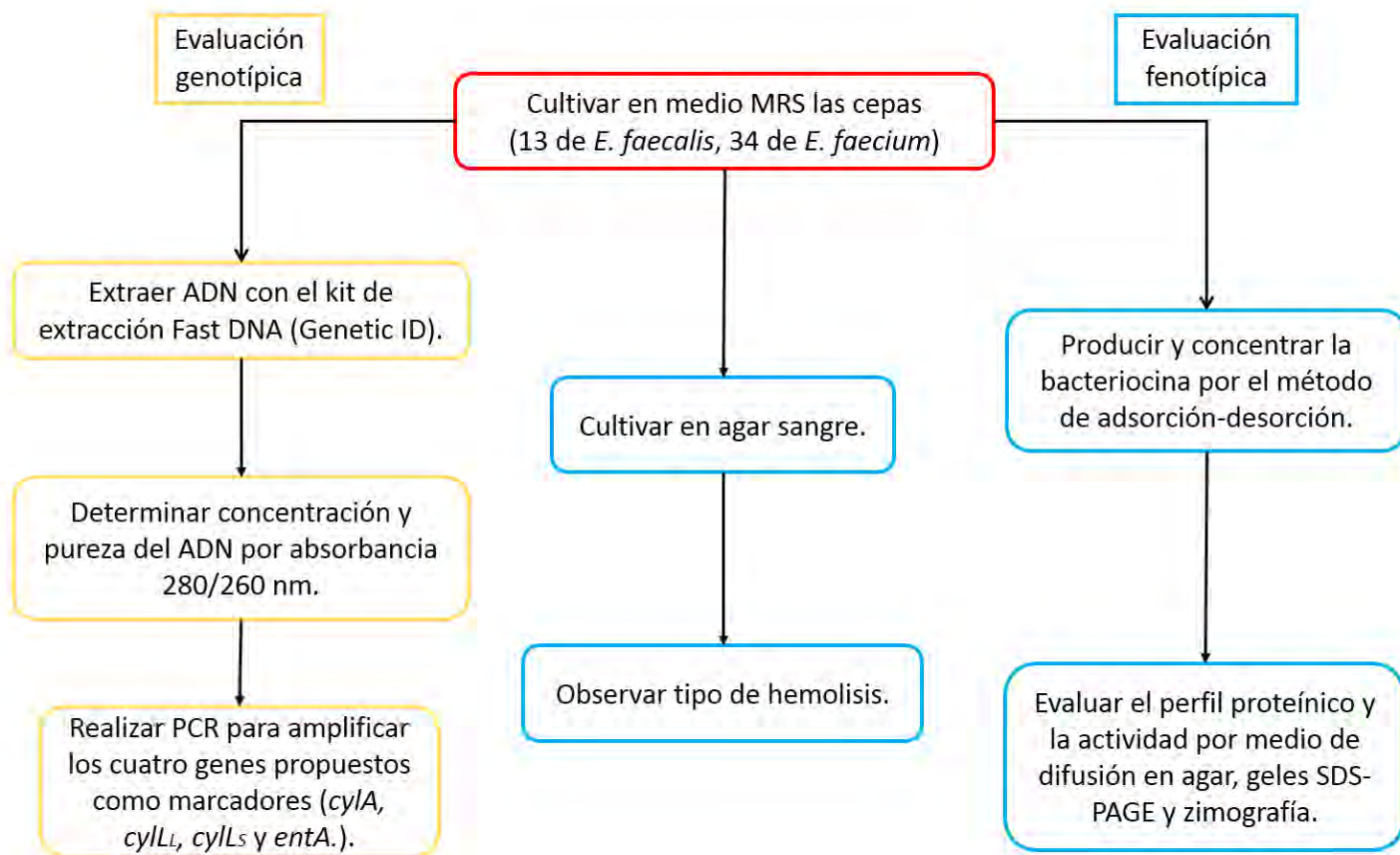


Figura 9. Diagrama general de trabajo.

8.1.- Evaluación genotípica

8.1.1.- Reactivación de las cepas

Las cepas aisladas del queso Cotija (mencionadas en la Tabla 3) se encuentran almacenadas en tubos crioviales a -20°C , en medio MRS con glicerol al 15%; para reactivarlas se descongelaron los tubos a 4°C , posteriormente se inocularon $80\mu\text{L}$ del medio con glicerol en 5mL de medio MRS y se dejaron en incubación durante 24h a 37°C , posteriormente se obtuvieron los pellets de bacterias centrifugando a 8000 rpm por 15 minutos a 4°C , a partir del pellet se realizó la

extracción de ADN utilizando el kit de extracción de ADN genómico Fast ID, de Genetic ID.

Tabla 3. Cepas de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* con las que se trabajó a lo largo del proyecto.

Clave	Cepa	Clave	Cepa
1	<i>E. faecium</i> A4-1	10	<i>E. faecalis</i> QG-2
2	<i>E. faecium</i> A4-2	18	<i>E. faecalis</i> A5-2
3	<i>E. faecium</i> A4-3	29	<i>E. faecalis</i> QB-1
6	<i>E. faecium</i> A4-6	30	<i>E. faecalis</i> QB-2
8	<i>E. faecium</i> A4-8	31	<i>E. faecalis</i> QC-1
12	<i>E. faecium</i> QD-1	32	<i>E. faecalis</i> QC-2
14	<i>E. faecium</i> QG-4	34	<i>E. faecalis</i> QA-2
15	<i>E. faecium</i> QG-3	35	<i>E. faecalis</i> QA-3
16	<i>E. faecium</i> QD-2	A	<i>E. faecalis</i> FM-YLV
17	<i>E. faecium</i> QE-2	C	<i>E. faecalis</i> V583
19	<i>E. faecium</i> QG-5	D	<i>E. faecalis</i> ATTC 29212
21	<i>E. faecium</i> QE-4		
22	<i>E. faecium</i> QD-3		
F	<i>E. faecium</i> MXVK29		

Las cepas FM-YLV, ATCC 292212 y la V583 son cepas de aislados clínicos mientras que la cepa MXVK29 es una cepa probiótica aislada de un chorizo español. Estas cuatro cepas fungieron como cepas control a lo largo del proyecto y no se encuentran como parte de la microbiota del queso Cotija.

8.1.2.- Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó un kit de extracción de ADN genómico Fast ID, de la marca Genetic ID. Para realizar la extracción se obtuvo un pellet de células mediante centrifugación, posteriormente se trataron utilizando una serie de soluciones buffer de lisis y de lavado, cuya función es desintegrar la membrana celular y eliminar sustancias como lípidos y proteínas. La solución resultante se hace pasar por unas pequeñas columnas, las cuales contienen una

membrana de sílice, su función es retener el ADN por adsorción mientras que todas las demás impurezas atraviesan la membrana, esto permite que el ADN se pueda concentrar y purificar ya que permanece adherido a la membrana todo el tiempo. Al final se hace pasar una solución de buffer Tris-EDTA, el cual desorbe y solubiliza al ADN adherido en la membrana y le permite atravesarla, de esta manera se obtiene un concentrado de ADN puro y de buena calidad para realizar la reacción de PCR.

Para corroborar dicha pureza se debe medir la absorbancia del extracto a las longitudes de onda de 280 y 260 nm. El ADN se considera puro cuando el resultado de la división de los valores obtenidos a 280/260 se encuentre en un intervalo entre 1.8 y 2.2, valores inferiores o superiores indican una mala calidad del ADN y no se considera útil para la reacción de PCR (Thermo Scientific, 2012). La absorbancia 280/260nm se midió en el equipo EPOCH (BioTek), el equipo indica como resultado el valor de absorbancia 280/260nm y además proporciona la concentración de ADN presente en la muestra.

8.1.3.- Amplificación de los genes

Se realizaron las reacciones de amplificación utilizando la enzima Taq polimerasa (Thermo Scientific), para ello se determinaron los volúmenes de cada reactivo a utilizar por cada reacción (Tabla 4), se determinaron las condiciones de temperatura de la reacción tomando como base las indicadas por el proveedor de la enzima y se ajustaron de acuerdo al tamaño del amplicón esperado así como a las temperaturas de alineamiento de los cebadores, las condiciones la reacción se encuentran en las Tablas 5, 6, 7 y 8.

Los cebadores para los genes *cyLL* y *cyLS* se diseñaron en el laboratorio, pues no se encontró una referencia en la cual se utilizaran cebadores para amplificar dichos genes; para ello se buscó en la base de datos NCBI las secuencias correspondientes a los genes *cyLL* y *cyLS*, dichas secuencias lograron encontrarse como parte de la secuencia del plásmido pAD1 de *E. faecalis*, con el número de acceso genbank L37110 y son de tamaño 207pb para *cyLL* y de 192pb para *cyLS*.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes a utilizar por cada reacción de PCR.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen a agregar (μL)
Agua grado biología molecular	--	--	27
Buffer Taq	10x	1x	5
dNTP's	2 μM	0.2 μM	5
Cebador de ida	100 μM	0.3 μM	0.15
Cebador de regreso	100 μM	0.3 μM	0.15
MgCl ₂	25mM	2mM	4
Taq Polimerasa	5U/ μL	1U	0.25
ADN	20ng/ μL	100ng	5
Volumen final de reacción:	50 μL		

Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR para *cyIA*.

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30s	30
Alineamiento	49	30s	
Extensión	72	1min	
Extensión final	72	10min	1

Tabla 6. Condiciones de la reacción de PCR para *cyLL*.

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30s	30
Alineamiento	56	30s	
Extensión	72	10s	
Extensión final	72	10min	1

Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR para *cyLLs*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30s	30
Alineamiento	55	30s	
Extensión	72	10s	
Extensión final	72	10min	1

Tabla 8. Condiciones de la reacción de PCR para *entA*.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30s	30
Alineamiento	42	30s	
Extensión	72	30s	
Extensión final	72	10min	1

Tabla 9. Secuencias y temperaturas de alineamiento de los cebadores a utilizar.

Gen	Secuencia del cebador	Tamaño del amplicón (pb)	Tm (°C)	Referencia
<i>cyIA</i>	F: 5'-TAGCGAGTTATATCGTTCACTGTA-3' R: 5'-CTCACCTCTTTGTATTTAAGCATG-3'	688	F: 52.3 R: 52.3	Martin-Platero <i>et al.</i> , 2009.
<i>cyLL</i>	F: 5'-AGAACTAAGTGTTGAGGAAATGG-3' R: 5'-TTAAAGACACAACACTACAGTTACTCC-3'	164	F: 61 R: 61	Este trabajo
<i>cyLLs</i>	F: 5'-TAGAACTTGTTGGTCCTTCTTT-3' R: 5'-ATAATGCACCTACTCCTAAGC-3'	130	F: 60 R: 60	Este trabajo
<i>entA</i>	F: 5'-AAATATTATGGAAATGGAGTGTAAT-3' R: 5'-GCACTTCCCTGGAATTGCTC-3'	141	F: 45 R: 45	Álvarez-Cisneros, 2011.

Posteriormente, para el diseño de los cebadores se introdujeron las secuencias en la herramienta Primer Quest Tool del sitio IDT (Figura 10), el cual permite la modificación de diversos parámetros al momento de introducir las secuencias y que se considerarán al momento de mostrar un resultado (como puede ser por

ejemplo una Tm fija, un tamaño de cebadores fijo, etc.). Para obtener secuencias apropiadas únicamente se redujo el tamaño del amplicón deseado a 160pb para el caso de *cy/L_L* y 130pb para el caso de *cy/L_S*, pues tamaños mayores indicaban que no había un diseño posible que cumpliera con los parámetros requeridos para el diseño de cebadores y tamaños menores son muy propensos a dar como resultado una amplificación inespecífica al momento de la reacción. Los resultados obtenidos por la plataforma se muestran en la Tabla 8 y fueron los que se sintetizaron en la compañía IDT.

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

GET HELP CARLOS MENDOZA

0 ITEMS

PRODUCTS & SERVICES SUPPORT & EDUCATION TOOLS COMPANY

ORDER MENU You are using the Uniparts-Mexico IDT portal.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

Sequence Entry

Enter sequence(s) manually

```
ATGGAAAATTTAAGTGTAGTTCCTAGTTTTGAAGAACTAAGTGTGAGGAAATGGAAGCGATCAAGGTAGTGGAGATGTCAGGCTGAGACAACACCGGTGTGTGCTGTTGCGGGCGACAGCTGCAGCAAGTAGTGTGCTGCTTGTGGCTGGTGGTGGCGGTATTTTACTGGAGTAACTGTAGTTGTCTTTAAACATTGTTAA
```

Hints

- Paste your sequence into the Textbox
- Add up to 50 sequences in FASTA format
- Sequence length must be greater than 80 bases
- PrimerQuest accepts only nucleic acid bases

Sequence Name: Sequence 1 CLEAR SEQUENCE ENTRY

Download sequence(s) using Genbank or Accession ID

Upload sequences in an Excel file

Choose Your Design

HIDE CUSTOM DESIGN PARAMETERS

Figura 10. Imagen de la herramienta Primer Quest Tool del IDT. Se muestra la secuencia del gen *cy/L_L* en el menú de introducción de secuencias (solo se muestra una parte de las opciones).

Una vez realizadas las reacciones de amplificación, se prepararon geles de agarosa al 1% (para el gen *cyIA*) y al 1.5% (para los genes *entA*, *cyLL* y *cyLS*) y se tiñeron con bromuro de etidio al 0.01% para poder observar la presencia o ausencia del amplicón, el procedimiento detallado para la elaboración de los geles de agarosa se encuentra en el anexo 13.4.

Como control positivo para los genes *cyIA*, *cyLL* y *cyLS* se utilizó ADN de las cepas patógenas *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* V583 y *E. faecalis* FM-YLV; y para el gen *entA* se utilizó ADN de la cepa *E. faecium* MXVK29 aislada de un chorizo español.

8.2.- Evaluación fenotípica:

Se realizaron las pruebas fenotípicas para corroborar los resultados obtenidos en la evaluación genotípica y poder determinar si hay expresión de los genes en caso de encontrarse un resultado positivo en el análisis por PCR.

8.2.1.- Prueba de hemólisis en agar sangre

Para la evaluación correspondiente a los genes *cyIA*, *cyLI* y *cyLS* se realizaron cultivos en agar sangre de las cepas para observar si había producción de citolisina por medio del cambio de color en el medio debido a la hemólisis de los eritrocitos. En esta prueba se utiliza como control positivo una cepa de *Streptococcus pyogenes* de la colección del laboratorio y el cual se sabe que presenta β -hemólisis en el medio. Las cajas de agar utilizadas (cuya composición se presenta en la Tabla 10) ya vienen preparadas y listas para su uso, son fabricadas y distribuidas por la empresa Biomérieux.

Para realizar la prueba se tomaron 5 μ L de células conservadas en glicerol y se resuspendieron en 3mL de medio MRS, posteriormente se incubaron a 37°C por 24h. Pasadas las 24h se agitaron los cultivos y se hicieron diluciones 1/100 utilizando solución salina isotónica (SSI) como diluyente, posteriormente se inoculó por agotamiento radial para de esta manera obtener colonias aisladas y poder distinguir más fácilmente el cambio en la coloración del medio; las cajas se incubaron a 37°C por 24 h, una vez transcurrido el tiempo se determinó el tipo de hemólisis con base en el cambio de coloración del medio alrededor de las colonias aisladas.

Tabla 10. Composición del agar sangre (Biomérieux).

Componente	Cantidad
Peptona de caseína-soja	8.2 g
Polipeptona bacteriológica	3.5 g
Extracto de levadura	5.0 g
Glucosa	5.8 g
Buffer de tris (hidroximetil) amino-metano	3.0 g
Cloruro de sodio	1.7 g
Hemina	10 mg
L-cisteína	0.4 g
Agar-agar	13.5 g
Sangre de oveja	5%

8.2.2.- Evaluación de la actividad contra *Listeria monocytogenes*

Como se mencionó anteriormente, la enterocina A se caracteriza por tener una gran actividad antagónica contra el microorganismo *Listeria monocytogenes*, es por ello que la evaluación de la actividad se realizó utilizando este microorganismo como indicador, para esto se produjo la enterocina y se concentró utilizando el método de adsorción-desorción, al obtener el concentrado se midió la concentración de proteína por el método de Bradford y se realizaron pruebas de difusión en agar y de geles SDS-PAGE y zimografía.

8.2.2.1.- Producción de la bacteriocina

Para la evaluación de la producción de la enterocina A se realizó una metodología de concentración de bacteriocinas conocida como adsorción-desorción dependiente del pH (Yang, 1992; Álvarez-Cisneros, 2011; Segundo, 2017). La técnica consiste en tomar un cultivo bacteriano del microorganismo a analizar y realizar modificaciones en el pH, primero se ajusta a un valor de 5 para promover la adsorción de la bacteriocina a la membrana celular de las bacterias productoras del compuesto, luego se elimina el sobrenadante, se lavan las células y se resuspenden en una solución a pH=1 para desorber la bacteriocina de la membrana, posteriormente se colecta el sobrenadante, se neutraliza y se

concentra para así obtener una preparación de la bacteriocina que sirve para posteriores análisis, en el Anexo 12.1 se describe la metodología con más detalle.

8.2.2.2.- Difusión en agar

La técnica de difusión en agar consiste en depositar una pequeña cantidad de concentrado extracelular en pequeños pozos hechos en una caja Petri con medio semi-sólido, el cual contiene un tapete de algún microorganismo indicador contra el cual se desee evaluar la actividad inhibitoria, lo que ocasiona que el medio se vea opaco. Un resultado positivo se observa al haber un halo translúcido en los alrededores de aquellos pozos que contengan el extracto activo y que se deberá a la difusión de la proteína o sustancia inhibidora hacia el medio y que evita el crecimiento del microorganismo.

8.2.2.3.- Geles SDS-PAGE y zimografía

Este tipo de geles son utilizados para lograr la separación de las proteínas de una muestra con base en su tamaño. Lo que se hace es desnaturalizar a todas las proteínas presente a través de la adición de un reactivo desnaturalizante (generalmente se ocupa SDS) a la muestra que se va a encargar de romper todas las interacciones entre los aminoácidos para así llevar a la proteína hasta su estructura primaria, el SDS además va a formar un complejo con los péptidos de manera que le otorga una carga neta total a la proteína que va a estar en función de su tamaño y que por medio de una electroforesis puede lograr una separación eficaz de las proteínas, se debe tratar la muestra calentándola y añadiendo β -mercaptoetanol, el cual tiene la función de romper los enlaces disulfuro presentes en las proteínas para así asegurar que la proteína se encuentre completamente desnaturalizada antes de cargar la muestra en el gel. Tras la electroforesis se realiza una tinción (generalmente se utilizan tinciones con nitrato de plata o con azul brillante de Coomassie) que permite visualizar a las proteínas, se comparan además con un marcador de peso que permite una estimación aproximada del tamaño de las proteínas presentes en la muestra (Schägger y Von Jagow, 1987). Los geles de zimografía se realizan de manera similar, con la diferencia de que están embebidos con un sustrato de interés que permite la visualización de una actividad lítica que se desee observar (en este

caso se desea visualizar la actividad lítica contra el microorganismo *L. monocytogenes*), para lograr esto se sumerge el gel en una solución renaturalizante (Tris-HCl 100mM, Tritón 1% a pH=8) tras la electroforesis que le permite a las proteínas recobrar su actividad lítica, la aparición de una banda traslúcida en un fondo opaco indica que la proteína posee actividad contra el sustrato de interés, los zimogramas también pueden ser teñidos con colorantes (por ejemplo, azul de metileno) que permiten un contraste mucho más claro de la banda activa contra el fondo opaco. La metodología realizada se describe con mayor detalle en el Anexo 12.3.

9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la extracción de ADN de todas las cepas por duplicado, se determinó la concentración y la pureza por medio de absorbancia 260/280nm utilizando el equipo EPOCH de BioTeK. Los extractos que obtuvieron un valor 260/280 entre 1.8 y 2.2 y una concentración de por lo menos 20 ng/μL de ADN se guardaron a -20°C para su posterior uso en las reacciones de PCR. Se repitió la extracción de ADN de los microorganismos cuyo extracto quedara fuera del intervalo y no tuviera al menos 20 ng/μL de ADN.

Tras esto se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en la cual se corrió el extracto de ADN de algunas muestras aleatorias con el objetivo de observar su integridad y con esto confirmar que el ADN extraído con el kit era de buena calidad. También se realizó una reacción de PCR amplificando el gen ribosomal 16S la cual tuvo el objetivo de determinar si el ADN tenía calidad amplificable, los resultados de esta amplificación se observan en la Figura 11, en la cual se observan 2 bandas, una de 1000 pb la cual podría corresponder al ADN plasmídico de *Enterococcus*, y la segunda mayor a 10 000 pb, la cual corresponde al ADN genómico.

En la Figura 12, las bandas corresponden a los amplicones del gen ribosomal 16S, el cual tiene un tamaño aproximado de 1500 pb. En ambas figuras se observan bandas perfectamente nítidas y claras, lo que significa que el ADN extraído con el kit es de buena calidad y la reacción de PCR se está llevando a cabo adecuadamente. Cabe resaltar que en el gel con ADN genómico se observan dos bandas, una de tamaño mayor a 10 000 pb la cual corresponde al ADN genómico, así como una segunda banda muy nítida de 1000 pb la cual se puede atribuir a dos factores, una posibilidad es que se trate de algún tipo de contaminación proveniente del kit. La segunda posibilidad es que se trate de ADN plasmídico.

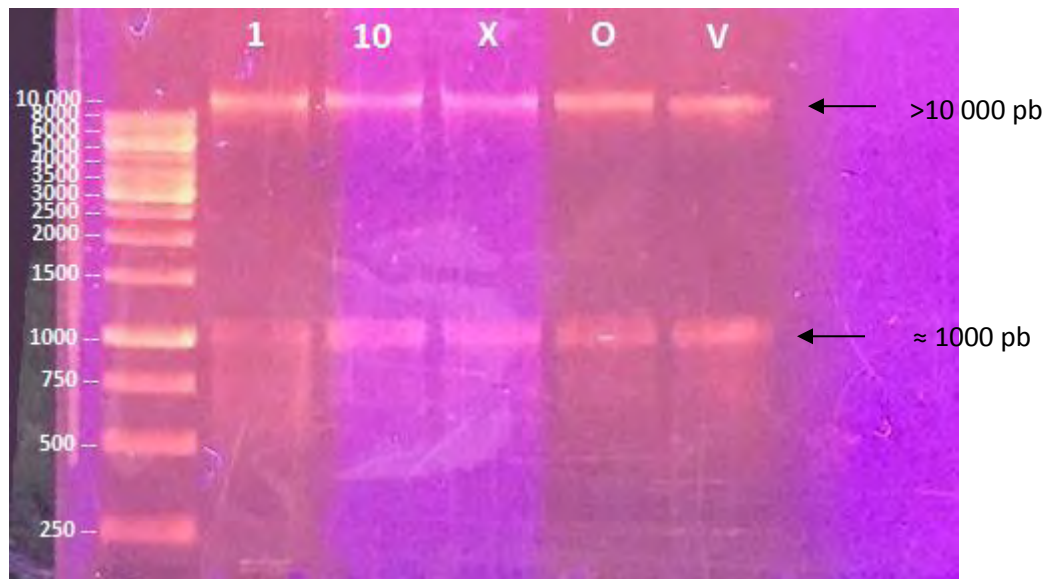


Figura 11. Evaluación de la integridad del ADN extraído con el kit. Las muestras 1 y 10 corresponden a *E. faecium* y *E. faecalis* respectivamente, las muestras X, O y V corresponden a *Lactobacillus* sp. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.01%, corrida a 80 V, marcador de peso GeneRuler 1kb #SM1163 (Thermo Scientific).

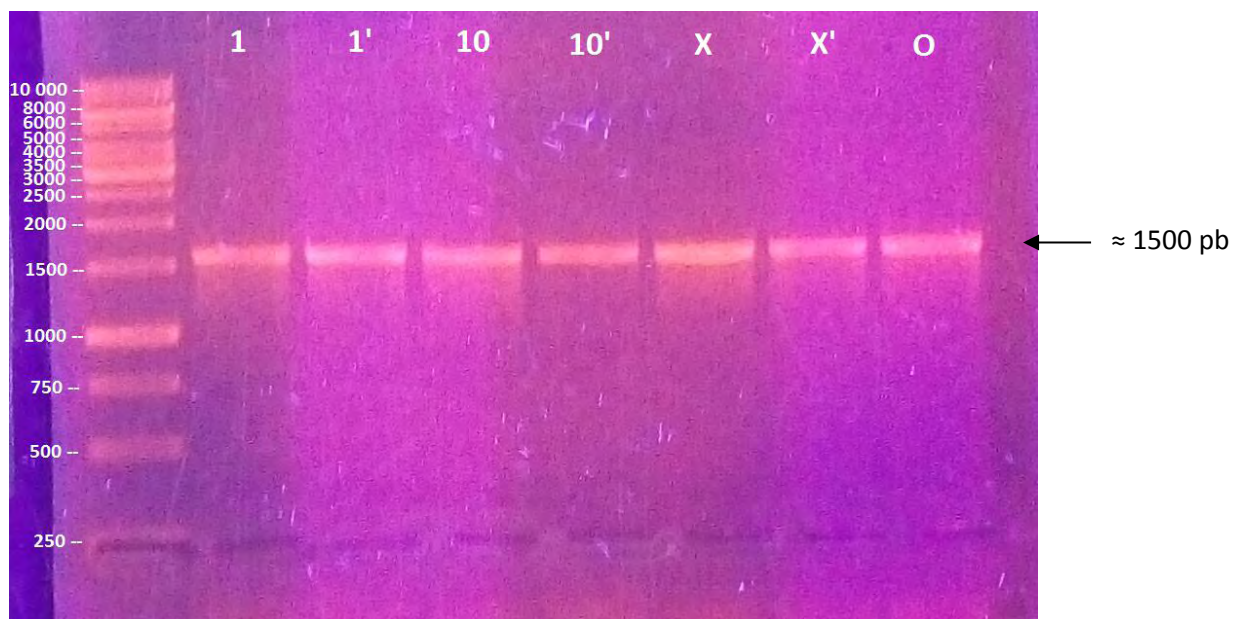


Figura 12. Evaluación de la amplificación del gen ribosomal 16S. Las muestras 1 y 10 corresponden a *Enterococcus faecium* y *faecalis* respectivamente, las muestras X y O corresponden a *Lactobacillus* sp., las muestras marcadas como 1',10', etc. corresponden a sus respectivos duplicados. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.01%, corrida a 80 V, marcador de peso GeneRuler 1kb #SM1163 (Thermo Scientific).

Para corroborar este resultado se corrió ADN del resto de las cepas en geles de agarosa al 1% para observar si todas presentaban la banda de 1000 pb. También se realizó un protocolo de extracción utilizando agua destilada en lugar de células con el objetivo de verificar si había contaminación por parte del kit. Con base en los resultados obtenidos en los geles se construyó la Tabla 11, en donde se condensan los resultados obtenidos para este análisis.

Tabla 11. Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 1% para cada muestra de ADN extraído con el kit.

Cepa	Presencia de la banda de 1000pb	Cepa	Presencia de la banda de 1000pb
<i>E.faecium</i> A4-1	Positivo	<i>E.faecalis</i> QB-1	Negativo
<i>E.faecium</i> A4-2	Positivo	<i>E.faecalis</i> QB-2	Negativo
<i>E.faecium</i> A4-3	Negativo	<i>E.faecalis</i> QC-1	Positivo
<i>E.faecium</i> A4-6	Positivo	<i>E.faecalis</i> QC-2	Positivo
<i>E.faecium</i> A4-8	Negativo	<i>E.faecalis</i> QA-2	Positivo
<i>E.faecium</i> QD-1	Negativo	<i>E.faecalis</i> QA-3	Positivo
<i>E.faecium</i> QG-4	Positivo	<i>E.faecalis</i> QG-2	Positivo
<i>E.faecium</i> QG-3	Positivo	<i>E.faecalis</i> A5-2	Negativo
<i>E.faecium</i> QD-2	Negativo	<i>E.faecalis</i> ATTC 29212	Positivo
<i>E.faecium</i> QE-2	Negativo	Blanco de reactivos	Negativo
<i>E.faecium</i> QG-5	Positivo		
<i>E.faecium</i> QE-4	Negativo		
<i>E.faecium</i> QD-3	Positivo		
<i>E. faecium</i> MKXYV	Negativo		

Como se observa el blanco de reactivos arrojó un resultado negativo y además hubo cepas que no presentaron la banda de 1000 pb, lo que significa que el kit está en buen estado y la banda de 1000 pb era propia del ADN de las cepas que lo presentan. Se ha reportado la presencia de plásmidos en *Enterococcus*, pues

es un género bacteriano que posee una alta frecuencia de conjugación (Giraffa, 2003), característica considerada de importancia ya que en estos plásmidos pueden estar codificados factores de virulencia y resistencias a antibióticos tal y como ocurre con los *Enterococcus* patógenos. Sin embargo, el que una cepa presente plásmidos no necesariamente implica que posean estos factores de virulencia y por lo tanto no es un resultado concluyente para determinar si estas cepas pueden o no ser patógenas.

9.1.- Resultados para el marcador de citolisina

9.1.1.- Resultados genotípicos

Una vez obtenidos los extractos de ADN de cada cepa de la colección de laboratorio se realizaron las reacciones de amplificación de los genes por cuadruplicado (dos por cada extracto de ADN) para cada una de las cepas problema y se corrieron los geles correspondientes, en el caso del gen *cyIA* se esperaba un tamaño de amplicón de 688 pb y se realizaron geles de agarosa al 1%, uno de los cuales puede observarse en la Figura 13, los resultados para todas las cepas se resumen en la Tabla 12. Las muestras 6, 8, 10, 12 y 14 corresponden a *E. faecium* A4-6, *E. faecium* A4-8, *E. faecalis* QG-2, *E. faecium* QD-1 y *E. faecium* QG-4 respectivamente. Únicamente el control positivo (*E. faecalis* ATTC 29212) presentó una banda de entre 500pb y 750pb, el tamaño del amplicón esperado es de 688pb.

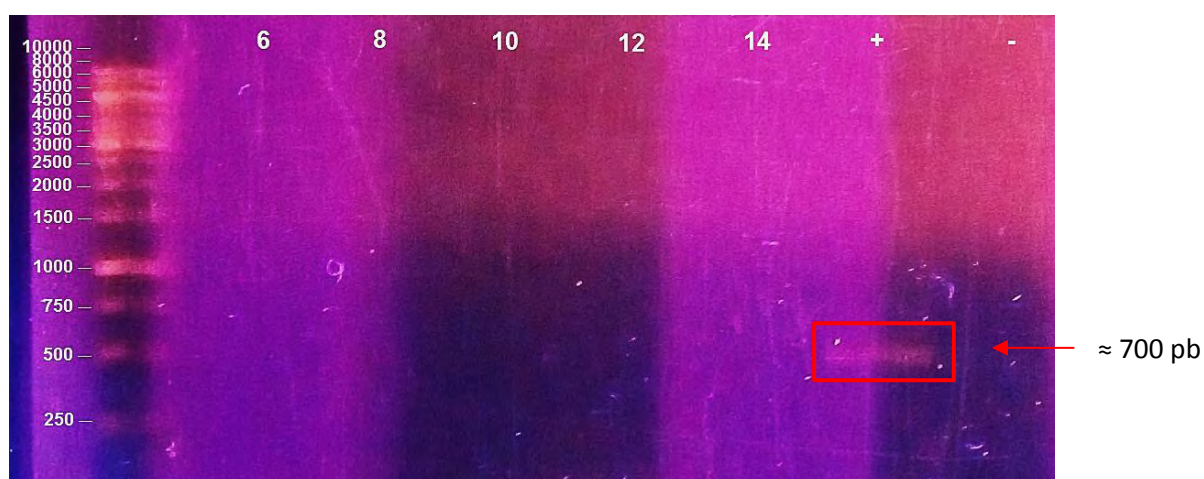


Figura 13. Evaluación de la presencia del gen *cyIA*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio al 0.01%, corrida a 80 V, marcador de peso GeneRuler 1kb #SM1163 (Thermo Scientific).

Tabla 12. Resultados del análisis genético para evaluar la presencia del gen *cylA* en *E. faecium* y *faecalis*.

Cepa	Resultado	Cepa	Resultado
<i>E. faecium</i> A4-1	Negativo	<i>E. faecalis</i> A5-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> QG-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-3	Negativo	<i>E. faecalis</i> QB-1	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-6	Negativo	<i>E. faecalis</i> QB-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-8	Negativo	<i>E. faecalis</i> QC-1	Negativo
<i>E. faecium</i> QD-1	Negativo	<i>E. faecalis</i> QC-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-4	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-3	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-3	Negativo
<i>E. faecium</i> QD-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Positivo
<i>E. faecium</i> QE-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> V583	Positivo
<i>E. faecium</i> QG-5	Negativo	<i>E. faecalis</i> FM-YLV	Positivo
<i>E. faecium</i> QE-4	Negativo		
<i>E. faecium</i> QD-3	Negativo		
<i>E. faecium</i> MXVK29	Negativo		

Como se observa en la Tabla 12, sólo las cepas patógenas presentaron el gen que codifica para la proteína CylA mientras que ninguna de las cepas aisladas de alimentos lo presentó, lo que significa que estas cepas de alimentos no producen la enzima responsable de la maduración de la citolisina y por lo tanto no presentarán actividad hemolítica y su potencial patogénico se ve significativamente reducido por la ausencia de este factor (Domann *et al.*, 2007). Esto concuerda con los resultados obtenidos previamente, en los que se realizó el mismo análisis de PCR en cepas del queso Cotija y el queso bola de Ocosingo;

en ambos casos las cepas de alimentos presentaron un resultado negativo (Olvera, 2013; Urrieta, 2018). Semedo y colaboradores (2003) realizaron un estudio en el que se evaluó la prevalencia de genes del operón *Cyl* en cepas de *Enterococcus* de distintos nichos ecológicos a través de análisis genómicos y fenotípicos, el estudio reveló que las cepas de origen nosocomial tenían mucho mayor prevalencia del operón que cepas de origen distinto al nosocomial.

Después se realizaron las reacciones de PCR correspondientes a los genes *cyiL_L* y *cyiL_S*, el tamaño de amplicón que se espera es de 164pb y de 130pb respectivamente. Para ambos casos se realizaron geles de agarosa al 1.5%, dos de los cuales pueden observarse en las Figuras 14 y 15. Los resultados resumidos para todas las cepas pueden observarse en las Tablas 13 y 14. Las muestras 6, 8 y 10 corresponden a *E. faecium* A4-6, *E. faecium* A4-8 y a *E. faecalis* QG-2, así como sus repeticiones respectivamente. Únicamente el control positivo (*E. faecalis* FM-YLV) presentó una banda de entre 100pb y 200pb, el tamaño del amplicón esperado es de 164pb.

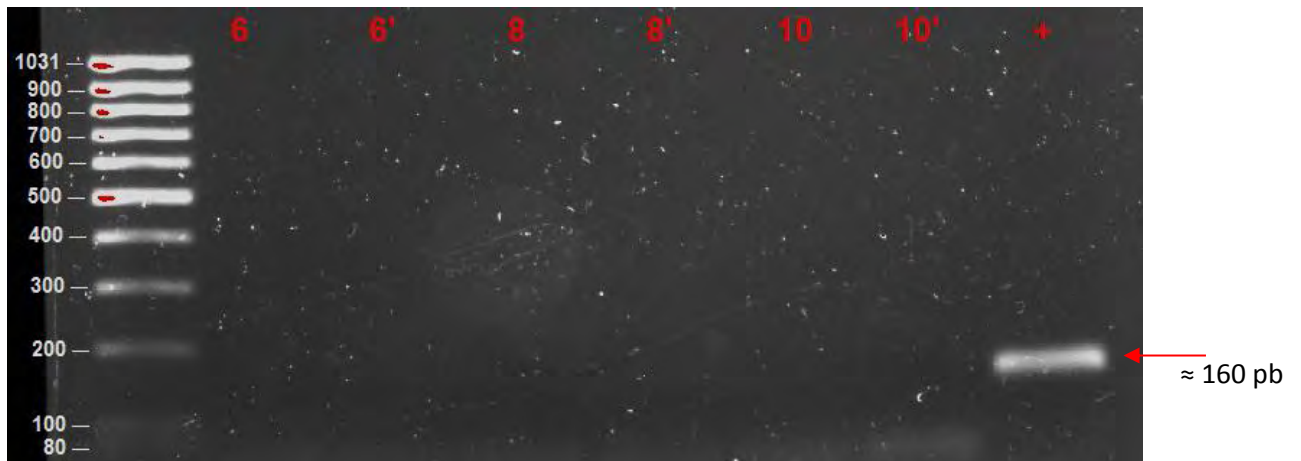


Figura 14. Evaluación de la presencia del gen *cyiL_L*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio al 0.01%, corrida a 80 V, marcador de peso GeneRuler Low Range #SM0383 (Thermo Scientific).

Tabla 13. Resultados del análisis genético para evaluar la presencia del gen *cyLL_L* en *E. faecium* y *faecalis*.

Cepa	Resultado	Cepa	Resultado
<i>E. faecium</i> A4-1	Negativo	<i>E. faecalis</i> A5-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> QG-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-3	Negativo	<i>E. faecalis</i> QB-1	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-6	Negativo	<i>E. faecalis</i> QB-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-8	Negativo	<i>E. faecalis</i> QC-1	Negativo
<i>E. faecium</i> QD-1	Negativo	<i>E. faecalis</i> QC-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-4	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-3	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-3	Negativo
<i>E. faecium</i> QD-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Positivo
<i>E. faecium</i> QE-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> V583	Positivo
<i>E. faecium</i> QG-5	Negativo	<i>E. faecalis</i> FM-YLV	Positivo
<i>E. faecium</i> QE-4	Negativo		
<i>E. faecium</i> QD-3	Negativo		
<i>E. faecium</i> MXVK29	Negativo		

En la Figura 15, las muestras 1, 2 y 3 corresponden a *E. faecium* A4-1, *E. faecium* A4-2 y *E. faecium* A4-3 respectivamente. Las tres muestras presentan una banda de entre 100pb y 200pb; sin embargo la intensidad de las bandas de las muestras es muy tenue en comparación con el control (*E. faecalis* V583). El tamaño del amplicón esperado es de 130pb.

El resultado para el marcador *cyL_S* indica que posiblemente exista una amplificación inespecífica en las muestras o en su defecto que la cantidad de ADN es muy poca para lograr observar una banda más nítida, es por eso que las amplificaciones posteriores se realizaron utilizando el doble de ADN (es decir, 200ng por cada tubo de reacción) para así eliminar esa posible interferencia. A pesar de lo anterior en los siguientes análisis se continuaron obteniendo bandas muy tenues en comparación al control por lo que se comprobó que la baja intensidad no se debía a una baja cantidad de ADN en el tubo de reacción.

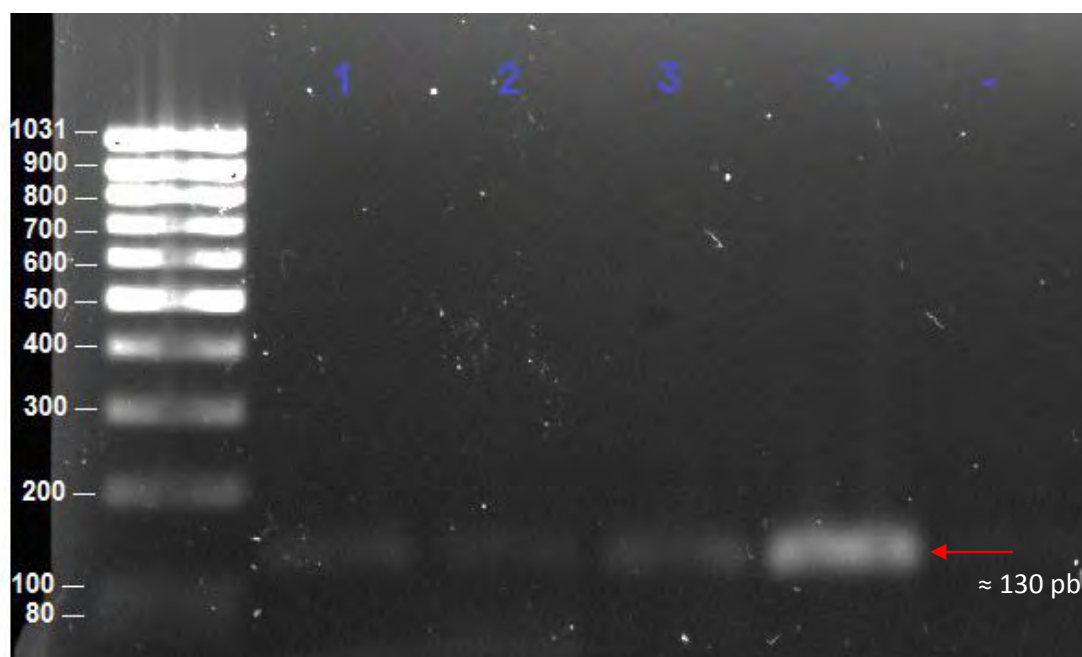


Figura 15. Evaluación de la presencia del gen *cyL_S*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio al 0.01%, corrida a 80 V, marcador de peso GeneRuler Low Range #SM0383 (Thermo Scientific).

Una vez realizado el análisis genómico para los genes *cyL_L* y *cyL_S*, se puede asegurar que ninguna de las cepas de alimentos posee la capacidad de producir la citolisina en su forma activa; si se toma en cuenta el mecanismo de síntesis de la citolisina se observa que la modificación realizada por la enzima CylA es requerida para la activación de las subunidades y la formación de la enzima activa (Tyne, 2013). Además la ausencia del gen *cyL_L* implica la ausencia de la subunidad CylL_L, por lo tanto la citolisina no se sintetiza por parte de las cepas del queso Cotija. En cuanto a la subunidad CylL_S, es difícil asegurar que haya una síntesis o una ausencia pues el resultado obtenido en el análisis genómico

nos muestra un resultado poco claro y convincente en contraste con el resultado arrojado por las cepas de aislados clínicos que si presentan los tres genes analizados y presentan bandas mucho más claras que las obtenidas en las muestras de alimentos, por lo que se requiere un análisis más profundo de este factor de virulencia en estas cepas de alimentos por medio de otras técnicas como podría ser la secuenciación de las bandas obtenidas, o en su defecto un PCR tiempo real o por transcriptasa-reversa para poder observar los niveles de expresión del gen en caso de que los hubiera, no se optó por realizar los análisis anteriores debido al alto costo que implica realizarlos.

Tabla 14. Resultados del análisis genético para evaluar la presencia del gen *cylL_S* en *E. faecium* y *faecalis*.

Cepa	Resultado	Cepa	Resultado
<i>E. faecium</i> A4-1	Positivo	<i>E. faecalis</i> A5-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-2	Positivo	<i>E. faecalis</i> QG-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-3	Positivo	<i>E. faecalis</i> QB-1	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-6	Negativo	<i>E. faecalis</i> QB-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-8	Negativo	<i>E. faecalis</i> QC-1	Negativo
<i>E. faecium</i> QD-1	Positivo	<i>E. faecalis</i> QC-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-4	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-3	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-3	Negativo
<i>E. faecium</i> QD-2	Positivo	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Positivo
<i>E. faecium</i> QE-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> V583	Positivo
<i>E. faecium</i> QG-5	Negativo	<i>E. faecalis</i> FM-YLV	Positivo
<i>E. faecium</i> QE-4	Negativo		
<i>E. faecium</i> QD-3	Negativo		
<i>E. faecium</i> MXVK29	Negativo		

9.1.2.- Resultados fenotípicos

Por último, se realizaron las pruebas fenotípicas en agar sangre, primero se realizaron dos inóculos para evaluar si se puede observar o no hemólisis por parte del control positivo, para validar el método se utilizó una caja de prueba contra cinco cepas de *S. pyogenes* de la colección del laboratorio para así determinar si las cajas resultaban útiles o no.

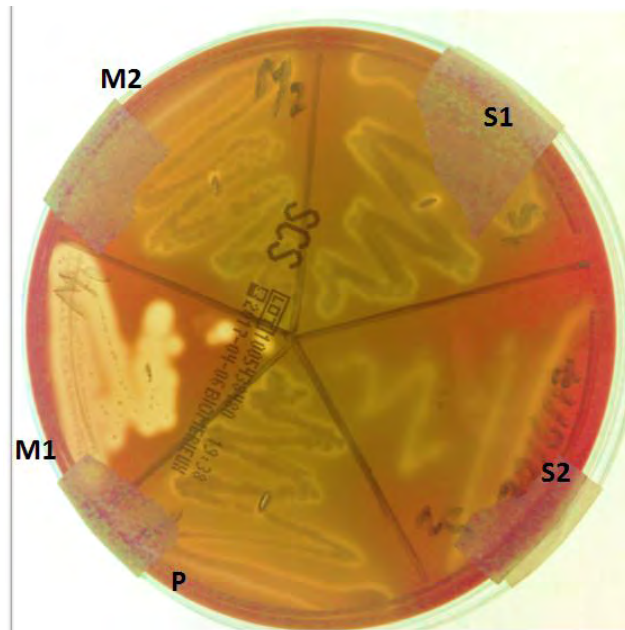


Figura 16. Evaluación de la producción de hemolisina de *S. pyogenes*. Las 5 muestras corresponden a distintas cepas de *S. pyogenes* de distintas colecciones.

Los resultados se observan en la Figura 16, en la cual se puede observar que, a pesar de tratarse de la misma especie, las 5 cepas de *S. pyogenes* presentan una hemólisis distinta en el medio siendo la cepa con clave M1 la única que presenta hemólisis β . Se concluyó que las cajas funcionan correctamente y son útiles para el análisis, con base en los resultados anteriores se optó por utilizar a la cepa de *S. pyogenes* con clave M1 como control positivo para los posteriores análisis.

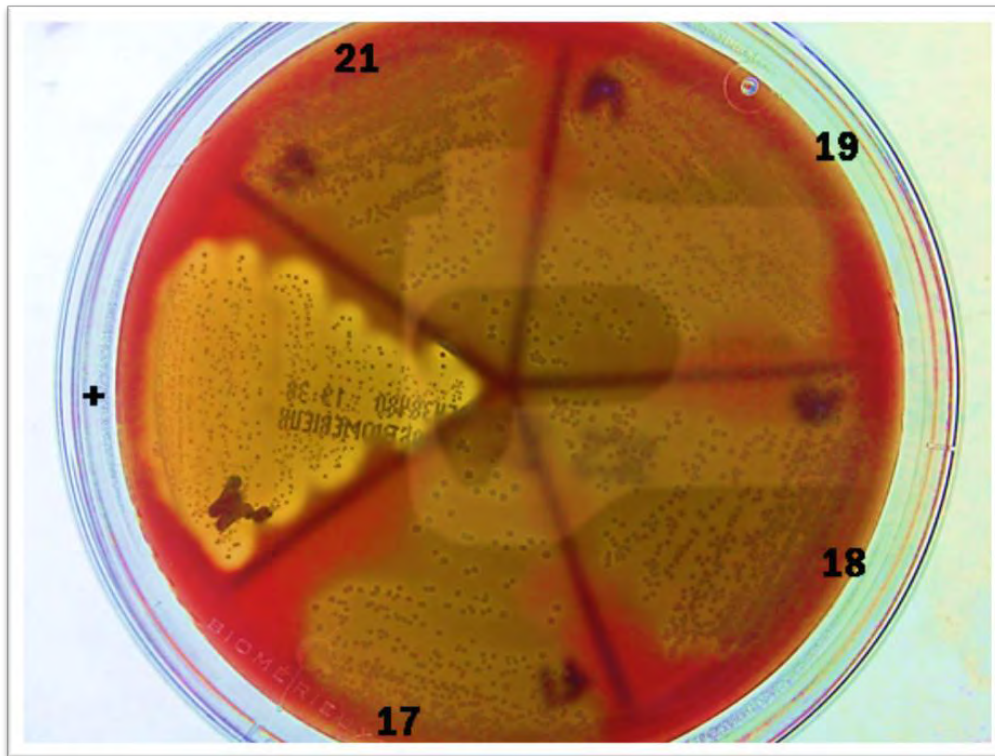


Figura 17. Evaluación de la producción de citolisina de *E. faecium* y *E. faecalis*. Las muestras 17, 18, 19 y 21 corresponden a *E. faecium* QE-2, *E. faecalis* A5-2, *E. faecium* QG-5 y *E. faecium* QE-4 respectivamente. El control positivo corresponde a la cepa *S. pyogenes* β -hemolítico.

En la Figura 17 se puede apreciar un cambio de coloración en el medio debido al crecimiento de las bacterias, es muy posible que dicho cambio se deba a la oxidación del medio debido a algún compuesto producido por los *Enterococcus* y no a una hemólisis como tal, pues todas las cepas presentaron un resultado negativo en el análisis genómico para los genes *cyIA* y *cyiLL* por lo que no cuentan con la maquinaria necesaria para la producción de la citolisina y teóricamente no son capaces de hemolisar a los eritrocitos, para corroborar lo anterior se realizó una prueba con las cepas patógenas de *Enterococcus* de aislados clínicos que si producen la citolisina y que arrojaron resultados positivos en el análisis por PCR para los tres genes evaluados.

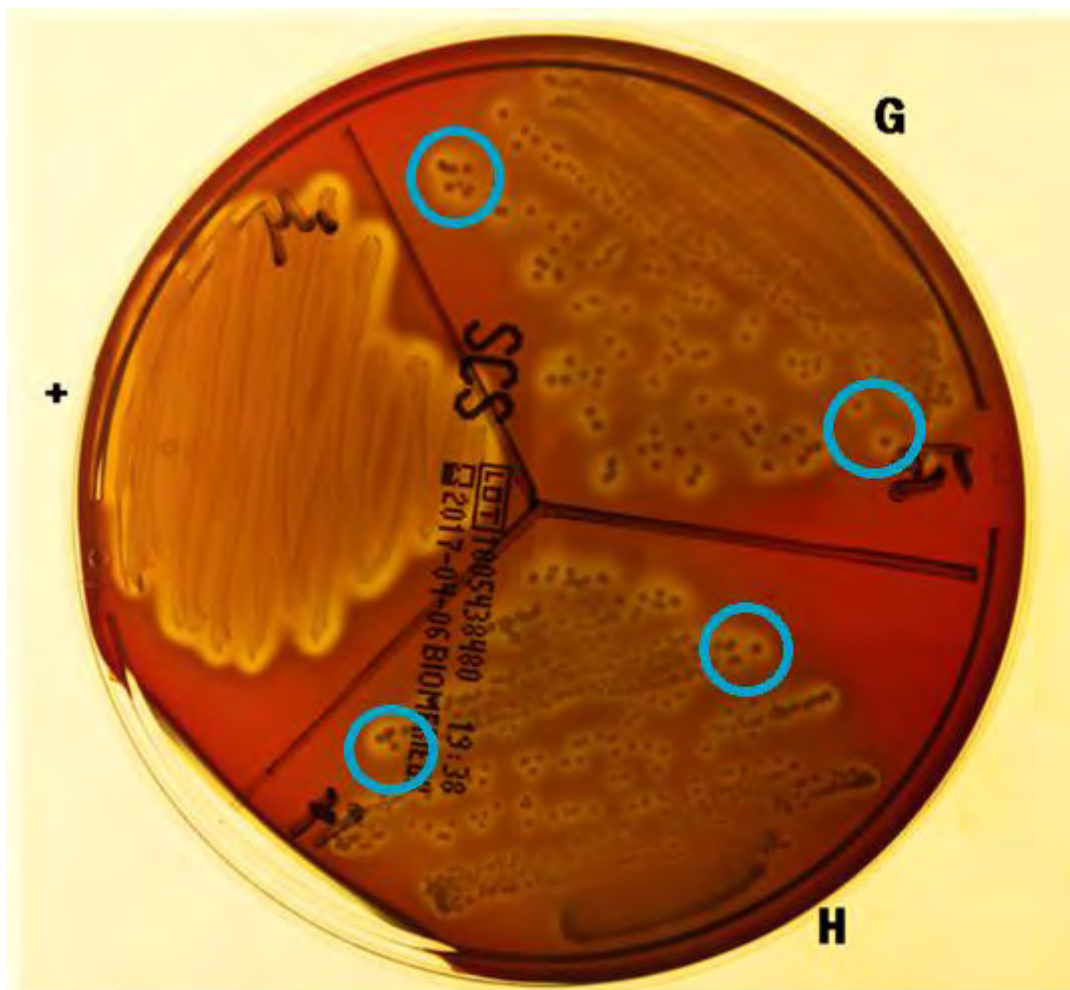


Figura 18. Evaluación de la producción de citolisina de las cepas control. Las muestras G y H corresponden a *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* V583 respectivamente. El control positivo corresponde a *S. pyogenes* β -hemolítico.

Como se puede observar en la Figura 18, las cepas *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* V583 presentan un cambio en la coloración del medio de rojo intenso a amarillo y presentan además un halo traslúcido alrededor de las colonias aisladas especialmente en las zonas indicadas con círculos azules, presentan además halos más claros que las cepas aisladas de alimentos. Hay que tomar en cuenta que estudios previos demuestran que al momento de realizar el análisis fenotípico en agar sangre se debe considerar la susceptibilidad de los eritrocitos y la especificidad de la citolisina hacia éstos, pues se ha demostrado que los eritrocitos de humano, caballo y conejo son sensibles a la citolisina enterococcica mientras que los eritrocitos de oveja y ganso son resistentes a la hemólisis (Semedo *et al.*, 2003); es importante aclarar que las cajas utilizadas

en este trabajo contienen sangre de oveja, lo que puede explicar el bajo potencial hemolítico de las cepas patógenas en comparación a la cepa de *S. pyogenes*.

Además, en el mismo estudio se determinó que una cepa de *Enterococcus* sólo se consideraría como productora de citolisina si produce hemólisis β , pues se observó que muchas de las cepas de origen distinto al nosocomial tienden a presentar lo que aparentemente es hemólisis α ; aun cuando por medio de otros análisis (como PCR) ya se había demostrado que no son productoras de la citolisina. Por ejemplo, la cepa *E. faecium* MXVK29 presenta hemólisis α a pesar de que no posee ninguno los genes correspondientes para la producción de citolisina. Tal resultado es muy común, pues una gran cantidad de cepas que no presentan el genotipo correspondiente a la citolisina (operón *cyL*), presentan hemólisis α en agar sangre, lo cual indicaría que el cambio en la coloración del medio puede deberse a la producción de otros compuestos, como ácidos orgánicos, que pueden provocar hemólisis parcial, o como se mencionó anteriormente, puede haber una oxidación que es la que podría provocar dicho cambio. Por otro lado, los resultados obtenidos para la hemólisis β sí son contundentes, pues únicamente las cepas que presentan el genotipo correspondiente a la producción de citolisina muestran este tipo de hemólisis en agar sangre.

Por lo anterior se determinó que la hemólisis α no es un resultado confiable que permita determinar si la cepa analizada produce o no citolisina (Semedo *et al.*, 2003; Olvera, 2013), y es por ello que únicamente se consideraron a las cepas β hemolíticas como productoras de la citolisina. Los resultados para todas las cepas se presentan en la Tabla 15.

Los resultados coinciden tanto con reportes anteriores, como con los obtenidos en la evaluación genotípica, ya que se observa una baja prevalencia de hemólisis β en cepas aisladas de alimentos, mientras que las cepas de aislados clínicos sí presentaron dicha hemólisis. (Semedo *et al.*, 2003; Olvera, 2013).

Tabla 15. Resultados del análisis fenotípico para citolisina.

Cepa	Resultado	Cepa	Resultado
<i>E. faecium</i> A4-1	Negativo	<i>E. faecalis</i> QB-1	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> QB-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-3	Negativo	<i>E. faecalis</i> QC-1	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-6	Negativo	<i>E. faecalis</i> QC-2	Negativo
<i>E. faecium</i> A4-8	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QD-1	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-3	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-4	Negativo	<i>E. faecalis</i> A5-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-3	Negativo	<i>E. faecalis</i> QG-2	Negativo
<i>E. faecium</i> QD-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Positivo
<i>E. faecium</i> QE-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> V583	Positivo
<i>E. faecium</i> QG-5	Negativo	<i>E. faecalis</i> FM-YLV	Positivo
<i>E. faecium</i> QE-4	Negativo		
<i>E. faecium</i> QD-3	Negativo		
<i>E. faecium</i> MXVK29	Negativo		

9.2.- Resultados para el marcador de enterocina A

9.2.1.- Resultados genotípicos.

Para la reacción de PCR se partieron de los mismos extractos utilizados para el resto de las reacciones. En el caso de la enterocina el tamaño de amplicón esperado es de 141pb. Se realizaron geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio al 0.01%, uno de estos geles se observa en la Figura 19. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 16, se observa que las

muestras 3, 16 y el control + (*E. faecium* MXVK29) presentan una banda entre 100pb y 200pb. El tamaño de amplicón esperado es de 141pb.

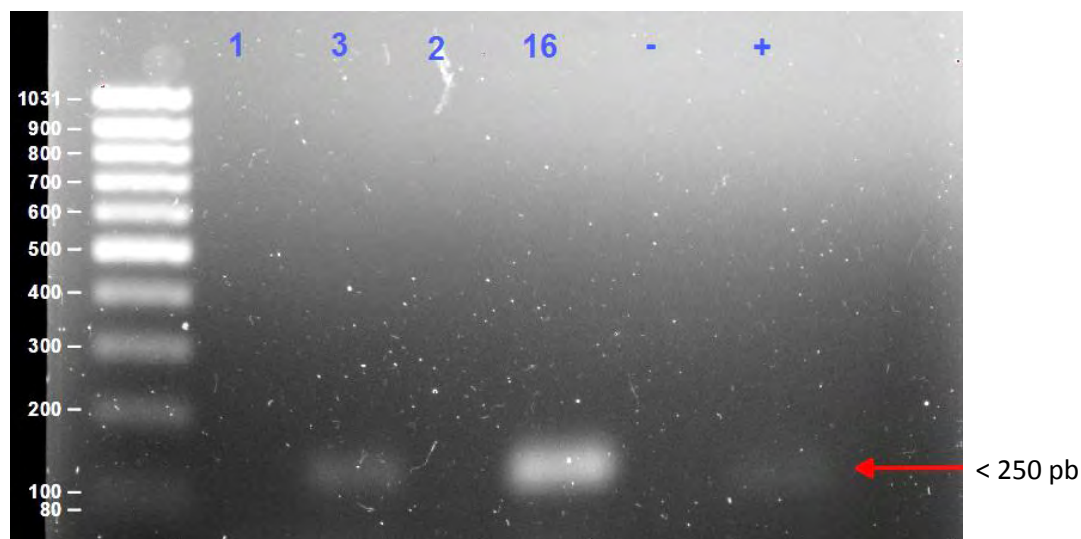


Figura 19. Evaluación de la presencia del gen *entA*. Las muestras 1, 2, 3 y 16 corresponden a *E. faecium* A4-1, *E. faecium* A4-2, *E. faecium* A4-3 y *E. faecium* QD-2 respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio al 0.01%, corrida a 80 V, marcador de peso GeneRuler Low Range #SM0383 (Thermo Scientific).

Como se observa en la Tabla 16, la gran mayoría de las cepas aisladas de alimentos sí presentan el gen que codifica para la enterocina A. Esto implica que son potenciales productores de la enterocina, lo que traería como consecuencia una actividad antimicrobiana contra patógenos de importancia en alimentos, sobre todo contra *Listeria monocytogenes* (Moreno, *et.al.*, 2006; Álvarez-Cisneros, 2011). Esto refuerza aún más el hecho de que estas cepas podrían contribuir a la inocuidad del alimento en el que se encuentran, al ejercer esta actividad antimicrobiana. Cabe destacar que en estudios previos se ha demostrado que el gen que codifica para la enterocina A se encuentra comúnmente en *Enterococcus* aislados de otros alimentos, así como de muestras de suelos y agua, lo que significa que estas cepas están más relacionadas con las obtenidas de nichos ambientales y de otros alimentos y no así para los aislados clínicos (Strompfova, *et al.*, 2008; Olvera, 2013). Por otro lado, se ha observado que el gen *entA* se encuentra codificado en el cromosoma y no en plásmidos (Aymerich, 1996), por lo que la banda de 1000 pb observada en la Figura 11, y que se piensa que podría ser un plásmido, no contendría el

gen *entA*, ni a los genes *cylA*, *cylL_L* ni *cylL_S*. Cabe resaltar también que varios reportes indican que la enterocina A es una bacteriocina característica de *E. faecium* y que raramente se encuentra en otras especies de *Enterococcus*, los resultados contrastan con lo anterior pues prácticamente todas las cepas de *E. faecalis* presentaron el genotipo correspondiente a la producción de la enterocina, aunque existe la posibilidad de que dicho gen no se exprese, por lo que es necesario recurrir a las pruebas fenotípicas para poder dar un resultado certero.

Tabla 16. Resultados del análisis genético para evaluar la presencia del gen *entA* en *E. faecium* y *E. faecalis*.

Cepa	Resultado	Cepa	Resultado
<i>E. faecium</i> A4-1	Negativo	<i>E. faecalis</i> A5-2	Positivo
<i>E. faecium</i> A4-2	Negativo	<i>E. faecalis</i> QG-2	Positivo
<i>E. faecium</i> A4-3	Positivo	<i>E. faecalis</i> QB-1	Positivo
<i>E. faecium</i> A4-6	Positivo	<i>E. faecalis</i> QB-2	Positivo
<i>E. faecium</i> A4-8	Positivo	<i>E. faecalis</i> QC-1	Positivo
<i>E. faecium</i> QD-1	Positivo	<i>E. faecalis</i> QC-2	Positivo
<i>E. faecium</i> QG-4	Positivo	<i>E. faecalis</i> QA-2	Positivo
<i>E. faecium</i> QG-3	Negativo	<i>E. faecalis</i> QA-3	Positivo
<i>E. faecium</i> QD-2	Positivo	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Negativo
<i>E. faecium</i> QE-2	Positivo	<i>E. faecalis</i> V583	Negativo
<i>E. faecium</i> QG-5	Positivo	<i>E. faecalis</i> FM-YLV	Negativo
<i>E. faecium</i> QE-4	Positivo		
<i>E. faecium</i> QD-3	Positivo		
<i>E. faecium</i> MXVK29	Positivo		

9.2.2.- Resultados fenotípicos.

Después se realizó el análisis fenotípico para evaluar la producción de la enterocina. Se seleccionaron varias cepas al azar y se realizó el protocolo de obtención y concentración de la enterocina por el método de absorción-desorción para cada una de éstas. Después se realizaron las pruebas para evaluar la actividad de la bacteriocina.

En un inicio y para validar el método de obtención de la bacteriocina se realizó la metodología antes descrita con cuatro cepas control, dos que son productoras de la enterocina A (*E. faecium* MXVK29) y de la enterocina AS-48 (*E. faecalis* FAIR), y dos que son aislados clínicos y que no son productoras de ninguna bacteriocina (*E. faecalis* FM-YLV y *E. faecalis* ATCC 29212). Una vez realizada la extracción de la bacteriocina se realizó una difusión en agar contra *L. monocytogenes* del extracto obtenido y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 20.

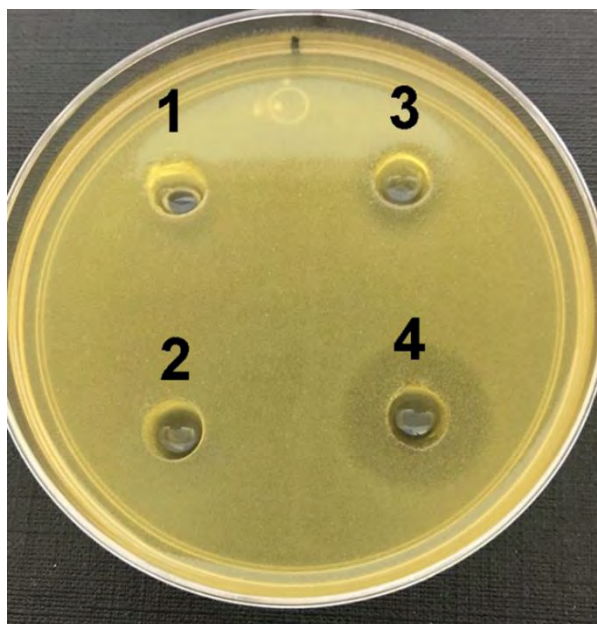


Figura 20. Evaluación de la actividad lítica de las cepas control contra *L. monocytogenes*. Los pozos 1, 2, 3 y 4 corresponden a *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* FM- YLV (Aislados clínicos), *E. faecalis* FAIR y *E. faecium* MXVK29 respectivamente. Las cepas FAIR y MXVK29 presentan inhibición y las cepas patógenas no la presentan.

Como se observa en la Figura 20, las cepas de aislados clínicos no presentaron inhibición alguna, mientras que la cepa MXVK29 sí presentó un halo muy claro.

La inhibición observada está dada por la enterocina A, bacteriocina que actúa contra *L. monocytogenes* y que se sabe que es producida por esta cepa (Álvarez-Cisneros, 2011, Segundo J., 2017)

Por otra parte, la cepa FAIR presentó muy poca inhibición a pesar de que es una cepa comercial y que se sabe produce la enterocina AS-48 que también tiene una gran actividad contra *L. monocytogenes*, posiblemente el método no sea útil para esta proteína pues esta bacteriocina se caracteriza por tener una estructura cíclica (clase III); el método de obtención se basa en la modificación estructural que sufre la proteína al realizar las modificaciones en el pH del medio, dicha modificación permite una mayor afinidad de la bacteriocina a la membrana plasmática de la célula productora al momento de acidificar y es esta modificación la que permite su adsorción en la membrana, al neutralizar la proteína vuelve a su estado nativo y poco afín a la membrana y es por eso que se desorbe (Yang, 1992; Dündar , 2014), es posible que la estructura cíclica de la enterocina AS-48 intervenga en este paso de modificación de la estructura ya que es más difícil de desnaturalizar, lo que trae como consecuencia que la afinidad hacia la membrana aún después de la acidificación sea muy leve y por lo tanto la mayor parte de la bacteriocina se elimina junto con el sobrenadante al realizar los lavados. También es posible que bajo las condiciones de producción la bacteriocina no se produzca en cantidad suficiente para observar una inhibición hacia el microorganismo indicador.

A pesar de lo anterior se determinó que el método era válido pues la actividad de la proteína de interés pudo observarse claramente, por lo que se prosiguió a analizar el resto de las cepas, únicamente se analizaron cuatro cepas seleccionadas al azar del grupo de cepas que presentaron en gen *entA* en la reacción de PCR, se realizó el mismo proceso de obtención y concentración de la bacteriocina y se evaluó su actividad por medio de difusión en agar contra *L. monocytogenes* obteniéndose los resultados de la Figura 21.

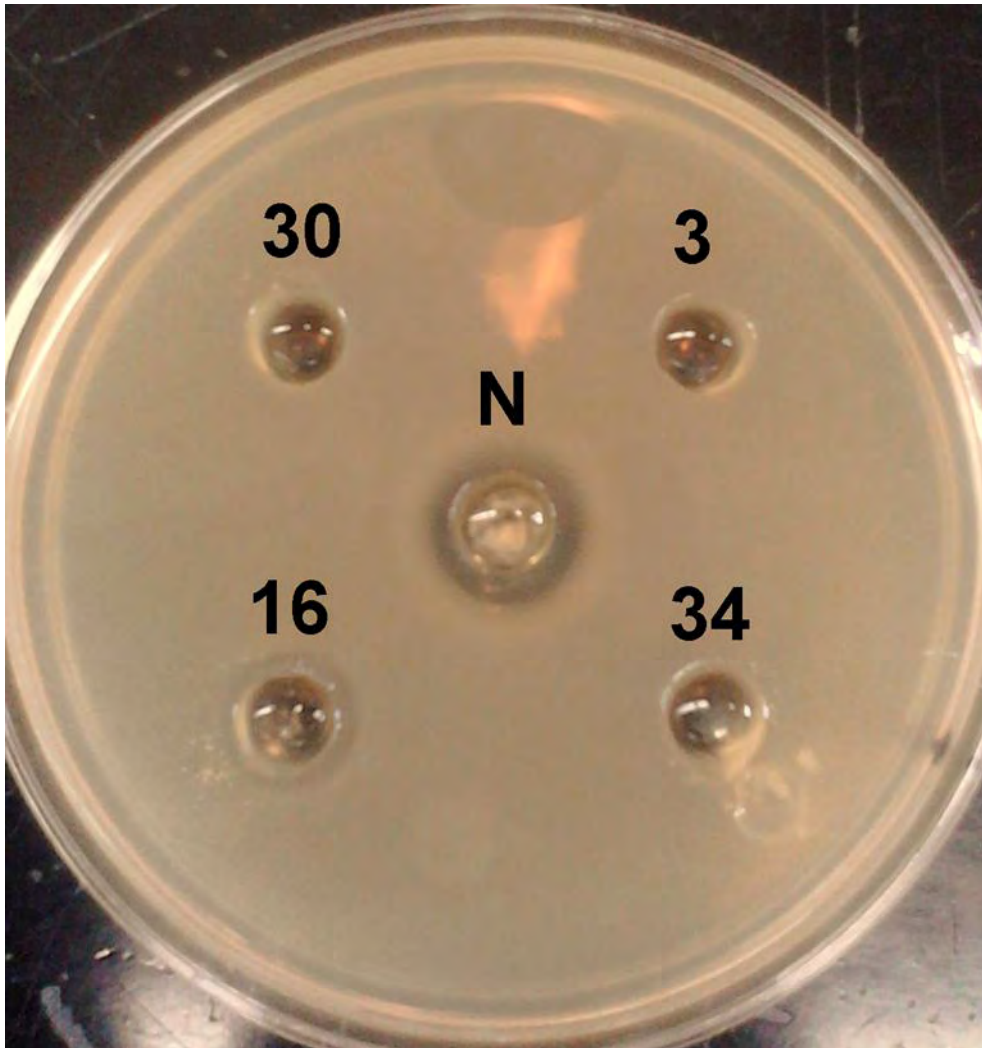


Figura 21. Evaluación de la actividad lítica de las cepas problema contra *L. monocytogenes*. Los pozos 3, 16, 30 y 34 corresponden a las cepas *E. faecium* A4-3, *E. faecium* QD-2, *E. faecalis* QB-2 y *E. faecalis* QA-2 respectivamente, se utilizó nisina como control positivo (N). Únicamente la cepa 16 presentó un halo de inhibición.

En la Figura 21 se observa que únicamente la cepa *E. faecium* QD-2 presentó actividad a pesar de que todas presentaron el genotipo correspondiente a la enterocina A, es posible que la inactividad se debiera a que el gen no se está expresando o a que la cantidad de proteína no fuera la suficiente para inhibir, es por eso que se midió la cantidad de proteína presente en cada concentrado por el método de Bradford, para lo cual se tomaron 160 μ L de extracto proteínico, y se mezclaron con 40 μ L del reactivo de Bradford, se deja reposar 5 minutos y posteriormente se midió la absorbancia de la mezcla a 595 nm en el equipo Epoch (BioTek) obteniéndose los resultados de la Tabla 17.

Tabla 17. Concentración de proteína de los concentrados de adsorción-desorción medida por el método de Bradford.

Cepa:	<i>E. faecium</i> A4-3	<i>E. faecium</i> QD-2	<i>E. faecalis</i> QB-2	<i>E. faecalis</i> QA-2
Concentración de proteína (µg/mL)	12.13	24.41	15.51	14.25

El ensayo de Bradford reveló que las cepas que no presentaron inhibición tienen casi la mitad de la proteína de la cepa que sí presentó actividad, es por esto que se optó por repetir el experimento haciendo un segundo lote de concentrados partiendo del doble del volumen original de fermentación (es decir, se partió de 300 mL de medio) para así obtener una cantidad de proteína similar a la cepa positiva. En caso de que un concentrado obtuviera cantidades mayores de proteína, éste se diluiría hasta obtener una concentración cercana a los 20 mg/mL para posteriormente realizar la evaluación por difusión. El ensayo solo se realizó para tres de las cuatro cepas previamente seleccionadas y los resultados de la concentración de proteína y de la difusión con las cantidades de proteína ya estandarizadas se muestran en la Tabla 18 y en la Figura 22 respectivamente.

Tabla 18. Concentración de proteína de los concentrados de adsorción-desorción del segundo lote medida por el método de Bradford.

Cepa:	<i>E. faecium</i> A4-3	<i>E. faecium</i> QD-2	<i>E. faecalis</i> QB-2
Concentración de proteína (µg/mL)	23.26	12.08	30.06

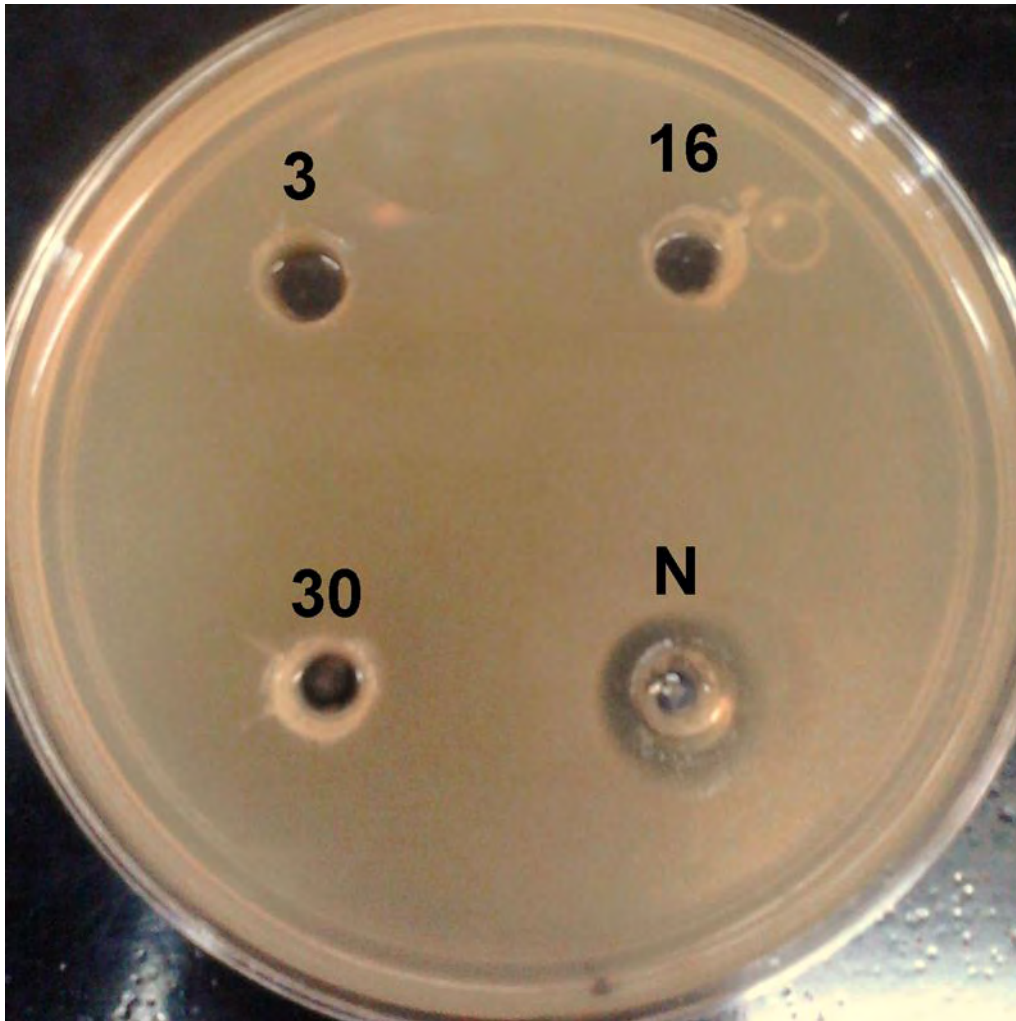


Figura 22. Segunda evaluación de la actividad lítica de las cepas problema contra *L. monocytogenes*. Los pozos 3, 16 y 30 corresponden a las cepas *E. faecium* A4-3, *E. faecium* QD-2 y *E. faecalis* QB-2 respectivamente, se utilizó nisina como control positivo (N). Ninguna cepa presentó inhibición.

En este caso se observó que a pesar de que se duplicó la cantidad de proteína presente en los concentrados, éstos seguían sin presentar actividad, se observa también que el extracto que si había presentado actividad no la presentó en esta ocasión debido a que la cantidad de proteína fue menor que en el primer análisis, lo cual demuestra que la cantidad de proteína presente es muy importante al momento de realizar este análisis, por lo anterior se puede concluir que las cepas que no presentan actividad no están expresando el gen de la enterocina A, por lo tanto es conveniente evaluar si existe algún factor en el medio que este previniendo su expresión.

Para poder demostrar que la actividad de inhibición se debe a la enterocina A, se realizó un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) para evaluar el perfil proteínico del concentrado obtenido por adsorción-desorción, también se realizó un zimograma embebido con células de *L. monocytogenes* para evaluar su actividad, también se corrió una muestra de concentrado que no presento inhibición para evaluar su perfil proteínico.

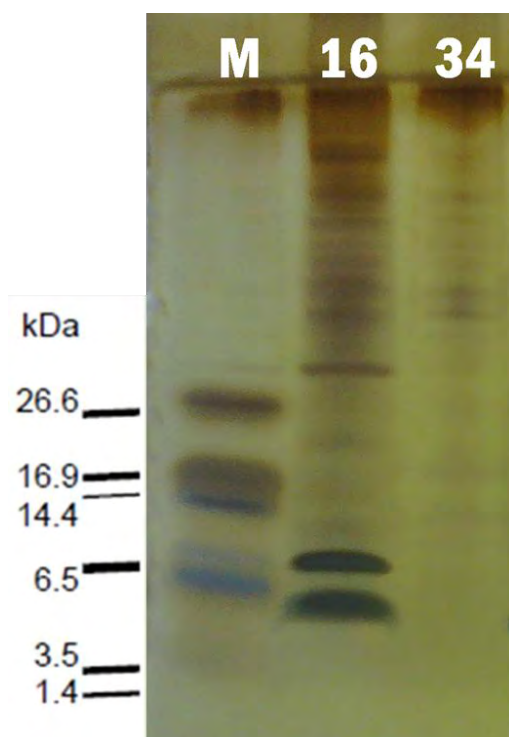


Figura 23. Evaluación del perfil proteínico del extracto obtenido por adsorción-desorción. Gel SDS-PAGE Tris-tricina al 12% teñido con nitrato de plata. El carril M corresponde al marcador de peso de polipéptido, los carriles 16 y 34 corresponden a los concentrados obtenidos de las cepas *E. faecium* QD-2 y *E. faecalis* QA-2 respectivamente. Corrida a 80V, 4°C, marcador de peso molecular polipéptido (SDS-PAGE Standards).

La Figura 23 revela la presencia de bandas de tamaño menor a 10kDa en la muestra número 16, las bacteriocinas se caracterizan por tener pesos menores a los 10kDa, particularmente la enterocina A tiene un peso de 4.8 kDa, en el gel se puede apreciar entre el bandeo una banda de tamaño entre 3.5 y 6.5 kDa, por lo que posiblemente se trate de la enterocina A. Por otra parte, en el zimograma no se apreció banda alguna (imagen no mostrada), lo que contrasta con los resultados de la difusión pues en ella si se observó inhibición a pesar de ser un

método menos sensible que la zimografía, es posible que la falta de actividad en el gel se deba al tratamiento tan severo al que fue sometido la proteína antes de colocar la muestra, pues se desnaturaliza hasta su estructura primaria; a pesar de que más tarde se resuspenden en una solución renaturalizante muchas veces las proteínas no alcanzan a recuperar su estructura activa y por lo tanto pierden su actividad.

En el mismo gel se observa también que la muestra que no presentó actividad no presentó tampoco bandas menores a 10kDa, lo que comprueba que la enterocina no se está expresando en esta cepa y que posiblemente haya que modificar las condiciones de cultivo para que se produzca.

10.- CONCLUSIONES

- Ninguna de las cepas de nuestra colección, aisladas de alimentos, presenta el gen que codifica para la proteína CylA, ni para la subunidad CylL, lo que significa que no hay producción de citolisina, lo cual se corroboró en las pruebas fenotípicas.
- Algunas cepas sí presentan el gen *cyLLs*; sin embargo, se sugiere secuenciar dichos amplicones para corroborar que se trate de dicho gen.
- La mayoría de las cepas sí presenta el gen *entA*, lo que indicaría que estas cepas pudieran poseer actividad antilisterial.
- De las cepas que se evaluaron sólo una presentó actividad antilisterial, lo que indicaría que no todas las cepas que tuvieron un resultado de amplificación positivo al gen *entA* producen la bacteriocina.
- La cantidad de proteína obtenida por el método de adsorción-desorción es importante para lograr una inhibición eficaz en los ensayos de difusión en agar.
- Para el caso de *E. faecium* los genes *cylA* y *cyLLI* pueden ser utilizados como marcadores genéticos para distinguir a las cepas patógenas nosocomiales de cepas de origen alimentario. No se recomienda la utilización de los genes *entA* y *cyLLs* como marcadores.
- Para el caso de *E. faecalis* los genes correspondientes a la producción de citolisina dieron resultados negativos para todas las cepas, por lo que pueden ser utilizados como un marcador de diferenciación entre cepas patógenas y de alimentos. Mientras que el gen para la producción de bacteriocina no arrojó resultados concluyentes.

11.- PERSPECTIVAS

- Evaluar si la enterocina se produce bajo distintas condiciones de cultivo por de las cepas que sí presentaron el gen y no la actividad.
- Secuenciar el amplicón correspondiente al gen *cyLLs*.
- Realizar la búsqueda de otros genes que pudieran actuar como marcadores genéticos de cepas alimentarias, como genes que codifiquen para la producción de otras bacteriocinas o de resistencias adquiridas a antibióticos, así como la evaluación de la expresión de dichos genes.

12.- REFERENCIAS

- **Álvarez Cisneros Y., (2011).** Aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de sus bacteriocinas. Tesis de doctorado. División de ciencias biológicas y de la salud. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, CDMX, México.
- **Álvarez Cisneros Y., Fernández F. J., Sainz Espuñez T., Ponce Alquicira (2016).** Assessment of virulence factors, antibiotic resistance and amino-descarboxylase activity in *Enterococcus faecium* MXVK29 isolated from Mexican chorizo. *Letters in applied microbiology* 64: 171-176.
- **Aymerich Teresa, Helge Holo, Leiv Sigve Havarstein, Marta Hugas, Margarita Garriga, Ingolf F. Nes. (1996).** Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium*, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1676–1682.
- **Becerril L. A., (2012),** Tipificación fenotípica y molecular de cepas de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. Aislados del pozol procedente de Villahermosa Tabasco México. Tesis de Maestría. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, México D.F.
- **Bonacina J., Suarez N., Hormigo R., Fadda S., Lechner M., & Saavedra L., (2016),** A genomic view of of food-related and probiotic *Enterococcus* strains. *DNA Research*, 24(1), 11-24.
- **Bravo R. G., (2017).** Evaluación del papel de especies de *Enterococcus* en la maduración de quesos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química UNAM, Ciudad Universitaria, CDMX.
- **Cleveland J., Montville T. J., Nes I. F., Chikindas M. L. (2001).** Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
- **Clewell D. B. (1990).** Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. Journal clinical of Microbiology. Infect. Dis.* 9: 90-102.

- **Cotter PD, Hill C & Ross RP (2005).** Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiology.* 3:777-788.
- **De Castro A., Montaña A., Casado F. J., Sánchez A. H. & Rejano L., (2002).** Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanishstyle green olive fermentation. *Food microbiology.* 19, 637-644.
- **Domann E., Hain T., Ghai R., Billion A., Kuenne C., Zimmermann K. & 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.
- **Dündar H., Atakay M., Çelikbicak Ö., Salih B., y Bozoglu F. (2014).** Comparison of two methods for purification of enterocin B, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* W3. *Preparative Biochemistry Biotechnology* 45: 796-809.
- **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.
- **Foulquié-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 C.M.AP., van Belkum M., Holzappel W. H., Abriouel H., y Gálvez A., (2007).** Diversity of enterococcal bacteriocin and their grouping in a new classification scheme. *Federation of European Microbiological Societies*, 31, 293-310.
- **García-Cano Israel, Serrano-Maldonado Carlos Eduardo, Olvera-García Myrna, Delgado-Arciniega Estela, Peña-Montes Carolina, Mendoza-Hernández Guillermo, Quirasco B. Maricarmen. (2014).** Antibacterial activity produced by *Enterococcus spp.* isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *Food Science and Technology.* 59, 26-34.
- **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., (2003).** Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- **Giraffa G., (2014).** Enterococcus. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Volume 1: 674-679.
- **Günter Klein, (2003).** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 123– 131.
- **Guzmán A. U., (2015).** Estudio genético poblacional de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del queso Cotija artesanal madurado. Tesis de licenciatura. Facultad de química UNAM, Ciudad Universitaria CDMX.
- **Heng, N.C.K. y Tagg, J.R. (2006).** Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*. 4, 1-2
- **Katla T., Netersatd K., Vancanneyt M., Swings J., y Axelsson L. (2003).** Differences in susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to sakacin P, sakacin A, pediocin PA-1 and nisin. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4431-4473.
- **Kayser F. H., (2003),** Safety aspects of Enterococci from the medical point of view, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 255-262.
- **Klaenhammer, T.R. (1993).** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12, 39-86.
- **Labra M. G., (2012),** Factores de riesgo para adquirir infección por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina en pacientes pediátricos del hospital infantil de México Federico Gómez. Tesis de posgrado. Facultad de medicina, división de estudios de posgrado, UNAM.
- **Martin-Platero A., Valdivia E., Maqueda M. y Martinez-Bueno M., (2009).** Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 24-32.

- **Moreno M. Sarantinopoulos P., Tsakalidoub E. y De Vuist L., (2006)**, The role and application of Enterococci in food and health, *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- **Murray Barbara, (1990)**. The life and time of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 46-65.
- **Ogier Jean-Claude y Serror Pascale, (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* sp. aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría. Posgrado de ciencias bioquímicas UNAM, CDMX.
- **Olvera García M., (2018)**. Caracterización genómica, poblacional y funcional de *Enterococcus* aislados de un alimento artesanal. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM, CDMX.
- **Olvera-García Myrna, Sánchez-Flores Alejandro, Quirasco Baruch Maricarmen (2018)**. Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102, 2251–2267.
- **Rehaïem A., B. Martínez, M. Manai and Rodríguez, (2010)**. Production of enterocin A by *Enterococcus faecium* MMRA isolated from 'Rayeb', a traditional Tunisian dairy beverage. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 1685–1693.
- **Schägger H., Von Jagow G., (1987)**. Tricine – Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368-379.
- **Segundo J. (2017)**. Estudio de compuestos antimicrobianos de origen proteico producidos por *Enterococcus faecium* MXVK29. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, Ciudad Universitaria, UNAM, CDMX.
- **Semedo Teresa, Margarida Almeida Santos, Paula Martins, Maria Fatima Silva Lopes, Jose J. Figueiredo Marques, Rogerio Tenreiro, and Maria Teresa Barreto Crespo, (2003)**. Comparative

Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates to Examine Hemolytic Activity and Occurrence of the *cyl* Operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2569–2576.

- **Serrano C. E., (2013).** Caracterización de péptidoglucano hidrolasas de bacterias ácido lácticas aisladas del queso Cotija. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, CDMX.
- **Serrano-Maldonado Carlos Eduardo, García-Cano Israel, González-Canto Augusto, Ruiz-May Eliel, Elizalde-Contreras José Miguel, Quirasco B. Maricarmen. (2018).** Cloning and Characterization of a Novel N-acetylglucosaminidase (AtID) from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 28, 14–27.
- **Shankar V., Baghdayan A. S., Huycke M. M., Lindahl G., & Gilmore M. S. (1999).** Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity* 67: 193-200.
- **Strompfova Viola, Laukova Andrea, Simonova Monika, Marcinakova Miroslava, (2008).** Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Veterinary Microbiology*, 132, 293–301.
- **Tyne Daria Van, Martin Melissa J. and S. Gilmore Michael. (2013).** Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Toxins*. 5, 895-911.
- **Urrieta J., (2018).** Análisis multilocus de *Enterococcus faecium* aislados del queso de Ocosingo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM. Ciudad Universitaria, CDMX.
- **Vankerckhoven V., Van Autgaerden T., Vael C., Lammens C., Chapelle S., Rossi R., Jabes D. & Goosens 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.

- **Yang R., Johnson M., & Ray B., (1992).** Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 3355-3359.

Referencias de internet:

- **Biomerieux S.A. (2018).** Schaedler agar +5% sheep blood, Disponible en: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/47-schaedler-agar-+5-percent-sheep-blood>. Última consulta: 11/Septiembre/2018
- **Lurueña Miguel A. (2015),** 5 cosas sobre el queso que quizá no sepas. Última consulta: 08/Noviembre/2018, Última actualización: 23/Diciembre/2015. Disponible en: <http://www.gominolasdepetroleo.com/2015/>.
- **Microkit (2018).** Medios de Cultivo. SCHAEGLER AGAR. Disponible en: <http://www.medioscultivo.com/schaedler-agar/>. Última consulta: 11/Septiembre/2018, Última actualización: 09/Febrero/2018.
- **National Center for Biotechnology Information (NCBI).** Se consultó la secuencia con nombre Plasmid pAD1 (from *Enterococcus faecalis*) *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *clyB*, *cylA* genes, complete cds. Número GenBank: L37110.1.
- **Thermo Scientific (2012).** Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios, T123 – TECHNICAL BULLETIN. Disponible en: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf>
- **Integrated DNA Technologies (IDT) (2018).** Herramienta PrimerQuest Tool para el diseño de dos pares de cebadores utilizados en este trabajo. Disponible en: <https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>.

13.- ANEXOS

13.1.- Metodología para la obtención del concentrado proteínico por el método de adsorción-desorción:

- Se parte de un cultivo bacteriano de 16h de fermentación en 150 mL de medio MRS, pues en dicho tiempo se da la mayor producción de la enterocina A (Olvera, 2013).

- Los matraces con el cultivo de 16h se someten a un tratamiento térmico que inactiva las proteasas presentes en el medio que pudieran degradar la bacteriocina de interés (Katla *et al*, 2003), se calientan en baño María a 70°C por 30 min.
- Una vez fríos los matraces, se mide el pH y se ajusta a 5 para adsorber la bacteriocina en la membrana celular.
- Se dejan en agitación y refrigeración los matraces a 150 rpm durante 14h como mínimo (se recomienda dejarlos toda la noche).
- Una vez transcurrido el tiempo de agitación se debe centrifugar todo el medio, para lo cual se tomaron los 150mL del matraz y se transfirieron a tres tubos Falcon de 50mL cada uno, posteriormente se sometieron a centrifugación a 8000 rpm, 15 min y 4°C.
- Una vez obtenidos los pellets celulares éstos se juntan en un solo tubo Falcon y se lavan dos veces utilizando una solución de buffer de fosfatos 500mM a pH=6.5, se utilizan aproximadamente 15mL de buffer por lavado.
- Una vez lavadas las células, éstas se resuspenden en una solución de metanol al 30% acidificada utilizando HCl concentrado hasta pH=1, se resuspenden las células y se dejan en agitación a 150 rpm y 4°C durante 16h (toda la noche de preferencia). La acidificación sirve para desorber la bacteriocina de la membrana celular.
- Transcurrido el tiempo de agitación, se centrifugan las células nuevamente a 8000rpm, 15 min y se colecta el sobrenadante, se neutraliza utilizando NaOH al 20% (o a la concentración que se desee).
- Una vez neutralizado el sobrenadante se evapora el metanol utilizando un equipo rotavapor con cuidado de no secar por completo la muestra, pues esto puede provocar la inactivación de la enzima. Una vez evaporado el metanol se puede utilizar el concentrado obtenido para posteriores análisis (se recomienda su uso inmediato, en caso de no ser posible se recomienda conservar el concentrado a 4°C, no congelar pues los cristales de hielo dañan la estructura de la proteína y puede perder actividad).

13.2.- Metodología para el ensayo de difusión en agar:

- Se realiza un preinoculo del microorganismo a utilizar como indicador, para este caso se utilizó una cepa de *L. monocytogenes* de la colección del laboratorio. Se tomaron 70µL del glicerol almacenado a -20°C y se inocularon en 7mL de medio BHI (Infusión cerebro-corazón por sus siglas en inglés), posteriormente se incubaron en una incubadora estática a 37°C por 8h o hasta la aparición de turbidez en el medio.
- Una vez que se observe turbidez en el medio, se toma 1mL de este y se diluye en 9mL de BHI estéril para así completar 10mL de medio (dilución 1/100)
- Una vez realizada la dilución anterior se toma 1 mL y se vierte en un tubo Falcon con 25mL de agar BHI al 0.7% fundido y a temperatura no mayor a 40°C para evitar la lisis del microorganismo indicador.
- Se agita levemente la mezcla de agar y se vierte en una caja Petri nueva estéril, se agita suavemente para homogeneizar el medio y se deja solidificar durante 15 min aproximadamente.
- Tras haber solidificado el medio se hacen los pozos con la parte superior de una punta para micropipeta P1000 estéril (Serrano, 2013). Se depositan 250µL de concentrado a probar en cada pozo y además se deposita un control positivo, en este caso el control positivo fue una preparación de 10mg/mL de nisina de la marca Nisaplin para asegurar que si es posible observar la inhibición y que los concentrados si están difundiendo en el medio.

13.3.- Metodología para la elaboración de los geles SDS-PAGE y los zimogramas:

- Se prepara un preinoculo del microorganismo indicador, se toman 10µL del glicerol almacenado a -20°C y se inoculan en 1mL de medio BHI en un tubo de vidrio estéril, se deja incubar a 37°C por 8h o hasta la aparición de turbidez.
- Tras esto se vierte todo el inoculo en un matraz Erlenmeyer con 100mL de medio BHI estéril (dilución 1/100) y se incuba durante 24h a 37°C en una incubadora estática.

- Pasadas las 24h el cultivo se esteriliza (opcional), se centrifuga a 8000rpm por 15min y se realizan dos lavados con SSI para eliminar los residuos del medio.
- Las células limpias se resuspenden en 8.5mL de SSI (volumen final del gel) y se mide la densidad óptica a 600nm y deberá estar entre 8 y 10.
- Se centrifuga nuevamente y se agregan los reactivos de acuerdo al orden y a los volúmenes presentados en la Tabla 19. Al agregar el agua se deben resuspender perfectamente las células antes de agregar el resto de los reactivos, de lo contrario pueden aparecer grumos que afecten en el resultado del gel (Olvera, 2013). Se mezclan perfectamente los reactivos y se vierten de manera rápida y precisa en los vidrios, se deja solidificar el gel por 15 min aproximadamente.
- Se realiza el tratamiento de la muestra, el concentrado de proteína se mezcla con un amortiguador de carga que contiene Tris HCl 1M a pH=6.8, glicerol al 24% v/v, SDS al 8% p/v, azul brillante de Coomassie G-250 al 0.02% p/v y β -mercaptoetanol 0.2M. Tras realizar la mezcla cada muestra se somete a un calentamiento a ebullición en baño María por 5 min.

Tabla 19. Reactivos y cantidades a utilizar para un gel de poliacrilamida Tris-Tricina al 12%

Reactivo	Cantidad (Separador)	Cantidad (Concentrador)
Agua desionizada	1.927 mL	1.557mL
Glicerol al 80%	0.895 mL	-
Buffer de gel	2.833 mL	620 μ L
Acrilamida Tris-Tricina	2.833 mL	324 μ L
APS 10%	42.5 μ L	13.33 μ L
TEMED	5.66 μ L	1.5 μ L
Volumen final	8.5 mL	2.5 mL

- Tras realizar el tratamiento de la muestra se toman 40µL y se depositan en el pozo del gel con cuidado de no derramar muestra en los pozos contiguos. Los geles deben estar ya montados en la cámara y sumergidos en el buffer de corrida.
- Se cierra la cámara y se corre la electroforesis a 80V, 4°C durante 6h o hasta que el frente de corrida llegue a la parte inferior del vidrio.
- Al terminar la corrida se retira el gel de la cámara, se separa de los vidrios cuidadosamente y se enjuaga con agua desionizada durante 20 minutos.
- Se desecha el agua y se sumerge el gel en una solución renaturalizante (Tris HCl, 100mM, Tritón 1% a pH=8), tras esto se incuba el gel a 37°C y 50rpm por 18h.
- Transcurrido el tiempo deben observarse bandas traslucidas sobre el fondo opaco, se puede mejorar el contraste sumergiendo el gel en una solución de azul de metileno durante 20 min y posteriormente enjuagándolo con agua destilada hasta la aparición de bandas.
- El gel para evaluar el perfil proteínico (SDS-PAGE) se realiza del mismo modo con las excepciones de que no utiliza ningún microorganismo indicador y no se incuba, si no que el gel puede ser teñido inmediatamente después de terminado el tiempo de corrida, en este caso se utilizó la técnica de tinción de plata para observar el bandeo.

13.4.- Metodología para la elaboración de los geles de agarosa:

- Primero se prepara una solución de agarosa al 1% para los amplicones de *cylA*, y al 1.5% para los amplicones de *cylL_L*, *cylL_S*, y *entA*; utilizando buffer TBE o TAE a concentración 1X como diluyente.
- Se calienta la solución hasta fundir la agarosa (se debe manejar con cuidado para evitar quemaduras).
- Se toman 30 mL de agarosa fundida, se deja enfriar un poco y se mezclan con 3 µL de bromuro de etidio al 1% (concentración final de 0.01%).
- Se vierte la mezcla en un molde para geles con los cepillos colocados para la formación de los pozos, y se deja enfriar para que se solidifique.

- Una vez solidificado, se retiran los cepillos y se sumerge el gel en una cámara de electroforesis con buffer TBE o TAE 1X según el caso, de manera que los pozos queden totalmente sumergidos.
- Se mezclan 2 μL de buffer de carga con 8 μL de amplicón y se depositan los 10 μL de mezcla en cada pozo; además se deben depositar 3.5 μL de marcador de peso en uno de los pozos.
- Una vez depositado el marcador y las muestras, se realiza la corrida del gel a 80 V hasta que el frente de corrida llegue al otro extremo del gel.
- Terminada la corrida se retira el gel de la cámara y se observa en una cámara de luz UV para observar la aparición de bandas.