



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO GENÉTICO POBLACIONAL DE CEPAS DE
Enterococcus faecium AISLADAS DEL QUESO COTIJA
ARTESANAL MADURADO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

ANDRÉS ULISES GUZMÁN OVALLE



MÉXICO, D. F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: Velázquez Madrazo Olga
VOCAL	Profesor: Díaz Ruiz Gloria
SECRETARIO	Profesor: Quirasco Baruch Maricarmen
SUPLENTE 1	Profesor: Giles Gómez Martha
SUPLENTE 2	Profesor: Camacho de la Rosa Norma Angélica

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

Los recursos para la realización de este trabajo provinieron del proyecto PAPIIT IN222115: “Análisis funcional del metagenoma bacteriano, inocuidad y potencial biotecnológico del género *Enterococcus* del queso Cotija”.

Asesor del tema

Maricarmen Quirasco Baruch

Supervisor técnico

Carlos Eduardo Serrano Maldonado

Sustentante

Andrés Ulises Guzmán Ovalle

Índice

1. Introducción	7
1.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)	8
1.2 Generalidades de <i>Enterococcus</i> spp.	8
1.3 Importancia del género <i>Enterococcus</i> en alimentos fermentados y probióticos.	9
1.4 Los enterococos en las enfermedades humanas	12
1.5 Identificación fenotípica	14
1.6 Identificación genotípica, PCR especie-específica	15
1.7 Tipificación por secuenciación multi <i>locus</i>	16
2. Antecedentes	19
2.1 Queso Cotija	19
3. Justificación	21
4. Hipótesis	21
5. Objetivos	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos particulares	22
6. Metodología	23
6.1 Descripción de las muestras	24
6.2 Preparación de la muestra y enriquecimiento para <i>Enterococcus</i> spp.	25
6.3 Aislamiento, conservación, caracterización bioquímica y fenotípica	25
6.4 Extracción de ADN	26
6.5 Identificación de cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> por PCR especie-específica	27
6.6 Análisis MLST de <i>Enterococcus faecium</i>	29
7. Resultados y discusión	31
7.1 Caracterización parcial de cepas aisladas de queso Cotija y agrupaciones de enterococos	32
7.2 Caracterización del crecimiento de cepas aisladas de enterococos en diferentes condiciones de cultivo y conservación	34
7.3 Extracción y cuantificación de ADN de cepas aisladas de <i>Enterococcus</i> spp.	35
7.4 Identificación de cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Enterococcus faecium</i> por PCR especie-específica	36

7.5	PCR en tiempo real	37
7.6	PCR punto final	39
7.7	MLST de <i>Enterococcus faecium</i>	42
7.8	Análisis de las ST de las cepas aisladas de queso Cotija	50
7.9	Análisis e-BURST	56
8.	<i>Discusión final</i>	59
9.	<i>Conclusiones</i>	61
10.	<i>Perspectivas</i>	62
11.	<i>Bibliografía</i>	63
12.	<i>Anexos</i>	75

Resumen

El género *Enterococcus* pertenece al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), son microorganismos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza, se les puede encontrar en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, así como en el agua, en el suelo, en las plantas y vegetales (Giraffa, 2003). Se han utilizado como cultivos iniciadores o probióticos en alimentos fermentados, principalmente en lácteos y embutidos. Contrario a otras BAL, los enterococos no se consideran GRAS debido a que se asocian con condiciones antihigiénicas en la producción de alimentos aunado a su surgimiento en las últimas décadas como un patógeno nosocomial. Varias cepas de enterococos que se han aislado del queso Cotija “Región de Origen”, han mostrado que producen compuestos con actividad antimicrobiana (PGHs y enterocinas), que presentan antagonismo contra microorganismos patógenos y, en el caso de presentar factores de virulencia, éstos se relacionan con la capacidad de colonizar el intestino. El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar cepas de *E. faecium* utilizando la técnica de tipificación por secuenciación *multilocus* con el fin de diferenciarlas de complejos nosocomiales y determinar la existencia de un complejo clonal asociado a alimentos.

Se estudiaron cepas, que fueron aisladas en este trabajo de 7 quesos Cotija “Región de Origen”; así como de agrupaciones de enterococos y siete cepas de *Enterococcus* spp, todas aisladas de queso Cotija y caracterizadas previamente. Los aislados fueron caracterizados fenotípica y bioquímicamente. Resultaron cocos Gram positivos, catalasa negativos y con crecimiento a 4 °C, 45 °C y 37 °C con 6.5% NaCl. Por medio de PCR especie-específica se identificaron cepas a nivel de especie. Se identificaron 13 cepas de *E. faecalis* y 12 de *E. faecium*. Se seleccionaron siete cepas de *E. faecium* y para cada una de ellas se amplificaron y secuenciaron siete genes altamente conservados (*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS* y *adk*). Se obtuvieron los perfiles alélicos y las secuencias tipo y, por último, se realizó el análisis clúster de las secuencias tipo obtenidas, utilizando la base de datos de MLST (<http://efaecium.mlst.net/#>) y el algoritmo e-BURST disponible en línea (<http://efaecium.mlst.net/eburst/>).

El análisis de MLST de las siete cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija “Región de Origen” reveló cuatro secuencias tipo nuevas (ST 1045, ST 1046, ST 1047 y ST 1048) y el hallazgo de un nuevo alelo para el gen *ddl* (*ddl* 74).

Los resultados de la tipificación con MLST, sugieren que las cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija “Región de Origen” no están relacionadas directamente con el complejo clonal 17 (CC17), que está asociado con infecciones nosocomiales. A pesar de que no fue posible establecer una asociación con aislados de alimentos, si se observa una relación entre las cepas aisladas de queso Cotija pertenecientes a la misma colecta.

1. Introducción

Las bacterias del género *Enterococcus* son microorganismos ubicuos, pero tienen un hábitat predominante en el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Debido a su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas son capaces de colonizar diversos nichos. Están asociadas a alimentos fermentados, pero su presencia siempre ha sido controvertida, ya que por un lado desempeñan un papel importante en el desarrollo de propiedades sensoriales deseables y la producción de compuestos antimicrobianos; pero por el otro lado son utilizadas como un indicador de contaminación fecal, generan aminas biógenas por la descarboxilación de aminoácidos libres y han surgido como un patógeno nosocomial en pacientes inmunosuprimidos, causando infecciones como bacteremia, endocarditis e infecciones en el tracto urinario (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997).

El hallazgo de cepas de *E. faecium* en muestras clínicas ha aumentado en las últimas décadas debido a la expansión del complejo clonal 17 (CC17) que ha adquirido progresivamente resistencia a antibióticos (ampicilina, quinolona y vancomicina) y factores de virulencia (Freitas *et al.*, 2010). El CC17 está integrado por tres linajes principales ST 17, 18 y 78 (Willems *et al.*, 2012). Se ha propuesto la evolución de enterococos comensales a patógenos oportunistas originados por la presión selectiva del ambiente intrahospitalario, que se han expandido en otros ambientes y poblaciones. La posible relación entre enterococos de alimentos y los del ambiente nosocomial es una cuestión que ha limitado el uso como cultivos iniciadores o probióticos. Por lo que es necesario deslindar cepas inocuas de patógenas; sin embargo, la mayoría de los estudios de tipificación con MLST se han centrado en aislados clínicos de humanos y animales, por lo que la información de aislados de alimentos es escasa o no está disponible. En México no existe una norma que regule la seguridad de cepas de enterococos que pudieran ser usadas como probióticos o cultivos iniciadores. Los reglamentos en Europa estipulan que la seguridad de las cepas probióticas o como cultivos iniciadores es responsabilidad del productor, por lo tanto, cada cepa destinada a tal uso debe de ser cuidadosamente evaluada, conocer los factores de virulencia que posea así

como la resistencia a antibióticos y de esta manera evaluar el peligro potencial de su uso (Franz *et al.*, 2003).

1.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se definen como cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos, que producen ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Las BAL son responsables de muchos procesos de fermentación en alimentos, se encuentran comúnmente en productos lácteos, productos cárnicos, mariscos, frutas, verduras y cereales, así como en el tracto genital, respiratorio e intestinal de los humanos y animales (Wang y Wang, 2014), han sido ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores en la producción de alimentos fermentados, como productos lácteos (yogurt y queso), cárnicos (salchichas), productos a base de pescado, productos a base de cereales (pan y cerveza), frutas y vegetales (sauerkraut y kimchi), debido a la producción compuestos que contribuyen al sabor, aroma y textura de los alimentos (Rattanachaiakunsopon y Phumkhachorn, 2010), así como la producción de compuestos con actividad antimicrobiana, como ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico o acético), diacetilo, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, reuterina y péptidos bioactivos (Wang y Wang, 2014), capaces de controlar bacterias patógenas y microorganismos no deseables responsables del deterioro de los alimentos.

Los principales géneros que conforman al grupo de las BAL son: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Salminen *et al.*, 2004).

1.2 Generalidades de *Enterococcus* spp.

El género *Enterococcus* se encuentra dentro de la familia *Enterococcaceae* y pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL). Son cocos Gram-positivos, no esporulados, oxidasa, catalasa y reductasa negativos, anaerobios facultativos, se pueden encontrar solos, en pares o en cadenas cortas. (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Su metabolismo es homofermentativo, siguen la

vía de Embden-Meyerhof-Parnas, produciendo ácido L(+)-láctico, a partir de la fermentación de hexosas (Garg y Mital, 1991). Los enterococos pueden ser fácilmente distinguidos de otros cocos homofermentativos, Gram-positivos, catalasa-negativos, como los estreptococos y los lactococos, debido a su capacidad de crecer en un rango de temperatura de 10 ° a 45 °C y sobrevivir por lo menos 30 minutos a 60 °C. Así mismo pueden crecer en un intervalo de pH de 4 a 9.6, con 6.5% de NaCl, en presencia de azida de sodio y tienen la capacidad de hidrolizar la esculina en presencia de 40% de bilis (Giraffa, 2003; Franz *et al.*, 2003; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, se le puede encontrar en el tracto gastrointestinal y heces de mamíferos, y debido a su habilidad de sobrevivir a ambientes adversos, los enterococos pueden colonizar diversos nichos y se suelen encontrar en el agua, en el suelo, en las plantas y vegetales, así como en alimentos de origen animal y alimentos fermentados (Giraffa, 2003).

1.3 Importancia del género *Enterococcus* en alimentos fermentados y probióticos.

Provenientes de contaminación fecal o ambiental, los enterococos se pueden multiplicar en alimentos crudos o procesados. Contrario a otras bacterias ácido lácticas, no se consideran GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) ya que se asocian con condiciones antihigiénicas en la producción de alimentos y son utilizados como un indicador microbiológico de contaminación en alimentos y agua. Sin embargo, pueden ser añadidos de manera accidental o intencional (formando parte de un cultivo iniciador) en la preparación de alimentos fermentados (especialmente embutidos y quesos madurados), ya que contribuyen a la maduración y desarrollo de características organolépticas deseables, tales como el aroma y sabor, debido a la producción de ácido láctico y de metabolitos obtenidos de la actividad proteolítica y lipolítica como aminoácidos libres, acetaldehído, diacetilo y acetoína (Giraffa, 2003). La presencia y desarrollo de los enterococos en alimentos fermentados como el queso y embutidos resultan en productos organolépticamente únicos, que contribuyen a enaltecer la cocina local y forman parte del patrimonio regional.

El género *Enterococcus* está conformado por 32 especies, algunas de ellas se asocian con los quesos tradicionales europeos fabricados en los países mediterráneos a partir de leche cruda o pasteurizada (Ordoñez *et al.*, 1978; Coppola *et al.*, 1988; Del pozo *et al.*, 1988; Litopoulou-Tzanetaki, 1990; Tzanetakis y Litopoulou-Tzanetaki, 1992; Macedo *et al.*, 1995; Tzanetakis *et al.*, 1995; Centeno *et al.*, 1996; Bouton *et al.*, 1998). Las especies más frecuentemente encontradas en estos quesos son *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. casseliflavus* (Giraffa, 2003). La fuente principal de enterococos en la leche y el queso son las heces de las vacas lecheras, agua contaminada, los equipos de ordeña y los tanques de almacenamiento (Gelsomino *et al.*, 2002). La presencia de enterococos en quesos artesanales puede ser deseable, ya que varios estudios han indicado que cepas de enterococos pueden tener una influencia positiva en la producción y madurado de quesos tradicionales como Manchego, Armada, Cebreiro, Picante, Majoero, Feta, Teleme, Mozzarella, Monte Veronese, Fontina, Caprino, Serra, Venaco y Comnté (Giraffa, 2003). Aunado a su contribución en el desarrollo de características organolépticas, los enterococos pueden desempeñar un papel antagonista en contra de bacterias patógenas. Se ha reportado que *E. faecalis* y *E. faecium* son capaces de producir una variedad de bacteriocinas, llamadas enterocinas, las cuales tienen como blanco de acción principal la membrana citoplasmática. Forman poros en la membrana celular, agotando el potencial transmembranal y/o el gradiente de pH, lo que resulta en la fuga de moléculas indispensables (Cleveland *et al.*, 2001). Se ha reportado que las enterocinas tienen actividad contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Vibrio cholerae* (Giraffa, 1995; Franz *et al.*, 1996; Maisnier-Patin *et al.*, 1996; Nunez *et al.*, 1997; Simonetta *et al.*, 1997; Ennahar *et al.*, 1998; Laukova y Czikkova, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2002).

Por otra parte, los enterococos son utilizados en algunos países de Europa como probióticos (Franz *et al.*, 1999; 2003). Un probiótico puede ser descrito como una preparación o un producto que contiene microorganismos viables bien definidos y en cantidades adecuadas, que alteran el microbioma (por implantación o colonización) y confieren un beneficio a la salud en el hospedero (De Vuyst *et al.*, 2004). Los efectos funcionales atribuidos a los probióticos

incluyen: la inhibición de microorganismos patógenos, el fortalecimiento de la barrera mucosa intestinal, efecto antimutagénico y anticancerígeno, la estimulación del sistema inmune y la disminución de colesterol en sangre (Fuller, 1989; Havenaar y Huis in't Veld, 1992; Salminen *et al.*, 1993, 1996; Holzapfel *et al.*, 1998). Una serie de requisitos que tiene que cumplir un microorganismo para ser definido como un probiótico incluyen la capacidad para a) adherirse a las células del intestino; b) excluir o reducir la adhesión de patógenos; c) subsistir y multiplicarse; d) producir ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas antagonistas contra el desarrollo de patógenos; e) ser seguro, no invasivo, no cancerígeno, y no patógeno; f) agregarse para formar una microbiota normal y equilibrada (Salminen *et al.*, 1996).

La mayoría de los cultivos probióticos son de origen intestinal y pertenecen al grupo de las BAL y *Bifidobacterium*; por ejemplo cepas de *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. thermophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *P. acidilactici* se han utilizado como probióticos (Fuller, 1989; O'Sullivan *et al.*, 1992; Holzapfel *et al.*, 1998).

La cepa de *E. faecium* SF68 se ha usado en el tratamiento contra la diarrea y se considera como una alternativa al tratamiento con antibióticos (Loewenstein *et al.*, 1979; Bellomo *et al.*, 1980). Rossi y colaboradores (1999) utilizaron la cepa de *E. faecium* CRL 183 para el desarrollo de un producto con leche de soya fermentada con posibles propiedades probióticas. Otro uso de cepas de enterococos como probiótico es el cultivo Causido® que está integrado por cepas de *S. thermophilus* y *E. faecium*, se le atribuye un efecto hipocolesterolemico a corto plazo (Agerholm-Larsen *et al.*, 2000). Pero la reducción de los niveles de LDL y colesterol a largo plazo no se demostró, (Richelsen *et al.*, 1996; Sessions *et al.*, 1997) por lo tanto, la relevancia clínica de este efecto es incierta. Así mismo, se utilizó la cepa *E. faecium* PR88 probiótica, como un cultivo adjunto en el queso Cheddar. En comparación con el control, el queso que contenía la cepa PR88, aumentó la proteólisis y se percibieron mayores niveles de compuestos volátiles. La cepa mantuvo la viabilidad en queso Cheddar durante 9-15 meses de maduración a 8 ° C (Gardiner *et al.*, 1999).

El uso de cepas de enterococos como cultivo iniciador y/o probiótico sigue siendo un asunto controversial, si bien los beneficios durante la maduración, el desarrollo de características organolépticas y como probiótico de algunas cepas están bien establecidos, el surgimiento como un patógeno nosocomial, la aparición de cepas resistentes a antibióticos y la presencia de factores de virulencia, han restringido su uso en alimentos.

1.4 Los enterococos en las enfermedades humanas

En las últimas décadas los enterococos han surgido como un patógeno nosocomial en pacientes inmunosuprimidos y en cuidado intensivo, se han implicado como causantes de endocarditis, bacteremia, infecciones de vías urinarias, infecciones del sistema nervioso central, infecciones intra-abdominales y pélvicas (Franz *et al.*, 1999). De hecho, *E. faecalis* se ha vinculado con el 80-90 % de las infecciones causadas por enterococos, mientras que *E. faecium* es responsable del 10-15 %. *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. hirae*, *E. mundtii* y *E. raffinosus* son otras especies de enterococos clínicamente relevantes pero menos frecuentes (Murray, 1990). Aunque los principales factores de riesgo para la adquisición de infecciones enterocólicas aún no son claros, se reconocen como factores de riesgo la falta de higiene, la hospitalización prolongada y la presencia de catéteres urinales o vasculares (Ogier y Serror, 2008).

La patogénesis de la mayoría de las infecciones sigue una secuencia de eventos que implican la colonización y la adherencia del patógeno a los tejidos del hospedero, la invasión del tejido y la resistencia a los mecanismos específicos e inespecíficos de defensa. El patógeno debe producir cambios patológicos ya sea directamente por la producción de toxinas o indirectamente por inflamación (Johnson, 1994).

Se han reportado alrededor de una docena de factores de virulencia putativos en analizados en diversos modelos animales, que están involucrados en la adhesión a las células hospederas y a proteínas de la matriz extracelular (*asa*, *esp*, *efaA*), en la resistencia a macrófagos (*asa*, *hypR*), en el daño celular y tisular (*cyl*, *gelE*, *srpE*) y la evasión del sistema inmune (polisacáridos capsulares) (Ogier y Serror, 2008). A pesar de la detección de genes que

codifican para factores de virulencia en cepas de enterococos aisladas de alimentos, que sugieren una potencial virulencia, los enterococos no se han implicado directamente como causantes de infecciones transmitidas por alimentos (Adams, 1999). Sin embargo, pueden causar intoxicación debido a la ingestión de alimentos, ya que se ha reportado que pueden producir aminas biogénas por la descarboxilación de aminoácidos libres en algunos alimentos, como en: embutidos, quesos, vinos, cervezas, aceitunas y productos de pescado, los síntomas incluyen dolor de cabeza, vómito, aumento de la presión arterial e incluso reacciones alérgicas de fuerte intensidad (Giraffa, 2002).

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a un número de antibióticos, que están mediados por genes localizados en el cromosoma. Lo cual es distinto de la resistencia adquirida, que es mediada por los genes que residen en plásmidos o transposones (Clewell, 1990; Murray, 1990). Ejemplos de resistencia intrínseca a los antibióticos incluyen resistencia a las cefalosporinas, β -lactámicos, sulfonamidas y bajos niveles de clindamicina y aminoglucósidos, mientras que ejemplos de resistencia adquirida incluyen resistencia al cloranfenicol, eritromicina, altos niveles de clindamicina, aminoglucósidos, tetraciclinas y β -lactámicos, fluoroquinolonas y glicopéptidos (Murray, 1990; Leclercq, 1997). Dentro de la resistencia adquirida a antibióticos, la resistencia a glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) es la más preocupante debido a que estos antibióticos representan “la última opción terapéutica” contra patógenos nosocomiales. Existen seis fenotipos diferentes de VRE (Enterococos Resistentes a Vancomicina, por sus siglas en inglés) conocidos hasta la fecha (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG). Los fenotipos VanA y VanB son los de mayor importancia clínica, ya que se observan con mayor frecuencia en las dos especies de enterococos predominantes, *E. faecalis* y *E. faecium* (Murray, 1997, 1998; Cetinkaya *et al.*, 2000). El fenotipo VanA se caracteriza por la resistencia a altos niveles tanto a la vancomicina y teicoplanina, mientras que en el fenotipo VanB las cepas son resistentes a niveles variables de vancomicina pero susceptible a la teicoplanina (Arthur *et al.*, 1996).

La incidencia de cepas de enterococos resistentes a antibióticos aisladas de alimentos ha sido ampliamente estudiada (Klein y Pack, 1997; Davies y

Roberts, 1999; Baumgartner *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2001; Aarestrup *et al.*, 2002; Mac *et al.*, 2002). Estos estudios revelaron que, aunque muchas de las cepas mostraron resistencia a uno o más de los antibióticos, la mayoría de los aislados, especialmente cepas de *E. faecium*, eran sensibles a los antibióticos clínicamente relevantes, como la penicilina, ampicilina, estreptomicina y la vancomicina (Klein *et al.*, 1998; Baumgartner *et al.*, 2001; Franz *et al.*, 2001; Aarestrup *et al.*, 2002).

1.5 Identificación fenotípica

En general, los enterococos se pueden diferenciar de otras bacterias Gram-positivas como estreptococos, lactococos y lactobacilos por su actividad pirrolidonil-arilamidasa (PYR) positiva, reacción positiva con el antígeno D de Lancefield y una reacción negativa con el antígeno A de Lancefield (Murray, 1990). Dentro del género *Enterococcus*, *E. faecalis* se distingue de *E. faecium* y otras especies por su capacidad de crecer en medio que contienen 0.04% de telurito, por reducir el tetrazolio a formazan y producir ácido a partir de D-tagatosa, sorbitol y glicerol. Alternativamente *E. faecium* se separa de *E. faecalis* y otras especies por producir ácido a partir de melobiosa y L-arabinosa (Murray, 1990). Con base en estos principios se han desarrollado varios sistemas comerciales para la identificación y diferenciación de enterococos. Las pruebas más comúnmente usadas son *api 20 strep* (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francia), *api 50 CH* (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francia) y *Rapid api ID32 strep* (Bio-Merieux, Marcy l'Etoile, Francia). Si bien estas pruebas funcionan bien en combinación, proporcionando buenos resultados en la mayoría de los casos, presentan inconvenientes como ser lentas y algunas veces ofrecen resultados variables debido a la considerable diversidad fenotípica intraespecie (Devriese *et al.*, 1993).

Con el incremento de la aparición de cepas de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE), se ha generado la necesidad de desarrollar pruebas de detección con mayor sensibilidad y especificidad, para contener y eliminar las infecciones oportunamente. La aplicación de la reacción de PCR en la amplificación de genes específicos para cada especie ha proporcionado una

herramienta rápida, precisa y sensitiva para la detección e identificación de enterococos.

1.6 Identificación genotípica, PCR especie-específica

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita por Kary Mullis en 1983, aplica la bioquímica básica de la replicación del ADN, con el objetivo de amplificar un fragmento de ADN particular (Koneman y Allen, 2008).

La PCR consiste en tres fases repetitivas:

- 1) Desnaturalización del ADN
- 2) Hibridación del cebador
- 3) Extensión

La desnaturalización del ADN en hebras individuales es producida por la elevación de la temperatura de la mezcla de reacción hasta 95 °C, para romper los puentes de hidrogeno que le confieren al ADN su estructura de doble hélice. La hibridación de los cebadores empieza cuando la mezcla de reacción se enfría y alcanza la temperatura de hibridación, los cebadores flanquean la zona por amplificar, y se hibridan con las hebras simples de la molécula de ADN molde. Un cebador tiene el mismo sentido que la hebra superior de ADN y se denomina cebador directo mientras que el otro es del mismo sentido que la hebra opuesta y se llama cebador inverso. La extensión del ADN complementario ocurre con un incremento de temperatura a 72 °C, la temperatura óptima para la ADN polimerasa, una vez transcurrido el tiempo necesario para la extensión completa del amplicón se vuelven a repetir las tres fases por un numero definido de ciclos. Así, la porción diana de ADN se amplifica exponencialmente hasta obtener millones de amplicones. La presencia de los productos de amplificación suele determinarse por electroforesis en gel y teñidos con bromuro de etidio (Koneman y Allen, 2008).

El desarrollo de métodos basados en la amplificación de genes conservados que codifican para ARN ribosomal (23S y 16S) y proteínas de choque térmico 60 (HSP60 o CPN60) (Goh *et al.*, 2000), gen *sod* que codifica para una superóxido dismutasa (Jackson *et al.*, 2004), gen *tuf* que codifica para un factor de elongación EF-Tu (Li *et al.*, 2012), gen *ddl* que codifica para una ligasa D-alanina:D-alanina (Satake *et al.*, 1997; Kariyama *et al.*, 2000; Deparieu *et al.*,

2004), gen *Ef0027* que codifica para un regulador transcripcional putativo (Liu *et al.*, 2005) y gen *PBP5* codifica para una proteína de unión a penicilina (Mohn *et al.*, 2004), han permitido una identificación específica de los enterococos.

1.7 Tipificación por secuenciación multi *locus*

Se han reportado diversos estudios para determinar la relación y diferencias entre enterococos aislados de alimentos y de aislados clínicos, estos estudios utilizan una variedad de métodos de tipificación molecular, como el análisis de restricción del ADN ribosomal 16S amplificado (ARDRA) (Ulrich y Muller, 1998), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de los patrones de macro-restricción de ADN (Descheemaeker *et al.*, 1997; Gambarotto *et al.*, 2001; Vancanneyt *et al.*, 2002), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (Cocconcelli *et al.*, 1995; Descheemaeker *et al.*, 1997; Andrighetto *et al.*, 2001; Cosentino *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005) y los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Antonishyn *et al.*, 2000; Willems *et al.*, 2000; Vancanneyt *et al.*, 2002). La electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) ha sido utilizada con éxito para mostrar las diferencias entre aislados clínicos y de alimentos (Klare *et al.*, 1995), entre aislados de aves de corral y pacientes hospitalizados (van den Braak *et al.*, 1998; Lemcke y Bulte, 2000). Aunque PFGE es el método estándar para distinguir entre cepas de enterococos, se considera caro, tardado y complejo de implementar. Recientemente dos métodos de tipificación han demostrado ser más discriminatorios que PFGE; tipificación por secuenciación multi *locus* (MLST) basado en la secuenciación de genes altamente conservados y el análisis variable multi *locus* (MLVA) basado en un número variable de secuencias en tándem (Homan *et al.*, 2002; Top *et al.*, 2004; Titze-de-Almeida *et al.*, 2004).

La tipificación por secuenciación multi *locus* (MLST) permite la caracterización de aislados bacterianos mediante la amplificación de los fragmentos internos de 7 genes altamente conservados y su posterior secuenciación. La secuencia de cada uno de los *loci* se alinea con las ya existentes en la base de datos. Si la secuencia coincide, el programa asigna el número de uno de los alelos ya identificados; en caso contrario, es necesario contactar al curador para la

inclusión de un nuevo alelo. Una vez asignado un número a cada alelo, utilizando siempre el mismo orden de los genes, se genera un perfil alélico que resulta de la combinación de los siete alelos. A cada perfil alélico, se le asigna entonces un número de tipo de secuencia (ST) (Vázquez y Berrón, 2004). Esta técnica fue desarrollada para estudios epidemiológicos globales, para el reconocimiento, rastreo y conexión de cepas virulentas y multirresistentes a antibióticos por todo el mundo.

Una de las grandes ventajas de esta técnica es la existencia de una base de datos, la cual se encuentra disponible al público (<http://www.mlst.net/>) y fue desarrollada de manera dinámica ya que permite a investigadores de todo el mundo enriquecerla con aislados de diferentes superficies, permitiendo así, el intercambio de información entre laboratorios de todo el mundo sin la necesidad del tránsito de cultivos vivos.

Homan y colaboradores (2002) desarrollaron la caracterización de *E. faecium* usando MLST. La necesidad de entender la epidemiología y la estructura de la población fueron las causas principales para la investigación de este organismo. En particular, la manera en que una cepa comensal residente en el intestino pasaba a ser un patógeno; sin embargo, se ha demostrado que las infecciones adquiridas en el hospital no son causadas por cepas de *E. faecium* que normalmente residen en el intestino, sino que son causadas por cepas específicas de *E. faecium* que se adquieren a través de material de curación durante la hospitalización, y aparentemente están bien adaptadas para prosperar en la microbiota perturbada de los pacientes hospitalizados (Palmer *et al.*, 2014).

La caracterización de *E. faecium* mediante MLST está basada en la amplificación de los fragmentos internos de 7 genes (400 a 600 bp) altamente conservados. La elección de estos genes se basó en su función putativa, su uso en MLST en otras especies bacterianas y en la disponibilidad de las secuencias (Homan *et al.*, 2002).

El esquema de MLST de *E. faecium* ofrece un método universal para la tipificación de aislados y el direccionamiento epidemiológico a largo plazo. Ha revelado la existencia de genogrupos de hospederos específicos, incluyendo

un linaje genético específico llamado el complejo clonal 17 (CC17), asociado con los aislados nosocomiales (Homan *et al.*, 2002). El complejo clonal 17 (CC17) se caracteriza por resistencia a vancomicina, ampicilina y quinolona, así como la presencia de una isla de patogenicidad putativa que incluye el gen *esp* y/o el gen *hyl* en la mayoría de los aislados (Top *et al.*, 2008). El complejo clonal 17 (CC17), está integrado por tres linajes principales: ST 17, ST 18 y ST 78 (Willems *et al.*, 2012); sin embargo, se han encontrado varias STs estrechamente relacionadas como: ST 16, ST 203 y ST 412, que están diseminadas en todo el mundo (Panesso *et al.*, 2010). Curiosamente, la mitad de las cepas dentro del complejo clonal 17 (CC17) se han identificado en muestras obtenidas de seres humanos sanos, cerdos, aves de corral y animales domésticos, lo que sugiere que éstos son los principales vehículos para la diseminación de estas cepas (Willems *et al.*, 2009).

2. Antecedentes

2.1 Queso Cotija

El queso Cotija es uno de los principales quesos mexicanos genuinos, debe su nombre a la ciudad de Cotija de la Paz en el estado de Michoacán, lugar donde se comercializa tradicionalmente. Es elaborado desde hace más de cuatro siglos en la sierra de Jalmich, territorio límite entre Jalisco y Michoacán, las zonas reconocidas como auténticas para la producción de este queso se encuentran en los municipios de Santa María del Oro en Jalisco, sur de Tocumbo y Cotija en Michoacán principalmente, así como en municipio aledaños como Jilotlán de los Dolores, Tamazula, Valle de Juárez y de Quitupán en Jalisco, y en los Reyes, Peribán, Tancítaro, y Buena Vista Tomatlán en Michoacán (Álvarez *et al.*, 2005).

El queso Cotija es un producto elaborado a partir de leche bronca y entera, de ganado criollo, no recibe algún tratamiento térmico y tiene como característica principal la maduración de mínimo 3 meses en el lugar de origen. Después del proceso de maduración se obtiene una pasta dura, ácida, prensada, no cocida, con un alto contenido de sal y de un olor penetrante. Es un queso de gran formato pues se produce en voluminosas piezas cilíndricas de 22 kg y dimensiones de 40 cm de diámetro por 18 cm de altura en promedio. El queso Cotija no es adicionado con cultivos iniciadores por lo que la microbiota presente proviene de las materias primas (leche bronca y sal de grano), así mismo de las etapas que se llevan a cabo manualmente y del ambiente (García-Saturnino, 2011).

Bravo en el 2008 llevó a cabo la caracterización por métodos tradicionales y dependientes de cultivo de la microbiota del queso Cotija, encontró que la misma cambia durante la maduración y después de 3 meses, no se detectan levaduras, los coliformes fecales disminuyen por debajo del límite de detección (50 NMP/g) indicado en la NOM 121 “Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias”. Así mismo, llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del género *Enterococcus* y *Lactobacillus*. Durante la maduración ocurren cambios fisicoquímicos como el aumento de acidez, la disminución de la a_w y el pH, lo cual limita el

desarrollo de ciertos microorganismos. Aunado a la probable producción de peptidoglucano hidrolasas (Serrano, 2010) y bacteriocinas por las BAL, estos cambios fisicoquímicos contribuyen a la selección de microorganismos.

Zúñiga en el 2009 estudió la comunidad bacteriana del queso Cotija por métodos moleculares (PCR-DGGE y posterior secuenciación de la región V3 del gen ADN_r 16 S) lo cual permitió identificar especies de *Enterococcus*, las cuales no son la población dominante, sin embargo están presentes y se mantienen durante el periodo de maduración.

Olvera en el 2013 llevó a cabo la evaluación del potencial de virulencia y efectos antibacterianos en 12 grupos de *Enterococcus* spp. aislados de muestras de queso Cotija “Región de Origen” y de cepas aisladas y caracterizadas por el grupo de trabajo, mediante la detección y evaluación de la expresión de genes que codifican para factores de virulencia (citolisina, proteína de superficie y sustancias de agregación), enterocinas (enterocina A y AS-48) y peptidoglucano hidrolasas (AtlA).

Los resultados obtenidos indican que ningún grupo presenta el gen para citolisina (*cytA*), más de la mitad de los grupos poseen el gen para la sustancia de agregación y tienen la capacidad de formar biopelículas, así como las cepas A e I de *E. faecalis* y la cepa B de *E. faecium*, además todas son capaces de adherirse a las líneas celulares Caco-2 y HT-29. Sólo dos grupos y la cepa B presentan el gen que codifica para las proteínas de superficie. El gen que codifica para la AtlA se detectó en dos grupos y en la cepa B, aunque se detectaron varias bandas con actividad antibacteriana contra *M. lysodeikticus* para la mayoría de los grupos. El gen de la enterocina AS-48 no se detectó en ningún grupo ni cepa aislada. La mitad de los grupos presentan el gen que codifica para la enterocina A, activa contra *M. lysodeikticus* y *L. innocua*. Además, por medio de la técnica de difusión en agar se detectó la actividad bacteriostática contra *E. coli*, *S. aureus* y *L. innocua*.

Olvera concluye que los factores de virulencia detectados se relacionan con la capacidad de colonizar, además del papel protagónico que los enterococos pueden desarrollar en la inocuidad del producto, por la producción de

sustancias con actividad antibacteriana; por lo que el riesgo de una infección enterococal por el consumo de queso Cotija, es bajo.

3. Justificación

En el grupo de trabajo se han aislado enterococos del queso Cotija, los cuales se ha demostrado que producen compuestos con actividad antimicrobiana (peptidoglucano hidrolasas y enterocinas), presentan antagonismo contra microorganismos patógenos y en caso de presentar factores de virulencia, éstos se relacionan con la capacidad de colonizar y no de invadir al huésped. Sin embargo, con la expansión del CC17 a otros ambientes y poblaciones, el hallazgo de cepas nosocomiales detectadas en humanos sanos, animales domésticos y de granja, y su potencial distribución mediante alimentos de origen animal, vuelve objetable la presencia del género *Enterococcus* en el queso Cotija, ya que no se usa un cultivo iniciador caracterizado sino que se trata de una fermentación natural.

Además, los resultados obtenidos en el grupo de trabajo se determinaron en grupos de enterococos identificados a nivel de género. Por lo que se propone generar una colección de cepas identificadas a nivel de especie (*E. faecalis* y *E. faecium*), que serán analizadas, por métodos moleculares, particularmente por tipificación por secuenciación *multilocus* (MLST) con el fin de diferenciarlas de complejos clonales nosocomiales y determinar la existencia de un complejo clonal asociado a alimentos.

4. Hipótesis

Debido a que las cepas analizadas de *E. faecium* provienen de un alimento, que es un hábitat diferente al nosocomial, entonces éstas no pertenecerán al CC17 y sí se encontrarán estrechamente relacionadas entre sí y con complejos clonales no clínicos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Determinar la relación de cepas de *E. faecium* aisladas de un alimento artesanal madurado con cepas de *E. faecium* aisladas de otros ambientes utilizando tipificación por secuenciación *multilocus*, así como establecer el nexo con respecto al CC17.

5.2 Objetivos particulares

- Aislamiento de cepas de *Enterococcus* spp. a partir de quesos Cotija con al menos 3 meses de maduración en el lugar de origen y de agrupaciones de enterococos con los que ya se cuenta en el laboratorio.
- Caracterización fenotípica de las de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas.
- Identificación a nivel especie por medio de PCR especie-específica.
- Determinación de la secuencia tipo de 7 cepas aisladas de quesos Cotija.
- Determinación de la relación de las 7 cepas aisladas de queso Cotija con los complejos clonales reportados en la base de datos de MLST.

6. Metodología

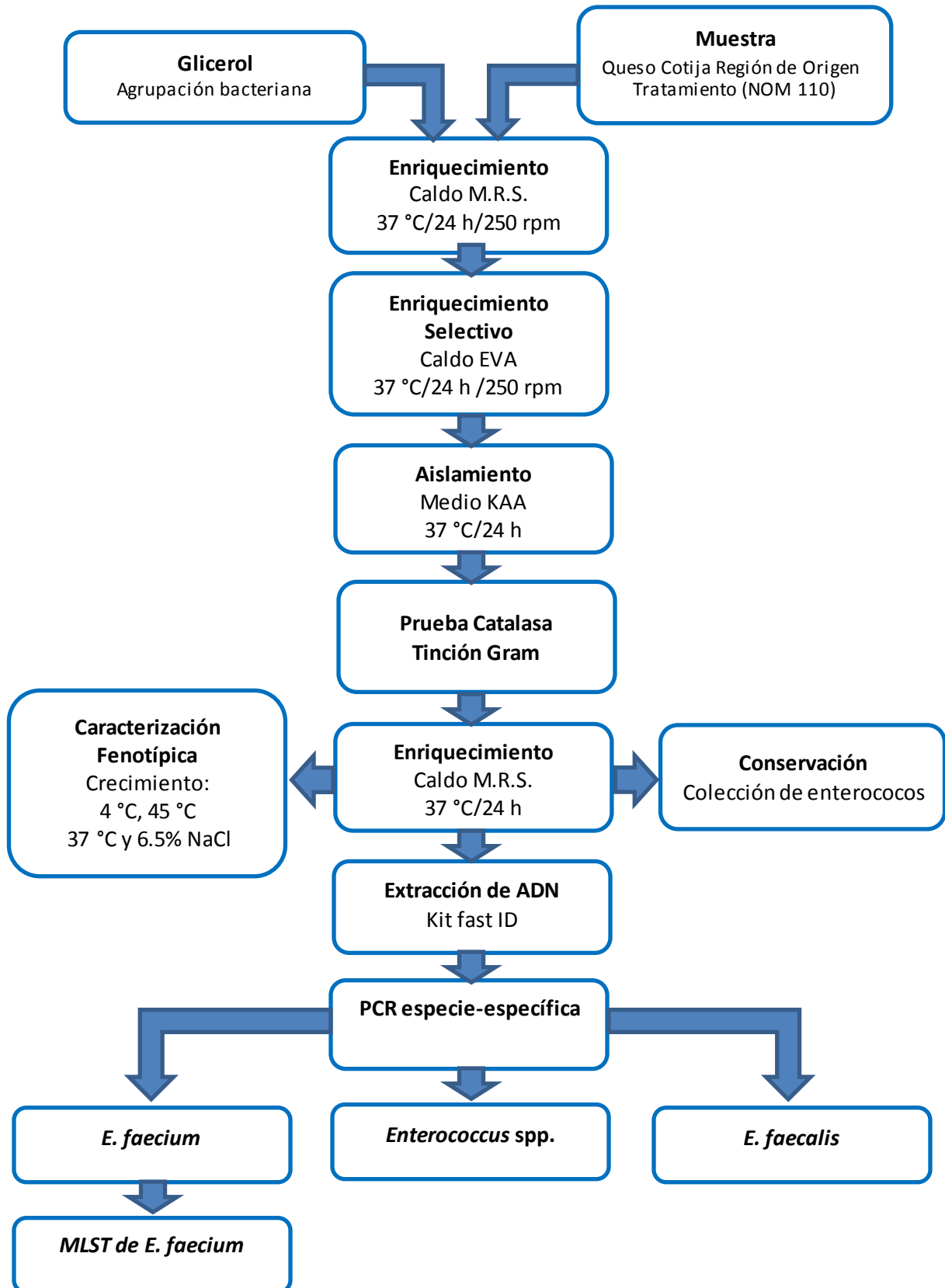


Figura 1. Diagrama general de trabajo

6.1 Descripción de las muestras

Se analizaron 7 quesos Cotija “Región de Origen” con más de 3 meses de maduración (en el lugar de origen) y almacenados en congelación a -70 °C (triturados y homogeneizados omitiendo la corteza del queso) en el laboratorio desde hace más de 4 años (Tabla 1). En el laboratorio existe una colección de muestras de queso Cotija, fueron seleccionadas 3 muestras en las que se detectó ADN de microorganismos patógenos y 4 muestras con calidad microbiología aceptable, con el fin de determinar diferencias genómicas entre los enterococos aislados. Además en este trabajo se incluyeron 2 agrupaciones de *Enterococcus* spp. que ya se tenían en el laboratorio, 4 cepas de *Enterococcus faecium* y 3 cepas de *Enterococcus faecalis*, aisladas y caracterizadas anteriormente por el grupo de trabajo, así como 3 cepas de colección (Tabla 2).

Tabla 1. Muestras de queso Cotija y región de la que fueron obtenidas.

Muestra	Región de origen	Calidad microbiológica
Queso A	Cotija (Mich)	Presencia de ADN <i>Salmonella</i> spp.
Queso B	Santa María del Oro (Jal)	Presencia de ADN <i>Salmonella</i> spp.
Queso C	Quitupán (Jal)	Presencia de ADN <i>Salmonella</i> spp.
Queso D	Quitupán (Jal)	Aceptable
Queso E	Quitupán (Jal)	Aceptable
Queso F	Quitupán (Jal)	Aceptable
Queso G	Santa María del Oro (Jal)	Aceptable

Tabla 2. Agrupaciones, cepas aisladas y de colección utilizadas en este trabajo.

Cepas	Origen
Agrupación 4	Obtenidas por el grupo de trabajo (Olvera, 2013).
Agrupación 5	
Cepa A: <i>Enterococcus faecalis</i>	Aisladas y caracterizadas por el grupo de trabajo (Bravo, 2008).
Cepa B: <i>Enterococcus faecium</i>	
Cepa C: <i>Enterococcus faecium</i>	
Cepa D: <i>Enterococcus faecium</i>	
Cepa E: <i>Enterococcus faecalis</i>	
Cepa G: <i>Enterococcus faecium</i>	
Cepa I: <i>Enterococcus faecalis</i>	
Cepa ATCC 700802: <i>E. faecalis</i>	Cepas de colección.
Cepa ATCC 29212: <i>E. faecalis</i>	
Cepa ATCC 47077: <i>E. faecalis</i>	
Cepa MXVK29: <i>E. faecium</i>	Dra. Edith Ponce UAM-I

Una agrupación consiste en la mezcla de 20 colonias que fueron obtenidas a partir del aislamiento en medio KAA provenientes de un mismo queso Cotija y que presentaron crecimiento característico de *Enterococcus* spp.

La metodología que se utilizó consistió en 8 etapas: preparación de la muestra, enriquecimiento, aislamiento, caracterización fenotípica, conservación de la cepa, extracción de ADN, PCR especie-específica e identificación de las cepas, y análisis MLST de *E. faecium*.

6.2 Preparación de la muestra y enriquecimiento para *Enterococcus* spp.

La primera etapa consistió en la preparación de la muestra, como se indica en la NOM 110 "Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico". Después del descongelado a 4 °C durante 18 h, se pesaron 10 g de muestra dentro de una bolsa estéril (Seward laboratory, London, UK) y se adicionaron 90 mL de agua peptonada (0.85 % NaCl p/v y 1 % Peptona de caseína p/v). Se homogenizó en un Stomacher 400 circulator (Seward laboratory, London, UK) durante 2 minutos a máxima velocidad.

Para la etapa de enriquecimiento se inoculó 1 mL de la suspensión en caldo MRS (de Man, Rogosa, Sharpe; OXOID), se incubó a 37 °C, 250 rpm durante 24 horas en una incubadora INNOVA 4000, New Brunswick Scientific. En el caso de las agrupaciones de enterococos se tomaron 50 µL de un vial criogénico y se inocularon en 10 mL de caldo MRS. Se incubó a 37 °C, 250 rpm durante 24 horas. Después del periodo de incubación se inoculó 1 mL del cultivo en MRS en caldo etil-violeta-azida (EVA, CONDA) y se incubó a 37 °C, 250 rpm durante 24 a 48 horas.

6.3 Aislamiento, conservación, caracterización bioquímica y fenotípica

En la etapa de aislamiento, después del periodo de incubación en caldo EVA se sembró por agotamiento en medio sólido de kanamicina-esculina-azida de sodio (KAA, OXOID), al cual se le agregó 1 mg kanamicina una vez reconstituido, las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas. A partir de

colonias con crecimiento característico de *Enterococcus* spp. se realizó tinción de Gram, prueba de catalasa y se inoculó en 10 mL de caldo MRS el cual se incubó a 37 °C durante 8 horas.

Del cultivo en MRS se llevaron a cabo 3 acciones:

- a) Caracterización de crecimiento. Se tomaron 100 µL del cultivo, se inocularon en 10 mL de caldo MRS y se incubó a 37 °C (con 6.5 % NaCl), y a 4 °C y 45 °C. se observó si hubo turbidez a las 24 y 48 h.
- b) Conservación de la cepa. Se tomaron 800 µL del cultivo, se colocaron en viales criogénicos adicionados con 200 µL de glicerol (80%) y se almacenaron a -20 °C.
- c) Inoculación de 100 mL de caldo MRS el cual se incubó a 37 °C, 250 rpm por 8 h, el desarrollo se utilizó para la extracción de ADN.

6.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se partió de un cultivo 100 mL en caldo MRS. El crecimiento se detuvo a las 8 h, es decir, durante la fase exponencial de crecimiento (Olvera-García, 2010). Para separar las células del medio se centrifugó a 10,015 x g durante 15 min a 4 °C (Biofuge Primo R, Haereus). Después se realizaron tres lavados con solución salina isotónica (0.85% p/v, pH 7) y se recuperaron las células centrifugando en las mismas condiciones. Se utilizó el kit Fast ID Genomic DNA Extraction (Genetic ID, USA), siguiendo las instrucciones del proveedor. La extracción de ADN se basa en la liberación del material genético, mediante el uso de detergentes y de enzimas, que rompen y digieren las proteínas de membrana celular. El ADN se une a una membrana de sílica por afinidad y se eliminan contaminantes con lavados con etanol al 70% para ser finalmente eluido con buffer Tris-EDTA.

Una vez que fue obtenido el ADN de cada cepa se cuantificó utilizando el espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTek, USA) y una placa Take 3 micro-volume (BioTek, USA).

6.5 Identificación de cepas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* por PCR especie-específica

La técnica PCR especie-específica se basa en la amplificación de un gen único a nivel de especie (presencia-ausencia y tamaño del mismo) el cual permite hacer una identificación rápida. La colección de cepas aisladas del queso Cotija y agrupaciones de enterococos comprendió 39 cepas. Debido a la gran cantidad de muestras a analizar, se usó la reacción de PCR en tiempo real, ya que ésta permite, empleando un fluorocromo de unión inespecífica a la doble cadena de ADN (SYBR Green) identificar fragmentos amplificados de ADN específicos, a partir de la temperatura de fusión (T_m), que es particular para el fragmento amplificado que se está buscando, y cuyos resultados son obtenidos a partir de la observación de la curva de disociación.

Los cebadores Ef0027 (Directo e Inverso) flanquean el gen *Ef0027* que codifica para un regulador transcripcional putativo de unión a un fosfoazúcar, permitiendo la amplificación de un fragmento de 518 pb con una temperatura de fusión de 79 °- 80 °C, este gen está presente únicamente en *E. faecalis* y no muestra homología en otros genomas microbianos, tales como *E. faecium* (Liu *et al.*, 2005). Por esta razón fue seleccionado para la identificación de *Enterococcus faecalis* utilizando la reacción de PCR en tiempo real.

La especificidad de los cebadores se analizó por algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 3. Secuencia de cebadores y condiciones de PCR especie-específica para *Enterococcus faecalis*.

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Gen	Tamaño amplicón	T_m (°C)	Condiciones de PCR	Referencia
Ef0027 D	GCCACTATTTCTCGGA	<i>Ef0027</i> (<i>E. faecalis</i>)	518 pb	79-80	1 ciclo: 94 °C, 2 min. 30 ciclos: 94 °,20 s. 60 °, 45 s y 72 °C 45 s. 1 ciclo: 72 °C, 2 min.	Liu <i>et al.</i> , 2005
Ef0027 I	GTCGTCCCTTTGGCAA ATAA					

Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 20 s, alineamiento o hibridación a 60 °C durante 45 s y polimerización o extensión a 72 °C durante 2 min; y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL usando mezcla de reacción SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), los cebadores Ef0027_D y Ef0027_I (0.4 µM) y 50 ng de ADN de cada muestra.

Una vez identificadas las cepas de *Enterococcus faecalis*, se realizó PCR punto final para la identificación de las cepas restantes. Se utilizaron los cebadores específicos FAC (Directo e Inverso) para amplificar el gen *ddl* presente en *Enterococcus faecium* y reportados por Deparieu *et al.*, en el 2004. El tamaño del amplicón esperado después de la reacción de PCR es de 1091 bp, siendo el criterio de identificación de las cepas como *Enterococcus faecium*.

La especificidad de los cebadores se analizó por algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 4. Secuencia de cebadores y condiciones de PCR especie-específica para *Enterococcus faecium*.

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Gen	Tamaño del amplicón	T _m (°C)	Condiciones de PCR	Referencia
FAC D FAC I	GAGTAAATCACTGA ACGA CGCTGATGGTATCG ATTCAT	<i>ddl</i> (<i>E. faecium</i>)	1090 pb	81.1	1 ciclo: 94 °C, 3 min. 30 ciclos: 94 °, 1 min. 54 °, 1 min y 72 °C, 1 min. 1 ciclo: 7 min 72 °C.	Deparieu <i>et al.</i> 2004

Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento o hibridación a 54 °C durante 1 min y polimerización o extensión a 72 °C durante 1 min; y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL usando buffer *Taq+* MgCl₂ (1x), dNTP's (0.2 mM), cebadores FAC_D y FAC_I (0.4 µM), 100 ng de ADN de cada muestra y 0.25 U de *Taq* polimerasa (Roche).

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

6.6 Análisis MLST de *Enterococcus faecium*

Siete cepas identificadas como *E. faecium* fueron analizadas por MLST (<http://efaecium.mlst.net>; Homan *et al.*, 2002) usando los cebadores disponibles en <http://efaecium.mlst.net/misc/info.asp>. (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencia de cebadores y condiciones de PCR para MLST de *E. faecium*

Gen	Cebador	Secuencia 5'- 3'	Tamaño amplicón (bp)	Condiciones de PCR Phusion DNA pol
<i>adk</i> (adenilato cinasa)	adk _D adk _I	TATGAACCTCATTTTAATGGG GTTGACTGCCAAACGATTTT	437	1 ciclo: 98 °C, 30 s 30 ciclos: 98 °C, 10 s 50 °C, 30 s y 72 °C, 15 s 1 ciclo: 72 °C, 10 min
<i>atpA</i> (ATP sintasa, subunidad alfa)	atpA _D atpA _I	CGGTTCATACGGAATGGCAC A AAGTTCACGATAAGCCACGG	556	
<i>ddl</i> (D-alanina:D-alanina ligasa)	ddl _D ddl _I	GAGACATTGAATATGCCTTATG AAAAAGAAATCGCACCG	465	
<i>gdh</i> (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)	gdh _D gdh _I	GGCGCACTAAAAGATATGGT CCAAGATTGGGCAACTTCGTCC CA	530	
<i>gyd</i> (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa)	gyd _D gyd _I	CAAACCTGCTTAGCTCCAATGGC CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395	
<i>purK</i> (subunidad fosforibosilaminoimidazol carboxilasa ATPasa)	purK _D purK _I	CAGATTGGCACATTGAAAAG TTCATTACATATAGCCCG	492	
<i>pstS</i> (transportador ABC)	pstS _D pstS _I	TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGA CGTGATCACGTTCTACTTCC	583	

Los perfiles alélicos fueron obtenidos por la secuenciación de los fragmentos internos de siete genes altamente conservados: *adk* (adenilato cinasa), *atpA* (ATP sintasa, subunidad alfa), *ddl* (ligasa D-alanina:D-alanina), *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gyd* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), *purK*

(subunidad fosforibosilaminoimidazol carboxilasa ATPasa) y *pstS* (transportador ABC).

Las condiciones para todas las reacciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C durante 30 s, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 s, alineamiento o hibridación a 50 °C durante 30 s y polimerización o extensión a 72 °C durante 15 s y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL usando buffer Phusion HF+MgCl₂ (1x), dNTP's (0.2 mM), cebadores directo e inverso (0.2 µM) para cada gen respectivamente, 100 ng de ADN de cada muestra y 0.5 U de Phusion DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific, USA).

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

Los productos de PCR fueron purificados con el kit DNA Clean & ConcentratorTM-5, (Zymo Research, USA), cuantificados utilizando el espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTek, USA) y una placa Take 3 micro-volume (BioTek, USA), y secuenciados con sus respectivos cebadores por Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur), mediante secuenciación de Sanger, la cual se basa en la polimerización del ADN con dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluoróforos y se resuelve mediante una electroforesis capilar (Sanger, 1977).

Las secuencias de cada uno de los *loci* fueron alineadas con las reportadas en la base de datos (<http://efaecium.mlst.net/sql/concatenate/default.asp>), una vez asignado un número a cada alelo, se generó un perfil alélico con la combinación de los siete alelos y se definió una secuencia tipo para cada una de las cepas.

Se realizó el análisis clúster de las secuencia tipo obtenidas, utilizando la base de datos de MLST (<http://efaecium.mlst.net/#>) y el algoritmo e-BURST disponible en línea (<http://efaecium.mlst.net/eburst/>).

El algoritmo e-BURST fue desarrollado como una forma de mostrar las relaciones entre cepas de una especie bacteriana, utiliza un modelo de evolución bacteriana en el que un genotipo ancestral (fundador) aumenta la frecuencia de hallazgo en la población y mientras lo hace comienza a diversificarse para producir un grupo de genotipos estrechamente relacionados que son descendientes del genotipo fundador, mostrando el resultado como un diagrama radial, el cual tiene al centro el genotipo fundador predicho mientras que los genotipos relacionados se encuentra conectados entre sí. El procedimiento fue desarrollado para ser usado con los datos producidos por MLST (Feil *et al.*, 2004).

Es importante mencionar que el diagrama radial producido por el algoritmo de e-Burst no representa la evolución bacteriana, simplemente produce una hipótesis acerca de la forma en que cada complejo clonal pudo haber surgido y diversificado.

7. Resultados y discusión

Se llevó a cabo el aislamiento de colonias de *Enterococcus* spp. provenientes de muestras de queso Cotija “Región de Origen” y de agrupaciones de enterococos aisladas previamente del mismo alimento (Tabla 6), se utilizó el caldo MRS, el cual permite la recuperación del microorganismo e inhibe el crecimiento de Gram-negativos debido a la presencia de citrato de amonio. Así mismo se utilizó el caldo EVA (medio selectivo), el desarrollo fue abundante y característico de enterococos, dado el cambio de coloración de violeta a amarillo paja. Los cultivos en caldo EVA fueron sembrados por agotamiento en placas de KAA. Se observó crecimiento típico del género *Enterococcus*; colonias circulares blancas o grises, con un diámetro alrededor de 2 mm, rodeadas de un halo negro debido a la hidrólisis de la esculina. Este medio también es selectivo para *Enterococcus* dada la presencia del antibiótico kanamicina.

Tabla 6. Colonias seleccionadas de muestras de queso Cotija y agrupaciones de enterococos.

Muestra	Colonias aisladas	Muestra	Colonias aisladas
Queso A	3	Queso F	Ausencia de colonias típicas
Queso B	4	Queso G	5
Queso C	4	Agrupación 4	8
Queso D	5	Agrupación 5	5
Queso E	5	Total	39

Es importante mencionar que del queso F no se logró el aislamiento de colonias características del género *Enterococcus*, en la etapa de enriquecimiento se observó crecimiento abundante en el caldo MRS, sin embargo después de inocular el caldo EVA e incubar durante 48 horas no se observó crecimiento. Se repitió el análisis a este queso para confirmar el resultado. El desarrollo en caldo MRS indica la presencia de bacterias ácido lácticas, sin embargo no se obtuvo desarrollo en un medio selectivo para enterococos. Debido a que se trata de un queso artesanal al cual no se le agrega un cultivo iniciador y la microbiota presente depende del ambiente y las condiciones de maduración es posible que el género *Enterococcus* esté ausente en este queso.

7.1 Caracterización parcial de cepas aisladas de queso Cotija y agrupaciones de enterococos

Los enterococos son bacterias Gram-positivas, no esporuladas, no móviles, no formadoras de pigmentos, catalasa, reductasa y oxidasa negativas; así mismo, son resistentes a la kanamicina, la cual es una resistencia intrínseca y se encuentra codificada en cromosoma. Con estos datos se hizo una caracterización parcial respecto a su resistencia a la kanamicina, la ausencia de la enzima catalasa y la tinción de Gram.

Los cultivos en medio EVA, pertenecientes a las 7 muestras de queso Cotija y las agrupaciones de enterococos, se sembraron por agotamiento en medio sólido KAA. Las colonias obtenidas en este medio lograron hidrolizar la esculina (Figura 2), se observaron con halos negros alrededor de las mismas,

debido a la formación de compuestos fenólicos de hierro derivados de los productos de hidrólisis de la esculina y Fe^{+2} , con lo cual se corrobora la presencia de enterococos.

De cada placa de KAA se seleccionaron colonias aisladas con crecimiento típico y se realizó la técnica de tinción de Gram y la prueba de la catalasa (Tabla 7), se observaron al microscopio para confirmar la presencia uniforme de cocos Gram-positivos (Figura 3) y la ausencia de la enzima catalasa como parte de la caracterización.

Así mismo cada colonia caracterizada parcialmente fue inoculada en caldo MRS y se incubó a 37 °C, durante 8 horas, para obtener un cultivo joven, el cual tiene dos propósitos, la conservación de la cepa y la caracterización del crecimiento en diferentes condiciones.

Tabla 7. Tinción de Gram y prueba de catalasa de colonias aisladas de *Enterococcus* spp.

Cepa	Cat	Gram	Cepa	Cat	Gram	Cepa	Cat	Gram
Queso A-1	(-)	(+)	Queso D-3	(-)	(+)	Agrupación 4-1	(-)	(+)
Queso A-2	(-)	(+)	Queso D-4	(-)	(+)	Agrupación 4-2	(-)	(+)
Queso A-3	(-)	(+)	Queso D-5	(-)	(+)	Agrupación 4-3	(-)	(+)
Queso B-1	(-)	(+)	Queso E-1	(-)	(+)	Agrupación 4-4	(-)	(+)
Queso B-2	(-)	(+)	Queso E-2	(-)	(+)	Agrupación 4-5	(-)	(+)
Queso B-3	(-)	(+)	Queso E-3	(-)	(+)	Agrupación 4-6	(-)	(+)
Queso B-4	(-)	(+)	Queso E-4	(-)	(+)	Agrupación 4-7	(-)	(+)
Queso C-1	(-)	(+)	Queso E-5	(-)	(+)	Agrupación 4-8	(-)	(+)
Queso C-2	(-)	(+)	Queso G-1	(-)	(+)	Agrupación 5-1	(-)	(+)
Queso C-3	(-)	(+)	Queso G-2	(-)	(+)	Agrupación 5-2	(-)	(+)
Queso C-4	(-)	(+)	Queso G-3	(-)	(+)	Agrupación 5-3	(-)	(+)
Queso D-1	(-)	(+)	Queso G-4	(-)	(+)	Agrupación 5-4	(-)	(+)
Queso D-2	(-)	(+)	Queso G-5	(-)	(+)	Agrupación 5-5	(-)	(+)

*Cat= prueba de catalasa

*Agrupación= cepas de *Enterococcus* spp.

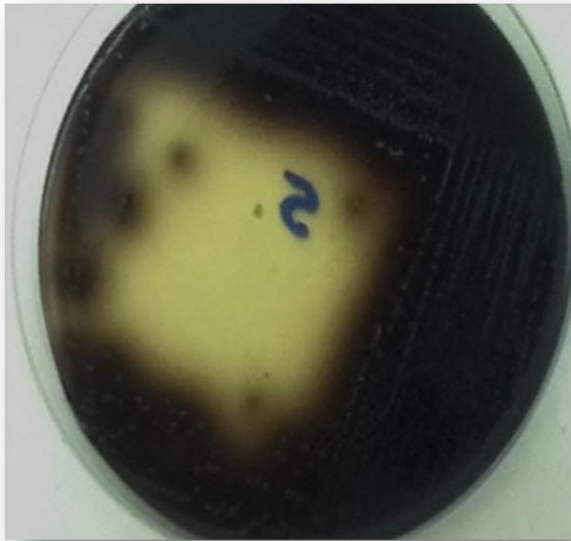


Figura 2. Crecimiento típico del género *Enterococcus* spp. en medio KAA; colonias circulares blancas o grises, con un diámetro alrededor de 2 mm, rodeadas de un halo negro.

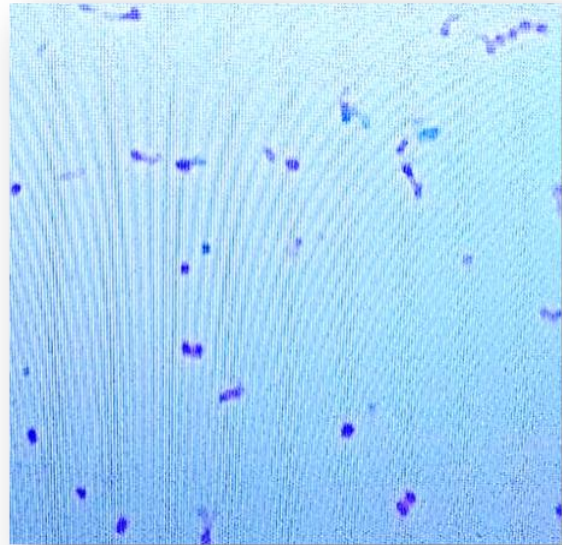


Figura 3. Tinción de Gram de una colonia aislada de *Enterococcus* spp. en medio KAA; se observan cocos en pares o cadenas cortas Gram-positivos.

7.2 Caracterización del crecimiento de cepas aisladas de enterococos en diferentes condiciones de cultivo y conservación

Se realizó esta caracterización inoculando con el cultivo joven tubos con caldo MRS y se incubaron a 37 °C (con 6.5% NaCl), y a 4 °C y 45 °C. Todas las colonias mostraron el crecimiento a las distintas temperaturas, típico de enterococos (Tabla 8).

Del cultivo joven en caldo MRS se tomaron 800 µL y se colocaron en viales criogénicos para su conservación, adicionados con 200 µL de glicerol (80% v/v) y se almacenaron a -20 °C. La colección de cepas comprende 39 aislados, la caracterización preliminar fenotípica de los aislados sugiere que pertenecen al género *Enterococcus* por lo que se continuó con la extracción de ADN de cada cepa.

Tabla 8. Caracterización fenotípica de cepas aisladas de *Enterococcus* spp.

Cepa	Crecimiento			Cepa	Crecimiento			Cepa	Crecimiento		
	4°C 48h	45°C 24 h	37°C 6.5 % NaCl 24 h		4°C 48 h	45°C 24 h	37°C 6.5 % NaCl 24 h		4°C 48h	45°C 24 h	37°C 6.5 % NaCl 24 h
Queso A-1	(+)	(+)	(+)	Queso D-3	(+)	(+)	(+)	Agrupación 4-1	(+)	(+)	(+)
Queso A-2	(+)	(+)	(+)	Queso D-4	(+)	(+)	(+)	Agrupación 4-2	(+)	(+)	(+)
Queso A-3	(+)	(+)	(+)	Queso D-5	(+)	(+)	(+)	Agrupación 4-3	(+)	(+)	(+)
Queso B-1	(+)	(+)	(+)	Queso E-1	(+)	(+)	(+)	Agrupación 4-4	(+)	(+)	(+)
Queso B-2	(+)	(+)	(+)	Queso E-2	(+)	(+)	(+)	Agrupación 4-5	(+)	(+)	(+)
Queso B-3	(+)	(+)	(+)	Queso E-3	(+)	(+)	(+)	Agrupación 4-6	(+)	(+)	(+)
Queso B-4	(+)	(+)	(+)	Queso E-4	(+)	(+)	(+)	Agrupación 4-7	(+)	(+)	(+)
Queso C-1	(+)	(+)	(+)	Queso E-5	(+)	(+)	(+)	Agrupación 4-8	(+)	(+)	(+)
Queso C-2	(+)	(+)	(+)	Queso G-1	(+)	(+)	(+)	Agrupación 5-1	(+)	(+)	(+)
Queso C-3	(+)	(+)	(+)	Queso G-2	(+)	(+)	(+)	Agrupación 5-2	(+)	(+)	(+)
Queso C-4	(+)	(+)	(+)	Queso G-3	(+)	(+)	(+)	Agrupación 5-3	(+)	(+)	(+)
Queso D-1	(+)	(+)	(+)	Queso G-4	(+)	(+)	(+)	Agrupación 5-4	(+)	(+)	(+)
Queso D-2	(+)	(+)	(+)	Queso G-5	(+)	(+)	(+)	Agrupación 5-5	(+)	(+)	(+)

*Agrupación= cepas de *Enterococcus* spp.

7.3 Extracción y cuantificación de ADN de cepas aisladas de *Enterococcus* spp.

Para la extracción de ADN se utilizó el kit Fast ID Genomic DNA Extraction (Genetic ID, USA). Debido a que se presentaban concentraciones muy bajas fue necesario realizar un paso de concentración hasta un tercio del volumen, para ello se utilizó el concentrador DNA Speedvac (Savant, USA) y se volvió a cuantificar el ADN (Tabla 9), obteniéndose las concentraciones necesarias para la reacción de PCR.

Las cepas A, B, C, D, E, G, e I (Tabla 10) fueron aisladas y caracterizadas por Bravo en el 2008 e identificadas mediante la secuenciación de la región V3 del gen ADNr 16S (Zúñiga, 2009). Estas cepas fueron utilizadas en este trabajo como cepas de referencia junto a las cepas de colección ATCC 700802, ATCC 47077 y ATCC 29212, las tres pertenecientes a *E. faecalis*.

Tabla 9. Concentración de ADN de cepas aisladas de *Enterococcus* spp.

Cepa	ADN (ng/μL)	R 260/280	Cepa	ADN (ng/μL)	R 260/280	Cepa	ADN (ng/μL)	R 260/280
Queso A-1	126.967	2.312	Queso D-3	33.583	1.731	Agrupación 4-1	202.628	2.293
Queso A-2	95.799	2.149	Queso D-4	22.261	3.08	Agrupación 4-2	279.751	2.237
Queso A-3	216.742	2.132	Queso D-5	17.497	2.413	Agrupación 4-3	251.257	1.823
Queso B-1	8.113	2.385	Queso E-1	14.551	2.244	Agrupación 4-4	376.947	2.217
Queso B-2	2.513	1.846	Queso E-2	60.563	2.407	Agrupación 4-5	235.713	2.125
Queso B-3	21.684	1.935	Queso E-3	52.706	2.19	Agrupación 4-6	54.919	2.292
Queso B-4	21.187	2.033	Queso E-4	19.737	1.933	Agrupación 4-7	127.271	1.970
Queso C-1	11.376	2.649	Queso E-5	19.666	2.717	Agrupación 4-8	90.962	1.746
Queso C-2	14.091	2.187	Queso G-1	140.913	2.276	Agrupación 5-1	30.727	2.406
Queso C-3	17.474	2.101	Queso G-2	98.953	2.313	Agrupación 5-2	18.670	1.289
Queso C-4	44.454	2.019	Queso G-3	31.951	2.268	Agrupación 5-3	20.681	2.179
Queso D-1	22.208	2.109	Queso G-4	90.689	2.292	Agrupación 5-4	16.083	2.905
Queso D-2	139.918	2.207	Queso G-5	151.739	2.086	Agrupación 5-5	92.653	2.220

*Agrupación= cepas de *Enterococcus* spp.

Tabla 10. Concentración de ADN de cepas de referencia y de colección.

Cepa de referencia	ADN (ng/μL)	Cepa de referencia	ADN (ng/μL)	Cepa de colección	ADN (ng/μL)
Cepa A: <i>E. faecalis</i>	52.346	Cepa E: <i>E. faecalis</i>	181.713	ATCC 700802: <i>E. faecalis</i>	141.951
Cepa B: <i>E. faecium</i>	10.158	Cepa G: <i>E. faecium</i>	26.252	ATCC 29212: <i>E. faecalis</i>	159.439
Cepa C: <i>E. faecium</i>	19.973	Cepa I: <i>E. faecalis</i>	99.939	ATCC 47077: <i>E. faecalis</i>	100.525
Cepa D: <i>E. faecium</i>	11.947	MXVK29: <i>E. faecium</i>	141.903		

7.4 Identificación de cepas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* por PCR especie-específica

Para la identificación de cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* se utilizaron los cebadores específicos descritos por Liu *et al.*, 2005 y Deparieu *et al.*, 2004, respectivamente. Se evaluó la especificidad de los cebadores por algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information). <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

7.5 PCR en tiempo real

La reacción de PCR en tiempo real permitió la identificación a nivel de especie de *E. faecalis*, a través de la observación de una curva de disociación debida a la presencia del amplicón del gen *Ef0027*, el cual únicamente está presente en esta especie y codifica para un regulador transcripcional putativo de unión a un fosfoazúcar, de un tamaño de 518 pb, el cual teóricamente presenta una temperatura de fusión de 79 °-80 °C.

La temperatura de fusión teórica fue calculada utilizando la secuencia del genoma de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, GenBank: CP008816.1. Se alinearon los cebadores EF0027 directo e inverso con la secuencia de *E. faecalis* utilizando el programa en línea ClustalW2, (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) y se obtuvo la secuencia del amplicón esperado. La secuencia del amplicón fue introducida en el programa en línea OligoCalc (<http://simgene.com/OligoCalc>), el cual realiza el cálculo de las propiedades físicas como la temperatura media de fusión.

Una vez analizada la especificidad de los cebadores se realizó la reacción de PCR en tiempo real de los templados de las cepas obtenidas por el grupo de trabajo y las cepas de colección con la finalidad de verificar la amplificación del gen *Ef0027*. En la Figura 4 se observa la curva de disociación en la que únicamente el control positivo (cepa ATTC 29212: *E. faecalis*) presenta un pico a la temperatura 79.6 °C, lo cual indica que se produjo la amplificación del gen *Ef0027* y que su temperatura media de fusión coincide con lo esperado, mientras que el control negativo (cepa D: *E. faecium*) y el blanco (NTC) no presentan ningún pico.

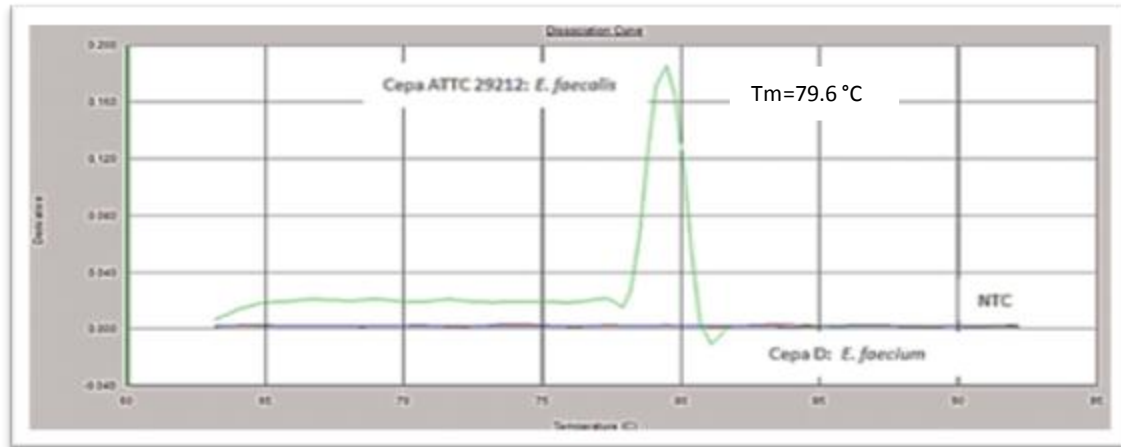


Figura 4. Curva de disociación obtenida por PCR en tiempo real de la cepa de colección ATCC 29212: *E. faecalis*.

La reacción de PCR en tiempo real se realizó por triplicado (Figura 5) para cada cepa aislada del queso Cotija y de agrupaciones de enterococos, se incluyó un blanco de reacción (NTC), se utilizó como control negativo la cepa D: *E. faecium* (genoma completamente secuenciado en el grupo de trabajo) y como control positivo la cepa de colección *E. faecalis* ATCC 29212. En la Tabla 11 se muestran las 13 cepas identificadas presuntamente como *E. faecalis* y su temperatura de fusión.

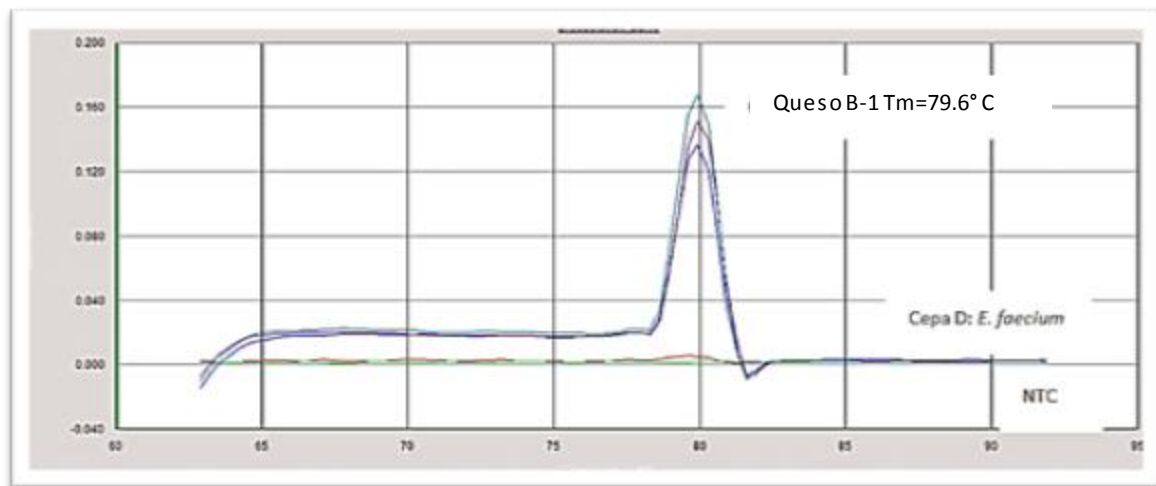


Figura 5. Curva de disociación obtenida por PCR en tiempo real de la cepa Queso B-1 aislada del queso Cotija.

Tabla 11. Cepas identificadas presuntivamente como *E. faecalis* por PCR en tiempo real.

Cepa	Tm	Cepa	Tm
Queso A-1	79.9 °C	Queso C-2	79.9 °C
Queso A-2	79.6 °C	Queso C-4	80.3 °C
Queso A-3	79.9 °C	Queso D-1	80.0 °C
Queso B-1	79.9 °C	Queso G-2	80.0 °C
Queso B-2	79.6 °C	Agrupación 5-1	80.0 °C
Queso B-3	79.9 °C	Agrupación 5-2	79.7 °C
Queso C-1	79.6 °C		

7.6 PCR punto final

El gen *ddl* codifica para una ligasa D-Ala:D-Ala, presente en *E. faecium*, se utilizaron los cebadores específicos para este gen, FAC (Directo e Inverso). El tamaño del amplicón esperado después de la reacción de PCR es de 1091 bp, siendo el criterio de identificación de las cepas de *Enterococcus faecium*.

Después de analizar la especificidad de los cebadores, se realizó la reacción de PCR de punto final de las cepas de referencia y las cepas de colección con la finalidad de verificar la amplificación del gen *ddl* en las especies de *E. faecium*.

La reacción de PCR punto final se realizó para las cepas restantes aisladas del queso Cotija y de agrupaciones de enterococos (Figura 6), se incluyó un blanco de reacción (carril 2), se utilizó como control negativo la cepa de colección *E. faecalis* ATCC 47077(carril 3) y como control positivo las cepas C y D de *E. faecium* (carriles 4 y 5 respectivamente). En la Tabla 12 se muestran las 12 cepas identificadas presuntivamente como *E. faecium*.

En total se logró la identificación de 25 cepas; 13 cepas de *E. faecalis* y 12 cepas de *E. faecium*, no se logró identificar a nivel de especie 14 cepas debido a que probablemente se traten de otras especies de enterococos.

Se han encontrado las especies *Enterococcus italicus*, *Enterococcus casseliflavus* y *Enterococcus gallinarum* por anotación con genes marcadores de copia única en el metagenoma de queso Cotija (Escobar, en revisión), por lo

que es posible que algunas de las cepas no identificadas pertenezcan a estas especies.

En la Tabla 13 se observan las cepas identificadas como *E. faecalis* y *E. faecium*, así como del queso o agrupación de la que fue aislado y la región de origen.

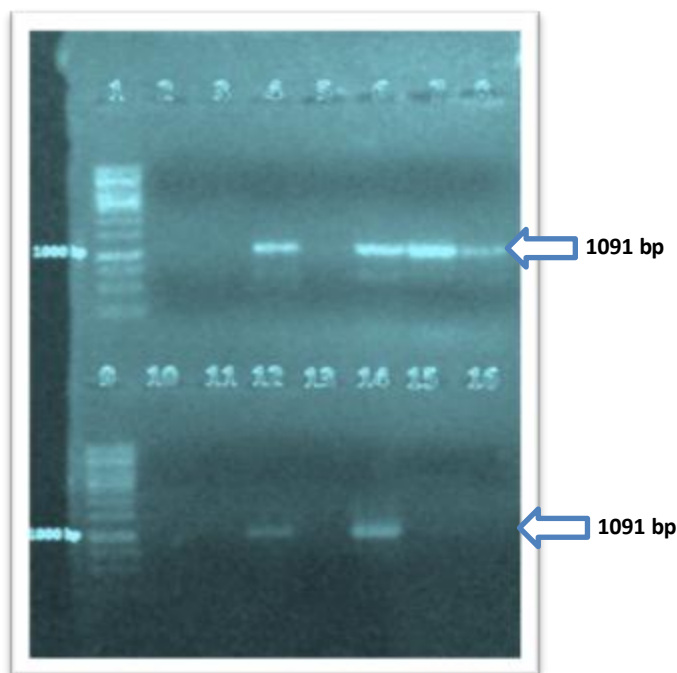


Figura 6. Gel de agarosa de PCR punto final para detectar gen *ddl*. Carril 1 y 9: marcador 1 kb DNA Ladder (GeneRuler); carril 2: Blanco; carril 3: Control negativo *E. faecalis* ATCC 47077; carril 4 y 5: control positivo cepa C y cepa D de *E. faecium*; carril 6: cepa A4-1; carril 7: cepa A4-2; carril 8: cepa A4-3; carril 10: cepa A4-4; carril 11: cepa A4-5; carril 12: cepa A4-6; carril 13: cepa A4-7; carril 14: A4-8; carril 15: Queso G-1; carril 16 cepa Queso E-1.

Tabla 12. Cepas identificadas presuntivamente como *E. faecium* por PCR punto final.

Cepa	Cepa
Queso D-2	Queso G-5
Queso D-3	Agrupación 4-1
Queso E-2	Agrupación 4-2
Queso E-4	Agrupación 4-3
Queso G-3	Agrupación 4-6
Queso G-4	Agrupación 4-8

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 13) se observa que la población de enterococos para cada queso es diferente. Esto es debido a que el queso Cotija es elaborado de manera artesanal, no se usan cultivos iniciadores por lo que la microbiota presente proviene de las materias primas con las que se elabora el queso (leche bronca y sal de grano), así como de las etapas manuales y del ambiente (García-Saturnino, 2011). Durante su elaboración no se incluye ningún tipo de tratamiento térmico por lo que cada queso tiene una carga microbiana diferente que se va modificando durante la maduración.

Tabla 13. Cepas identificadas por queso Cotija o agrupación.

Muestra	Región de origen	Cepas <i>E. faecalis</i>	Cepas <i>E. faecium</i>	Cepas identificada como <i>Enterococcus</i> spp
Queso A	Cotija (Mich)	Queso A-1 Queso A-2 Queso A-3		
Queso B	Santa María del Oro (Jal)	Queso B-1 Queso B-2 Queso B-3		Queso B-4
Queso C	Quitupán (Jal)	Queso C-1 Queso C-2 Queso C-4		Queso C-3
Queso D	Quitupán (Jal)	Queso D-1	Queso D-2 Queso D-3	Queso D-4 Queso D-5
Queso E	Quitupán (Jal)		Queso E-2 Queso E-4	Queso E-1 Queso E-3 Queso E-5
Queso F	Quitupán (Jal)	No fue posible el aislamiento del genero <i>Enterococcus</i> spp		
Queso G	Santa María del Oro (Jal)	Queso G-2	Queso G-3 Queso G-4 Queso G-5	Queso G-1
Agrupación 4			Agrupación 4-1 Agrupación 4-2 Agrupación 4-3 Agrupación 4-6 Agrupación 4-8	Agrupación 4-4 Agrupación 4-5 Agrupación 4-7
Agrupación 5		Agrupación 5-1 Agrupación 5-2		Agrupación 5-3 Agrupación 5-4 Agrupación 5-5

Debido a la importancia del género *Enterococcus* durante la maduración del queso Cotija, las cepas aisladas e identificadas presuntivamente como *E. faecalis* y *E. faecium* fueron caracterizadas con MLST con el fin de diferenciarlas de complejos clonales nosocomiales. En este trabajo únicamente se realizó el análisis de MLST para *E. faecium*, el análisis de MLST para *E. faecalis* fue realizado por otro miembro del grupo de trabajo (Olvera, en proceso).

7.7 MLST de *Enterococcus faecium*

Para el análisis de MLST de *E. faecium* se seleccionaron siete cepas, las 4 cepas de *E. faecium* previamente identificadas, caracterizadas por el grupo de trabajo y las cuales fueron incluidas en el estudio de evaluación de inocuidad de *Enterococcus* spp. por Olvera en el 2013. Así como 3 cepas identificadas durante este trabajo (Tabla 14), el criterio de selección fue que provinieran de diferentes quesos.

Tabla 14. Cepas seleccionadas para el análisis de MLST de *E. faecium*

Cepa	Origen	Cepa	Origen
B: <i>E. faecium</i>	Aisladas y caracterizadas por el grupo de trabajo. (Bravo, 2008)	Queso D-2	Quitupán (Jal)
C: <i>E. faecium</i>		Queso E-2	Quitupán (Jal)
D: <i>E. faecium</i>		Queso G-5	S. Ma. del Oro (Jal)
G: <i>E. faecium</i>			

Para cada cepa se amplificaron siete genes (*adk*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK* y *pstS*), de un tamaño de 400 a 600 bp, usando los cebadores y de acuerdo a lo reportado por Homan y colaboradores en el 2002. Después de la amplificación, los productos de PCR se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) para comprobar la amplificación específica observada por la presencia de una sola banda.



Figura 7 a



Figura 7 b



Figura 7 c



Figura 7 d

Figura 7. Geles de agarosa obtenidos de los genes *gyd*, *pstS*, *purK* y *atpA*.

En la Figura 7a se observa el gel de agarosa para el amplicón del gen *gyd* (395 bp) para las 7 cepas; en la Figura 7b se observa el gel de agarosa para el amplicón del gen *pstS* (583 bp) para las 7 cepas; en la Figura 7c se observa el gel de agarosa para el amplicón del gen *purK* (492 bp) para las 7 cepas, por último en la Figura 7d se observa el gel de agarosa para el amplicón del gen *atpA* (556 bp) para las 7 cepas.

Los productos de PCR fueron purificados y cuantificados, las concentraciones obtenidas se muestran en la Tabla 15. Las concentraciones obtenidas fueron adecuadas en concentración y calidad para la secuenciación. Los amplicones purificados fueron secuenciados por ambas hebras con sus respectivos cebadores, de esta manera la asignación de los alelos se realiza de manera inequívoca, ya que las variaciones en la secuencia son “autenticadas” al realizar el alineamiento. La secuenciación fue hecha por MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur), mediante el método de Sanger.

Tabla 15. Concentración de los amplicones obtenidos para los siete genes utilizados en MLST de *E. faecium* de las siete cepas aisladas de queso Cotija.

	<i>atpA</i> (ng/μL)	<i>ddl</i> (ng/μL)	<i>gdh</i> (ng/μL)	<i>purK</i> (ng/μL)	<i>gyd</i> (ng/μL)	<i>pstS</i> (ng/μL)	<i>adk</i> (ng/μL)
Cepa B	72.4	102.4	108.2	218.9	110.3	91.2	84.8
Cepa C	53.6	54.8	73.4	126.9	107.9	50.6	62.8
Cepa D	51.3	62.2	93.9	73.6	88.1	68.4	64.5
Cepa G	38.2	69.9	86.9	88.7	79.9	70.1	78.2
Cepa QD-2	28.4	47.2	94.9	68.4	61.5	51.8	66.1
Cepa QE-2	31.6	42.9	43.9	75.2	64.8	30.6	62.2
Cepa QG-5	42.3	59.1	72.3	166.8	78.8	85.3	77.8

Una vez recibidos los resultados de secuenciación, se llevó a cabo el alineamiento utilizando el programa en línea MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

En cada caso se alineó la secuencia obtenida con el cebador directo y la secuencia complementaria obtenida con el cebador indirecto.

En la Figura 8 se observa el alineamiento de las secuencias obtenidas para el gen *gdh* de la cepa Queso E-2 (*gdhE2* y *gdhE2r*), la zona de color rojo indica la coincidencia entre las dos secuencias mientras que las letras en azul y negro indican discordancia en la secuencia.

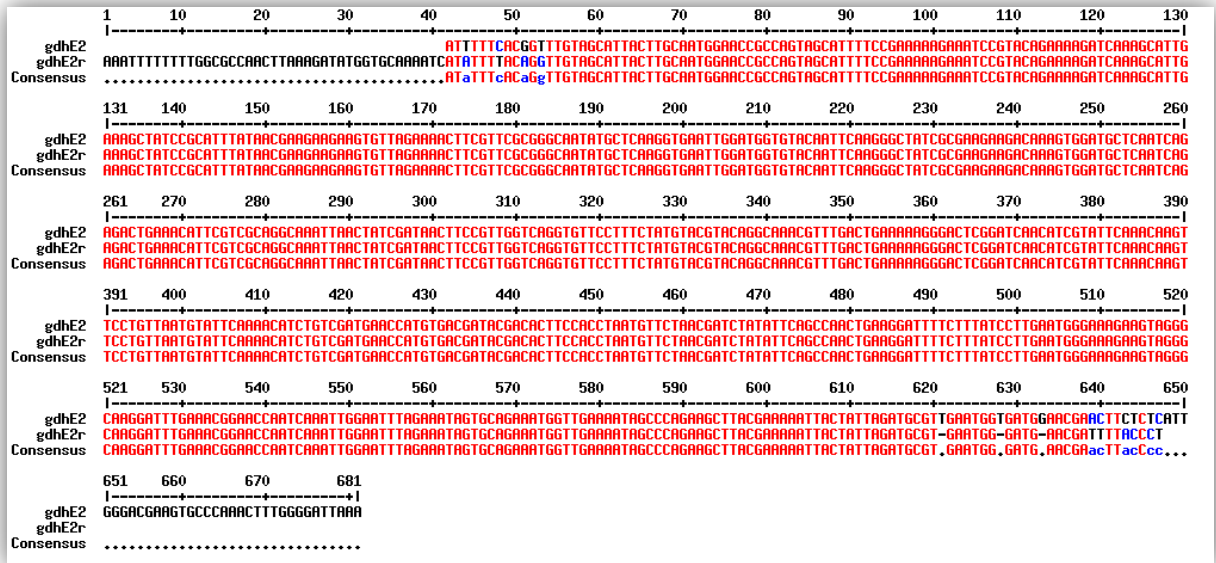


Figura 8. Alineamiento de las secuencias del gen *gdh* de la cepa Queso E-2.

Una vez obtenida la secuencia consenso para todos los genes de cada una de las cepas, la secuencia de cada uno de los *loci*, se alineó con los existentes en la base de datos para conocer el número de alelo, sin embargo la base de datos es tan específica que es necesario introducir únicamente el número de caracteres indicados en el tamaño de cada gen, como se muestra en la Figura 9.

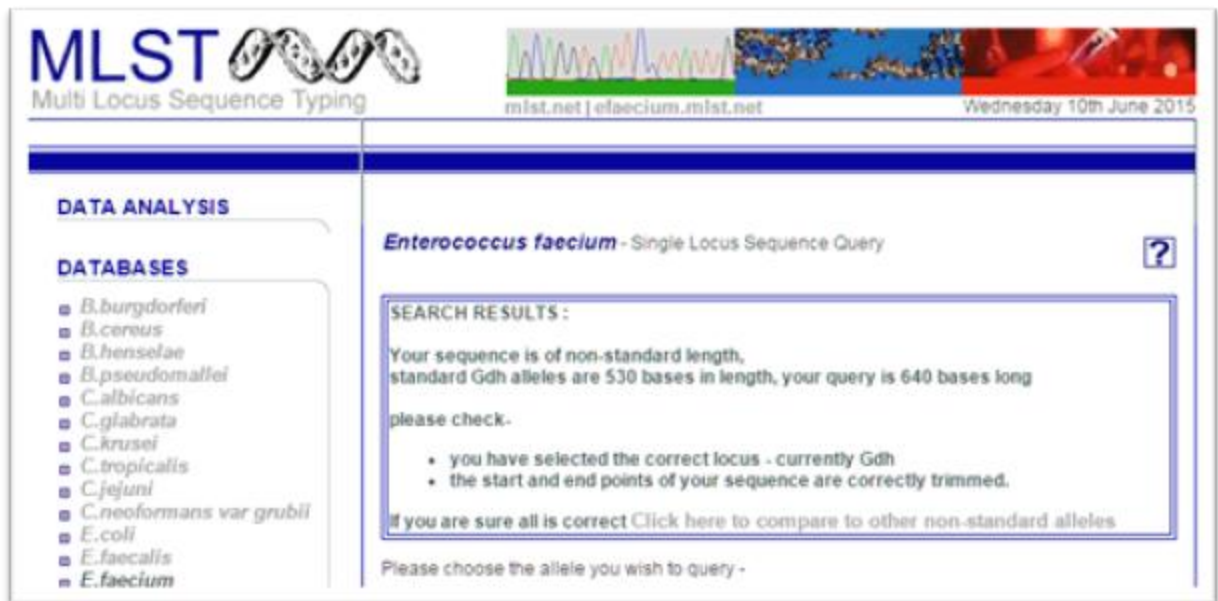


Figura 9. Captura de pantalla de la base de datos MLST cuando la secuencia introducida no corresponde al número de caracteres permitido para cada gen.

Para obtener el número indicado de caracteres requeridos se utilizó un patrón para cada gen. Para lo cual se seleccionó de manera aleatoria alguno de los alelos reportados en la base de datos de MLST, esto permitió “cortar” las secuencias y a su vez identificar los cambios en las pares de bases que dan origen a los diferentes alelos.

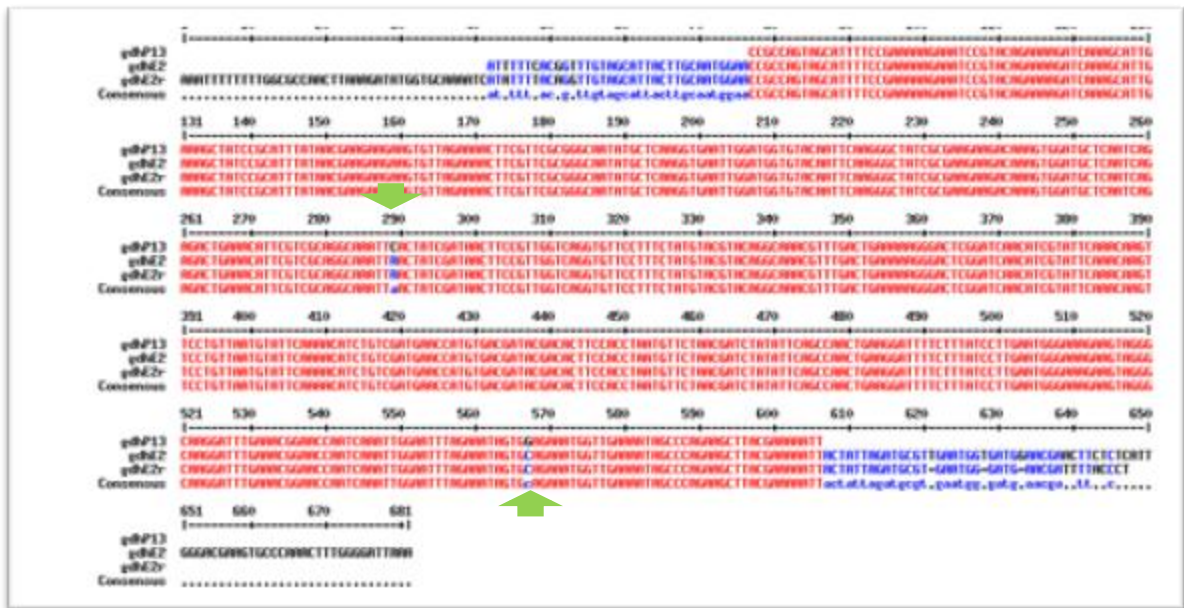


Figura 10. Alineamiento de las secuencias del gen *gdh* de la cepa Queso E-2 (*gdhE2* y *gdhE2r*) y la secuencia del patrón *gdh* 13 (*gdhP13*).

En la Figura 10 se observa el alineamiento de las secuencias obtenidas para el gen *gdh* de la cepa Queso E-2 (*gdhE2* y *gdhE2r*) y el uso de una secuencia patrón, el alelo 13 del gen *gdh* (*gdhP13*) obtenida de la base de datos. La zona de color rojo indica la coincidencia entre las tres secuencias, como se muestra en la imagen la discordancia entre las secuencias (zona azul) se da en los extremos, donde ya no forma parte de la secuencia de interés, así mismo en la posición 289 y 567 se observa discordancia entre las tres secuencias, pero concordancia entre la secuencia *gdhE2* y *gdhE2r*, de esta manera se “autentifica” los cambios en las pares de bases que generan los diferentes alelos. Este procedimiento se repitió para cada par de secuencias de los siete genes de cada una de las siete cepas, con el fin de obtener una secuencia consenso del tamaño indicado en la base de datos para cada gen.

Se alineó cada una de las secuencias consenso con las existentes en la base de datos, cuando las secuencias coincidieron el programa asignó el número de uno de los alelos ya identificados; en caso contrario, fue necesario contactar al curador para la inclusión de un nuevo alelo. El resultado obtenido para cada alelo se muestra en la Tabla 16, la combinación de los siete números utilizando siempre el mismo orden se conoce como perfil alélico.

Tabla 16. Perfil alélico de las cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija.

	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
Cepa B	5	7	5	7	1	1	1
Cepa C	51	2	12	9	1	1	5
Cepa D	3	7	5	7	1	1	1
Cepa G	51	2	12	9	1	1	5
Cepa QD-2	27	3	1	2	1	1	1
Cepa QE-2	27	3	25	2	1	12	1
Cepa QG-5	8	74	12	6	1	1	5

Cada perfil alélico fue concatenado en la base de datos, y la misma asignó un número de secuencia tipo (ST), la secuencia tipo permite la rápida comparación entre aislados de diferentes ambientes y la asociación a complejos clonales.

CONCATENATE YOUR OWN ALLELIC PROFILE - Enter your profile below (below each box is the highest allele number present in the database)

AtpA Ddl Gdh PurK Gyd PstS Adk

77 65 67 76 45 96 31

Figura 11. Captura de pantalla de la base de datos MLST para ejemplificar la concatenación de los perfiles alélicos.

En la Figura 11 se observa la captura de pantalla de la base de datos la cual debe de ser completada con el perfil alélico de cada cepa, esto permite obtener la secuencia tipo (ST), debajo de cada recuadro aparece el número de alelos reportados en la base de datos, por ejemplo para el gen de *atpA* existen 77 alelos mientras que para el gen *adk* existen reportados 31.

Una vez concatenado cada uno de los perfiles alélicos en la base de datos, el programa estableció la secuencia tipo para cada una de las cepas, así como una tabla de las cepas reportadas en la base de datos que comparten la misma secuencia tipo (ST).

En la Figura 12 se observa la secuencia tipo obtenida para la cepa Queso D-2 (QD-2), la ST obtenida fue la 135 (renglón sombreado), así como 2 cepas reportadas que comparten la misma ST (E1276 y A2504).

Enterococcus faecium - Allelic Profiles query results

Your sequence type is 135

Strain	ST	Serotype	AtpA	Ddl	Gdh	PurK	Gyd	PstS	Adk
			27	3	1	2	1	1	1
E1276	135		27	3	1	2	1	1	1
A2504	135		27	3	1	2	1	1	1

Cepa QD-2 →

Figura 12. Secuencia tipo obtenida para la cepa Queso D-2 (QD-2).

En caso de que la secuencia tipo no se encuentre reportada en la base de datos, aparece la leyenda “secuencia tipo no encontrada” y debajo una tabla con las cepas reportadas que comparten seis de siete alelos.

Enterococcus faecium - Allelic Profiles query results

Your sequence type is not found, the closest matches are shown below

Strain	ST	Serotype	AtpA	Ddl	Gdh	PurK	Gyd	PstS	Adk
			51	2	12	9	1	1	5
E0788	44		3	2	12	9	1	1	5
E1221	44		3	2	12	9	1	1	5
E0696	156		5	2	12	9	1	1	5
A0167	217		21	2	12	9	1	1	5

Cepa C →

Figura 13. Secuencia tipo obtenida para la cepa C.

En la Figura 13 se observa el resultado obtenido para la cepa C, esta secuencia tipo no había sido reportada, en la tabla se muestran STs de cepas parecidas, como se observa en la tabla la cepa C comparte seis alelos (*ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS* y *adk*) con la ST 44, ST 156 y ST 217.

Es importante mencionar que la mayoría de las secuencias tipo obtenidas resultaron ser nuevas. Ya que se trata de una técnica epidemiológica, la base de datos está integrada en su mayoría por por aislados clínicos, de humanos y de animales, sin embargo en los últimos años se ha enriquecido con aislados de distintos ambientes incluyendo alimentos, con lo cual se ha permitido dilucidar la divergencia de cepas patógenas de este microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza (Giraffa, 2003).

De las siete cepas aisladas de queso Cotija analizadas con MLST, comprenden 4 secuencias tipo nuevas (ST 1045, ST 1046, ST 1047 y ST 1048), el hallazgo de un nuevo alelo para el gen *ddl* (*ddl* 74) y dos cepas reportadas en la base de datos, la cepa B (ST 820) y la cepa QD-2 (ST 135). Se presenta en la Tabla 18 los perfiles alélicos de las siete cepas.

Tabla 17. Secuencias tipo de los tres linajes principales del CC17 reportadas en la base de datos de MLST de *E. faecium*.

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

Tabla 18. Secuencias tipo de las cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija.

Cepa	ST	Región	Año	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
Cepa B	820	La Tinaja (Michoacán)	2008	5	7	5	7	1	1	1
Cepa C	1045	S. Ma. del Oro (Jalisco)	2008	51	2	12	9	1	1	5
Cepa D	1046	S. Ma. del Oro (Jalisco)	2008	3	7	5	7	1	1	1
Cepa G	1045	La Tinaja (Michoacán)	2008	51	2	12	9	1	1	5
Cepa QD-2	135	Quitupán (Jalisco)	2015	27	3	1	2	1	1	1
Cepa QE-2	1047	Quitupán (Jalisco)	2015	27	3	25	2	1	12	1
Cepa QG-5	1048	S. Ma del Oro (Jalisco)	2015	8	74	12	6	1	1	5

De acuerdo a la hipótesis planteada, ninguna de las cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija pertenece al complejo clonal CC17 (Tabla 17), el cual está integrado por tres linajes principales ST 17, ST 18 y ST 78 (Willems *et al.* 2012). Sin embargo, no se estableció un complejo clonal de las cepas aisladas de alimentos. Aunque se esperaba que las cepas estuvieran estrechamente relacionadas entre sí, esto sucedió de manera parcial, la cepa C y G se encuentran en la misma secuencia tipo; así mismo, la cepa B y D se encuentran estrechamente relacionadas entre sí comparten seis alelos (*ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS*, *adk*). Sin embargo, entre las cuatro cepas únicamente comparten dos alelos (*gyd* y *pstS*). Estas cepas fueron aisladas de dos quesos distintos, uno de la ranchería “La Tinaja” en Michoacán y otro de Santa María del Oro en Jalisco durante una misma colecta en el año 2005. La cepa QD-2 y QE-2 comparten 5 alelos (*atpA*, *ddl*, *purK*, *gyd* y *adk*) entre si y fueron aisladas de dos quesos que provenían de Quitupán Jalisco elaborados por diferentes productores. Por último la cepa QG-5 comparte cuatro alelos (*gdh*, *gyd*, *pstS* y *adk*) con la cepa C y G, esta cepa fue aislada de un queso que provenía de Santa María del Oro. Las cepas QD-2, QE-2 y QG-5 comparten entre si un solo alelo (*gyd*), y fueron aisladas de tres quesos distintos, de una misma colecta en el año 2011. Como se mencionó al principio, el queso Cotija es elaborado de manera artesanal y durante su elaboración no se incluye ningún tipo de tratamiento térmico ni cultivos iniciadores, por lo que inicialmente tiene una carga microbiana diferente que además va cambiando durante la maduración. Durante la elaboración existen puntos críticos que son posibles fuentes de inoculación de microorganismos, como la ordeña, el tiempo de reposo de la leche a temperatura ambiente, el amasado y salado manual, y la maduración (García-Saturnino, 2011). Así mismo la inoculación puede provenir del equipo de ordeña, los utensilios para la elaboración del queso y el uso de agua contaminada durante su elaboración o limpieza del equipo (Gelsomino *et al.*, 2002). Debido a la diversidad de fuentes de donde pueden provenir los enterococos resulta difícil que se establezca un solo grupo entre estos aislados, entre las siete cepas comparten únicamente un solo alelo (*gyd*), sin embargo se observó una cierta relación entre las cepas que provenían de una misma colecta.

En la base de datos de MLST existen reportadas 5 cepas aisladas de quesos, sin embargo la información proporcionada resulta muy pobre, ya que no se informa de que tipo de queso fueron aisladas. Como se observa en la Tabla 19, la cepa A0037 y A0038 fueron aisladas de un queso italiano y pertenecieron a la ST 22. Es un resultado similar al obtenido para las cepas C y G, las cuales se encuentran asociadas en la misma ST (1045). La cepas E1611, E1604 y E1607 fueron aisladas de un queso durante un brote alimenticio en Noruega (la base de datos no proporciona mayor información), las secuencias obtenidas son únicas, sólo existe una cepa asociada a cada secuencia tipo (ST 72, 75 y 76 respectivamente) sin embargo se observa una estrecha relación entre E1604 y E1607, las cuales comparten 6 alelos entre sí, como en el caso de las cepas B y D.

Tabla 19. ST de cepas aisladas de queso reportadas en la base de datos MLST de *E. faecium*.

Cepa	Ambiente	País	ST	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
A0037	Queso	Italia	22	2	3	1	2	1	1	1
A0038	Queso	Italia	22	2	3	1	2	1	1	1
E1611	Queso	Noruega	72	3	1	1	2	13	1	1
E1604	Queso	Noruega	75	13	8	8	23	6	28	11
E1607	Queso	Noruega	76	13	8	10	23	6	28	11

Resulta complicado establecer analogías entre nuestros aislados y las cepas aisladas de quesos reportadas en la base de datos debido a la escasa información proporcionada, sin embargo las cepas analizadas durante este trabajo fueron incluidas en la base de datos de MLST y de esta manera se enriqueció la base de datos con aislados alimenticios.

7.8 Análisis de las ST de las cepas aisladas de queso Cotija

Se analizó la secuencia tipo obtenida para cada una de las cepas, haciendo hincapié en las cepas reportadas en la base de MLST, relacionadas con nuestros aislados, ninguno de los aislados nosocomiales relacionados pertenece al CC17, sin embargo el CC17 fue nuestro criterio de comparación. Es importante recordar que las cepas B, C, D y G fueron incluidas en un trabajo previo. De acuerdo a los resultados obtenidos por Olvera en el 2013, no se

detectó el gen para la citolisina (*cyIA*) para ninguna de las cepas, la cepa B es la única que cepa tiene el gen para la sustancia de agregación (*asa*) y el gen que codifica para la proteína de superficie (*esp*), por lo que los factores de virulencia detectados se relacionan con la capacidad de colonizar y no existe riesgo de una infección producida por estas cepas. También durante este estudio se evaluó la resistencia al antibiótico vancomicina usando la concentración mínima inhibitoria (MIC) recomendada por el Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) que es de 256 µg/mL, y una segunda concentración previamente reportada en el grupo de trabajo (20 µg/mL) (Bravo, 2008). Los resultados mostraron que ninguna cepa tiene capacidad de crecer en presencia de las concentraciones evaluadas del antibiótico vancomicina.

En la Tabla 20 se muestran los resultados obtenidos para las cepas B y D que se encuentran relacionadas entre sí (comparten 6 alelos), esto es un resultado que se esperaba debido a que provienen de un mismo nicho ecológico. Ya que se tratan de secuencias tipo no reportadas o no se encuentra la información disponible, también se muestran los resultados de otras cepas relacionadas.

Tabla 20. Secuencias tipo de las cepas B y D de *E. faecium* aisladas de queso Cotija.

Cepa	ST	Ambiente	País	Año	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
Cepa B	820	Queso madurado art.	México	2008	5	7	5	7	1	1	1
Cepa D	1046	Queso madurado art.	México	2008	3	7	5	7	1	1	1
E0203	27	Ternero (Heces)	Holanda	1996	2	7	5	7	1	1	1
E0463	27	Perro (Heces)	Holanda	1996	2	7	5	7	1	1	1
E1574	27	Perro (Heces)	Bélgica	1995	2	7	5	7	1	1	1
E2071	27	Ave de corral	Dinamarca	2001	2	7	5	7	1	1	1
E0120	27	Hum hosp (Ascitis)	Holanda	1996	2	7	5	7	1	1	1
A0161	212	Hum sano (Heces)	Brasil	ND	15	7	5	7	1	1	1

Como se observa en la Tabla 20 la mayoría de las cepas relacionadas son de origen fecal y pertenecen a la ST 27. Los enterococos son bacterias autóctonas del tracto gastrointestinal de humanos y animales, que una vez que son

expulsados al medio son capaces de colonizar diversos nichos, por lo cual se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente (Giraffa, 2003). Si bien la mayoría de las cepas relacionadas son de origen fecal, la inoculación pudo suceder de manera indirecta, la ubre de las vacas está expuesta al ambiente y están en continuo contacto con el suelo, plantas y otros animales o de las manos de humanos que en un ambiente rural están en constante contacto con animales de granja y domésticos, con lo cual pudo ocurrir la inoculación en cualquiera de las múltiples etapas manuales. Así mismo la inoculación puede provenir del equipo de ordeña, los utensilios para la elaboración del queso y el uso de agua contaminada durante su elaboración o limpieza del equipo (Gelsomino *et al.*, 2002). Por lo tanto, aunque el origen de las cepas es diverso como terneros, aves de corral o perros, todos estos individuos pueden ser encontrados en el ambiente rural donde se produce el queso Cotija. Se ha reportado la aparición de cepas de *E. faecium* resistentes a antibióticos entre animales de granja, destinados al consumo humano y domésticos (Van den Bogaard *et al.*, 2000). De acuerdo a lo reportado en la base de datos la cepa E0203 (becerro) y E0463 (perro) presentan el gen VanA. El fenotipo VanA se caracteriza por la resistencia a altos nivel tanto a la vancomicina y teicoplanina (Arthur *et al.*, 1996); Sin embargo, aunque no se ha dilucidado de manera concisa la forma en que estas cepas adquieren estos genes, existe evidencia que el uso desmedido de antibióticos en la medicina veterinaria así como su uso como factores de crecimiento durante la crianza de ganado, como el caso de la avoparcina (Aarestrup, 1995; Bager *et al.*, 1997; Wegener *et al.*, 1999), genera reservorios de cepas resistentes, y se sugiere que se pueden propagar entre los mismo animales y humanos que están en estrecho contacto con ellos. De la misma manera la cepa E0120 presenta el gen VanA, sin embargo es de origen nosocomial, esta característica le permite sobrevivir a altos niveles de vancomicina y teicoplanina durante la medicación, esta cepa fue aislada de un paciente con ascitis, la ascitis es la presencia de líquido seroso en el espacio peritoneo visceral y peritoneo parietal, sin embargo en condiciones normales este líquido es estéril, la presencia de bacterias indica peritonitis bacteriana espontánea (PBE), la cual es una complicación grave que se produce escasamente en pacientes con cirrosis y ascitis (Pinzello *et al.*, 1983). Se ha reportado que los enterococos pueden actuar como patógenos

nosocomiales y causar infecciones intra-abdominales como en este caso (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997). Únicamente para la cepa B se detectó el gen *esp* que codifica para la proteína de superficie de enterococos, el cual se ha asociado con las cepas pertenecientes al CC17; sin embargo, no presentó el alelo 1 del gen *purK* característico de las cepas del CC17 (Homan *et al.*, 2002), así mismo ninguna de las dos cepas aisladas de queso Cotija son resistentes a vancomicina con lo que se descarta toda posible asociación con cepas nosocomiales.

Tabla 21. Secuencias tipo para la cepas C y G de *E. faecium* aisladas de queso Cotija.

Cepa	ST	Ambiente	País	Año	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adh</i>
Cepa C	1045	Queso madurado art.	México	2008	51	2	12	9	1	1	5
Cepa G	1045	Queso madurado art.	México	2008	51	2	12	9	1	1	5
E1221	44	Ternero (Heces)	Holanda	1996	3	2	12	9	1	1	5
E0788	44	Hum hosp (Heces)	Holanda	2000	3	2	12	9	1	1	5
E0696	156	Aguas residuales	Reino unido	ND	5	2	12	9	1	1	5
A0167	217	Cerdo	Brasil	ND	21	2	12	9	1	1	5

En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos para la cepa C y G las cuales comparten la misma secuencia tipo, lo cual es un resultado esperado debido a su procedencia. Ya que se trata de una nueva secuencia tipo se muestran las cepas vinculadas. De nuevo observamos que las cepas vinculadas son de origen fecal aisladas de animales de granja (ternero y cerdo), en este caso no existe información disponible acerca de genes Van o resistencia a antibióticos. Observamos que la cepa E0788 sin ser patógena es de origen nosocomial y fue aislada de las heces de un paciente (no se especifica el padecimiento) durante un sondeo hospitalario, debido a su origen intestinal es normal encontrar enterococos en las heces de humanos sanos y hospitalizados, esta cepa presenta el gen VanA y resistencia a glicopéptidos. Se ha reportado que los enterococos son comensales inofensivos en humanos sanos, sin embargo son patógenos nosocomiales oportunistas en pacientes

que han tenido una estadía larga en hospitales, en pacientes que se encuentran inmunocomprometidos o en pacientes de edad avanzada, aunque la resistencia a antibióticos no se considera un factor de virulencia nos habla de la capacidad que tiene el microorganismo de sobrevivir a la medicación durante el tratamiento de una infección. A pesar de que la cepa C y la G comparten 6 alelos con la cepa E0788 (humano hospitalizado), no se detectó la presencia de los genes que codifican para la citolisina (*cytA*), proteína de superficie de enterococos (*esp*) y sustancia de agregación (*asa1*), ni el alelo 1 del gen *purK* característico de las cepas del CC17, ni resistencia a la MIC (256 µg/mL) de vancomicina con lo que se descarta toda posible asociación con cepas nosocomiales.

En la Tabla 22 se muestra el resultado para la cepa QD-2 la cual pertenece a la secuencia tipo 135, comparte ST con las cepas A2504 y la cepa E1276, mientras que con la cepa QE-2 comparte cinco alelos (*atpA*, *ddl*, *purK*, *gyd* y *adk*).

Tabla 22. ST de la cepas QD-2 y QE-2 de *E. faecium* aisladas de queso Cotija.

Cepa	ST	Ambiente	País	Año	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
Cepa QD-2	135	Queso madurado art.	México	2015	27	3	1	2	1	1	1
A2504	135	Hum sano (Heces)	Rusia	2008	27	3	1	2	1	1	1
E1276	135	Hum hosp (Sangre)	Alemania	ND	27	3	1	2	1	1	1
Cepa QE-2	1047	Queso madurado art.	México	2015	27	3	25	2	1	12	1

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que la cepa A2504 fue aislada de las heces de un humano sano, sin embargo la cepa E1276 fue aislada de sangre de un humano hospitalizado, bacteremia es el nombre que se le da a este padecimiento. No existe información disponible acerca de genes Van o resistencia a antibióticos para ninguna de las dos cepas. Se ha reportado que los enterococos son reconocidos como los principales patógenos nosocomiales que causan bacteremia (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997). La razón por la que un enterococo pasa de ser un comensal a un patógeno no se

ha determinado. Inicialmente se creía que la infección era producida por cepas endógenas, sin embargo parece ser que se trata de cepas adquiridas a nivel hospitalario, las cuales se encuentran bien adaptadas para prosperar en la microbiota de los pacientes hospitalizados y las cuales se han enriquecido de distintos genes de virulencia y de resistencia a antibióticos (Palmer *et al.*, 2014). Se ha determinado que el personal sanitario juega un papel importante en la transmisión de estas cepas a los pacientes (mediante inoculación por catéteres venosos o urinarios, o durante la higiene de suturas quirúrgicas), así como la presión selectiva ejercida por antibióticos de amplio espectro lo cual contribuye a la selección de cepas resistentes al erradicar el resto (Bonten, *et al.*, 2001). A pesar que las cepas QD-2 y QE-2 no presentan el alelo 1 del gen *purK*, observamos que la cepa QD-2 tiene 4 alelos con el número 1, sabemos que la ST 17 presenta en todos sus *loci* el alelo 1, para deslindar la cepa QD-2 claramente de la cepa nosocomial E1276 (bacteremia), es necesario determinar los factores de virulencia que posee y conocer su resistencia a antibióticos, ya que se encuentran en la misma secuencia tipo. Es probable que las cepas QD-2 y QE-2 sean de origen humano y que hayan sido inoculadas en alguna de las múltiples etapas manuales.

Tabla 23. Secuencia tipo de la cepa QG-5 de *E. faecium* aislada de queso Cotija.

Cepa	ST	Ambiente	País	Año	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>
Cepa QG-5	1048	Queso madurado art.	México	2015	8	4	12	6	1	1	5
E1283	130	Hum hosp (sangre)	Alemania	ND	8	4	12	9	1	1	5
A0165	216	Hum sano	Brasil	ND	15	4	12	6	1	1	5
A2401	518	Hum hosp (Heces)	España	1997	5	4	12	6	1	1	5
A2501	545	Hum sano (Heces)	Rusia	2008	14	4	12	6	1	1	5

De acuerdo a los resultados de la Tabla 23, se observa que la secuencia tipo de la cepa QG-5 no había sido reportada previamente y se muestran las cepas relacionadas con las que comparte 6 alelos, siendo cada una de una ST distinta. Sin embargo, todas las cepas son de origen humano ya sea sano u hospitalizado, de nuevo se observan cepas de origen fecal y un caso de

bacteremia. No existe información disponible acerca de genes Van, factores de virulencia o resistencia a antibióticos de las cepas relacionadas, así mismo la cepa QG-5 no ha sido caracterizada con respecto a resistencia a antibióticos y factores de virulencia. No presenta el alelo 1 del gen *purK* y sólo comparte dos alelos con la ST 17 (*gyd* y *pstS*). Por lo tanto, sólo se puede concluir que la cepa QG-5 probablemente sea de origen fecal humano y que posiblemente haya sido inoculada en alguna de las múltiples etapas manuales.

7.9 Análisis e-BURST

El primer paso del algoritmo consiste en dividir los datos de entrada en grupos de ST que tienen seis alelos o menos de similitud en el perfil alélico, ya que el algoritmo de e-BURST se basa en la similitud en las STs, ya que de esta manera determina el descenso desde un mismo genotipo fundador y las relaciones más distantes entre los grupos. El término grupo se utiliza como un término neutro para una colección de STs que son colocadas juntas por e-BURST, mientras que un complejo clonal es un conjunto de STs que desciende de un mismo genotipo fundador (Feil *et al.*, 2004). El genotipo principal fundador es definido como la ST que difiere de la mayoría de las STs en un sólo alelo, así la diversificación del genotipo fundador dará lugar a variantes conectados entre sí de manera que solo difieren en uno de los siete *loci* (SLV). Para cada grupo se muestra el número de grupo, las STs que pertenecen al grupo, el total de aislados y, si es posible, el genotipo fundador. También se muestra la distancia media entre las STs en el grupo y es calculada a partir del número promedio de diferencias entre sus perfiles alélicos. Algunas STs que no pudieron ser agrupadas, se muestran debajo de todos los grupos, se conocen como ST únicas (Feil *et al.*, 2004).

En la base de datos hay reportados 2195 aislados, los cuales están distribuidos en 745 STs, que a su vez dan origen a 11 grupos.

La configuración predeterminada de e-BURST para la agrupación es la más estricta (conservadora), donde todos los miembros asignados al mismo grupo comparten ≥ 6 alelos de los 7 *loci*, con al menos otro miembro del grupo. Sin embargo, de esta manera sólo la cepa QD-2, la cual pertenece a una secuencia tipo previamente reportada podía ser agrupada. Por lo que se definió

un enfoque menos estricto para la agrupación, arbitrariamente se modificó a un valor ≥ 5 de los 7 *loci*. En la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos, se definió un código de e-BURST para las cepas, se tiene que asignar un número a partir de 10,000. Como se observa en la Tabla 24 todas las cepas se encuentran en el grupo 1, el cual tiene como ST fundadora principal la ST 17, en este grupo se encuentra la ST 17, ST 78 y ST18, es decir el CC17. Sin embargo, esto no indica que estén estrechamente relacionadas con el CC17. Debido a que se le dio un enfoque más relajado fue posible agruparlas, ya que comparten 5 alelos con algún miembro lejano de este grupo. Como se observa en los valores de distancia promedio (la cual es una medida de la diferencia entre los perfiles alélicos de una ST con respecto a la ST fundadora) las cepas aisladas del queso Cotija se encuentran muy alejadas de la ST 17 (ST fundadora). Lo cual se corrobora con el diagrama radial (Figura 14).

Tabla 24. Análisis e-Burst para las siete cepas aisladas de queso Cotija

	Código e-Burst	Grupo	ST fundadora	Distancia Promedio	Numero de aislados
Cepa B	10001	1	17	4.69	1
Cepa C	10002	1	17	5.13	2
Cepa D	10003	1	17	4.79	1
Cepa G	10002	1	17	5.13	2
Cepa QD-2	135	1	17	3.94	1
Cepa QE-2	10004	1	17	5.20	1
Cepa QG-5	10005	1	17	5.19	1

El diagrama radial muestra toda la base de datos de MLST de *E. faecium*. Las STs están representadas por nodos en el diagrama y están etiquetadas con su respectivo número. El color azul indica el genotipo fundador principal, el color amarillo una secuencia fundadora secundaria y el color negro una ST cualquiera. Las áreas de cada uno de los círculos indican la prevalencia de la ST en la base de datos de MLST y se encuentran conectadas de manera que muestran los patrones de descenso, ya que cada ST conectada difiere en un solo alelo de su anterior. Las STs 17, 18 y 78 pertenecientes al complejo clonal 17 (CC17) están marcadas con flechas rojas, mientras que los aislados de queso Cotija se muestran con flechas negras y el nombre de la cepa.

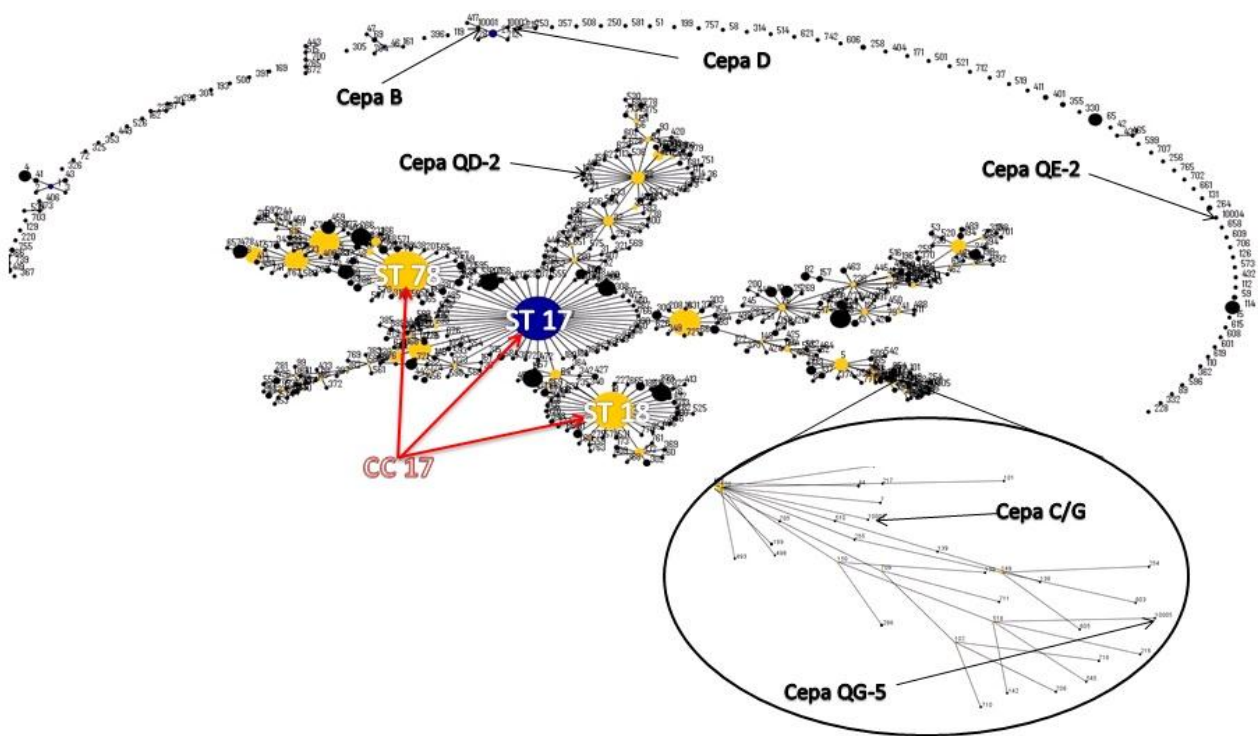


Figura 14. Diagrama de población de *E. faecium* elaborado con e-Burst.

Como se observa en el diagrama radial (Figura 14) las cepas aisladas del queso Cotija “Región de Origen” se encuentran muy alejadas del CC17, en los casos de la cepa B, cepa D y QE-2, no fue posible relacionarlas de manera directa ya que se observan en el exterior, las cepas C, G, QG-5 y QD-2 se encuentran relacionadas a cepas muy distantes del CC17 ya que se observan en las ramificaciones terminales. No se formó un complejo clonal de las cepas aisladas del queso Cotija, debido a la diversidad de fuentes de donde pueden provenir los enterococos, no es posible que se establezca un solo grupo entre estos aislados.

8. Discusión final

Los enterococos son microorganismos ubicuos, pero tienen un hábitat predominante en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, debido a su capacidad de sobrevivir a ambiente adversos, una vez expulsado son capaces de colonizar diversos nichos. Ya sea por contaminación ambiental o agregados como cultivos iniciadores, suelen estar asociados a alimentos fermentados donde juegan un papel importante en el desarrollo de propiedades organolépticas deseables. Con la expansión del CC17 a diversos ambientes y poblaciones, el incremento en el hallazgo de cepas resistentes a antibióticos y que portan factores de virulencia en humanos sanos, animales de granja y domésticos (Willems y van Schaik, 2009), así como su potencial distribución a través de alimentos, es una cuestión preocupante. A pesar que las diferencias entre un enterococo patógeno y una cepa inocua que puede ser utilizada como cultivo iniciador o probiótico en alimentos no han sido establecidas con claridad, la tipificación con MLST apoyado con la detección de genes de factores de virulencia y la resistencia a antibióticos han proporcionado una herramienta para la distinción entre estos aislados. Se menciona que es una línea delgada la que separa a los enterococos patógenos de los comensales inofensivos; sin embargo, es un proceso que involucra múltiples factores, tanto en el microorganismo como en el hospedero, por ejemplo, en los enterococos la adquisición de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia, son factores determinantes. La edad, el estado inmune, la presencia de catéteres venosos o urinarios, son factores que influyen por parte del hospedero. Contrario a lo que se piensa, se ha demostrado que las infecciones adquiridas en el hospital no son causadas por cepas de *E. faecium* que normalmente residen en el intestino, sino que son causadas por cepas específicas de *E. faecium* que se adquieren durante la hospitalización, que están bien adaptadas para prosperar en la microbiota perturbada de los pacientes hospitalizados y que gradualmente han adquirido distintos genes de virulencia y de resistencia a antibióticos (Palmer *et al.*, 2014). Por lo tanto es necesario deslindar cepas inocuas y enriquecer la base de datos de MLST con aislados de diversos alimentos y de esta manera generar un panorama más amplio de este controvertido microorganismo.

En conclusión los resultados del presente estudio demostraron la presencia de 4 nuevas secuencias tipo con lo que se enriqueció la base de datos con aislados de alimentos, además los resultados de tipificación apoyado con los resultados previos del grupo de trabajo, indican que las cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija “Región de Origen” no se encuentran relacionadas con el complejo clonal 17 (CC17) y su presencia en el queso Cotija no representa un riesgo, ya que no sólo contribuyen en el desarrollo de propiedades sensoriales, sino que por la producción de sustancias con actividad antimicrobiana que contribuyen a la inocuidad del producto.

9. Conclusiones

- La presencia de bacterias del género *Enterococcus* en la microbiota del queso Cotija artesanal madurado es frecuente.
- El método de aislamiento selectivo fue eficiente para poder aislar miembros del género *Enterococcus*.
- El juego de cebadores Ef0027, que tiene como blanco el gen homónimo, permite la detección de la especie *Enterococcus faecalis* y el juego de cebadores FAC, que flaquean el gen *ddl*, permite la detección de la especie *Enterococcus faecium*.
- Se aislaron 39 cepas de *Enterococcus* spp. de diferentes piezas de queso Cotija con 3 meses de maduración. De estas: 13 cepas fueron de *E. faecalis* y 12 de *E. faecium* y el resto de otras especies.
- Las siete cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija “Región de Origen”, analizadas por MLST, comprenden 4 secuencias tipo nuevas (ST 1045, ST 1046, ST 1047 y ST 1048). La cepa B y la cepa QD-2 pertenecen a una ST reportada, ST 820 y ST 135, respectivamente.
- Los resultados de la tipificación por MLST sugiere que las cepas de *E. faecium* aisladas de queso Cotija “Región de Origen” no están relacionadas con el complejo clonal 17 (CC17).
- No se logró establecer un complejo clonal de aislados de alimentos; sin embargo, se observa una relación entre las cepas aisladas que pertenecen a una misma colecta.

10. Perspectivas

- Determinar a nivel de especie la identidad de las cepas de *Enterococcus* spp. aisladas que no fueron identificadas como *E. faecium* o *E. faecalis*, con el fin de determinar el papel que desarrollan otras especies de enterococos durante la maduración del queso Cotija.
- Determinar los factores de virulencia y resistencia a antibióticos de las cepas QD-2, QE-2 y QG-5, con el fin de profundizar su caracterización.
- Se propone la determinación de genes que codifican para las descarboxilasas implicadas en la producción de aminas biógenas y la resistencia a una amplia gama de antibióticos.

11. Bibliografía

- Aarestrup, F.M., 1995. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microbiological Drug Resistance* 1, 255–257.
- Aarestrup, F.M., Hasman, H., Jensen, L.B., Moreno, M., Herrero, I. A., Domínguez, L., Finn, M., Franklin, A., 2002. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4127–4129.
- Adams, M.R., 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology.* 68, 171-178.
- Agerholm-Larsen, L., Bell, M.L., Grunwald, G.K., Astrup, A., 2000. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49, 346– 352
- Álvarez, R., Barrgan, E. y Chombo, P. 2005. Reglas de uso Marca Colectiva Queso Cotija Region de Origen. Asociación Regional de Productores de Queso Cotija.
- Andrighetto, C., Knijff, E., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J., Dellaglio, F., 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research* 68, 303–316.
- Antonishyn, N.A., McDonald, R.R., Chan, E.L., Horsman, G., Woodmansee, C.E., Falk, P.S., Mayhall, C.G., 2000. Evaluation of fluorescence-based amplified fragment length polymorphism analysis for molecular typing in hospital epidemiology: comparison with pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4058–4065.
- Arthur, M., Reynolds, P.E., Courvalin, P., 1996. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiology* 4, 401– 407.
- Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., Aarestrup, F.M., 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine* 31, 95–112.

- Baumgartner, A., Kueffer, M., Rohner, P., 2001. Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in various ready-to-eat foods. *Arch. Lebensm. hyg.* 52, 1–24.
- Bellomo, G., Mangiagle, A., Nicastro, L., Frigerio, G., 1980. A controlled double-blind study of SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. *Curr. Ther. Res.* 28, 927– 934.
- Bonten, M.J., Willems, R., Weinstein, R.A., 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet. Infectious Diseases* 1, 314–325.
- Bouton, Y., Guyot, P., Grappin, P., 1998. Preliminary characterization of microflora of Comte´ cheese. *Journal Applied Microbiology.* 85, 123–131.
- Bravo-Mendoza A. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química UNAM, México D.F. pp. 18-24, 85-90.
- Centeno, J.A., Menéndez, S., Rodríguez-Otero, J.L., 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology.* 33, 307–313.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G., 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 686–707.
- 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.
- Cocconcelli, P.S., Porro, D., Galandini, S., Senini, L., 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Letters in Applied Microbiology* 21, 376–379.
- Coppola, S., Parente, E., Dumontet, S., La Peccerella, A., 1988. The microflora of natural whey cultures utilized as starters in the manufacture of Mozzarella cheese from water-buffalo milk. *Lait* 68, 295–310.

- Cosentino, S., Pisano, M.B., Corda, A., Fadda, M.E., Piras, C., 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Journal of Dairy Research* 71, 444–450.
- Davies, R., Roberts, T.A., 1999. Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from commercial swine carcasses: effect of feed additives. *Letters in Applied Microbiology* 29, 327–333.
- Descheemaeker, P., Lammens, C., Pot, B., Vandamme, P., Goossens, H., 1997. Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 555–561.
- Del Pozo, B.F., Gaya, P., Medina, M., Rodríguez-Marín, M.A., Nuñez, M., 1988. Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*. 55, 449– 455.
- Depardieu F., Perichon B. 2004. Detection of the van Alphabet and Identification of *Enterococci* and *Staphylococci* at the Species Level by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(12): 5857–5860.
- Devriese, L.A., Pot, B., Collins, M.D., 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*. 75, 399–408.
- De Vuyst, L., Avonts, L., Makras, E., 2004. Probiotics, prebiotics and gut health (Chap. 17). Remacle, C., Reusens, B. (Eds.), *Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom, pp. 416– 482.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C., 1998. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 85, 521– 526.
- Escobar Zepeda, A., 2015. Análisis taxonómico y del potencial metabólico del metagenoma de queso Cotija. Tesis de Doctorado (En revisión). Facultad de Química UNAM

- Feil, E.J., Li, B., Aanensen, D.M., Hanage, W.P. and Spratt, B.G. 2004. eBURST: Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*. 186: 1518-1530.
- 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*. 106:1-24.
- Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H., 1996. Production and characterisation of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. *International Journal of Food Microbiology*. 29, 255–270.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Stiles, M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1–24.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J. y Holzapfel, W.H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 4385-4389.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, ME; Schleifer, K.H y Holzapfel W.H, 2003. Enterococci in foods a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88, 105-122.
- Freitas A.R., Tedim A.P., Novais C., Ruiz-Garbajosa P., Werner G., Laverde-Gomez J.A., Cantón R., Peixe L., Baquero F., Coque T.M. 2010. Global spread of the hylEfm colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2660–2665
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365– 378.
- Gambarotto, K., Ploy, M.C., Dupron, F., Giangiobbe, M., Denis, F., 2001. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 2354–2365.

- García Saturnino V. 2011. Detección de microorganismos lipolíticos durante las etapas de elaboración de un queso artesanal, mediante técnicas moleculares. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
- Gardiner, G.E., Ross, R.P., Wallace, J.M., Scanlan, F.P., Jagers, P.P.J.M., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Stanton, C., 1999. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of Cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 4907–4916.
- Garg, S.K. y Mital, B.K. 1991. Enterococci in Milk and Milk Products. *Critical Reviews in Microbiology*. 18 (1):15-45
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T.M., Condon, S., Swings, J., 2002. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. *Applied Environmental Microbiology*. 68, 3560–3565
- Giraffa, G., 1995. Enterococcal bacteriocins: their potential use as anti-Listeria factors in dairy technology. *Food Microbiology* 551–556.
- Giraffa, G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 163– 171.
- Giraffa G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of Food Microbiology* 88, 215-222.
- Goh, S.H., Facklam, R.R., Chang, M., Hill, J.E., Tyrrell, G.J., Burns, E.C., Chan, D., He, C., Rahim, T., Shaw, C., Hemmingsen, S.M., 2000. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3953–3959.
- Havenaar, R., Huis in't Veld, J.H.J., 1992. Probiotics, general view. In: Wood, J.B.J. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Elsevier, London, United Kingdom, pp. 151– 170.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41, 85– 101.

- Homan W.L., Tribe D., Poznanski S., Li M., Hogg G., Spalburg E., Van Embden J.D., Willems R.J., 2002. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* 40:1963–1971
- Jackson, C.R., Fedorka-Cray, P.J., Barrett, J.B., 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 3558–3565.
- Johnson, A.P., 1994. The pathogenicity of enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemother.* 33, 1083–1089.
- Kariyama, R., Mitsuhashi, R., Chow, J.W., Clewell, D.B., Kumon, H., 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3092–3095
- Klare, I., Heier, H., Claus, H., Bohme, G., Marin, S., Seltmann, G., Hakenbeck, R., Antanassova, V., Witte, W., 1995. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microbial Drug Resistance* 1, 265–272.
- Klein, G., Pack, A., 1997. Antibiotic resistance and transfer of vanA-mediated resistance of enterococci used in animal nutrition. *Microecology and Therapy* 26, 257–268.
- Klein, G., Pack, A., Reuter, G., 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1825–1830.
- Koneman, W., Allen, S. 2008. Diagnostico Microbiológico: texto y atlas a color. Editorial Médica Panamericana. México. pp 137-142.
- Laukova, A., Czikkova, S., 2001. Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on “bryndza”, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiological Research* 156, 31–34.
- Leclercq, R., 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* 24 (Suppl. 1), S80– S84.
- Lemcke, R., Bulte, M., 2000. Occurrence of the vancomycin-resistant genes vanA, vanB, vanC1, vanC2 and vanC3 in *Enterococcus* strains

- isolated from poultry and pork. *International Journal of Food Microbiology* 60, 185–194.
- Lewenstein, A., Frigerio, G., Moroni, M., 1979. Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. *Curr. Ther. Res.* 26, 967– 981.
 - Li, X., Xing, J., Li, B., Wang P., Liu J. 2012. Use of *tuf* as a target for sequence-based identification of Gram-positive cocci of the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, and *Lactococcus*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 11:31.
 - Liu, D., Wang, C., Swiatlo, E.J., Lawrence, M.L., 2005. PCR amplification of a species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*. *Microbiological Research* 156, 944–948.
 - Litopoulou-Tzanetaki, E., 1990. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. *J. Food Sci.* 55, 111–113.
 - Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Peters, J., Ellerbroek, L., 2002. Nachweis von Vancomycin-Resistenzgenen bei Enterokokken-Feldstämmen tierischer Herkunft mittels Multiplex-PCR. *Arch. Lebensm.hyg.* 53, 49–72.
 - Macedo, A.C., Malcata, F.X., Hogg, T.A., 1995. Microbiological profile in Serra ewe's cheese during ripening. *Journal of Applied Bacteriology*. 79, 1 – 11.
 - Maisnier-Patin, S., Forni, E., Richard, J., 1996. Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology* 30, 255–270
 - Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1177–1190.
 - Mohn, S.C., Ulvik, A., Jureen, R., Willems, R.J.L., Top, J., Leavis, H., Harthug, S., Langeland, N. 2004. Duplex Real-Time PCR Assay for

- Rapid Detection of Ampicillin-Resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(2):556–560.
- Morrison, D., Woodford, N., Cookson, B., 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology* (Suppl. 83), 89–99.
 - Murray B.E., 1990. The life and the times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews.* 3, 46-65.
 - Murray, B.E., 1997. Vancomycin-resistant enterococci. *American Journal of Medicine* 102, 284– 293.
 - Murray, B.E., 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases* 4, 37– 47.
 - Nunez, M., Rodríguez, J.L., García, E., Gaya, P., Medina, M., 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology* 83, 671–677.
 - 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. 2010. Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos en *Enterococcus* spp. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F.
 - Olvera García M. 2013. Evaluación de la inocuidad de *Enterococcus* spp. aislados del queso Cotija. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.
 - Ordoñez, J.A., Barneto, R., Ramos, M., 1978. Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft* 33, 609–612.
 - O’Sullivan, M.G., Thornton, G., O’Sullivan, G.C., Collins, J.K., 1992. Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science and Technology* 3, 309– 314
 - Palmer, K., van Schaik, W., Willems, R. 2014. Enterococcal Genomics. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Gilmore M. Eye and Ear Infirmary, Boston, USA. 1-37.

- Panesso, D., Reyes J., Rincon S., Diaz L., Galloway-Pena J., Zurita J., Carrillo C., Merentes A., Guzman M., Adachi JA., 2010. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(5):1562–1569.
- Pinzello, G., R. G. Simonetti, A. Craxi, S. Di Piazza, C. Spano, and L. Pagliaro. 1983. Spontaneous bacterial peritonitis: a prospective investigation in predominantly nonalcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 3:545-549.
- Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. 2010. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Ann. Biol. Res.* 4:218–28.
- Richelsen, B., Kristensen, K., Pedersen, S.B., 1996. Long-term (6 months) effect of a new fermented milk product on the level of plasma lipoproteins—a placebo-controlled and double blind study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 50, 811– 815.
- Rossi, E.A., Vendramini, R.C., Carlos, I.Z., Pei, Y.C., de Valdez, G.F., 1999. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. *European Food Research and Technology* 209, 305–307.
- Salminen, S., Deighton, M., Gorbach, S., 1993. Lactic acid bacteria in health and disease. *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, New York, pp. 199– 225.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E., 1996. Clinical uses of probiotics for stabilising gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 347– 358.
- Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A., 2004. *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional aspects*. 3^a edición. Marcel Dekker inc. Estados Unidos. pp. 375-398.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74 (12): 5463-5467.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory

- characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 76, 93–105.
- Satake, S., Clark, N., Rimland, D., Nolte, F.S., Tenover, F.C., 1997. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2325–2330.
 - Sessions, V.A., Lovegrove, J.A., Taylor, G.R.J., Dean, T.S., Williams, C.M., Sanders, T.A.B., MacDonald, I.A., Salter, A.M., 1997. The effect of a new fermented milk product on total plasma cholesterol, LDL-cholesterol, and apolipoprotein B concentrations in middle-aged men and women (abstract 285). In: Sadler, M.J., Saltmarch, M. (Eds.), *Functional Foods: The Consumer, The Product, and the Evidence*. The Royal Society of Chemistry, London, pp. 15–19.
 - Simonetta, A.C., Moragues de Velasco, L.G., Frison, L.N., 1997. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Letters in Applied Microbiology* 24, 139–143.
 - Titze-de-Almeida, R., Willems, R.J.L., Top, J., Pereira Rodrigues, I., Fonseca Ferreira II, R., Boelens, H., Brandileone, M.C.C., Zanella, R.C., Soares Felipe, M.S., van Belkum, A., 2004. Multilocus variable-number tandemrepeat polymorphism among Brazilian *Enterococcus faecalis* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4879–4881.
 - Top, J., Schouls, L.M., Bonten, M.J., Willems, R.J., 2004. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 4503–4511.
 - Top J., Willems R., Bonten M., 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:297–308.
 - Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 1992. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two greek cheeses from ewes' milk. *J. Dairy Sci.* 75, 1389– 1393.
 - Tzanetakis, N., Vafopoulou-Mastrojiannaki, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., 1995. The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters. *Food Microbiology*. 12, 55– 63.

- Ulrich, A., Muller, T., 1998. Heterogeneity of plant-associated streptococci as characterized by phenotypic features and restriction analysis of PCR amplified 16S rDNA. *Journal of Applied Microbiology* 84, 293–303.
- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K.J., Franz, C.M., Foulquie-Moreno, M.R., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F., Holzapfel, W.H., 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1381–1391.
- van den Braak, N., van Belkum, A., van Keulen, M., Vliegthart, J., Verbrugh, H.A., Endtz, H.P., 1998. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in The Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1927–1932.
- van den Bogaard, A.E. and Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int. J. Antimicrob. Agents* 14, 327-335.
- Vázquez J.A. y Berrón S. 2004. *Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica* 22(2):113-20.
- Wang, W., Wang, H. 2014. The effect of Lactic Acid Bacteria in food and feed and their impact on food safety. *International Journal of Food Engineering* 10(2): 203-210.
- Wegener, H.C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M., Bager, F., 1999. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 5, 329–335.
- Willems, R.J., Top, J., van Den Braak, N., van Belkum, A., Endtz, H., Mevius, D., Stobberingh, E., van Den Bogaard, A., van Embden, J.D., 2000. Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Infectious Diseases* 182, 816–823.

- Willems R.J.L., van Schaik W., 2009. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiology* 4:1125–1135.
- Willems R.J.L., Top J., van Schaik W., Leavis H., Bonten M., Sire´n J., Hanage W.P., Corander J., 2012 Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio* 3:e00151–e00212.
- Zuñiga, B. 2009. Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el queso Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

Sitios de internet consultados:

- Base de datos MLST

Esta publicación fue hecha usando la página web de *Enterococcus faecium* MLST (<http://pubmlst.org/efaecium/>) situada en la Universidad de Oxford (Jolley y Maiden 2010, BMC Bioinformatics, 11:595). El desarrollo de este sitio ha sido financiado por el Wellcome Trust.

- BLASTn

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- ClustalW2

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

- e-Burst

<http://efaecium.mlst.net/eburst/>

- MultAlin

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

- OligoCalc

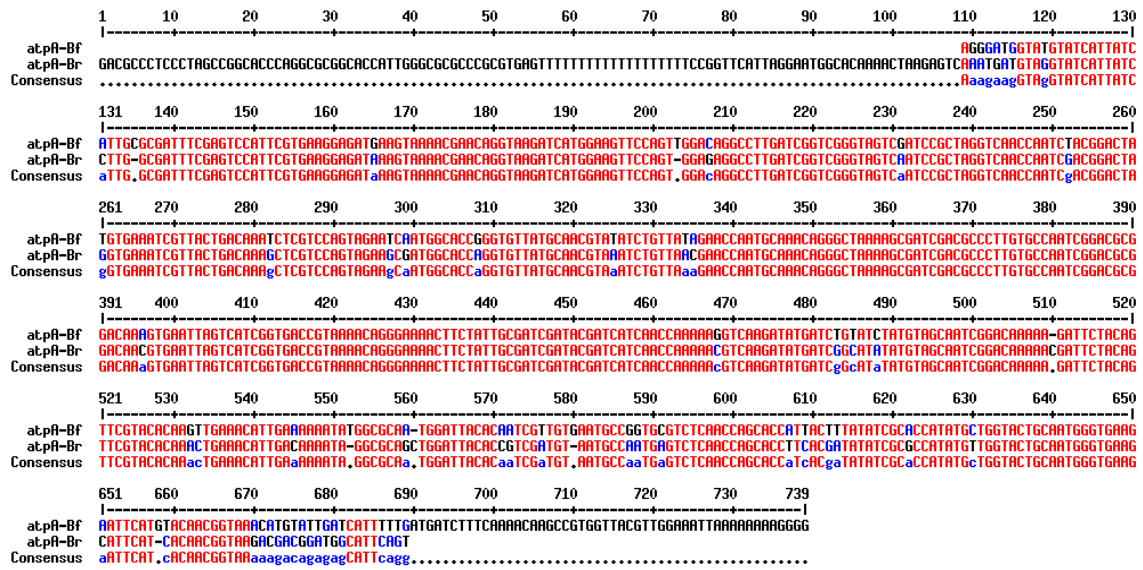
<http://simgene.com/OligoCalc>

12. Anexos

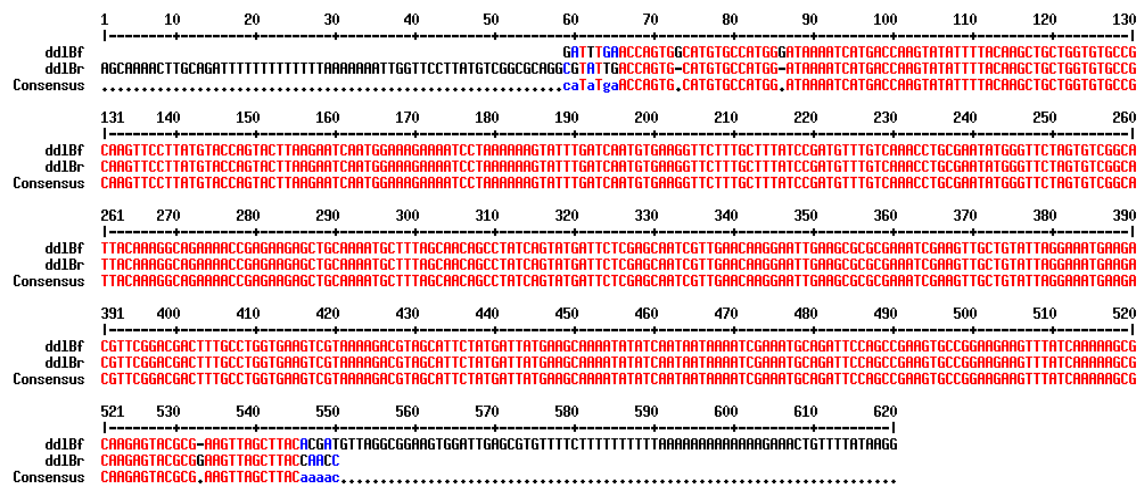
Alineamiento de las secuencias obtenidas para cada uno de los genes utilizados en MLST, realizados con el programa en línea MultAlin. (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)

Cepa B

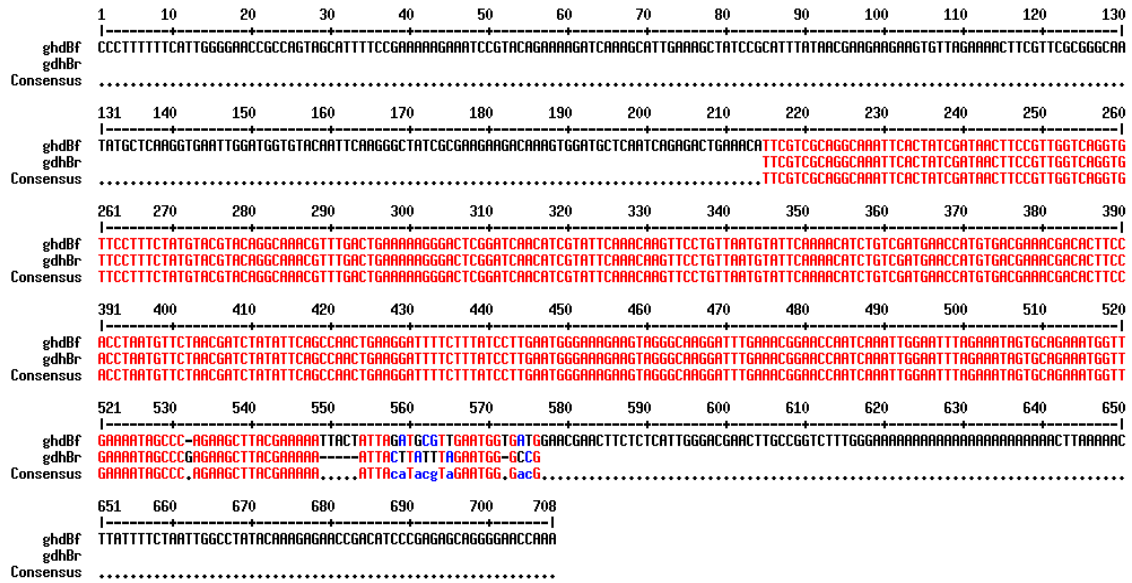
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *atpA* de la cepa B.



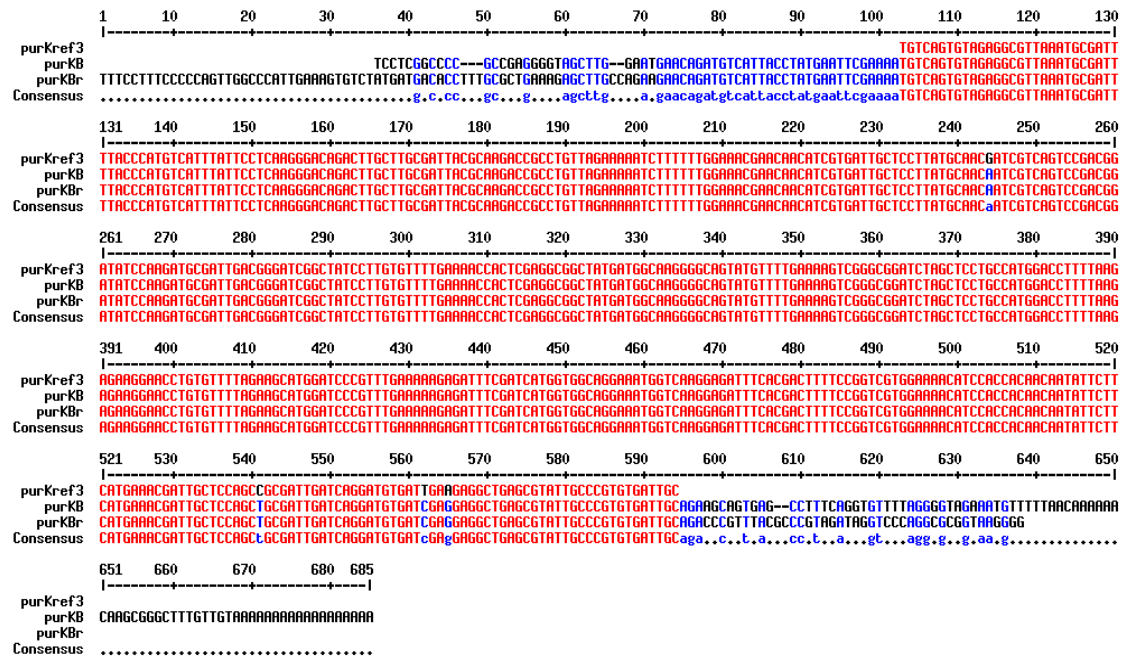
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *ddl* de la cepa B.



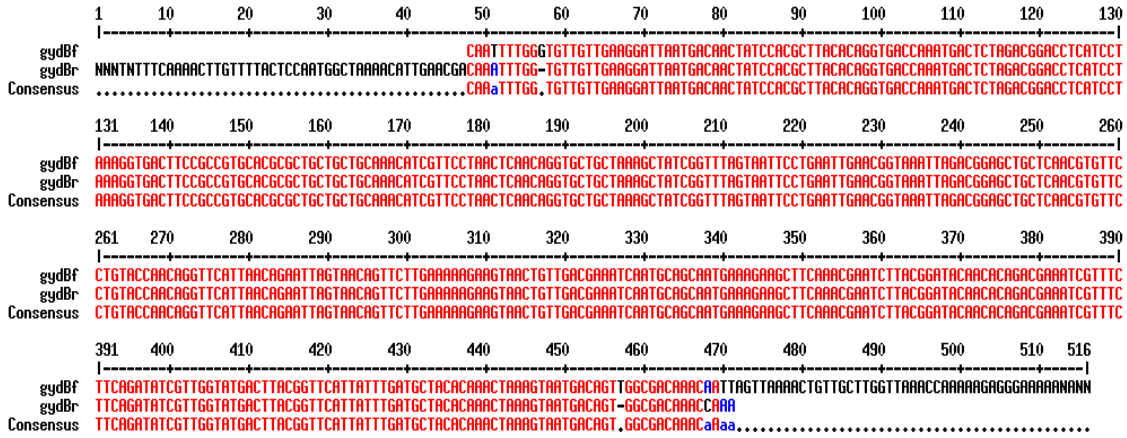
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gdh* de la cepa B.



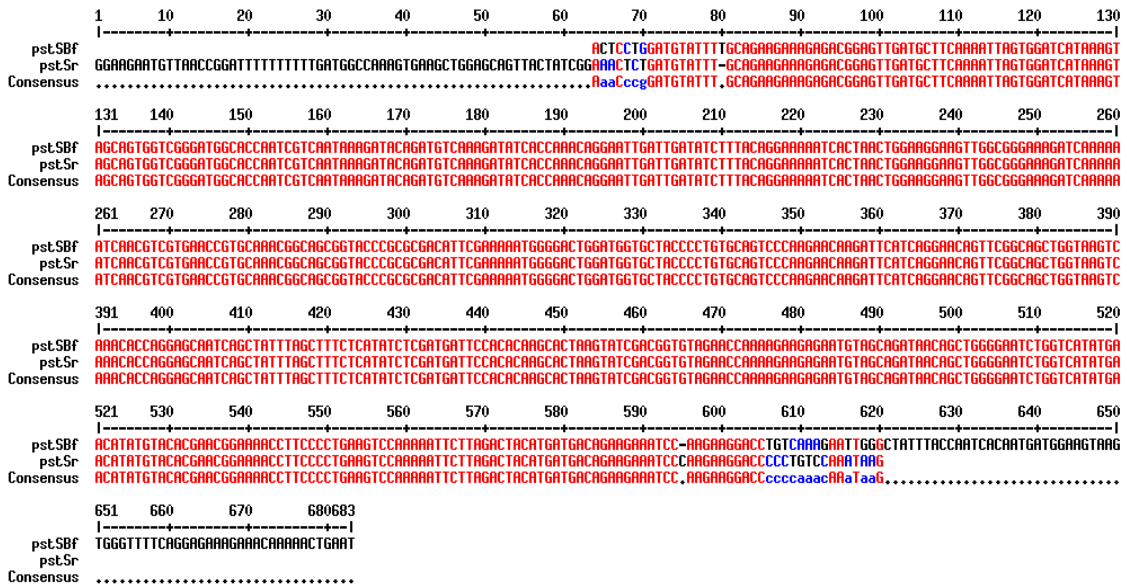
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *purK* de la cepa B.



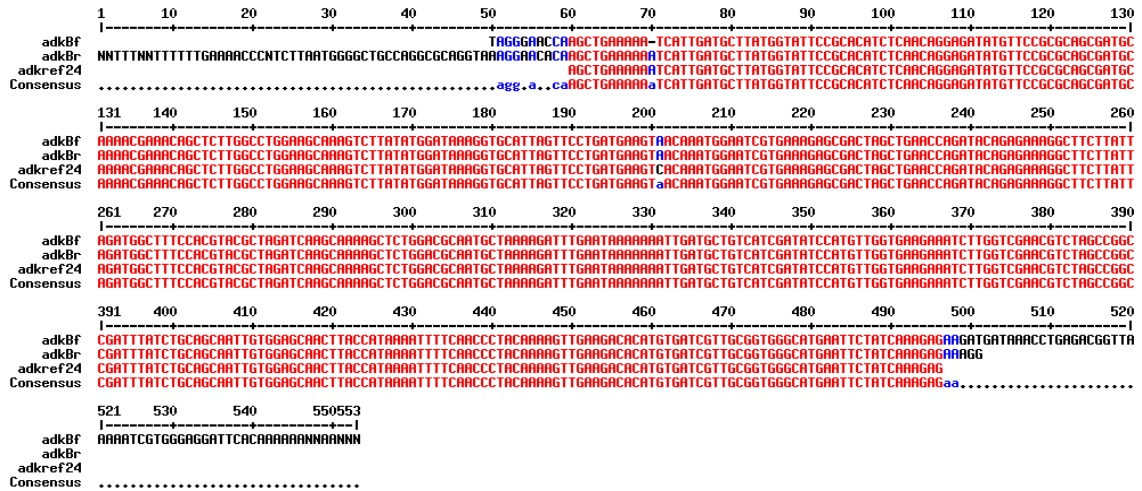
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gyd* de la cepa B.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *pstS* de la cepa B.

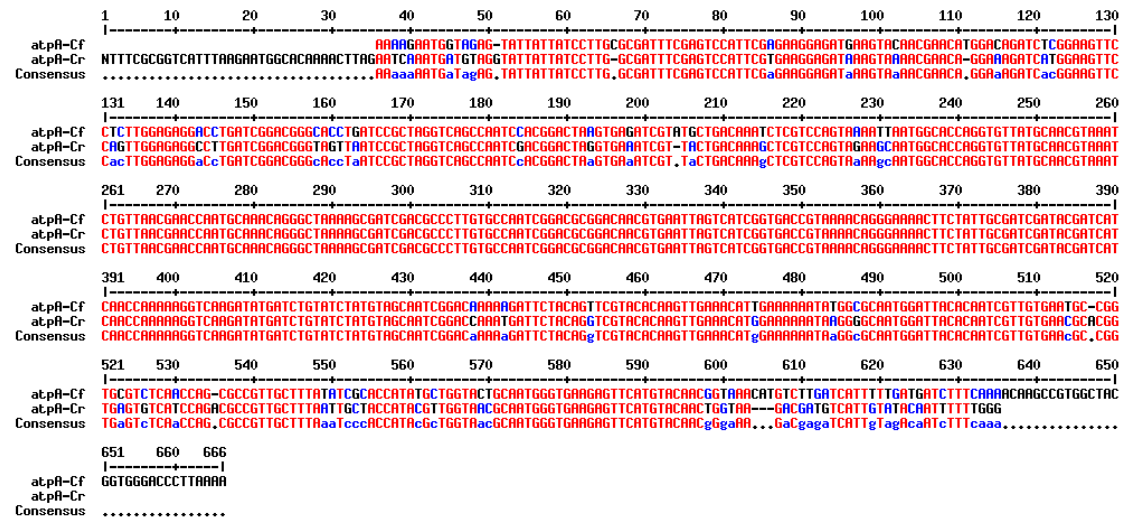


Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *adk* de la cepa B.

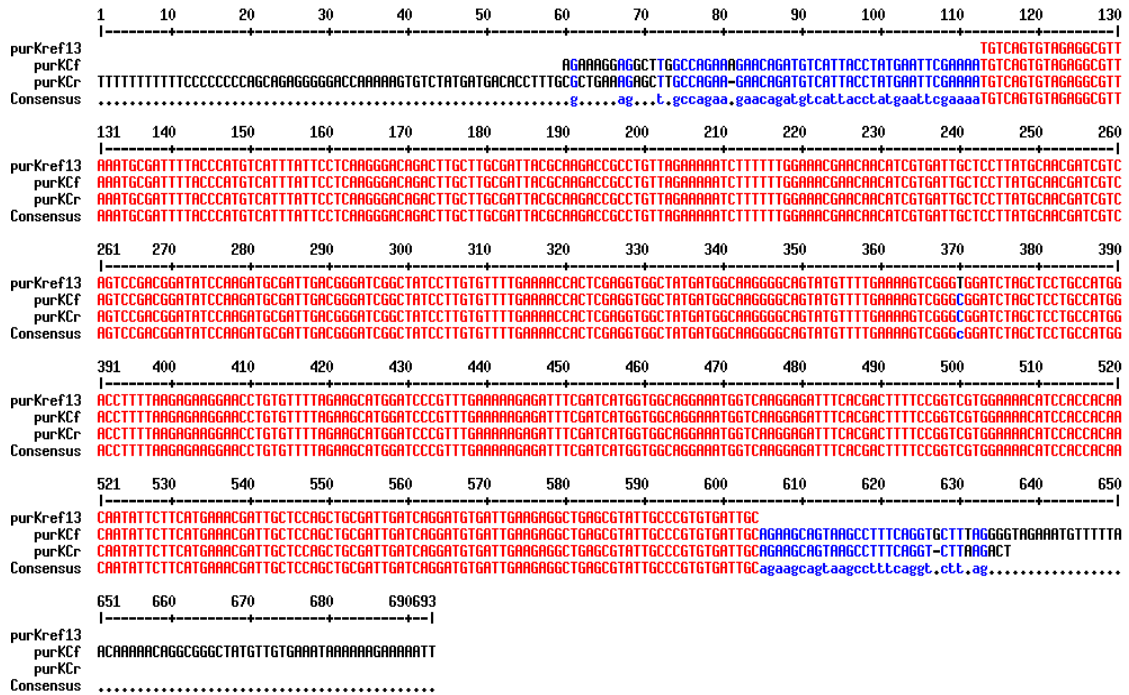


Cepa C

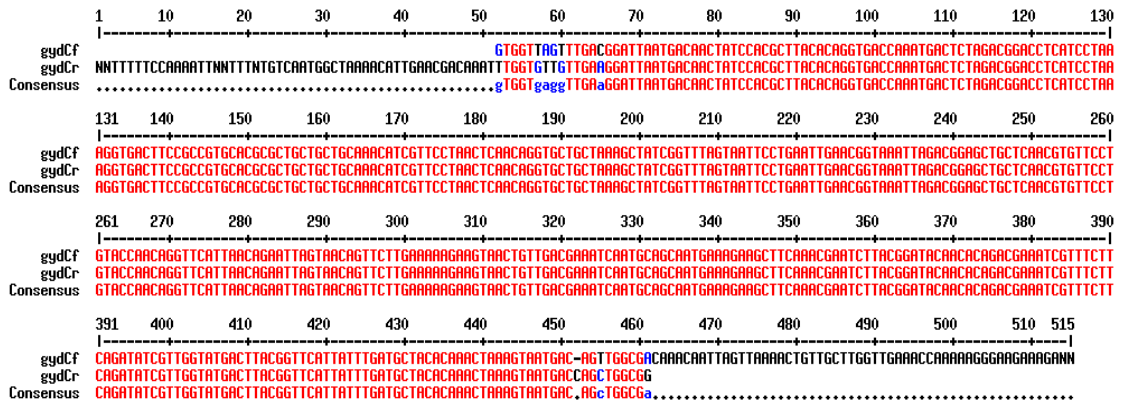
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *atpA* de la cepa C.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *purK* de la cepa C.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gyd* de la cepa C.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *pstS* de la cepa C.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pst.Scf  CTACTG-GATGTATTTGCAGARGAGAGAGCGGAGTTGATGCTTCARAAATTAGTGGATCATRAAGTAGCAGTGG
pst.SCr  GGAGTAGTAAGTTCATTTTTGAGGCCAATTGAGCTGGAGCAGTACTATCGGAACTTTGATGTATTT-GCAGARGAAGAGAGCGGAGTTGATGCTTCARAAATTAGTGGATCATRAAGTAGCAGTGG
Consensus .....aaacTg.GATGTATTT.GCAGARGAAGAGAGCGGAGTTGATGCTTCARAAATTAGTGGATCATRAAGTAGCAGTGG

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pst.Scf  TCGGGATGGCACCAATCGTCARARAAGATACAGATGTCARAGATATCCCAACACAGGARTTGATGTATCTTTACAGGAAAAATCAC TACTGGAGGAGTTGGCGGARAAGATCAAAAATCAACGT
pst.SCr  TCGGGATGGCACCAATCGTCARARAAGATACAGATGTCARAGATATCCCAACACAGGARTTGATGTATCTTTACAGGAAAAATCAC TACTGGAGGAGTTGGCGGARAAGATCAAAAATCAACGT
Consensus TCGGGATGGCACCAATCGTCARARAAGATACAGATGTCARAGATATCCCAACACAGGARTTGATGTATCTTTACAGGAAAAATCAC TACTGGAGGAGTTGGCGGARAAGATCAAAAATCAACGT

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pst.Scf  CGTGAACTGTCARACGGCAGCGGTACCCGCGGCACATTCGAAAAATGGGGACTGGATGGTGTACCCCTGTGCAGTCCCAAGAACAGATTTCATCAGGACAGTTCCGGCAGCTGGTAGTCARACCCA
pst.SCr  CGTGAACTGTCARACGGCAGCGGTACCCGCGGCACATTCGAAAAATGGGGACTGGATGGTGTACCCCTGTGCAGTCCCAAGAACAGATTTCATCAGGACAGTTCCGGCAGCTGGTAGTCARACCCA
Consensus CGTGAACTGTCARACGGCAGCGGTACCCGCGGCACATTCGAAAAATGGGGACTGGATGGTGTACCCCTGTGCAGTCCCAAGAACAGATTTCATCAGGACAGTTCCGGCAGCTGGTAGTCARACCCA

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pst.Scf  GGGCAATCAGCTATTTAGCTTTCTCATATCTCGATGATCCACACACAGCCTAGTATCGACGGGTAGAACCAAAAGAGAGARTGTAGCAGATACAGCTGGGGAATCTGGTCATATGACATATGT
pst.SCr  GGGCAATCAGCTATTTAGCTTTCTCATATCTCGATGATCCACACACAGCCTAGTATCGACGGGTAGAACCAAAAGAGAGARTGTAGCAGATACAGCTGGGGAATCTGGTCATATGACATATGT
Consensus GGGCAATCAGCTATTTAGCTTTCTCATATCTCGATGATCCACACACAGCCTAGTATCGACGGGTAGAACCAAAAGAGAGARTGTAGCAGATACAGCTGGGGAATCTGGTCATATGACATATGT

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pst.Scf  ACACGAAACGGAAACCTCCCTCGAGTCCAAAATTTCTAGACTACATGATGACAGAGAAATCCAGAGAGGACCTGTCAAGAAATGGGCTATTTACCAATCCATGATGAGAGTAGAGTTGGATC
pst.SCr  ACACGAAACGGAAACCTCCCTCGAGTCCAAAATTTCTAGACTACATGATGACAGAGAAATCCAGAGAGGACCTGTCAAGAAATTTGGTCTC
Consensus ACACGAAACGGAAACCTCCCTCGAGTCCAAAATTTCTAGACTACATGATGACAGAGAAATCCAGAGAGGACCTGTCAAGAAaaggGcTc.....

651    660    670    680    690    700    710    720    729
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pst.Scf  ACGAACATTATATAAAACACAAAGCTGGAAAAACAAACAAATCCAGGATTATAGGGGGTTGATAGGAGGGGTAGA
pst.SCr
Consensus .....

```

Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *adk* de la cepa C.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
adkCf   TTAGGGCAACCAANGCTGANAATTCATTGATGCTTATGGTATCCGCACATCTCACAGGAGATATGTTCCGCGCAGCATGC
adkCr   NNTTTTTTTTGGAGAACCCCTTTTATGGGGTGCACAGGCGCAGGTAAAGGAAACACAGCTGAAATAATCATTGATGCTTATGGTATCCGCACATCTCACAGGAGATATGTTCCGCGCAGCATGC
Consensus .....gTAAAGCAACCAANGCTGAAATAATTCATTGATGCTTATGGTATCCGCACATCTCACAGGAGATATGTTCCGCGCAGCATGC

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
adkCf   AAAACGAACAGCTTTGGCCGGAGCAAGTCTTATATGGATAAAGGTGATAGTTCTGATGAGTAAACAAATGGARTCGTGAAGAGCGACTAGCTGAACAGATACAGAGAAAGGCTTCTTATT
adkCr   AAAACGAACAGCTTTGGCCGGAGCAAGTCTTATATGGATAAAGGTGATAGTTCTGATGAGTAAACAAATGGARTCGTGAAGAGCGACTAGCTGAACAGATACAGAGAAAGGCTTCTTATT
Consensus AAAACGAACAGCTTTGGCCGGAGCAAGTCTTATATGGATAAAGGTGATAGTTCTGATGAGTAAACAAATGGARTCGTGAAGAGCGACTAGCTGAACAGATACAGAGAAAGGCTTCTTATT

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
adkCf   AGATGGCTTCCAGTACGCTAGATCAGCAAAAGCTTGGACGCAATGCTAARAGATTTGAATAAAAATTTGATGCTGTCTCATGATATCCATGTTGGTGAAGAAATCTGGTGAACGCTTAGCCGGC
adkCr   AGATGGCTTCCAGTACGCTAGATCAGCAAAAGCTTGGACGCAATGCTAARAGATTTGAATAAAAATTTGATGCTGTCTCATGATATCCATGTTGGTGAAGAAATCTGGTGAACGCTTAGCCGGC
Consensus AGATGGCTTCCAGTACGCTAGATCAGCAAAAGCTTGGACGCAATGCTAARAGATTTGAATAAAAATTTGATGCTGTCTCATGATATCCATGTTGGTGAAGAAATCTGGTGAACGCTTAGCCGGC

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
adkCf   CGATTTATCGACCAATTTGGAGCACTTACCATAAAATTTCAACCTACAAAGTTGAAAGCACATGTGATCGTTGCGGTGGCATGAATCTATCAAGAGAGATGATAAACCAGAGCGGTTA
adkCr   CGATTTATCGACCAATTTGGAGCACTTACCATAAAATTTCAACCTACAAAGTTGAAAGCACATGTGATCGTTGCGGTGGCATGAATCTATCAAGAGAGAGGA
Consensus CGATTTATCGACCAATTTGGAGCACTTACCATAAAATTTCAACCTACAAAGTTGAAAGCACATGTGATCGTTGCGGTGGCATGAATCTATCAAGAGaaAAGGA.....

521    530    540    550553
|-----|-----|-----|-----|
adkCf   AAAATCGTGGCAGATTACAAAAAANAANN
adkCr
Consensus .....

```

Cepa D

Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *atpA* de la cepa D.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
atpA-Df      AATGGARTGGTAGTG-TATCATTATCCTTGGGCGATTTCGAGTCCATTCTGTAAGGAGATAAAGTAAACGAACAGGAAGATCATGGAGTTCCA
atpA-D      NTTTTTCGGTTCATACGGATGGCACAARAATTAGAAATCAATGATGTAAGTATCATTATCCTTGG-CGATTTTCGAGTCCATTCTGTAAGGAGATAAAGTAAACGAACAGGAAGATCATGGAGTTCCA
Consensus    .....aAATCaAATGaTagaG.TATCATTATCCTTGG.CGATTTTCGAGTCCATTCTGTAAGGAGATAAAGTAAACGAACAGGAAGATCATGGAGTTCCA

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
atpA-Df      GTTGGAGAGCCCTTGATCGGACGGGTAGTAAATCCGCTAGGTCAGCCCAATCGACGGACTAGGTGAARATCGTTACTGACAAAGCTCGTCCAGTAGAAGCAATGGCACCAGGCGTTATGCARCGTAAATCTG
atpA-D      GTTGGAGAGCCCTTGATCGGACGGGTAGTAAATCCGCTAGGTCAGCCCAATCGACGGACTAGGTGAARATCGTTACTGACAAAGCTCGTCCAGTAGAAGCAATGGCACCAGGCGTTATGCARCGTAAATCTG
Consensus    GTTGGAGAGCCCTTGATCGGACGGGTAGTAAATCCGCTAGGTCAGCCCAATCGACGGACTAGGTGAARATCGTTACTGACAAAGCTCGTCCAGTAGAAGCAATGGCACCAGGCGTTATGCARCGTAAATCTG

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
atpA-Df      TTAACGAACCAATGCARAACAGGCTAAAGCAATCGACGCTCTGTACCAATCGACGGCGCCCAACGTGAATAGTATTCCGTTACCGTAACACAGGGAARCTTCTATTGCATCGATACGATCATCA
atpA-D      TTAACGAACCAATGCARAACAGGCTAAAGCAATCGACGCTCTGTACCAATCGACGGCGCCCAACGTGAATAGTATTCCGTTACCGTAACACAGGGAARCTTCTATTGCATCGATACGATCATCA
Consensus    TTAACGAACCAATGCARAACAGGCTAAAGCAATCGACGCTCTGTACCAATCGACGGCGCCCAACGTGAATAGTATTCCGTTACCGTAACACAGGGAARCTTCTATTGCATCGATACGATCATCA

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
atpA-Df      CCAAAAGGTCARAGATATGATCTGTATCTATGTAGCAATCGACCAAAAGATTCTACAGTTCGTACACAGTTGAACATTGAAAATATGGCCAAATGGATTACCAATCGTTGTGAATGC-CGGTGC
atpA-D      CCAAAAGGTCARAGATATGATCTGTATCTATGTAGCAATCGACCAAAAGATTCTACAGTTCGTACACAGTTGAACATTGAAAATATGGCCAAATGGATTACCAATCGTTGTGAATGC-CGGTGC
Consensus    CCAAAAGGTCARAGATATGATCTGTATCTATGTAGCAATCGACCAAAAGATTCTACAGTTCGTACACAGTTGAACATTGAAAATATGGCCAAATGGATTACCAATCGTTGTGAATGC-CGGTGC

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
atpA-Df      GTCTCAACACGCCCGTTCCTTATATCGCACCATATGCTGGTACTGCARATGGGTGAAGGATTCATGTACACAGGTAACATGCTTGGAT-CATTTTTGATGATCTTCAAAACAGCCGTGGCTTACGT
atpA-D      GTCTCAACACGCCCGTTCCTTATATCGCACCATATGCTGGTACTGCARATGGGTGAAGGATTCATGTACACAGGTAACATGCTTGGAT-CATTTTTGATGATCTTCAAAACAGCCGTGGCTTACGT
Consensus    GTCTCAACACGCCCGTTCCTTATATCGCACCATATGCTGGTACTGCARATGGGTGAAGGATTCATGTACACAGGTAACATGCTTGGAT-CATTTTTGATGATCTTCAAAACAGCCGTGGCTTACGT

651    660    670    680    690    700    710    720
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
atpA-Df      GGAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAARACACAGCAACACACCCCAACACACCC
atpA-D      GGAACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAARACACAGCAACACACCCCAACACACCC
Consensus    .....

```

Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *ddl* de la cepa D.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ddlDf      TTCCATTGACCAAGTATATTTACAGCTGCTGGTGTGCCGAGTTCCTTATGTAC
ddlDr      NNNTTTTTTTTTTGCAACCTNTAATACCTTATGTCGGCGAGGCGTATTGACCAAGTGCATGTGCCATGGATAAATCATGACCAAGTATATTTACAGCTGCTGGTGTGCCGAGTTCCTTATGTAC
Consensus    .....aaacaaTACCAAGTATATTTACAGCTGCTGGTGTGCCGAGTTCCTTATGTAC

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ddlDf      CAGTACTTAGAATCAATGGAAGAARATCTAAAARAGTATTGATCAATGTGARAGGTTCTTTGCTTTATCCGATGTTGTCAACCTGCGAATATGGGTTAGTGTCCGATTACAAAGGCAGAAA
ddlDr      CAGTACTTAGAATCAATGGAAGAARATCTAAAARAGTATTGATCAATGTGARAGGTTCTTTGCTTTATCCGATGTTGTCAACCTGCGAATATGGGTTAGTGTCCGATTACAAAGGCAGAAA
Consensus    CAGTACTTAGAATCAATGGAAGAARATCTAAAARAGTATTGATCAATGTGARAGGTTCTTTGCTTTATCCGATGTTGTCAACCTGCGAATATGGGTTAGTGTCCGATTACAAAGGCAGAAA

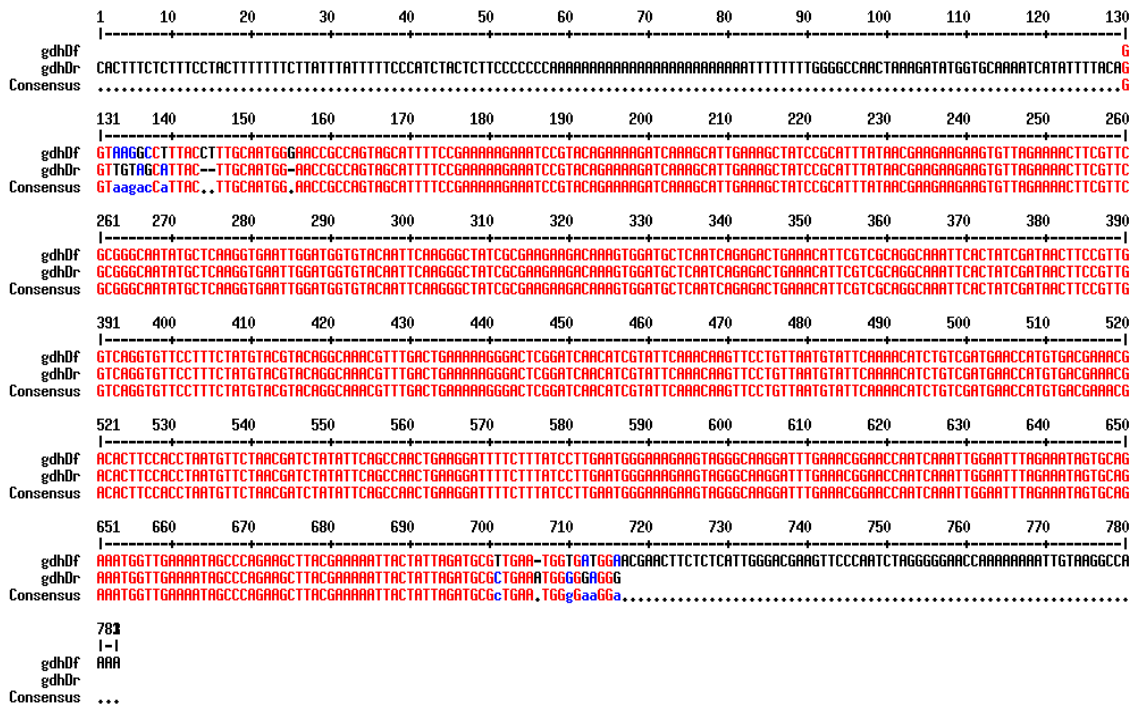
261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ddlDf      CCGAGAGAGCTGCAAAATGCTTTAGCAACAGCCTATCAGTATGATTCGAGCAATCGTTGACCAAGGATTTGAGCGCGCGAATCGAAGTTGCTGTATTAGGAATGARGAGTTCCGGACACTTTG
ddlDr      CCGAGAGAGCTGCAAAATGCTTTAGCAACAGCCTATCAGTATGATTCGAGCAATCGTTGACCAAGGATTTGAGCGCGCGAATCGAAGTTGCTGTATTAGGAATGARGAGTTCCGGACACTTTG
Consensus    CCGAGAGAGCTGCAAAATGCTTTAGCAACAGCCTATCAGTATGATTCGAGCAATCGTTGACCAAGGATTTGAGCGCGCGAATCGAAGTTGCTGTATTAGGAATGARGAGTTCCGGACACTTTG

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ddlDf      CCTGGTGAAGTCGTAAGAGACGTAGCATTCTATGATTATGAGCAAAATATATCATATAAATCGAATGCAGATCCAGCCGAGTGCCGAGAGTTTATCAAAAGCGCAA-GAGTACCGAAG
ddlDr      CCTGGTGAAGTCGTAAGAGACGTAGCATTCTATGATTATGAGCAAAATATATCATATAAATCGAATGCAGATCCAGCCGAGTGCCGAGAGTTTATCAAAAGCGCAA-GAGTACCGAAG
Consensus    CCTGGTGAAGTCGTAAGAGACGTAGCATTCTATGATTATGAGCAAAATATATCATATAAATCGAATGCAGATCCAGCCGAGTGCCGAGAGTTTATCAAAAGCGCAA-GAGTACCGAAG

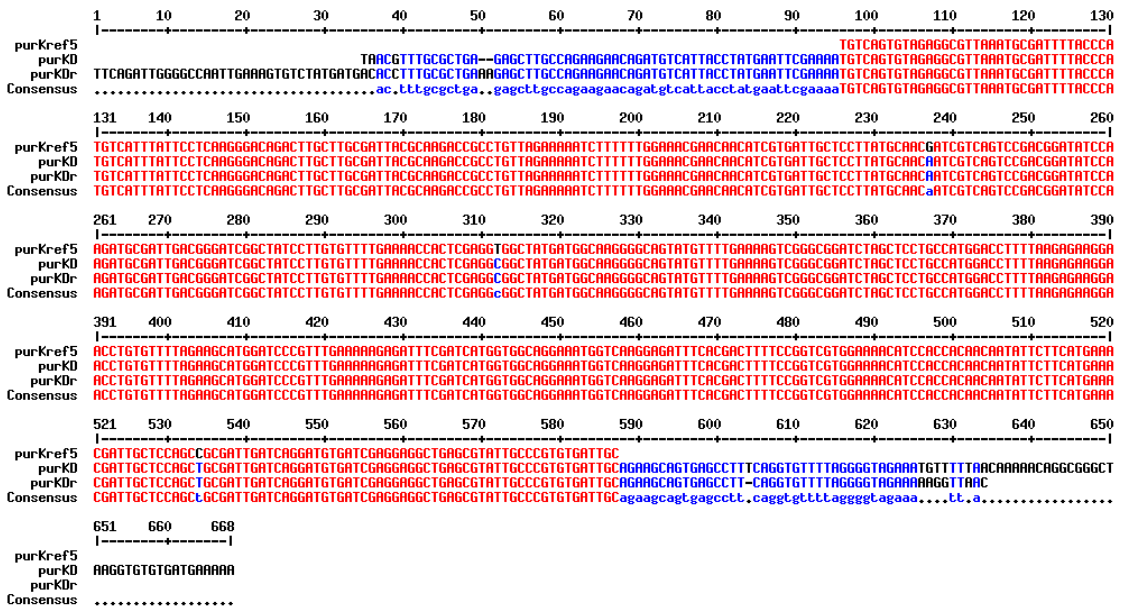
521    530    540    550    560    570    580    585
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ddlDf      TTAGCTTACACGATGTAGGCGGAGTGGATTGAGCCGCTCTTTCTTTTAAAAAAAAAANN
ddlDr      AAGGTTTG
Consensus    aaaGcTTa.....

```

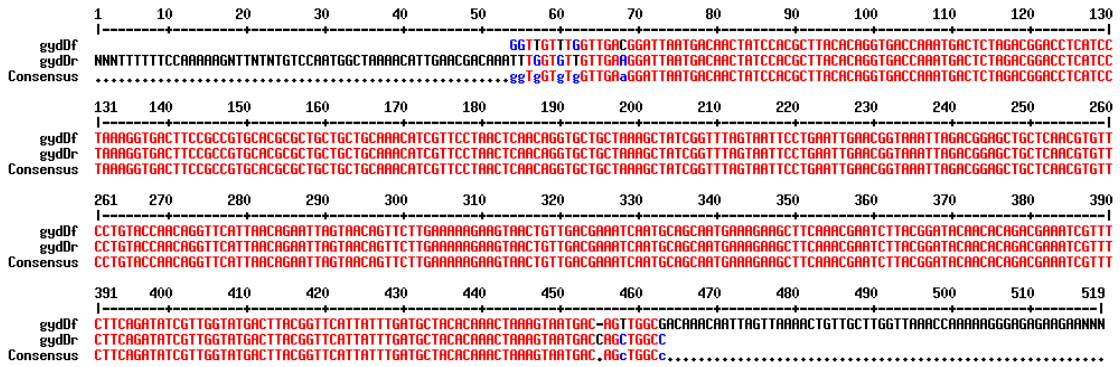
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gdh* de la cepa D.



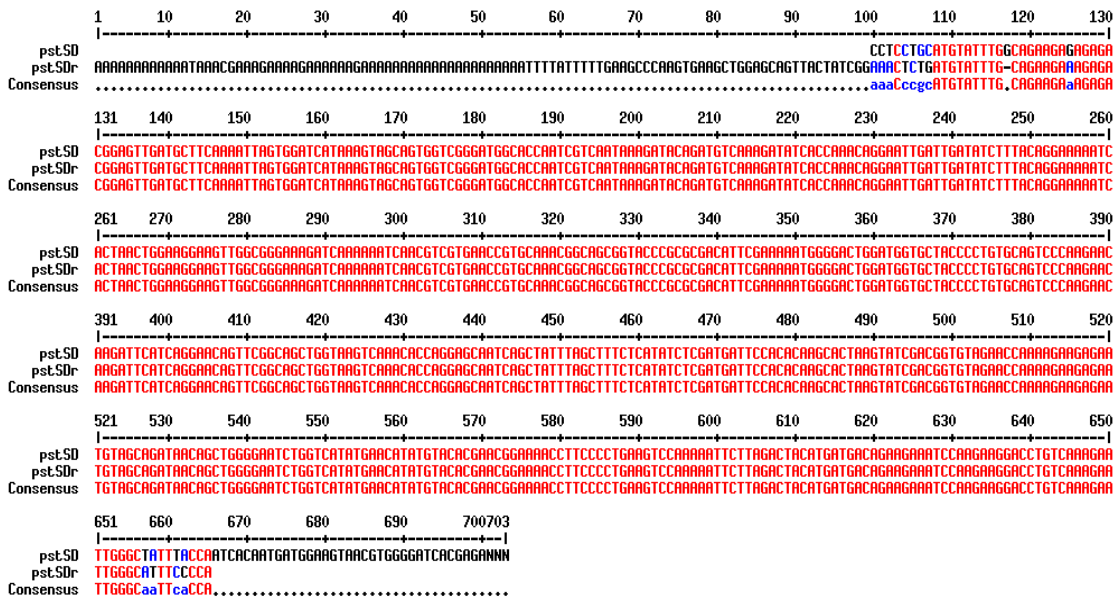
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *purK* de la cepa D.



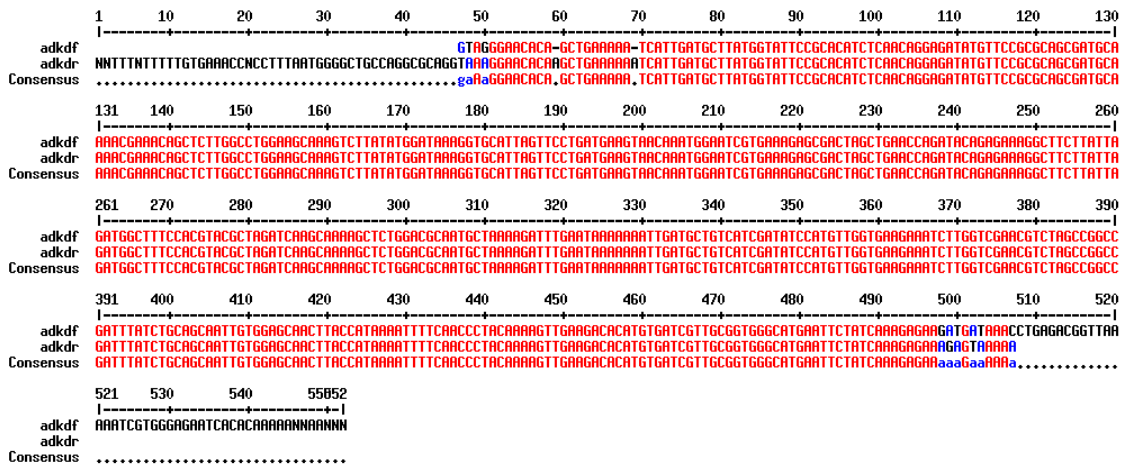
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gyd* de la cepa D.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *pstS* de la cepa D.

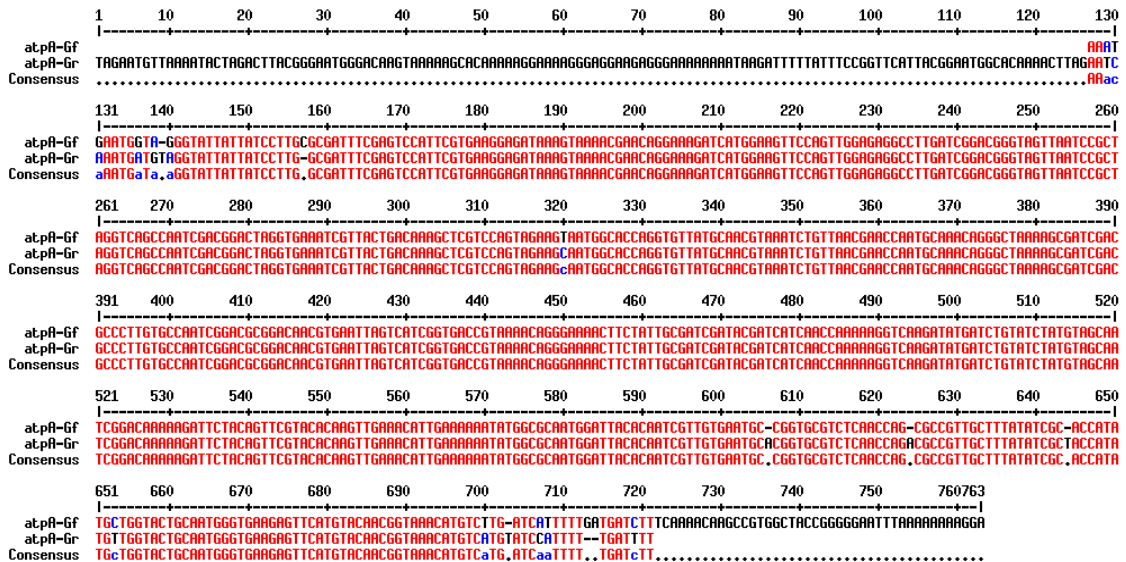


Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *adk* de la cepa D.

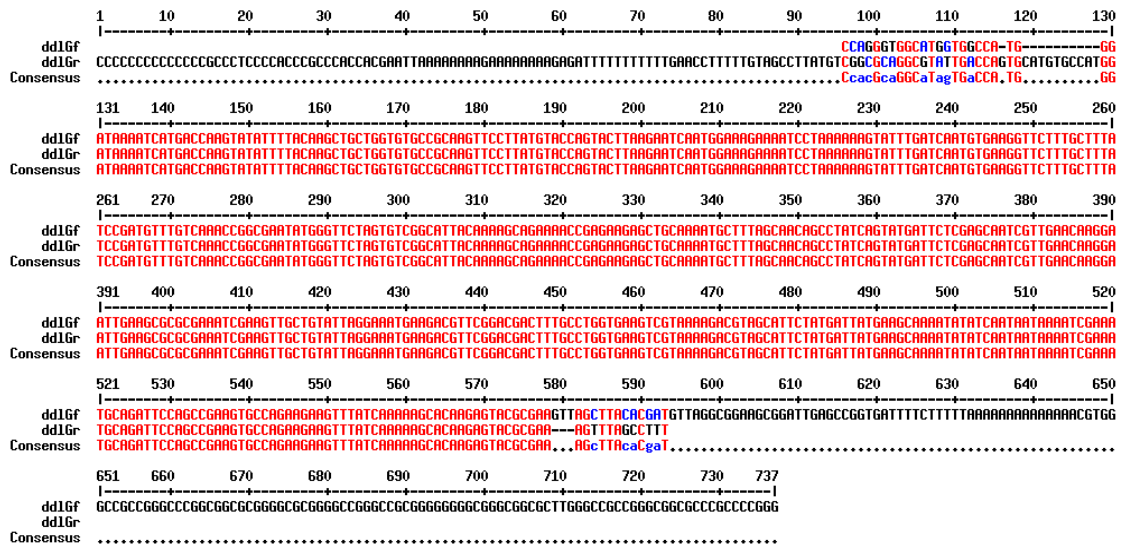


Cepa G

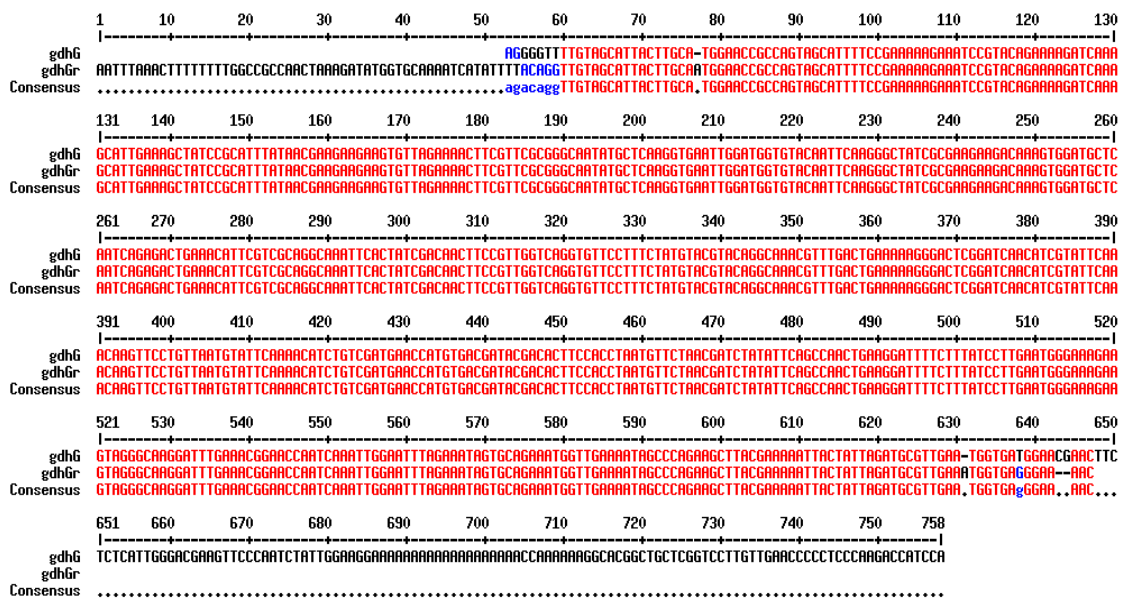
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *atpA* de la cepa G.



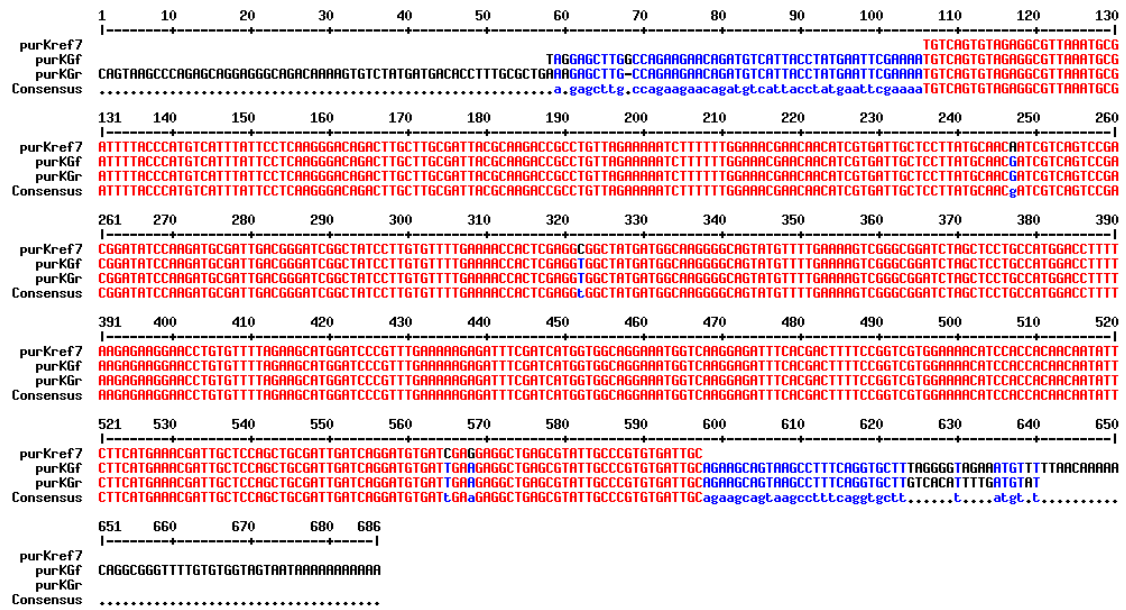
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *ddl* de la cepa G.



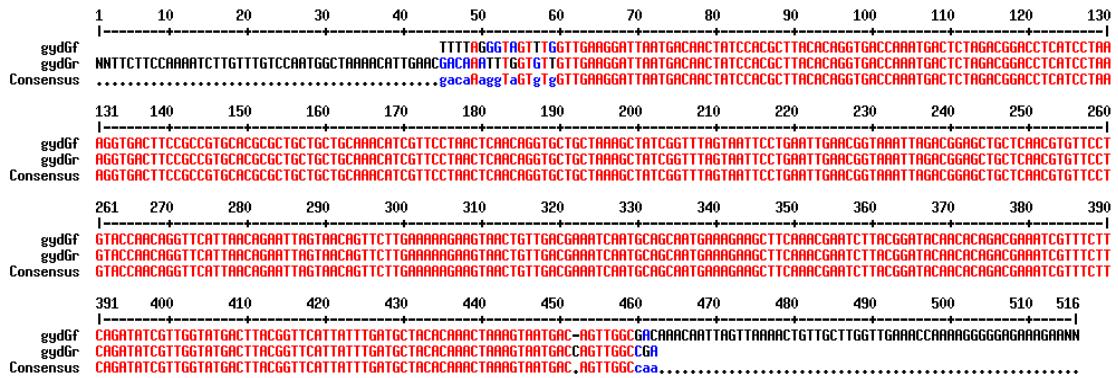
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gdh* de la cepa G.



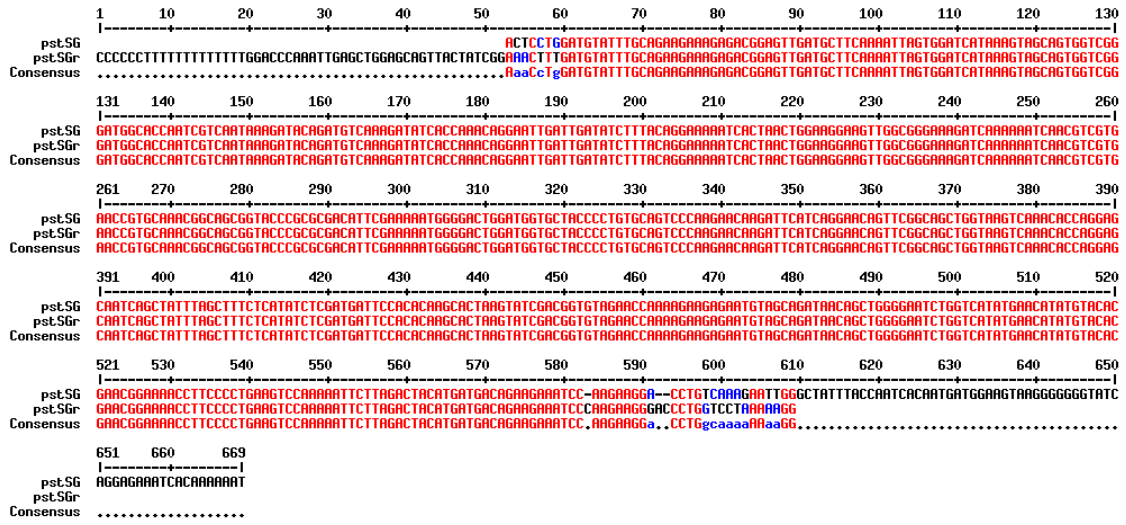
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *purK* de la cepa G.



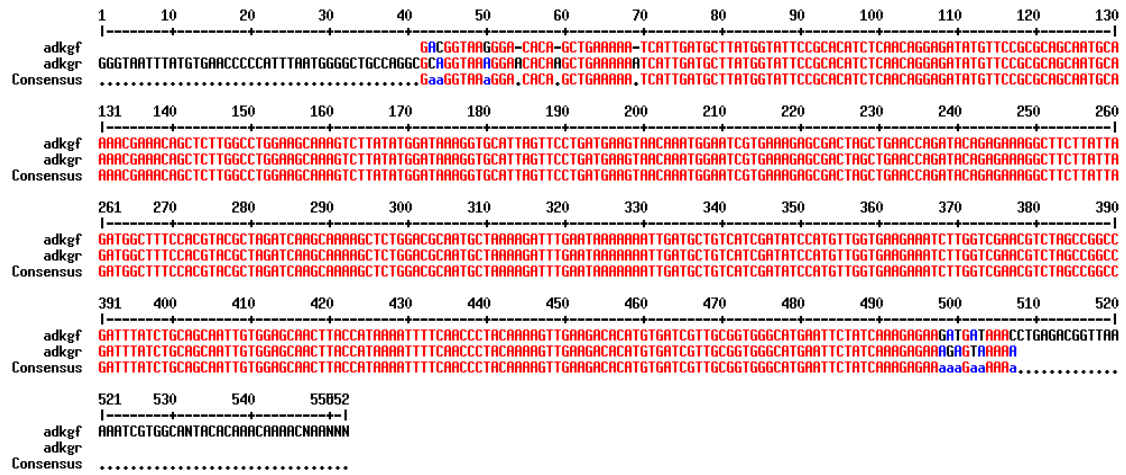
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gyd* de la cepa G.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *pstS* de la cepa G.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *adk* de la cepa G.



Cepa QD-2

Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *atpA* de la cepa QD-2.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
at.pA-D2      TTTGTTATTTTTGTTGAAAGGGAAAAAAGTTAGAAATCAAATGGAAAAAATGGGGGTTTGGGTTTTTAAAGTAAATTTCTTTACCGGTCATTACGGATGGCACAACCTTGGGACAAATGGAT
at.pA-D2r      ..aGaGaCAAAgGAT
Consensus      ..aGaGaCAAAgGAT

131     140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
at.pA-D2      GTAAATGATCATTATCCCTTGCGGATTCGAGTCATTCCAGAGGAGATAAAGTAAACGACAGGTCAGATCATGGTAAGTCCAGTTGGAGAGCCTTGATCGGTCGGTAGTCATCCGCTAGGTC
at.pA-D2r      GTAAATGATCATTATCCCTTGCGGATTCGAGTCATTCCAGAGGAGATAAAGTAAACGACAGGTCAGATCATGGTAAGTCCAGTTGGAGAGCCTTGATCGGTCGGTAGTCATCCGCTAGGTC
Consensus      GTAAATGATCATTATCCCTTGCGGATTCGAGTCATTCCAGAGGAGATAAAGTAAACGACAGGTCAGATCATGGTAAGTCCAGTTGGAGAGCCTTGATCGGTCGGTAGTCATCCGCTAGGTC

261     270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
at.pA-D2      ACCAATCGACGGACTAGGTGAATCGTTACTGACAAAGCTCGTCCAGTAGAATGATGGCACCAGGTTATGCAACGTAATCTGTTAACGACCAATGCAACAGGGCTAAAGCGATCGACGCCCTT
at.pA-D2r      ACCAATCGACGGACTAGGTGAATCGTTACTGACAAAGCTCGTCCAGTAGAATGATGGCACCAGGTTATGCAACGTAATCTGTTAACGACCAATGCAACAGGGCTAAAGCGATCGACGCCCTT
Consensus      ACCAATCGACGGACTAGGTGAATCGTTACTGACAAAGCTCGTCCAGTAGAATGATGGCACCAGGTTATGCAACGTAATCTGTTAACGACCAATGCAACAGGGCTAAAGCGATCGACGCCCTT

391     400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
at.pA-D2      GTGCAATCGGACGCGGACACACGTAATAGTATCATCGGTGACCTAAACAGGGAAACCTTCTATGCGATCGATCATCATCAACCAAAAGGTCAGATATGATCTGATCTATGACATCGGAC
at.pA-D2r      GTGCAATCGGACGCGGACACACGTAATAGTATCATCGGTGACCTAAACAGGGAAACCTTCTATGCGATCGATCATCATCAACCAAAAGGTCAGATATGATCTGATCTATGACATCGGAC
Consensus      GTGCAATCGGACGCGGACACACGTAATAGTATCATCGGTGACCTAAACAGGGAAACCTTCTATGCGATCGATCATCATCAACCAAAAGGTCAGATATGATCTGATCTATGACATCGGAC

521     530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
at.pA-D2      AAAAGATCTACAGTTCGTACACAGTTGAACATTTGAAAAATATGGCG-CA-ATGGATTACACATCG-TTGTGATGCC-GGTGCGTCCACCGCA-CCATTACTTTATATCGAC-CATATGC
at.pA-D2r      AAAAGATCTACAGTTCGTACACAGTTGAACATTTGAAAAATATGGCG,CA,ATGGATeACACATCG,TTGTGATGCa,GGTGAgtTCaCCAGCA,CCATTACTTTATATCGAC,CATAcGc
Consensus      AAAAGATCTACAGTTCGTACACAGTTGAACATTTGAAAAATATGGCG,CA,ATGGATeACACATCG,TTGTGATGCa,GGTGAgtTCaCCAGCA,CCATTACTTTATATCGAC,CATAcGc

651     660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    76962
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
at.pA-D2      TGGTACTGCATGGGTGAGAAATCATGTACAA-CGGTAAC--ATGTATGAT-CATTTTGTATGATCTTTCARAAACAGCCGGCTACCTGGTGAACCTTAAAAAGNN
at.pA-D2r      TGGTAcGCATCGGTGAGAAATCATGTACAA,CGGTAAC,.ATGTATgGaT,CATAcTcaGaaGaTaaag.....
Consensus      TGGTAcGCATCGGTGAGAAATCATGTACAA,CGGTAAC,.ATGTATgGaT,CATAcTcaGaaGaTaaag.....

```

Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *ddl* de la cepa QD-2.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
dd1D2f      NNNTTTTTTTTGAACACCTTATAAATCCTTATGTGCGGCGAGGCGTATTGACAGTGCATGTGCCATGAAATGAAATCATGACCAAGTATAATTTTACAGCTGCTGGTGTGCCGAGTTCCTTATGTACC
dd1D2r      ..gaaAaCAaaccAaaT...TTTACAGCTGCTGGTGTGCCGAGTTCCTTATGTACC
Consensus      ..gaaAaCAaaccAaaT...TTTACAGCTGCTGGTGTGCCGAGTTCCTTATGTACC

131     140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
dd1D2f      AGTACTTAGAATCAATGGAAAGAAATCCTAAAAAGTATTTGATCAATGTGAGGTTCTTGTCTTATCCGATGTTTGTCAACCTGCGAATATGGGTTCTAGTGTCCGATTACAAAGGCAGAAAC
dd1D2r      AGTACTTAGAATCAATGGAAAGAAATCCTAAAAAGTATTTGATCAATGTGAGGTTCTTGTCTTATCCGATGTTTGTCAACCTGCGAATATGGGTTCTAGTGTCCGATTACAAAGGCAGAAAC
Consensus      AGTACTTAGAATCAATGGAAAGAAATCCTAAAAAGTATTTGATCAATGTGAGGTTCTTGTCTTATCCGATGTTTGTCAACCTGCGAATATGGGTTCTAGTGTCCGATTACAAAGGCAGAAAC

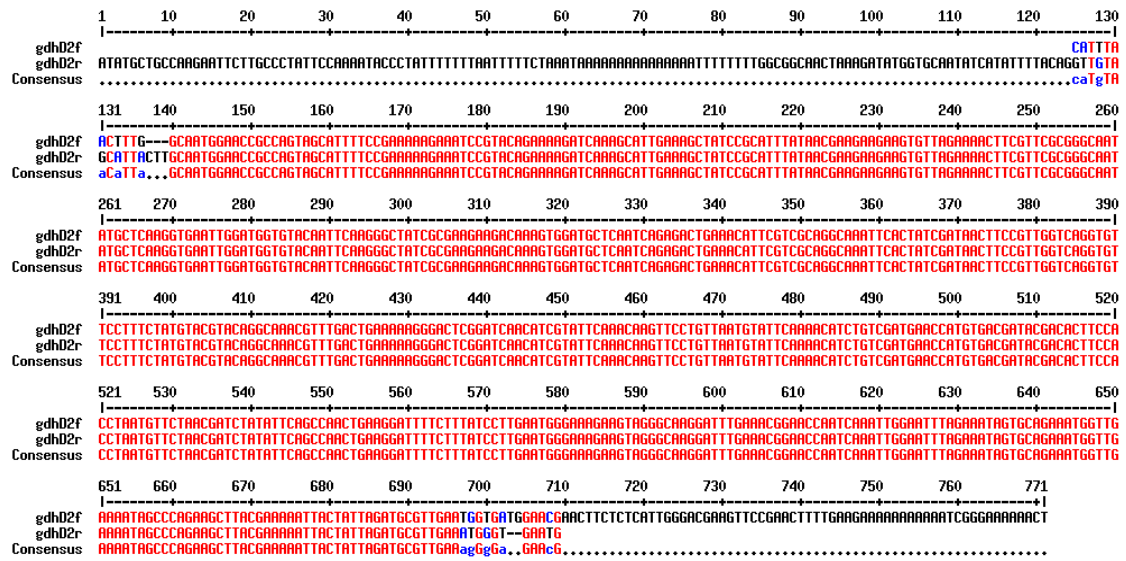
261     270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
dd1D2f      CGAGAGAGCTGCAAAATGCTTTAGCAACGCTTACGATGATTTCTGAGCAATCGTTGACACAGGATTTGAGCGCGCGAAATCGAGTTGCTGTATTAGGAATGAGATGTTCCGACGACTTTTGC
dd1D2r      CGAGAGAGCTGCAAAATGCTTTAGCAACGCTTACGATGATTTCTGAGCAATCGTTGACACAGGATTTGAGCGCGCGAAATCGAGTTGCTGTATTAGGAATGAGATGTTCCGACGACTTTTGC
Consensus      CGAGAGAGCTGCAAAATGCTTTAGCAACGCTTACGATGATTTCTGAGCAATCGTTGACACAGGATTTGAGCGCGCGAAATCGAGTTGCTGTATTAGGAATGAGATGTTCCGACGACTTTTGC

391     400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
dd1D2f      CTGGCAGATCGTAAAGAGCTAGCATTCTATGATTATGAGCCAAATATATCAATAAATAAATCGAATGCGATTCAGCCGAGTGCAGAGAG- GTTTATCAAAAAGCCAGAGTACCGGAGT
dd1D2r      CTGGCAGATCGTAAAGAGCTAGCATTCTATGATTATGAGCCAAATATATCAATAAATAAATCGAATGCGATTCAGCCGAGTGCAGAGAGAGTTTATCGAAA-TACA
Consensus      CTGGCAGATCGTAAAGAGCTAGCATTCTATGATTATGAGCCAAATATATCAATAAATAAATCGAATGCGATTCAGCCGAGTGCAGAGAG, GTTTATCAAAA,caCA.....

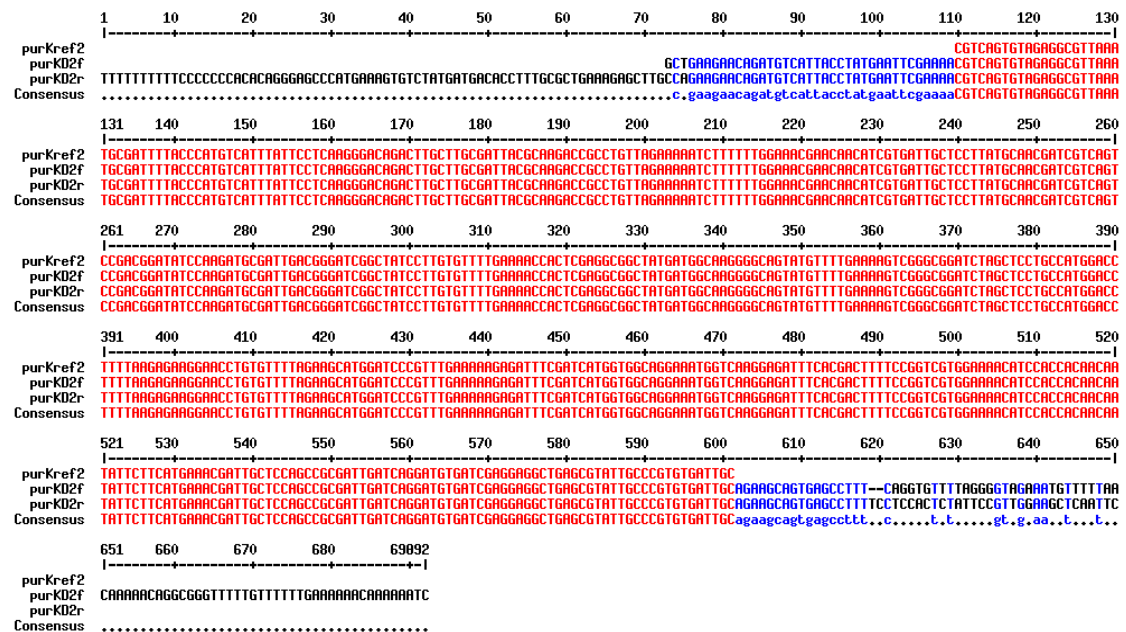
521     530    540    550    560    570    580    588
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
dd1D2f      TAGCTTACACGATGTTAGGTGGAGCGGATTTAGCGGGTATTCTTTTTTAAAAAANNN
dd1D2r      ..
Consensus      ..

```

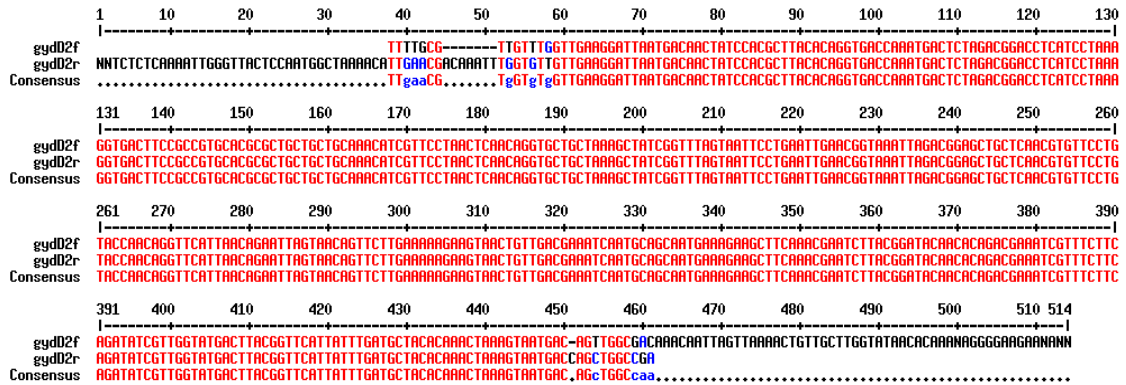
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gdh* de la cepa QD-2.



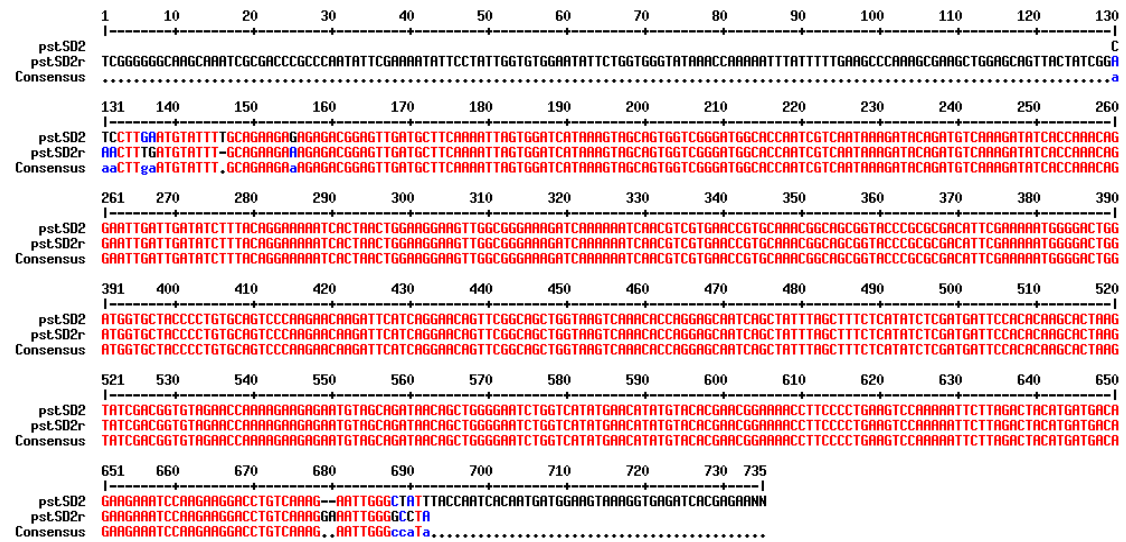
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *purK* de la cepa QD-2.



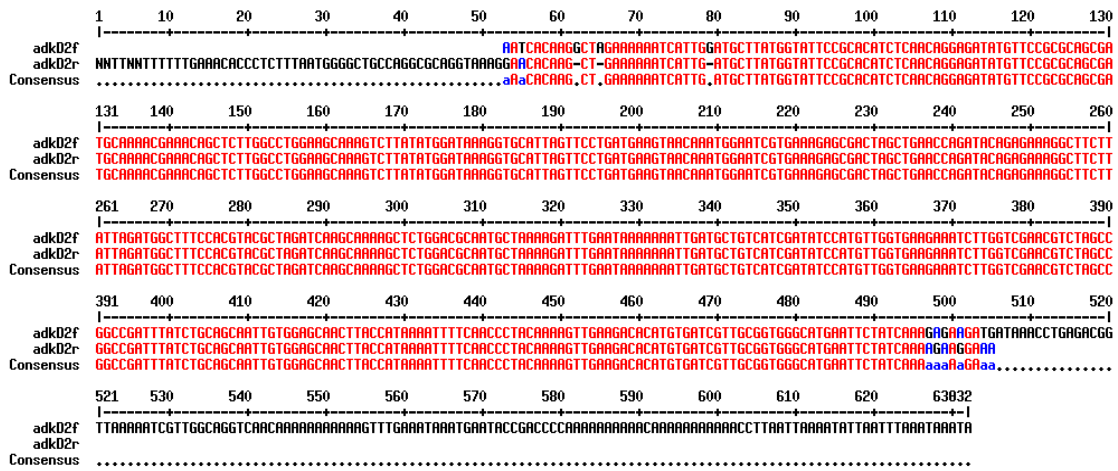
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gyd* de la cepa QD-2.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *pstS* de la cepa QD-2.

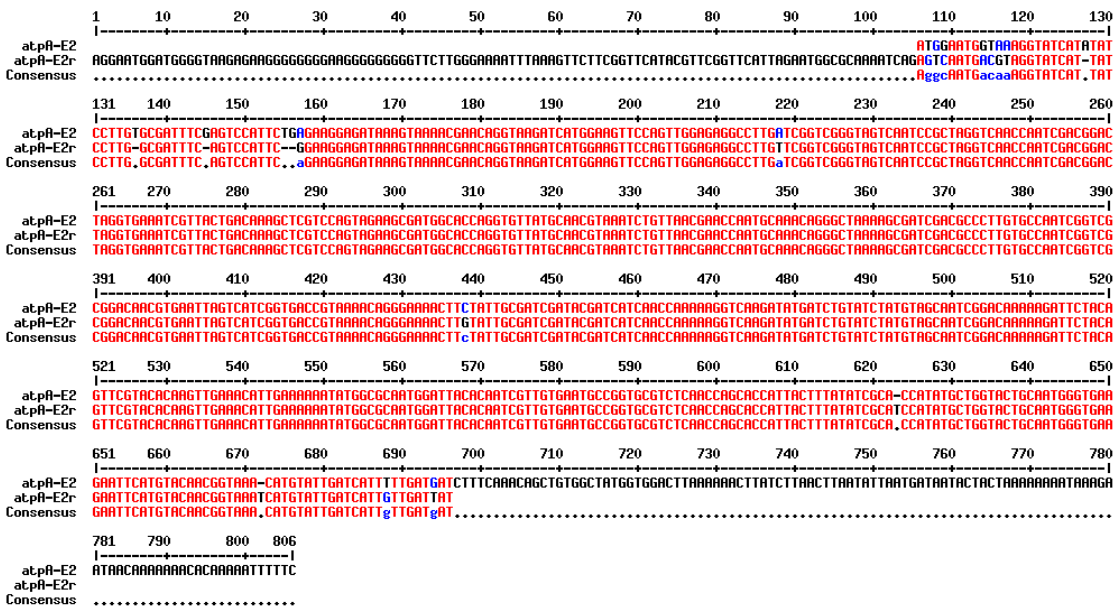


Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *adk* de la cepa QD-2.

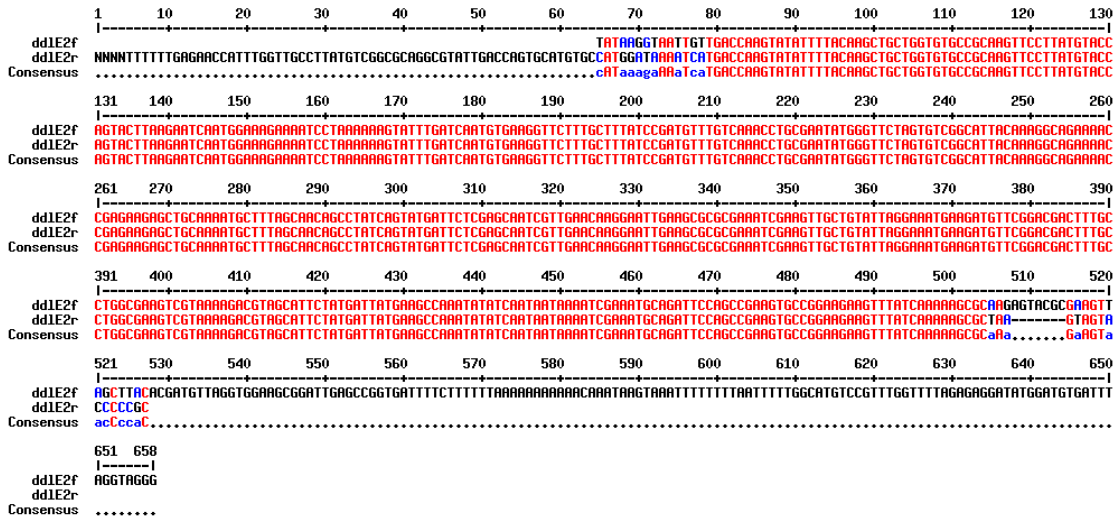


Cepa QE-2

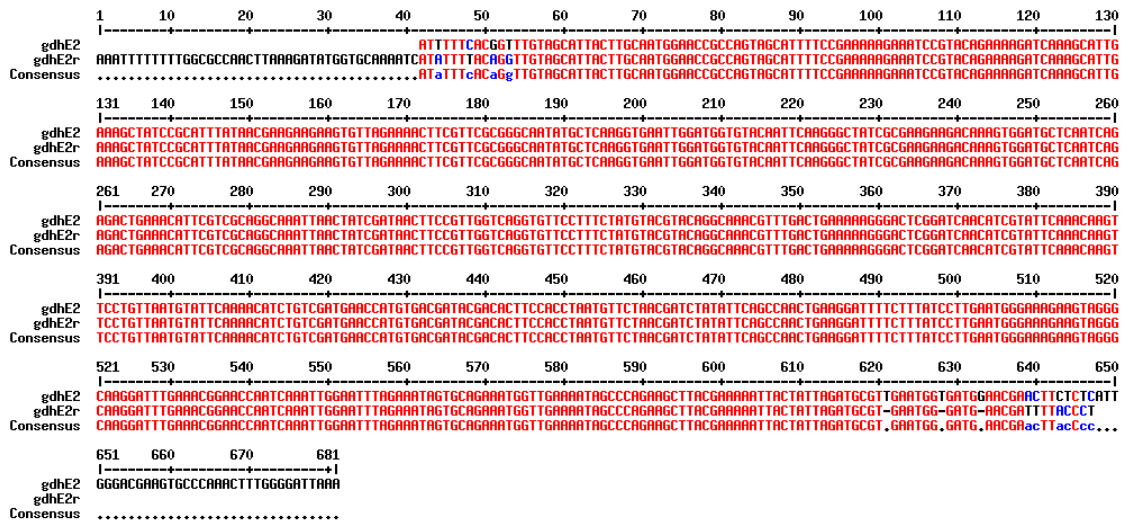
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *atpA* de la cepa QE-2.



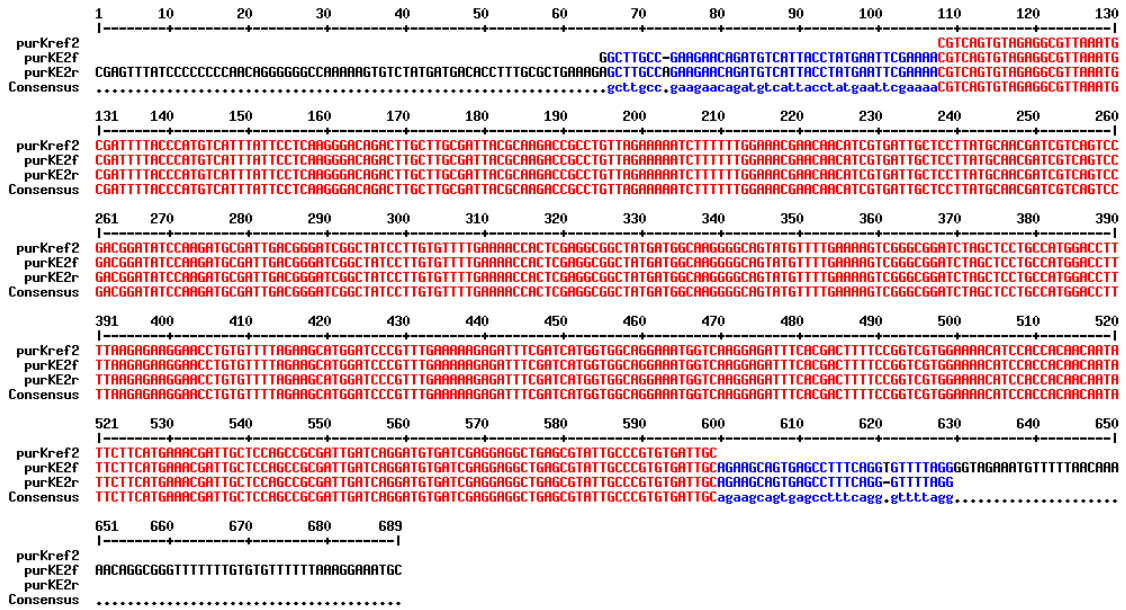
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *ddl* de la cepa QE-2.



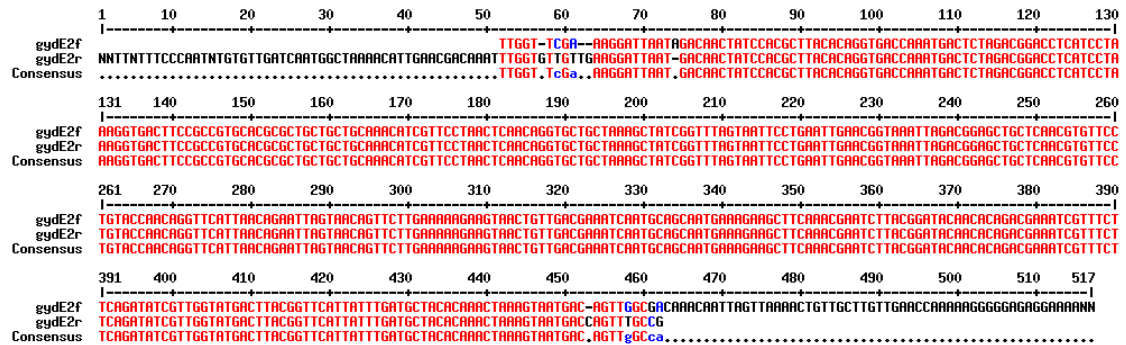
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gdh* de la cepa QE-2.



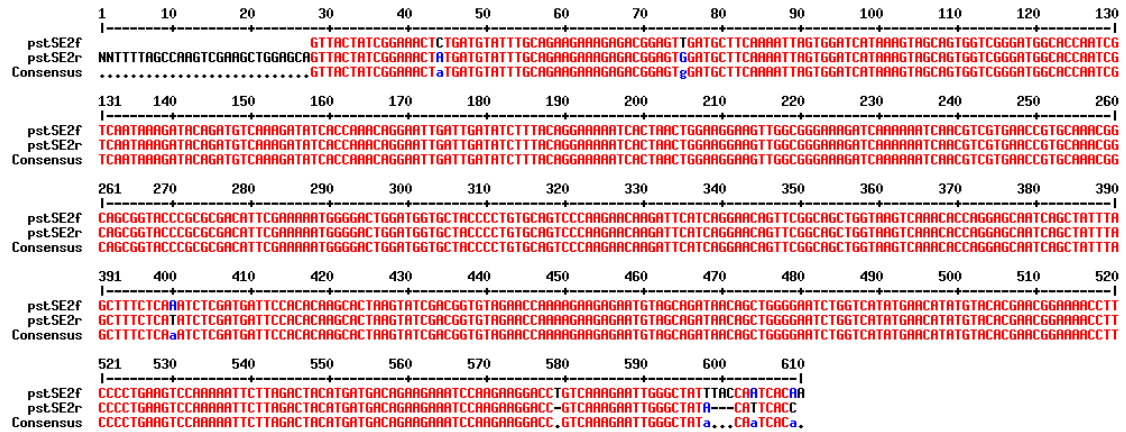
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *purK* de la cepa QE-2.



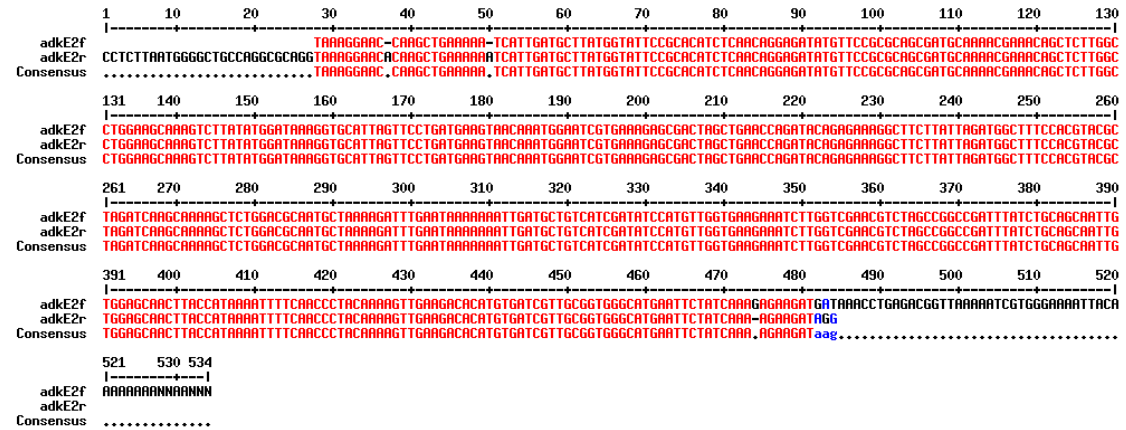
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gyd* de la cepa QE-2.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *pstS* de la cepa QE-2.

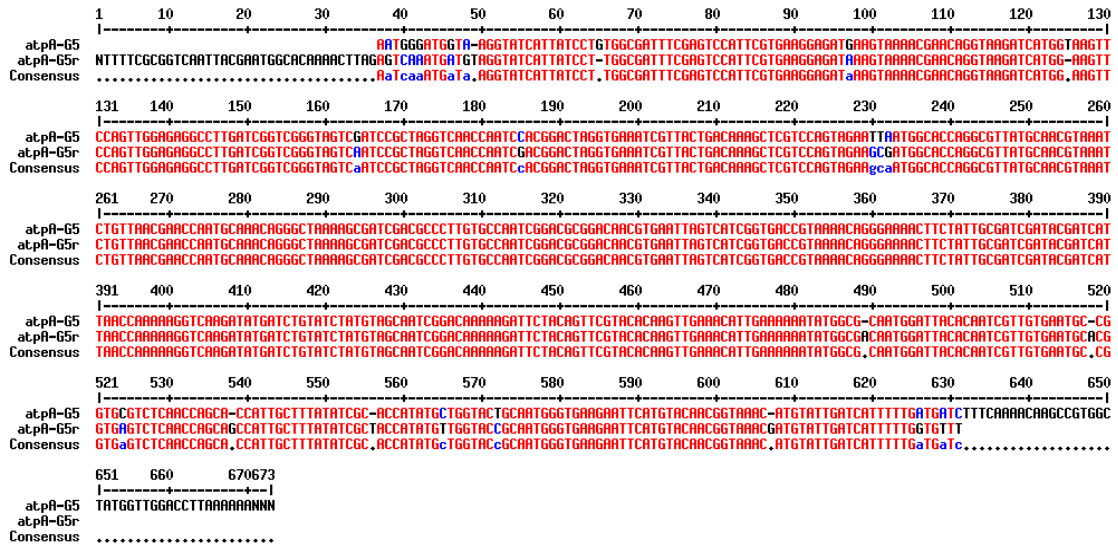


Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *adk* de la cepa QE-2.

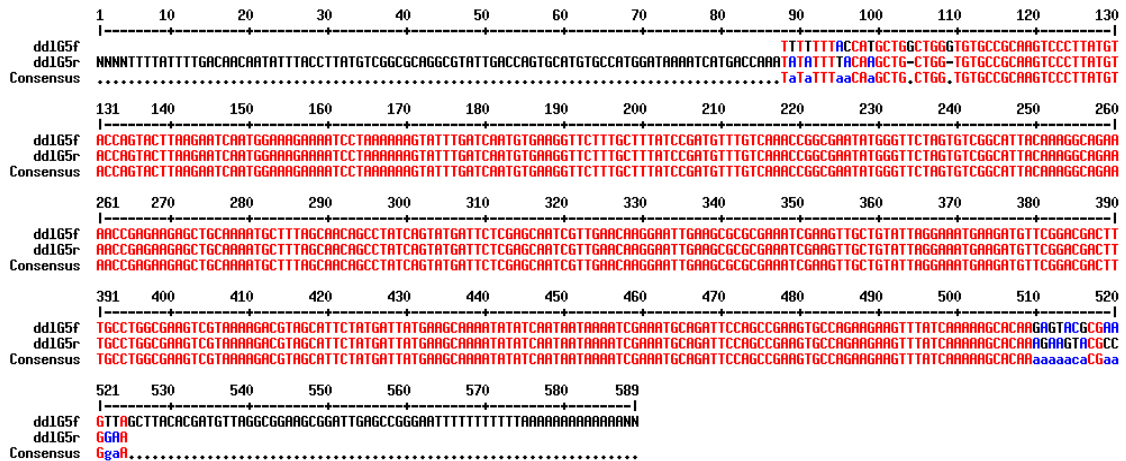


Cepa QG-5

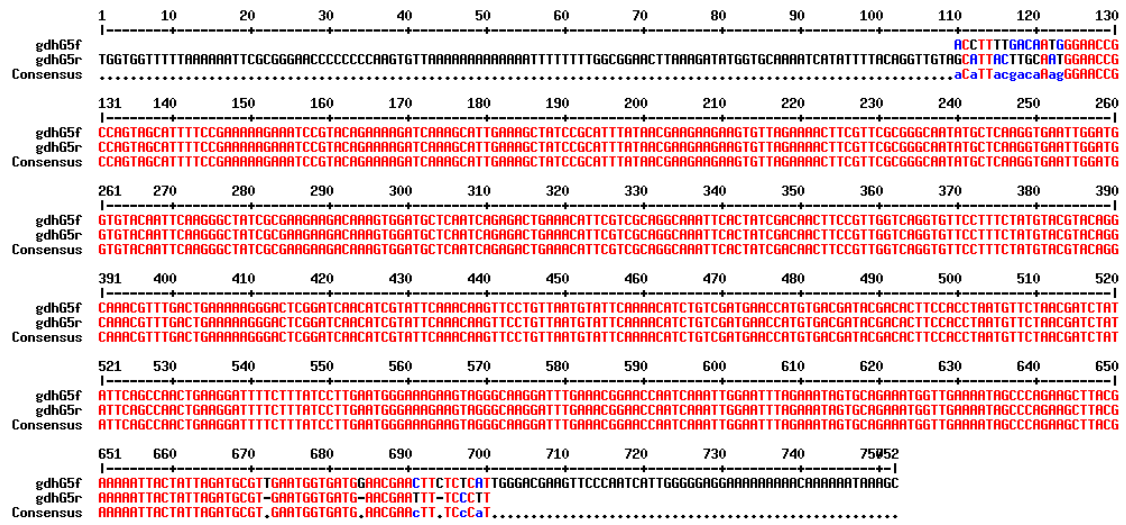
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *atpA* de la cepa QG-5.



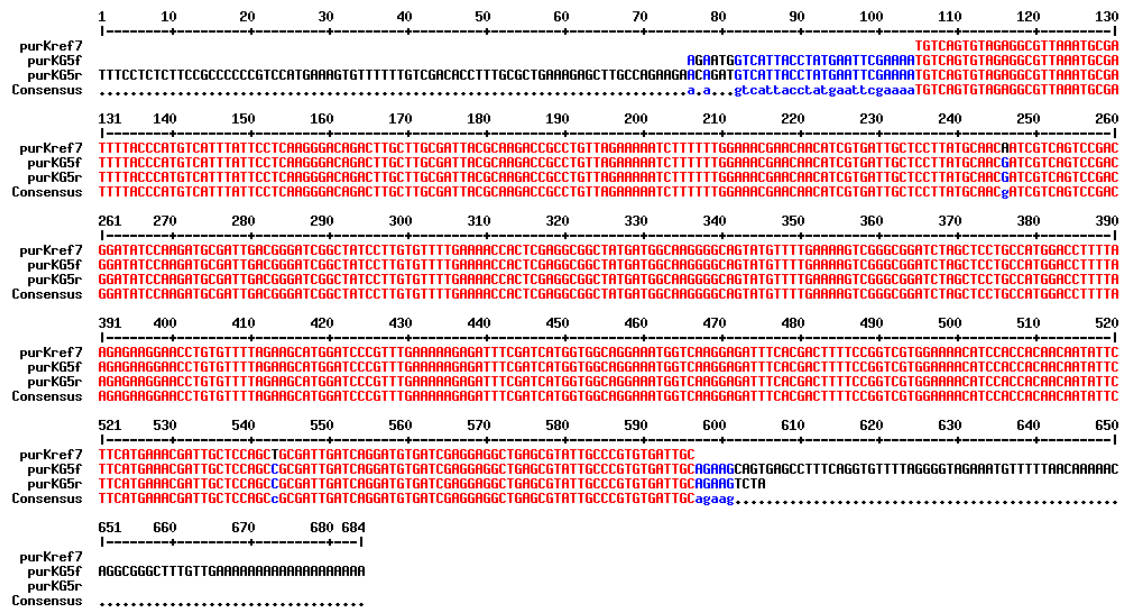
Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *ddl* de la cepa QG-5.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gdh* de la cepa QG-5.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *purK* de la cepa QG-5.



Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *gyd* de la cepa QG-5.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
gyd65f  TTATAGAGTAGTTGGT-----TGARAGATTAAAGCAACTATCCAGCTTACACAGGTGACCAATGACTCTAGACGGACCTCATCT
gyd65r  NNTTCTCTCCARCAAGNTGTTTAGTCCATGGCTAAACATGGACGACAAATTTGGTGGTGGTGGARAGATTAAAGCAACTATCCAGCTTACACAGGTGACCAATGACTCTAGACGGACCTCATCT
Consensus  .....TgAaGAcAaAaTTTGGT.....TGARAGATTAAAGCAACTATCCAGCTTACACAGGTGACCAATGACTCTAGACGGACCTCATCT

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
gyd65f  AARAGTGACTTCGCGCGTGCACGCGTGTCTGCARACATCGTTCTTACTCARCAGGTGCTGCTAARAGTATCGGTTTAGTAAATCCTGAATGACCGGTAATTAGACGGAGCTGCACAGCTGTT
gyd65r  AARAGTGACTTCGCGCGTGCACGCGTGTCTGCARACATCGTTCTTACTCARCAGGTGCTGCTAARAGTATCGGTTTAGTAAATCCTGAATGACCGGTAATTAGACGGAGCTGCACAGCTGTT
Consensus  .....AARAGTGACTTCGCGCGTGCACGCGTGTCTGCARACATCGTTCTTACTCARCAGGTGCTGCTAARAGTATCGGTTTAGTAAATCCTGAATGACCGGTAATTAGACGGAGCTGCACAGCTGTT

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
gyd65f  CTGTACCACAGGTCATTACAGAATTAGTACAGTCTTGAARAGAGTACTGTTGACGAATCAATGCAGCAATGAAGAGCTTCAACCAATCTACGGATACACACAGCAGAAATCGTTTC
gyd65r  CTGTACCACAGGTCATTACAGAATTAGTACAGTCTTGAARAGAGTACTGTTGACGAATCAATGCAGCAATGAAGAGCTTCAACCAATCTACGGATACACACAGCAGAAATCGTTTC
Consensus  .....CTGTACCACAGGTCATTACAGAATTAGTACAGTCTTGAARAGAGTACTGTTGACGAATCAATGCAGCAATGAAGAGCTTCAACCAATCTACGGATACACACAGCAGAAATCGTTTC

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
gyd65f  TTCAGATATCGTTGGTATGACTACGGTTCATTATTGATGCTACACAACTAAGTATGACGCTGGCCACAAACATTAAGTTAAACCTGTTGCTGGTTGACCCCAAGGGGGGAAAAA
gyd65r  TTCAGATATCGTTGGTATGACTACGGTTCATTATTGATGCTACACAACTAAGTATGACGCTGGCCACAAACATTAAGTTAAACCTGTTGCTGGTTGACCCCAAGGGGGGAAAAA
Consensus  .....TTCAGATATCGTTGGTATGACTACGGTTCATTATTGATGCTACACAACTAAGTATGACGCTGGCCACAAACATTAAGTTAAACCTGTTGCTGGTTGACCCCAAGGGGGGAAAAA

521    530    540    550    560    570    580    590    598    592
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
gyd65f  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
gyd65r  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
Consensus  .....AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *pstS* de la cepa QG-5.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pstS65 ACCTCTGATGATTTTGC
pstS65r CTTTAAATGGARGGTAACGTGGTGTATTGTTGGGGGAGGAGGGGAAAAAATTTTAAATTTTAAACCAATTGAGCTGGAGCAGTTACTATCGGAACCTCTGATGATTTTGC
Consensus  .....AAAAACCGaATGATTTTGC

131    140    150    160    170    180    190    200    210    220    230    240    250    260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pstS65  AGAGAGAGAGACGGAGTTGATGCTCAAAATAGTGGATCATAGAGTACGAGTGGTGGGATGGCACCARTCGTCAATAAGATACAGATGCAAGATATACCAACACAGGATTGATTGATATCTTT
pstS65r  AGAGAGAGAGACGGAGTTGATGCTCAAAATAGTGGATCATAGAGTACGAGTGGTGGGATGGCACCARTCGTCAATAAGATACAGATGCAAGATATACCAACACAGGATTGATTGATATCTTT
Consensus  .....AGAGAGAGAGACGGAGTTGATGCTCAAAATAGTGGATCATAGAGTACGAGTGGTGGGATGGCACCARTCGTCAATAAGATACAGATGCAAGATATACCAACACAGGATTGATTGATATCTTT

261    270    280    290    300    310    320    330    340    350    360    370    380    390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pstS65  ACAGAAAAATCCTACTTGGAGGAGTTGGCGGAAAGATCAAAAAATCAGCTCGTGAACCGTGCARACGGCAGCGGTACCCGCGCAGATTGAAAAATGGGGACTGGATGGTGTACCCCTGTGC
pstS65r  ACAGAAAAATCCTACTTGGAGGAGTTGGCGGAAAGATCAAAAAATCAGCTCGTGAACCGTGCARACGGCAGCGGTACCCGCGCAGATTGAAAAATGGGGACTGGATGGTGTACCCCTGTGC
Consensus  .....ACAGAAAAATCCTACTTGGAGGAGTTGGCGGAAAGATCAAAAAATCAGCTCGTGAACCGTGCARACGGCAGCGGTACCCGCGCAGATTGAAAAATGGGGACTGGATGGTGTACCCCTGTGC

391    400    410    420    430    440    450    460    470    480    490    500    510    520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pstS65  AGTCCCAAGACAGATTCTACGGACAGTTCGGCAGCTGGTARGTCARACACAGGAGCARTAGCTATTAGCTTTCTCATATCTCGATGATCCACACAGCCTTAGTATCGACGGTGTAGARCC
pstS65r  AGTCCCAAGACAGATTCTACGGACAGTTCGGCAGCTGGTARGTCARACACAGGAGCARTAGCTATTAGCTTTCTCATATCTCGATGATCCACACAGCCTTAGTATCGACGGTGTAGARCC
Consensus  .....AGTCCCAAGACAGATTCTACGGACAGTTCGGCAGCTGGTARGTCARACACAGGAGCARTAGCTATTAGCTTTCTCATATCTCGATGATCCACACAGCCTTAGTATCGACGGTGTAGARCC

521    530    540    550    560    570    580    590    600    610    620    630    640    650
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pstS65  AAAAGAGAGAAATGACAGATACAGCTGGGAAATCTGGTATGACATATGACACATATGACACAGCAGGAAACCTCCCTGAGTCCAAAATCTTAGACTACATGATGACAGAGAAATCCAGAGAGGA
pstS65r  AAAAGAGAGAAATGACAGATACAGCTGGGAAATCTGGTATGACATATGACACATATGACACAGCAGGAAACCTCCCTGAGTCCAAAATCTTAGACTACATGATGACAGAGAAATCCAGAGAGGA
Consensus  .....AAAAGAGAGAAATGACAGATACAGCTGGGAAATCTGGTATGACATATGACACATATGACACAGCAGGAAACCTCCCTGAGTCCAAAATCTTAGACTACATGATGACAGAGAAATCCAGAGAGGA

651    660    670    680    690    700    710    720    730    740    750    760    770
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
pstS65  CCTGTCAAGAAATGGGCATATACCAATCACAAATGATGGAAGTAAAGGTGAATCAGGAGAACCTCAAAATGCTATTTCGAAAAACCCATCTTCTCATGGGGCCACGGGGCAAC
pstS65r  CCTGTCAAGAAATGGGCCTATACCA
Consensus  .....CCTGTCAAGAAATGGGCATATACCA

```

Alineamiento de las secuencias (directa e inversa) del gen *adk* de la cepa QG-5.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
adk65f  GCGTTA--GGAC-CAGCTGAAAAA-TCATTGATGCTTATGGTATCCGCACATCTCACAGGAGATATGTTCCGCGCAGCARTGCA
adk65r  GGTTCTTTTAAAGGGAAACCCATTTAATGGGGTCCAGGCGCAGGTAAAGGAACACAGCTGAAAAATCATTGATGCTTATGGTATCCGCACATCTCACAGGAGATATGTTCCGCGCAGCARTGCA
Consensus .....GCaGgTA..GGaAC,CAGCTGAAAAA,TCATTGATGCTTATGGTATCCGCACATCTCACAGGAGATATGTTCCGCGCAGCARTGCA

131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
adk65f  AAACGAACAGCTCTTGGCTGGAGCAAGCTCTTATATGGATAAAGGTGCATTAGTTCCTGATGAGTAAACAATGGATCGTGAAGAGCGACTAGCTGACCAGATACAGAGAAGGGCTCTTATTA
adk65r  AAACGAACAGCTCTTGGCTGGAGCAAGCTCTTATATGGATAAAGGTGCATTAGTTCCTGATGAGTAAACAATGGATCGTGAAGAGCGACTAGCTGACCAGATACAGAGAAGGGCTCTTATTA
Consensus AAACGAACAGCTCTTGGCTGGAGCAAGCTCTTATATGGATAAAGGTGCATTAGTTCCTGATGAGTAAACAATGGATCGTGAAGAGCGACTAGCTGACCAGATACAGAGAAGGGCTCTTATTA

261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
adk65f  GATGGCTTCCACGTACGCTAGATCAGCAAAAGCTCTGGACGCAATGCTAAAGATTGATTAARAAAATTTGATGCTGTCATCGATCCATGTTGGTGAAGAAATCTGGTCGACGCTTAGCCGGCC
adk65r  GATGGCTTCCACGTACGCTAGATCAGCAAAAGCTCTGGACGCAATGCTAAAGATTGATTAARAAAATTTGATGCTGTCATCGATCCATGTTGGTGAAGAAATCTGGTCGACGCTTAGCCGGCC
Consensus GATGGCTTCCACGTACGCTAGATCAGCAAAAGCTCTGGACGCAATGCTAAAGATTGATTAARAAAATTTGATGCTGTCATCGATCCATGTTGGTGAAGAAATCTGGTCGACGCTTAGCCGGCC

391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
adk65f  GATTATCTGCAGCAATTTGGAGCACTTACCATAAAATTTTCAACCTACAAAAGTTGAGAGCACATGTGATCGTTGCGGTGGCATGAATCTATCAAGAGAGAGATGATTAACCTGAGACGGTTAA
adk65r  GATTATCTGCAGCAATTTGGAGCACTTACCATAAAATTTTCAACCTACAAAAGTTGAGAGCACATGTGATCGTTGCGGTGGCATGAATCTATCAAGAGAGCAGAGATATAC
Consensus GATTATCTGCAGCAATTTGGAGCACTTACCATAAAATTTTCAACCTACAAAAGTTGAGAGCACATGTGATCGTTGCGGTGGCATGAATCTATCAAGAGAGaaaaaTAAaAc.....

521     530     540     55852
|-----|-----|-----|
adk65f  AAATCGTTGGCAGATCACCRAAAAANNNNN
adk65r  .....
Consensus .....

```