



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE LABORATORIO CLINICO E HISTOPATOLOGICO

Informe final de investigación previo a la obtención del título de:

**LICENCIADO EN CIENCIAS DE LA SALUD EN LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Título:

Patrón de bandas genéticas en *Enterococcus sp.* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo.

Autor(es):

Klever Mauricio Lara Orozco

Leandro Mauricio Suárez Palacios

Tutor(a): PhD. Morella Lucía Guillén Ferraro.

Riobamba – Ecuador

2021

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de Graduación del Proyecto de Investigación, **Patrón de bandas genéticas en *Enterococcus sp.* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo**, presentado por **Klever Mauricio Lara Orozco y Leandro Mauricio Suárez Palacios** dirigido por la PhD. Morella Lucía Guillén Ferraro, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del presente trabajo con fines de graduación, en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente, para uso y custodia de la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Chimborazo.

Para constancia de lo expuesto firman:

Mgs. Mercedes Balladares
Presidente del tribunal



Firma

Mgs. Eliana Martínez
Miembro del tribunal



Firma

Mgs. Félix Atair Falconí Ontaneda
Miembro del tribunal



Firma

PhD. Morella Lucía Guillén Ferraro
Tutora del proyecto



Firma

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, MORELLA LUCIA GUILLÉN FERRARO, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: Patrón de bandas genéticas en *Enterococcus sp.* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo, propuesto por Klever Mauricio Lara Orozco, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 14 de Abril de 2021



Firma válida sólo para
Procesos de Titulación

Dra. Morella Lucia Guillén Ferraro
Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

CERTIFICADO DEL TUTOR

Yo, MORELLA LUCIA GUILLÉN FERRARO, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico en calidad de Tutora del Proyecto de Investigación titulado: Patrón de bandas genéticas en *Enterococcus sp.* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo, propuesto por Leandro Mauricio Suárez Palacios, egresado de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Facultad Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apto para la defensa pública del proyecto.

Riobamba, 14 de Abril de 2021





Firma válida sólo para
Procesos de Titulación

Dra. Morella Lucia Guillén Ferraro
Docente tutor de la carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico

AUTORÍA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del contenido de este trabajo de investigación, corresponde exclusivamente a sus autores Lara Orozco Klever Mauricio con cédula de identidad 0603570383 y Suarez Palacios Leandro Mauricio con cédula de identidad 172524987-2 y tutora PhD. MORELLA LUCIA GUILLÉN FERRARO, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.


Klever Mauricio Lara Orozco
Autor
Ci: 060357038-3


Leandro Mauricio Suarez Palacios
Autor
Ci: 1725249872

175687759 Digitally signed
by 1756877591
1 MORELLA MORELLA LUCIA
LUCIA GUILLEN
GUILLEN FERRARO
FERRARO Date: 2021.07.09
12:38:59 -05'00'

PhD. Dra. Morella Lucia Guillén Ferraro

Tutora

Agradecimiento

Agradecemos a Dios por bendecir nuestra vida, por guiarnos a lo largo de este proceso, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y debilidad.

Gracias a nuestros padres, familiares y amigos cercanos quienes han sido los principales promotores de nuestros sueños, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

Agradecemos a nuestros docentes de la Escuela de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Universidad Nacional de Chimborazo, por haber compartido sus conocimientos, así como su amistad y apoyo a lo largo de la preparación de nuestra carrera profesional, de manera especial, a nuestros tutores de nuestro proyecto de investigación a la PhD. Morella Guillén, al Ing. Félix Falconí y a la Dra. María del Carmen Cordovéz quienes nos ha guiado con su paciencia, conocimiento y rectitud como docentes a lo largo nuestra investigación.

Esta tesis está dedicada a

A mi familia Mercedes, Segundo, María, Marcelo e Iván quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, valentía y el no temer las adversidades porque Dios está siempre a mi lado.

A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañaron a lo largo del cumplimiento todas mis metas y sueños.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a todos mis amigos por apoyarme cuando más las necesite, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día, no me queda más que darles mil gracias a aquellas personas a quienes sin tener un lazo familiar directo se convirtieron en la familia que Dios me regalo a lo largo de mi vida.

Leandro Suarez

A mi Padre Klever Lara quien con su ejemplo me ha ayudado a ser una mejor persona, a mi madre Blanca Orozco que con su amor y su apoyo incondicional ha sido un pilar fundamental para que llegue a este momento de mi vida académica, a mi hermana Katherine Lara quien con sus consejos me ayudado a poder salir adelante a mi sobrina Alejandra que a pesar de ser el miembro más nuevo de la familia con una sonrisa me alienta a seguir avanzando.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a todos mis amigos, por apoyarme, por hacer de esta etapa una de las mejores de mi vida, por estar ahí en cada aventura nueva siempre estaré agradecido por todo el aprecio y el cariño que me han dado.

Klever Lara

INDICE

INDICE	9
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	¡Error! Marcador no definido.
OBJETIVOS.....	15
Objetivo General:	15
Objetivos Específicos:	15
MARCO TEORICO	16
<i>Enterococcus</i>	16
Importancia clínica	16
Aguas de riego y principales fuentes de contaminación	17
Medios de cultivo convencionales para <i>Enterococcus</i>	18
Caldo Cerebro Corazón	18
Agar sangre.....	19
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación	21
ADN Polimórfico amplificado al azar (RAPD)	21
PCR con oligonucleótidos aleatorios (AP-PCR).....	21
Electroforesis.....	23
Gel de Agarosa	23
METODOLOGÍA:	24
Tipo de investigación.....	24
Descriptiva:	24
Diseño:	24
Población:	24
Muestra:.....	24
PROCEDIMIENTOS	25
1. Técnicas de Microbiología	25
Tabla 1: Lugar de obtención de cepas de <i>Enterococcus</i>	25
Reactivación de cepas criocervadas.....	26
Criocervación de bacterias	26
2. Técnicas de Biología Molecular.....	27
Extracción de ADN de <i>Enterococcus</i>	27
Técnica de PCR para obtener amplificación fragmentos de ADN de <i>Enterococcus</i>	27

Tabla 2: Preparación de reactivos para el análisis mediante PCR	28
Tabla 3: Condiciones del Termociclador para realizar la PCR en muestras de ADN	28
Electroforesis en gel de agarosa	29
Preparación de gel de agarosa	29
Separación mediante electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos por PCR.	29
RESULTADOS	30
ADN extraído de las cepas <i>Enterococcus</i>	31
Patrón de bandas genéticas mediante técnica de PCR en cepas de <i>Enterococcus</i> utilizando Cebadores específicos.....	32
Tabla 4. Tabla de análisis de resultados de PCR en <i>Enterococcus</i> de diferente origen.....	34
Perfil de bandas genéticas comparación general <i>Enterococcus</i>	35
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXO 1: Evidencias Fotográficas	45

RESUMEN

En el periodo comprendido entre octubre del 2019 a marzo de 2020, se efectuó la presente investigación con cepas de la familia de *Enterococcus*, que fueron aisladas previamente en diferentes productos agrícolas y ríos de la provincia de Chimborazo – Ecuador, crioconservadas en el Laboratorio de Microbiología de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Chimborazo. Este trabajo se realizó con el propósito de determinar perfiles de bandas genéticas de *Enterococcus* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores aleatorios que permitan evidenciar su variabilidad intraespecífica considerando que en los últimos años los casos de infecciones causadas por esta bacteria han cobrado importancia por su resistente a la vancomicina (ERV) y debido a su característica innata para almacenar información y transferirla a otras cepas desarrollando cambios dentro de su material genético, lo que permite diferenciarlas dentro de su misma especie. La investigación fue de tipo transversal, con diseño no experimental, utilizando como muestra 13 cepas de *Enterococcus*. Se utilizó la Técnica de (PCR) la cual amplificó fragmentos aleatorios de ADN para poder observar los cambios que estos pudieran llegar a presentar y como instrumento una guía de observación en la que podamos distinguir las diferentes características obtenidas. Los resultados mostraron que dentro de las 13 cepas estudiadas 10 de ellas presentan un peso molecular similar y 3 de ellas un peso diferente lo cual nos demuestra a breves rasgos la variabilidad genética intraespecífica.

Palabras claves: Enterococcus, PCR, bandas genéticas. Variabilidad

Abstract

In the period from October 2019 to March 2020, the present research was carried out with strains of the Enterococcus family, which were previously isolated in different agricultural products and rivers of the province of Chimborazo - Ecuador, they were cryopreserved in the Microbiology Laboratory of the Clinical Laboratory Career of the Universidad Nacional de Chimborazo. This work was carried out with the purpose of determining genetic band profiles of Enterococcus by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers at random that allow evidencing its intraspecific variability considering that in the last years the cases of infections caused by this bacterium have gained importance due to its resistance to vancomycin (VRE) and due to its innate characteristic to store information and transfer it to other strains developing changes within its genetic material, which allows differentiating them within the same species. The research was of cross-sectional type, with non-experimental design, using 13 Enterococcus strains as a sample. The PCR technique was used, it amplified DNA fragments at random in order to observe the changes that these could present and as an instrument an observation guide in which we can distinguish different characteristics obtained. The results showed that among the 13 strains studied, 10 of them presented a similar molecular weight and three of them a different weight, which demonstrates in brief the intraspecific genetic variability.

Keywords: enterococcus, PCR, genetic bands, variability.

Reviewed by:
Mgs. Geovanny Armas Pesántez
ENGLISH PROFESSOR
C.C. 0602773301

INTRODUCCION

Con el pasar del tiempo las bacterias han señalado una evolución lo cual ha producido una serie de cambios dentro de sus características de supervivencia. Particularmente en los *Enterococcus* estas son bacterias Gram positivas que se pueden hallar en el interior del tracto gastrointestinal de una gran variedad de organismos, incluyendo al ser humano donde colonizan boca y tracto genitourinario. Al pasar el tiempo, se han podido identificar a éstos como uno de los patógenos oportunistas de los seres humanos, causando diversas enfermedades tales como: endocarditis, bacteriemias *enterocóccicas*, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central (muy raras), intrabdominal y pélvicas³.

Otra característica que suele ser de importancia dentro del material hereditario es la recombinación, la cual se basa en la producción de nuevas y variadas combinaciones genéticas que se generan a partir de una mutación, como consecuencia de la necesidad de subsistencia dentro de diferentes organismos. Cuando se tiene dos moléculas de ADN que poseen distintas mutaciones estas pueden intercambiar segmentos entre sí y dar lugar a la aparición de nuevas recombinaciones genéticas. Los virus y bacterias, al igual que los organismos eucarióticos también presentan mecanismos de recombinación. Cuando de bacterias se tratan, éstas pueden presentar tres mecanismos los cuales permiten la construcción de varios mapas genéticos en las bacterias¹.

Las apariciones de nuevas secuencias nucleotídicas dentro del material genético de las bacterias se encuentran en constante cambio, manifestándose en sus características de supervivencia, originan resistencias a los diferentes tratamientos. Las especies que con mayor frecuencia se han aislado e identificado han sido *E. faecalis* 80-90% y *E. faecium* con un 10%⁴¹.

Este género ha pasado por diversas variaciones taxonómicas, en 1930 Rebecca Lancefield se fundamentaba en un sistema de tipificación serológica con la identificación de hidratos de carbono en la pared celular, el cual tiempo después fue reemplazado ya que se los clasificaba como *Streptococcus*. Finalmente, en 1984 Scheleifer y Kilpper- Bälz observaron diferencias de hibridación del ADN y ARNr proponiendo que sea transferido de *Streptococcus* a *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*⁴¹.

Estos organismos han adquirido una mayor importancia como patógenos nosocomiales, a pesar de su baja virulencia según investigaciones en los últimos 10 años⁴.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que la infección por *Enterococcus faecium* requiere de medicación urgente⁶.

Bernardo A. menciona que este microorganismo si bien puede habitar el intestino humano sin causar ningún tipo de daño, existen aquellos que son resistentes a la vancomicina que podrían provocar enfermedades tales como la meningitis neonatal⁵. La aparición y selección de mutantes en estas poblaciones, o la importancia relativa de la mutación y la recombinación, son efectos esenciales para acometer los cambios epidemiológicos que se producen en estas⁶. Un estudio realizado en Ecuador en 2001 determinó que se trataba de *Enterococcus* que fueron aislados del catéter de vía central, indicando que las bacterias del grupo de Enterobacterias eran las responsables de las infecciones urinarias, así como también de las vías biliares, intrabdominal y pélvicas llegando hasta el desarrollo de bacteremia y sepsis³³.

Otras investigaciones realizadas en la provincia de Chimborazo, en Ecuador, identificaron la presencia de *Enterococcus* en diferentes ríos ^{35,36,37}, así como también en varios productos agrícolas, indicando una contaminación de los vegetales con este tipo de bacterias oportunistas por el sistema de riego utilizado⁷.

Ciertos *Enterococos* son intrínsecamente resistentes a los antibióticos de la familia β -lactam como las penicilinas y todas las cefalosporinas, así como también a muchos aminoglicósidos²³. Desde el año 1980, estudios llevados a cabo en Estados Unidos muestran que han ido apareciendo cepas de *Enterococcus* que son particularmente virulentas y resistentes a la vancomicina (VRE) en infecciones hospitalarias². Lo que sugiere que estas han presentado variación dentro de su material genético, es por eso que utilizamos la amplificación aleatoria mediante técnicas moleculares ya que esto hace visible los diferentes patrones de bandas que pueden llegar a expresar pudiendo diferenciarlas dentro de su misma especie².

Este trabajo se basó en el estudio de bandas genéticas de *Enterococcus* usando como iniciador el OPA-13, el cual demostro en diferentes estudios ser el más efectivo al momento de obtener fragmentos ampliados de ADN mediante PCR lo cual nos ayudó a observar de manera clara las variaciones genéticas intraespecíficas que estas presentaban permitiendo diferenciarlas por el número, tamaño y posición de sus patrones de bandas⁴⁰.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar perfiles de bandas genéticas de *Enterococcus* encontradas en productos agrícolas y aguas de riego de la Provincia de Chimborazo, Ecuador, mediante la reacción en cadena de la polimerasa que permita la diferenciación genotípica intraespecífica.

Objetivos Específicos:

- Reactivar de las cepas de *Enterococcus* aisladas de productos agrícolas y aguas de riego de la Provincia de Chimborazo, Ecuador.
- Aplicar de la técnica reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores para obtener amplificación de fragmentos de muestras de ADN de *Enterococcus*.
- Comparar los resultados de amplificación de fragmentos de ADN genómico de colonias de *Enterococcus*.

MARCO TEORICO

Enterococcus

El Enterococo es un organismo anaerobio facultativo o capnofílico, lo que quiere decir que este prefiere utilizar el dióxido de carbono (CO₂), aunque sobrevive bien en su ausencia que típicamente presentan una gamma-hemólisis en agar sangre de cordero¹¹. Los Enterococos son cocos Gram-Positivos que se observan formando parejas o cadenas, siendo difícil diferenciarlos de *Streptococcus* solo sobre la base de las características físicas que presentan¹². Es un género de bacterias del ácido láctico de la división Firmicutes. Contiene miembros que están clasificados como *Streptococcus Grupo D* hasta el año 1984 cuando los análisis de su ADN genómico indicaron que tomarlos como un género separado era mucho más apropiado¹². De esta especie dos de ellas actúan como comensales en el intestino humano como lo son: *E. faecalis* y *E. faecium*.

Importancia clínica

Los *Enterococcus* son causantes de importantes infecciones clínicas, como la infección urinaria, bacteremia, endocarditis, diverticulitis y meningitis. Las cepas menos agresivas de estas bacterias se pueden tratar con ampicilina y vancomicina. La característica más importante de este género es el nivel alto de resistencia antibiótica que presenta³.

Desde el año 1980, han aparecido cepas que son particularmente virulentas de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (VRE)³³.

Se estima que las infecciones intrahospitalarias ocasionadas por Enterococos afectan anualmente a más de 800,000 pacientes estadounidenses, lo que sitúa a estas bacterias como el segundo agente causal de infecciones, cabe destacar que más de la mitad de los casos enterocócicos de invasión sanguínea son debidos a VRE (vancomycin-resistant *Enterococcus*), en cuyo caso los índices de mortalidad ascienden hasta 37 %, cifra muy superior a la de 16 %, la cual se estima para los decesos provocados por cepas susceptibles a vancomicina³¹.

La meningitis producida por enterococos es una complicación que rara vez se presenta en neurocirugía. Suelen requerir un tratamiento intravenoso de vancomicina¹⁴.

Aguas de riego y principales fuentes de contaminación

Se define como el agua que se aplica, mediante diferentes sistemas de distribución, para el desarrollo correcto de los cultivos. Su origen puede proceder de ríos, lagos o corrientes continuas de aguas naturales.

El agua de riego está compuesta principalmente de cationes calcio, magnesio, sodio y potasio y los aniones carbonatos, bicarbonatos, cloruros, sulfatos, nitratos y boratos, de los cuales depende la calidad del agua. La presencia de estas sales disueltas en el agua de riego puede ocasionar en algunas ocasiones un aumento de la salinidad del suelo y esto hace que las plantas no sean capaces de absorber correctamente el agua⁷.

Agua de riego contaminada

Uno de los principales usuarios de recursos de agua dulce es la agricultura, que, a nivel mundial, utiliza un promedio de un 70% de todos los suministros hídricos superficiales que existen. Si dejamos de lado la pérdida de agua por la evapotranspiración el agua utilizada en la agricultura se recicla de nuevo en forma de agua superficial y/o subterránea¹⁰.

Los sistemas de evacuación de las aguas residuales de las ciudades y pueblos a menudo son defectuosos, por lo que es usual que los cuerpos de agua de las ciudades y su entorno más próximo tengan una alta carga de contaminantes y estos sean desechados a los ríos, que en su mayoría son una de las fuentes principales de obtención del agua de riego usadas en la agricultura³⁰.

Sin embargo, la agricultura es a su vez causa y víctima de la contaminación de recursos hídricos. Se convierte en causa cuando la descarga de contaminantes y sedimentos en aguas superficiales y subterráneas, originados por el uso de químicos, como los de las fumigaciones que al mezclarse con el agua destruye sus propiedades físicas, convirtiéndola en un contaminante importante cuando se desechan directamente en un río o son absorbidos por la tierra. Se convierte en víctima, cuando se utilizan aguas residuales, así como superficiales y subterráneas contaminadas, que contaminan los cultivos transmitiendo enfermedades tanto a los consumidores como a los trabajadores agrícolas¹⁰.

Identificación microbiológica de *Enterococcus*

Dentro de las características bioquímicas que podemos observar son: la capacidad de desarrollarse en presencia de NaCl al 6,5%, con temperaturas que van de 10°C y 45°C, con un pH de hasta 9,6.

Son capaces de hidrolizar la esculina y crecer en presencia de bilis al 40%, pueden sobrevivir 30 min a una temperatura de 60°C e hidrolizar la L-pirrolidonil β-naftil-amida (PYR); esto ha sido aprovechado por los laboratorios como un test rápido para la identificación de *Enterococos*²⁴.

Medios de cultivo convencionales para *Enterococcus*

Se desarrolló una gran variedad de medios de cultivo para el aislamiento de *Enterococcus* de aguas, alimentos, orina, heces y otros tipos de muestras.

Hay muchos factores que contribuyen a la selectividad del medio de cultivo, entre estas están las condiciones de crecimiento, el pH que el medio tiene, la temperatura de incubación, así como la concentración de cada uno de los inhibidores²⁴.

Los pH relativamente bajos (6.0 o 6.2) y la temperatura de incubación elevada de 42 o 45 °C son las condiciones especiales para el crecimiento de estos microorganismos. El correcto uso de inhibidores, así como el aumento o disminución de las concentraciones que estos tengan, también ofrece diferentes grados de selectividad al medio. Entre los medios selectivos para *Enterococcus* se pueden señalar al caldo cerebro corazón y agar sangre como los más empleados para el aislamiento de *Enterococcus* en aguas y productos de desecho²⁴.

Caldo Cerebro Corazón

La infusión cerebro-corazón resultó ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, estos incluyen muchos tipos de patógenos. Se lo suele utilizar como un medio básico para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando es suplementado con sangre o agentes selectivos. Brain Heart Infusion (BHI)²⁵. Agar sin ningún tipo de suplemento es recomendable para utilizar actualmente como un medio universal para bacteriología aerobia y para la recuperación primaria de hongos y Actinomycetales partiendo de muestras clínicas y no clínicas. BD Brain Heart Infusion (BHI) este agar obtiene los nutrientes de la infusión de cerebro-corazón, la peptona y la glucosa.

Las peptonas y la infusión son grandes fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas y sustancias de traza. La glucosa es la fuente de carbohidratos que los microorganismos utilizan mediante fermentación. Se utiliza fosfato disódico como un tampón en el medio²⁴.

Agar sangre

Este es un medio de cultivo enriquecido ya que lleva un aditivo principal del 5-10% de sangre sobre una base de agar. Ambos están compuestos contienen muchos nutrientes y esta propiedad permite que en el puedan crecer la mayoría de las bacterias cultivables.

El crecimiento que se producen en este se presenta sin ninguna restricción, por ese motivo no es selectivo.

Sin embargo, si al medio se le adicionan compuestos que impidan crecimiento de ciertos microorganismos favoreciendo a otros lo que lo hace selectivo. En algunos casos se pueden adicionar algunos tipos de antibióticos o antifúngicos.

De igual manera, el agar sangre es un medio diferencial, ya que este le permite diferenciar 3 tipos de bacterias como: Alfa-hemolíticos, beta-hemolíticos y gamma-hemolíticos.

Análisis de variabilidad

La variabilidad genética es una medida de la tendencia a presentarse genotipos en la población lo que los hace diferenciarse. Los individuos de una especie a pesar de presentar características similares, pero no son idénticos. Si bien, son reconocibles como pertenecientes a una misma especie, siempre existirán muchas diferencias en su forma, función y comportamiento. Dentro de cada una de las características que puede presentar un organismo dentro de su especie se pueden hablar de muchas variaciones dentro del mismo²⁰.

La mayor parte de la variación de individuos proviene de los genes, lo que quiere decir que la variación es genética. Esta se origina por varias mutaciones, recombinaciones y alteraciones en su cariotipo ya sea por el número, forma, tamaño y orden interno de los cromosomas. Los procesos a los que se rige que se mantengan o se eliminen varias características en un organismo es la selección natural y a la diversidad genética²⁰.

La variabilidad genética permite la evolución y adaptación de las especies, ya que en cada generación solamente una parte de la población sobrevive y se reproduce transmitiendo características particulares a su progenie para que esta pueda desarrollarse y sobrevivir²¹.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es un novedoso y revolucionario proceso ideado en el año 1985 por Karry B. Mullis, un investigador de Cetus Corporation, de Emerville, California. El mismo año múltiples investigadores del grupo de Mullis mejoraron y perfeccionaron la técnica y la utilizaron para el diagnóstico clínico de la anemia de células falciformes¹⁵.

Desde entonces la aparición de artículos que discuten acerca de las aplicaciones de esta nueva metodología en diferentes áreas de la biomedicina ha sido exponencial, esta tecnología ha tenido su efecto de bola de nieve sobre el avance del conocimiento científico en áreas como criminalística y paleontología, así como en el estudio de la evolución y plantas¹⁶.

La PCR es una técnica que se utiliza para hacer copias de una determinada región dentro del ADN in vitro, la región que se aísla suele ser la de mayor interés clínico o investigativo.

La PCR depende siempre de un ADN polimerasa termoestable, la Taq polimerasa, y requiere de cebadores los cuales serán diseñados específicamente para la región de ADN que pretendemos estudiar, la reacción se va a someter a un ciclo de cambios de temperatura que permiten la producción de varias copias de la región blanco. La PCR tiene muchas aplicaciones en la investigación y en la práctica. Se utiliza de forma rutinaria en la clonación de ADN, el diagnóstico médico y el análisis forense³².

Especificidad y sensibilidad de la PCR

Este método es altamente específico. Las secuencias de ADN que se amplifican son las únicas que se encuentran entre los fragmentos iniciadores que han hibridado. Un gen que está presente en una muestra el cual constituya una parte de millón total del material genético que se estudia, se vuelve accesible por PCR, por esa razón se dice que esta técnica es muy sensible. Una única molécula de ADN se puede amplificar y ser detectada¹⁷.

Múltiples perfiles arbitrarios de amplificación

ADN Polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Esta es una técnica de las más versátiles desde que se pudo desarrollar en el año 1990. La misma va a utilizar una colección de decanucleótidos para amplificar, mediante PCR, áreas específicas distribuidas al azar por el genoma. Su baja temperatura de alineamiento (36°C) y pequeñez aseguran que se unan a una infinidad de secuencias dentro del ADN para así conseguir amplificar muchos fragmentos, que posteriormente se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que pueden variar según el polimorfismo de los individuos o grupos de éstos, proporcionando así una huella genética característica¹⁸.

La técnica suele ser muy rápida, cómoda y no necesita de mucho ADN el cual no necesita tener una alta pureza para ser analizado, no se necesita de un conocimiento previo de la secuencia, y se puede distinguir a muchos organismos de manera rápida y simultánea³⁴.

Los inconvenientes que esta técnica presenta son que los fragmentos que se logran amplificar no suelen corresponder al fragmento de ADN que se intenta aislar dando como resultado la aparición de bandas falsas y por ende un resultado erróneo.

El uso de esta tecnología ha sido utilizado para la categorización de frutas, así como la selección de sus variedades, y diferentes líneas clonales. La técnica también se está utilizando para el análisis de diferentes variedades de apio, uva, limón y olivo³⁴.

El RAPD se utiliza para cuando no se cuenta con suficientes datos genómicos previamente publicados o bien cuando se quiere obtener información genética de manera rápida y relativamente económica de una especie en particular¹⁸.

PCR con oligonucleótidos aleatorios (AP-PCR)

El desarrollo de esta técnica se da de manera similar a la de la RAPD, aunque se cambia el diseño de los oligonucleótidos y el tipo de PCR. Los oligonucleótidos deben ser largos (no menor a 20 nucleótidos(nt), y la PCR presenta dos ciclos de baja astringencia (poca especificidad) que permiten la polimerización de una batería de fragmentos característicos de cada variedad. Posteriormente los ciclos aumentan su astringencia para poder amplificar y visualizar de manera específica las bandas anteriores.

Todos los fragmentos amplificados se migran en un gel de agarosa para observar las grandes diferencias que existen entre especies, o bien se puede mirar radiactivamente y migrar en el gel de poliacrilamida para obtener resultados mucho más finos y precisos¹⁸.

También se la considera una técnica de huellas dactilares de ADN que se basa en PCR la cual va a utilizar cebadores cuya secuencia de nucleótidos se elige de manera aleatoria³⁸.

A este método también se lo conoce como ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD). Los ciclos iniciales de la reacción se desarrollan bajo condiciones de baja rigurosidad ya que normalmente se realizan con temperaturas relativamente bajas durante la etapa de recocido o utilizando una alta concentración de magnesio en el tampón de reacción, aunque en ciertas ocasiones se pueden utilizar ambas al mismo tiempo. Al encontrarse en estas circunstancias, el cebador aleatorio se alineará con las mejores coincidencias en la hebra molde. La competencia entre estos eventos de recocido nos dará como resultado una amplificación reproducible y cuantitativa de varias bandas discretas. Al realizar una mayor amplificación de dichas secuencias en condiciones de alta rigurosidad producirá una huella genética característica cuando la observamos mediante una electroforesis en gel. Además, y en contraste con otras variaciones de PCR que consiguen una caracterización del ADN la AP-PCR permite la clonación directa de las secuencias de ADN amplificadas *in vitro*³⁹.

Dentro de las características que llega a presentar esta técnica tenemos tanto ventajas como desventajas y una de ellas es esta no es codominante lo que quiere decir que esta no es capaz de detectar las diferentes formas del marcador en el caso de que sea necesario determinar si el individuo es homocigoto o heterocigoto ya que el segundo muestra simultáneamente la combinación de los dos progenitores homocigotos además la amplificación que podemos obtener va a ser cuantitativa, es decir, que la intensidad de las bandas amplificadas serán proporcionales a las concentraciones de las correspondientes secuencias diana en la preparación de ADN entre sus ventajas podemos observar que esta técnica presenta un polimorfismo muy alto, lo que quiere decir que es variable dentro de un grupo de individuos y el grado de detección del mismo dependerá de la tecnología que utilizemos para medirlo. Al hablar de su tecnicidad y del costo que este representa son muy bajos por lo que al utilizarla para el estudio de varios individuos será más rápido fácil y barato. Su índice de eficacia al ser un estudio genotípico ronda del 70-90% de efectividad superando el análisis fenotípico con un 25-45% lo que lo hace el de mayor confiabilidad³⁹.

Electroforesis

Esta es una técnica que se utiliza en el laboratorio con el fin de separar pequeños fragmentos de ADN, así como ARN y diferentes moléculas en base a tamaño y carga eléctrica. La misma consiste en la aplicación de una corriente eléctrica a través de un gel de agarosa en el cual las moléculas se pueden desplazar por el mismo en varias direcciones con distinta velocidad entre sí haciendo visible cada fragmento mediante la tinción de bromuro de etidio que lo hace fluorescente al recibir la emisión de luz ultravioleta²⁶.

Gel de Agarosa

Es un polisacárido que se prepara en una concentración que va de 0.5% a 2%, suele encontrarse en forma de un polvo que se disuelve con un buffer de TAE (Tris-acetato-EDTA) o TBE(Tris-Borato-EDTA) y se funde a altas temperaturas obteniendo una solución transparente y homogénea que al enfriarse toma un estado semisólido la cual posee una estructura porosa variando el tamaño del poro según la concentración de agarosa obtenida¹⁹.

METODOLOGÍA:

Tipo de investigación

Descriptiva:

Se describe la presencia de perfiles de bandas genéticas generadas por PCR, su tamaño y posición en un gel de electroforesis para poder identificar, interpretar y asociar a la especie bacteriana.

Diseño:

El diseño con el que se trabajó fue un cuasi experimental, el perfil de bandas en *Enterococcus* (sujeto de estudio) no se seleccionó de forma aleatoria, sino que fue encontrado, además no tuvo el control de las variables que intervienen.

Población:

La población total empleada en el presente proyecto son 13 cepas de *Enterococcus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo.

Muestra:

Se trabajó con toda la población de cepas aisladas de *Enterococcus*.

VARIABLES:

Independiente: El ADN genómico de *Enterococcus*.

Dependiente: El patrón de bandas obtenidas del genoma bacteriano.

Técnicas: Observación.

Instrumento: Guía de observación.

PROCEDIMIENTOS

1. Técnicas de Microbiología

En el laboratorio de Microbiología de la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Universidad Nacional de Chimborazo en Riobamba-Ecuador, se reactivó las cepas de *Enterococcus* que fueron aisladas en estudios anteriores de productos agrícolas y aguas de riego de la Provincia de Chimborazo, en el período 2017-2018, y que se encontraban conservadas en estado de congelación. En la Tabla 1 se indica el lugar de obtención, el origen de la muestra y la cepa aislada.

Tabla 1: Lugar de obtención de cepas de *Enterococcus*

NUMERO DE MUESTRA	CANTON/PARROQUIA	ORIGEN DE A MUESTRA	CEPA
1. 1,4,1	Shobel Viallin	Papas	<i>Enterococcus faecalis</i>
2. 1,5,2	Parque Chibunga	Maíz	<i>Enterococcus spp.</i>
3. 2,1,2	Chambo	Remolacha	<i>Enterococcus faecium</i>
4. 2,4,1	Cebadas	Frutilla	<i>Enterococcus faecium</i>
5. 3,2,2	Alausí	Papas	<i>Enterococcus spp.</i>
6. 3,3,1	Tixán	Zanahoria	<i>Enterococcus spp.</i>
7. 3,3,2	Tixán	Habas	<i>Enterococcus spp.</i>
8. 3,4,1	Totoras	Ocas	<i>Enterococcus spp.</i>
9. 3,4,2	Totoras	Papas	<i>Enterococcus spp.</i>
10. 3,4,3	Totoras	Mashua	<i>Enterococcus spp.</i>
11. 3,5,2	Alausí	Cilantro	<i>Enterococcus spp.</i>
12. 3,5,3	Alausí	Cilantro	<i>Enterococcus spp.</i>
13. 5,2,2	Chipo chico	Agua de rio	<i>Enterococcus spp.</i>

Reactivación de cepas crioconservadas

1. Se descongelaron los viales a temperatura ambiente.
2. Se prepararon tantos tubos como viales de caldo cerebro corazón (BHI) para nutrir las cepas a reactivar rotuladas con el código de cada vial.
3. Con ayuda de una aza calibrada se colocó una pequeña cantidad de muestra de cada vial en los tubos y se los incubó durante 24h a 37°C para favorecer el crecimiento y desarrollo de las bacterias.
4. En agar sangre se sembraron las bacterias que previamente se nutrieron en caldo BHI, utilizando estriado y desgaste posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.
5. Posteriormente fueron replicadas hasta 3 veces para obtener muestras frescas.
6. En un matraz se colocaron 7.5 g de medio Caldo de Tripticasa soya (TSB) y 250 ml de agua destilada, y se llevó a punto de ebullición.
7. Se autoclavó el medio de cultivo por 25 minutos y se dejó reposar a temperatura ambiente.
8. En 13 matraces de 100 ml se repartió el caldo TSB por partes iguales para las 13 cepas estudiadas y el control positivo respectivamente.
9. Se dejó incubar por 18 horas a 37°C.

Crioconservación de bacterias

1. Se preparó un cubo con hielo en donde se colocó los matraces de cultivo TSB durante 15 minutos.
2. Cuidadosamente se trasvasó el contenido de los matraces a tubos cónicos que fueron centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm para obtener un precipitado, luego se desechó el sobrenadante.
3. Se agregó caldo TSB al tubo cónico y fue centrifugado nuevamente 15 minutos a 3000 rpm eliminando el sobrenadante, esto se realizó 2 veces realizando un lavado de nuestro precipitado.
4. Se prepararon y homogeneizaron 10 ml de solución de caldo TSB con glicerol al 15% y de manera cuidadosa se colocaron 100 µl de esta solución en cada tubo eppendorf de 1.5 ml previamente rotulados.
5. Finalmente se conservó a -20°C hasta su posterior utilización.

2. Técnicas de Biología Molecular

Extracción de ADN de *Enterococcus*.

El ADN total se obtuvo partiendo de cepas bacterianas de *Enterococcus* obtenidas previamente. La extracción de ADN genómico se llevó a cabo con la solución DNAzol. Este procedimiento de este reactivo se basa en el uso de una solución de lisis con detergente de guanidina que permite la precipitación selectiva de ADN de un lisado celular.

La metodología empleada fue la siguiente:

1. Con ayuda de una pipeta graduada se colocaron 1000 μ l de DNAzol y 100 μ l de la suspensión de bacterias.
2. Posteriormente se colocaron 500 μ l de etanol al 100% y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
3. Centrifugar las muestras durante un minuto
4. Con una pipeta graduada se trasladaron 1000 μ l de sobrenadante a tubos nuevos rotulados.
5. El precipitado, que corresponde al ADN extraído, fue lavado dos veces con 1000 μ l de etanol al 75%. En cada lavado, se suspendió el ADN en etanol invirtiendo los tubos de 3 a 6 veces.
6. Luego se colocaron verticalmente durante 30 segundos a 1 minuto para permitir que el ADN se asentara en el fondo de los tubos y se eliminó el etanol con cuidado.
7. Se preparó la solución de HEPES agregando 18.6 de HEPES en 181.4 μ l de NaOH
8. Se colocaron 18.6 μ l 8 Mm de NaOH pH 7.2 a los tubos de que contenían el ADN lavado
9. Finalmente se conservó a -20°C .

Técnica de PCR para obtener amplificación fragmentos de ADN de *Enterococcus*

Preparación de reactivos para la PCR.

1. En un tubo de microcentrífuga se agregó el reactivo de Buffer y Cl_2Mg , los Iniciadores, los nucleótidos (dNTPs), agua ultra pura y ADN polimerasa utilizando el esquema de la Tabla 2:

Tabla 2: Preparación de reactivos para el análisis mediante PCR

Reactivos	Concentración del Stock	Concentración Final	Volumen por tubo (µl)	Master Mix para 13 tubos (µl)
H₂O Ultrapura	-	-	29,8	447
Buffer y Cl₂Mg	10X	1X	5	75
dNTPs	100mM	10mM	4	60
Iniciador	44.3mM	50pM	10	150
Polimerasa	5UI/ul	1UI	0,2	3
Muestra ADN	-	-	1	-
Total			50	735

2. Los viales se agitaron por 2-3 segundos en un Vortex para homogenizarlos.
3. Para realizar la amplificación, se colocaron las muestras en el Termociclador utilizando las condiciones expuestas en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones del Termociclador para realizar la PCR en muestras de ADN

ETAPA	TIEMPO	T°C	CICLOS
Pre-desnaturalización	3min	94	1
Desnaturalización	1min	94	40
Hibridación	30seg	30	
Polimerización	2,5min	72	
Extensión final	3min	72	1
Conservación	∞	4	1

Electroforesis en gel de agarosa

Preparación de gel de agarosa

1. Se preparó un gel de electroforesis al 2% de agarosa en TAE 1X en una cubeta minigel de 50ml
2. Se colocó 50ml de la solución tampón TAE 1X y 1 g de agarosa en un frasco de vidrio, y se llevó a ebullición, posteriormente se dejó reposar unos minutos y se le agregó 7 ul de bromuro de etidio (BrEt).
3. Se vertió el contenido de gel dentro del molde o bandeja de electroforesis incrustando la peineta para dejar los espacios de los pocillos, se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que se solidificó.
4. Con mucho cuidado se retiró la peineta y se colocó la bandeja dentro de la cuba electroforética

Separación mediante electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos por PCR.

Para su análisis se utilizó cubetas de electroforesis horizontales. La metodología fue la siguiente:

1. Se colocó el gel de agarosa al 2% en la cubeta de electroforesis.
2. Se rellenó la cubeta de electroforesis con tampón TAE 1X hasta cubrir el gel de agarosa.
3. Adicionalmente se agregó 30.3 μ L de solución de BrEt de 10 mg/ml al tampón TAE 1X, para tener una concentración final de BrEt de 0.5 μ g/ml.
4. Con una pipeta automática se tomaron 20 μ l del producto amplificado, que se colocaron un tubo eppendorf al cual se le adicionó 4 μ l de tampón de carga 6X.
5. Con mucho cuidado se procedió a cargar las muestras en los pocillos y en uno de ellos se colocó 10 μ l del marcador de peso molecular. Se dejó resolver la electroforesis durante 1 h. a 100 Voltios.
6. Finalmente se visualizó en el fotodocumentador de ADN.

Evaluación del perfil de bandas

Para su observación se utilizó la técnica de electroforesis colocando 20 µl muestra que fue producto de la amplificación mediante PCR en un gel al 2% con una migración de 1 hora a 100 V se comparó el patrón de bandas obtenidas por electroforesis de cada una de las cepas aisladas y caracterizadas de *Enterococcus* verificando el tamaño y posición de las bandas de ADN para realizar una comparación. Se consideraron cepas similares cuando las bandas principales obtenidas de los geles fueron idénticas.

RESULTADOS

Para realizar este trabajo se utilizó ADN extraído de 13 cepas de *Enterococcus* aislados de ríos y productos agrícolas de la Provincia de Chimborazo, en trabajos previos llevados a cabo en la Escuela de Laboratorio Clínico e Histopatológico de la Universidad Nacional de Chimborazo.

Secuencia del iniciador para la técnica de PCR basado en el genoma de *Enterococcus*.

En la evaluación de oligonucleótidos como iniciadores para la técnica de PCR donde el ensayo realizado con el iniciador OPA 13 que posee la secuencia 5'... CAGCACCCA ... 3'; fue seleccionado de un grupo de iniciadores analizados bibliográficamente, encontrándose que este era apropiado para obtener bandas en la especie perteneciente a *Enterococcus*²⁸.

```
tctttttgtg tacctaggtc tttagcagaa acattcacga taccattttt atcaatgtca  
aaagtaactt cgattttgtg cacaccacgt ggtgctgcag gaatatctgt taattggaat  
cttctaagt tttgtttgtc agcagccatc ggacgttcac cttgcaagac atggatatct  
acagcagggt gattatctgc agccgttgag aacacttgtg atttacttgt agggatcgtt  
gtgtttcgat caattaattt agtaaagacg ccaccatttg tttcaatacc taatgataac  
ggagtaacat caagtaaac aacgtctttg acatcacctg tgataaacco acctggata  
gcagcaccca tcgctactac ttcactctggg tttacagatt tgtttggttc tttccagtt  
tcttttotta ctgcttcaac aactgcagga atacgtgttg aaccaccaac taagataact  
tcatcaattt cagattgtga taaaccagca tctttcaagg cttgtcgtac tggaaatttt  
gtacgctcta ctaaactcagc ggttaattca tcaaatctcg cacgagtcaa tgctatttct  
acgatatagt ctgtgccoat ctgcccgaag tacatgatct gtatgatgat aaacoggaac  
tcoctaaccta ggagctacac caataacggt gttcgttcaa tcagaacaag ttccagtcac  
cacaacttca gcacctgctt ttttcaaagc aaagactgtt tgtgcttgc ctggacatat  
acctggcaag gtacatctat atcttccatt cacttttacc attcgcttac agcgttgtgt  
agcaacaact tcagcaccca tgttttcage tatttcagtc attctttctt ctgaaccgcc  
gcattcacia agtaaatagtc ctatttttctg atgttcttga ggaaatggca tagcaaccaa  
taccctctcg ctggttttog taatgggggt ttcttccgtg ccgctatgac cagtcattgg  
tocaccgatc acaatttctc catggggctc aataaaacct ccaacttgat caattaattg  
cttgacacgt gttccaattg ggacatcttt aaagactgtt ttcttttgtt ttacacgacc  
agataccgta agatctttat caataaatgg ttttcgctgt tcaatcgtt cgacaatgog  
tttaattggt tcaacattat ccaactctgc tccgatttctg attggtagtt gaccagggtc  
taaagtgatg ttcaacactt cacgaatcac tacacgttca tcgctctgag gatagatgct
```

Imagen 1: Secuencia de *Enterococcus* obtenida en la base de datos Gen Bank donde la secuencia seleccionada se encuentra subrayada.

ADN extraído de las cepas *Enterococcus*

En las imágenes 2 y 3 se observa la calidad de ADN de *Enterococcus sp.* que se extrajo de las diferentes cepas de *Enterococcus* estudiadas, el tiempo de migración de 1 hora a 100V.

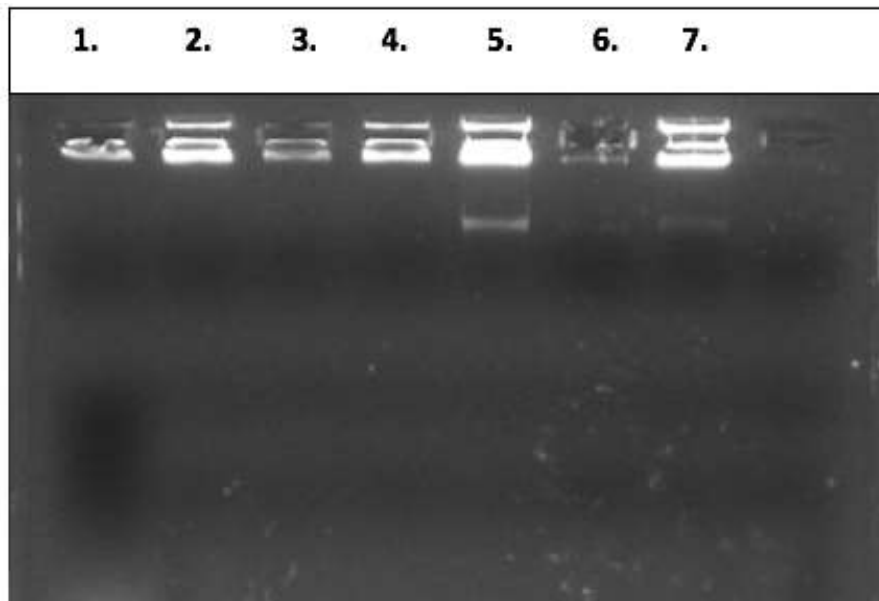


Imagen 2: Extracción de ADN de muestras de *Enterococcus* producto de PCR analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y 7ul de bromuro de etidio **Disposición:** Carril 1 (*E. faecalis* 1.4.1), Carril 2 (*Enterococcus sp.* 1.5.2), Carril 3 (*E. faecalis* 2.1.2), Carril 4(*E. faecalis* 2.4.1), Carril 5 (*Enterococcus sp.* 3.2.2(1)), Carril 6(*Enterococcus sp.* 3.3.1), Carril 7(*Enterococcus sp.* 3.3.2(As)).

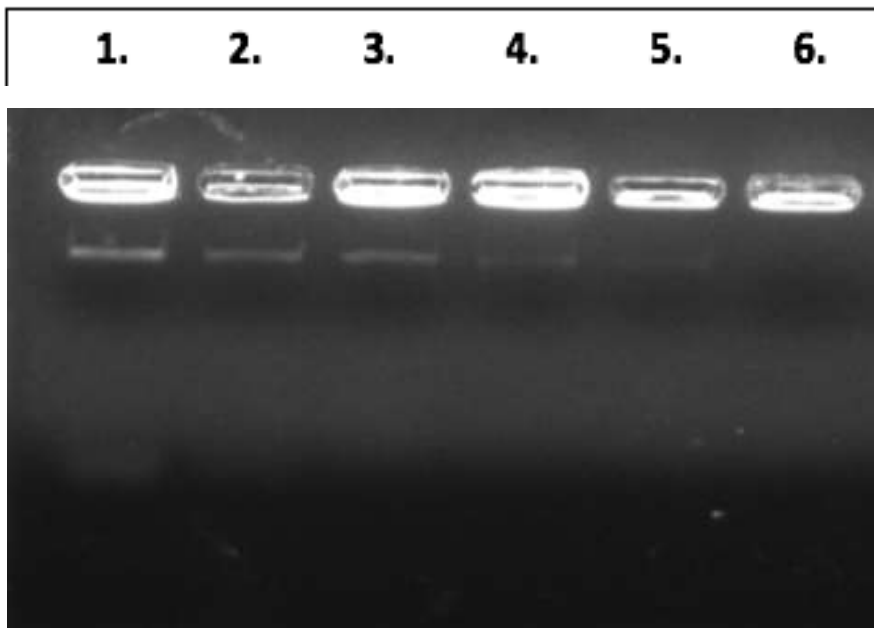


Imagen 3: Extracción de ADN de *Enterococcus* producto de PCR analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y 7ul de bromuro de etidio **Disposición:** Carril 1 *Enterococcus sp* 3.4.1; Carril 2 *Enterococcus sp* 3.4.2; Carril 3 *Enterococcus sp* 3.4.3; Carril 4 *Enterococcus sp* 3.5.2; Carril 5 *Enterococcus sp* 3.5.3(AS); Carril 6 *Enterococcus sp* 5.2.2.

Patrón de bandas genéticas mediante técnica de PCR en cepas de *Enterococcus* utilizando Cebadores específicos.

En las siguientes imágenes se observa los fragmentos de ADN de *Enterococcus* amplificados. Se utilizó un gel de agarosa al 2% y migración de 1 hora a 100V.

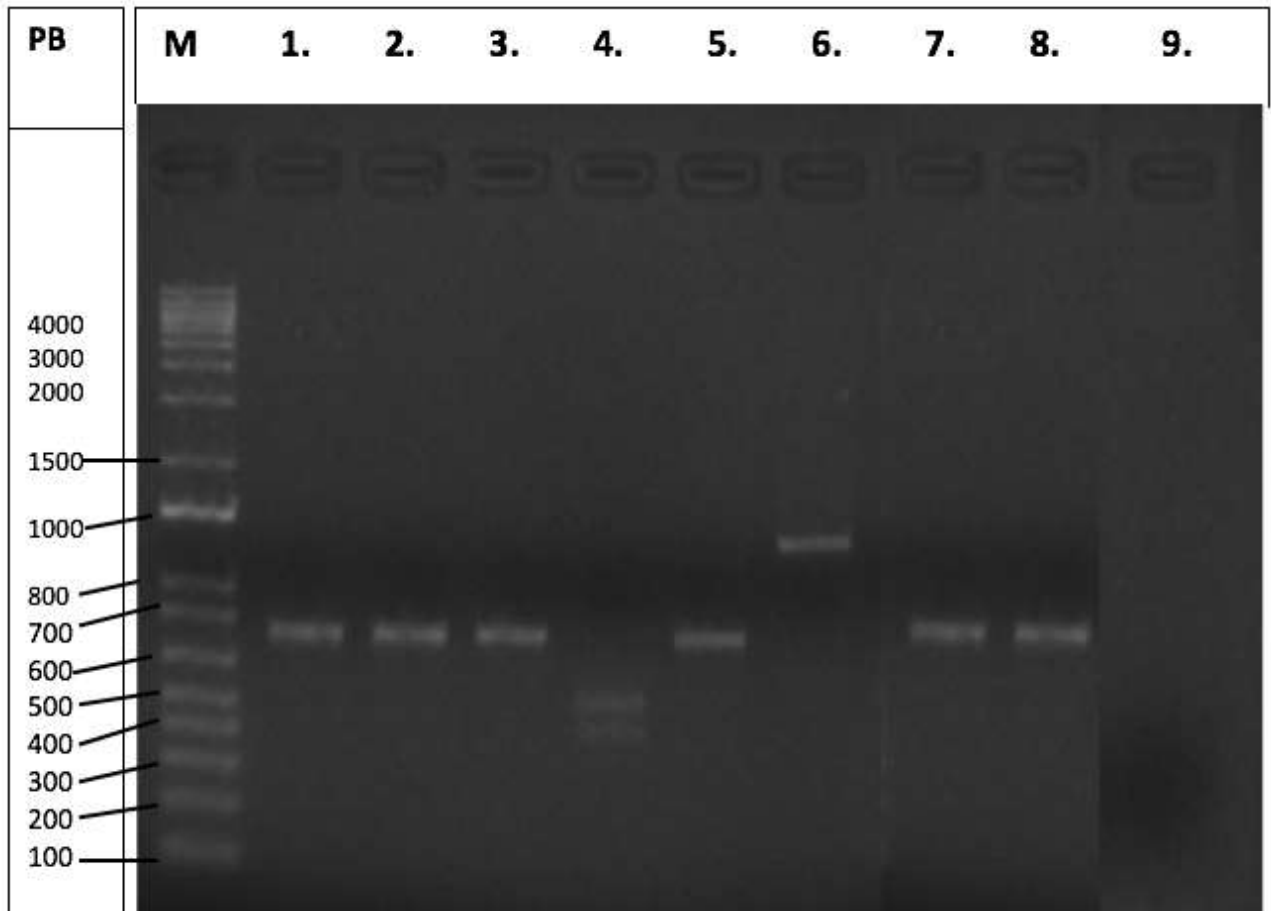


Imagen 4: Perfil de bandas de *Enterococcus* por PCR con indicadores OPA 13 producto de la PCR se analizaron por electroforesis con un contenido de 7ul de Bromuro de Etidio en un gel de agarosa al 2% **Disposición:** Carril M Marcador de peso molecular (escala 1000pb); Carril 1 *E. faecalis* 1.4.1; Carril 2 *Enterococcus sp.* 1.5.2; Carril 3 *E. faecalis* 2.1.2; Carril 4 *E. faecalis* 2.4.1; Carril 5 *Enterococcus sp.* 3.2.2(1), Carril 6 *Enterococcus sp.* 3.3.1 , Carril 7 *Enterococcus sp.* 3.3.2(As); Carril 8 control positivo; Carril 9 control negativo.

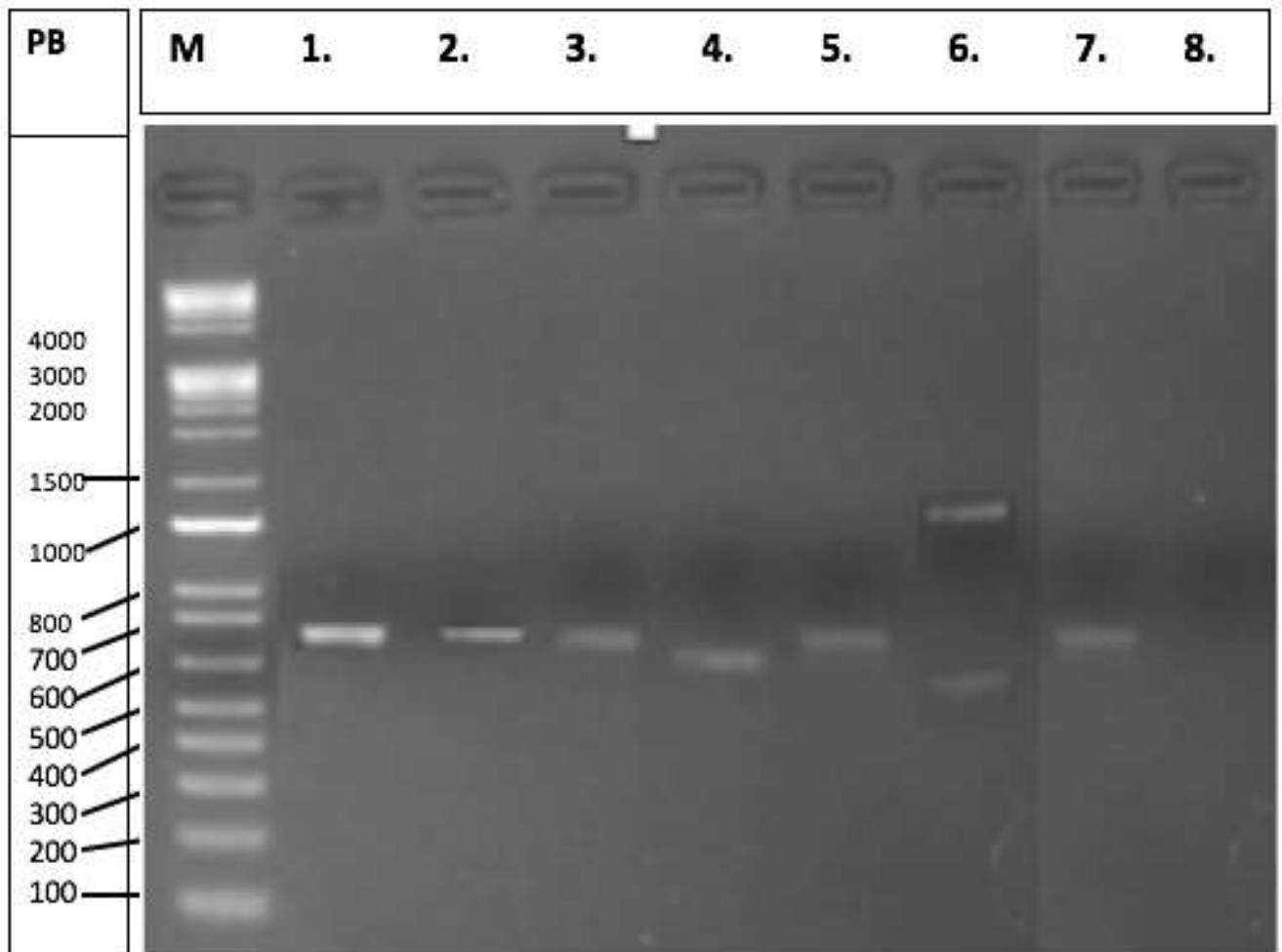


Imagen 5: Perfil de bandas de *Enterococcus* por PCR con indicadores OPA 13 producto de la PCR se analizaron por electroforesis con un contenido de 7ul de Bromuro de Etidio en un gel de agarosa al 2% **Disposición:** Carril 1 *Enterococcus* sp 3.4.1; Carril 2 *Enterococcus* sp 3.4.2; Carril 3 *Enterococcus* sp 3.4.3; Carril 4 *Enterococcus* sp 3.5.2; Carril 5 *Enterococcus* sp 3.5.3(AS); Carril 6 *Enterococcus* sp 5.2.2; Carril 7 control positivo; Carril 8 control negativo.

Tabla 4. Tabla de análisis de resultados de PCR en *Enterococcus* de diferente origen

NUMERO DE CARRIL	CODIGO DE LA MUESTRA	TAMAÑO DE LAS BANDAS EN pb	CANTIDAD DE BANDAS	ORIGEN DE LA MUESTRA	LUGAR
Análisis en base a lo observado en la imagen 4					
1	1,4,1	650pb	1	Papas	Shobel Viallin
2	1,5,2	650pb	1	Maíz	Parque Chibunga
3	2,1,2	650pb	1	Remolacha	Chambo
4	2,4,1	a) 400pb b) 500pb	2	Frutilla	Cebadas
5	3,2,2	650pb	1	Papas	Alausí
6	3,3,1	900pb	1	Zanahoria	Tixán
7	3,3,2	650pb	1	Habas	Tixán
Análisis en base a lo observado en la imagen 5					
1	3,4,1	650pb	1	Ocas	Totoras
2	3,4,2	650pb	1	Papas	Totoras
3	3,4,3	650pb	1	Mashua	Totoras
4	3,5,2	650pb	1	Cilantro	Alausí
5	3,5,3	650pb	1	Cilantro	Alausí
6	5,2,2	a) 500pb b) 980pb	2	Agua de rio Chipo chico	Chipo Chico

Perfil de bandas genéticas comparación general *Enterococcus*

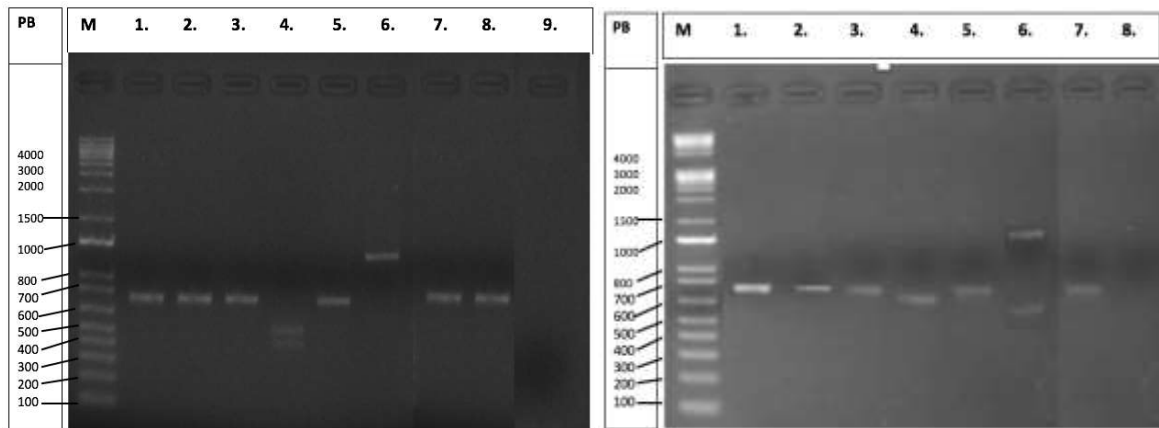


Imagen 6: Perfiles de bandas en *Enterococcus* mediante técnica PCR con iniciadores OPA 13 analizadas mediante proceso de electroforesis en gel de agarosa al 2% y 7ul de bromuro de etidio.

Mediante la técnica de PCR se observó de manera clara que si bien la mayoría de cepas presentaban una banda con un peso de 650pb por otro lado hubo 3 cepas la cuales demostraron un patrón totalmente distinto de las cuales 2 llegaron a presentar incluso dos bandas con pesos variantes para la cepa de *Enterococcus* 2.4.1 con dos bandas de 400pb y 500pb respectivamente para la cepa 3.3.1 con una banda de 900 pb y para la cepa 5.2.2 con dos bandas de 500 pb y 980pb respectivamente.

Imagen 7. Evaluación de resultados

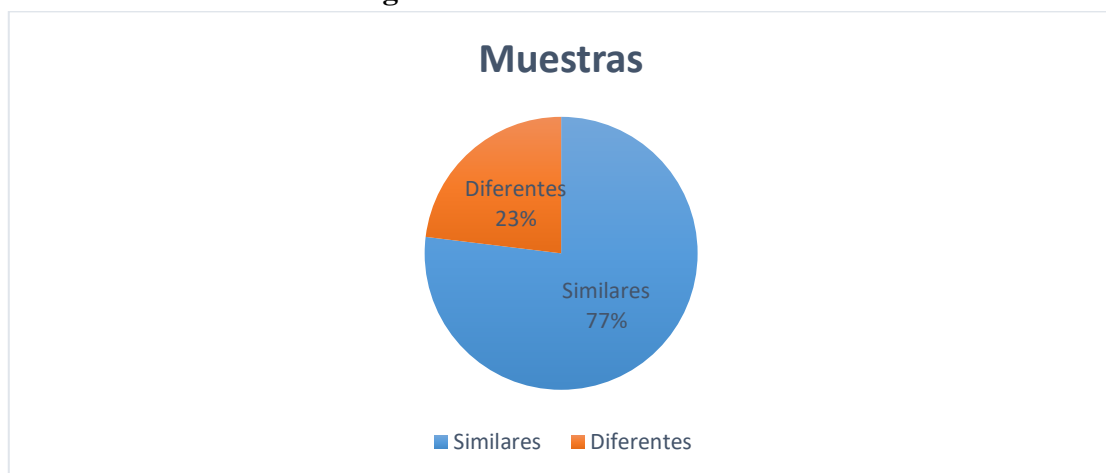


Imagen 7. En la gráfica se determinó gracias a los datos de la Imagen 5 y 6 que de las 13 muestras que fueron analizadas el 77% que corresponde a 10 muestras tienen un peso molecular similar y que un 23% que corresponde a 3 muestras poseen un peso molecular diferente, por lo que podríamos deducir que presenta variabilidad genética dentro de las cepas estudiadas demostrando y los cambios dentro del material genético se puede presentar en cualquier especie.

DISCUSIÓN

El estudio de las variantes y técnicas moleculares basadas en la PCR fueron enfocadas al análisis del material genético de varias especies lo cual ha sido de gran utilidad para el estudio de enfermedades infecciosas basándose en la amplificación fragmentos aleatorios de ADN de un organismo como es el caso del uso de la AP-PCR, contribuyendo a la caracterización y diferenciación de las cepas estudiadas ya que demostró ser una técnica de bajo costo y complicidad adecuada para trabajar con varias muestras simultáneamente. La variación en los patrones de bandas en organismos de una misma especie sería el indicativo de variabilidad genética o a su vez de una variante, este es uno de los puntos que pueden evidenciar que este estudio aporta con resultados que pueden ser de interés clínico en muestras que fueron obtenidas de diferentes sitios de la Provincia de Chimborazo dando un punto de partida para posteriores investigaciones²⁷.

Al realizar una comparación de nuestros resultados con un estudio realizado al caracterizar molecularmente aislados de *Burkholderia glumae* realizado por Galvis F.²⁹, estos utilizaron un cebador específico y una técnica más discriminatoria que la nuestra ellos obtuvieron patrones que al ser analizados mediante electroforesis en gel de agarosa se pudieron observar varias bandas con pesos moleculares si bien similares no iguales entre si lo que denominaron como polimórficos ya que estos no comparten exactamente el mismo perfil genético, lo que corrobora nuestra investigación ya que conociendo que son organismos de una misma especie estos expresan variación dentro de su material genético por lo tanto varios autores enfatizan que esto podría deberse a la resistencia antibiótica que desarrollan, lo que sería causa de preocupación ya que según menciona Guerrero D³³. en su investigación aquellas que se vuelven resistentes a fármacos como la Vancomicina causan de mayor dificultad al momento de dar tratamiento llegando a desarrollar una bacteremia y sepsis.

También se puede hacer una comparación con el estudio realizado por Pérez I., Martínez, Zhurbenko D.⁸, el cual se trató del estudio de resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética en *Enterococcus* aislados en Cuba; en el cual se evidencio que a pesar de estar trabajando con la misma bacteria se presentó variabilidad en el patrón bandas lo cual al comparar con este estudio indica que si existe la diferenciación sin importar la cantidad de muestras procesadas ya que en el presente caso solo se procesó 13 muestras pero se obtuvo un resultado útil para comparar la variabilidad.

También el poder comparar este estudio con otros ya sea realizados con nuestra misma bacteria o no va a ayudar a que en próximos proyectos se pueda profundizar más por qué existen dichas variaciones a nivel genético.

CONCLUSIONES

- Con la ayuda del caldo BHI (Brian Heart Infusion) y el Agar sangre siendo medios enriquecidos mostraron un gran desempeño al momento de la reactivación y replicación de nuestras bacterias lo que favoreció en su crecimiento normal para su posterior análisis mediante la técnica de PCR con primer aleatorio.
- Utilizando el iniciador OPA 13 en la técnica de PCR la amplificación de fragmentos de las 13 cepas de *Enterococcus* dio como resultado que 10 cepas presentaban un peso molecular similar y 3 que obtuvieron un peso diferente lo cual demuestra a breves rasgos la variabilidad genética
- Los perfiles de bandas de *Enterococcus sp*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus* presentaron diferentes pesos moleculares ya que la banda que mayor peso presentaba en las repeticiones era de aproximadamente 650 pb que fueron 10 cepas mientras que 3 de estas fueron diferentes presentando una de ellas dos bandas con pesos de 400 pb y 500 pb respectivamente, otra con una banda de aproximadamente con 900 pb y la última con dos bandas con pesos de 600pb y 1000 pb. Esto manifiesta de manera clara que dentro de una misma especie las características genéticas de estas pueden ser diferente demostrando que la variabilidad genética se presenta en cualquier tipo de organismos.

RECOMENDACIONES

- Aplicar las técnicas apropiadas para la reactivación de las bacterias ya que gracias al crecimiento correcto se pudo obtener buenos resultados finales.
- Crear un manual de biología molecular el cual contenga varios protocolos de análisis que puedan ser utilizarlos como base para una investigación, ya que muchas de las veces no es tan fáciles encontrar la información suficiente para poder realizar varios de los procedimientos inmersos en un proyecto que trate de genética, esto sería de gran utilidad para estudiantes, así como para docentes disminuyendo el prueba y error con el aporte de datos de previas investigaciones.
- Tener pleno conocimiento acerca del cebador el cual se utilizará asegurando de esta manera que durante la secuenciación se logre la amplificación correcta de las bandas ya que por el contrario los resultados no reflejarán valores por lo que la investigación no producirá un objeto de estudio haciéndolo inservible para su análisis.
- Al momento de realizar la medición de los pesos moleculares tener muy en cuenta de que sea lo más exacto posible ya que gracias a eso se puede realizar las comparaciones y el análisis necesario.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ucm.es. [citado el 16 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-56185/19-La%20recombinación%20genética%20en%20procariontes.pdf>
2. Fernández F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. ELSEVIER. 2004;
3. Baron S. Medical Microbiology. 4a ed. University of Texas Medical Branch; 1996.
4. de la Concepción Gorrín Alemán DI, Rodríguez DJ, Dianelys Quiñones D. Aislamientos de Enterococcus en muestras clínicas [Internet]. Medigraphic.com. [citado el 26 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medicadelcentro/mec-2012/mec123f.pdf>
5. Bernardo A. Hipertextual.com. [citado el 26 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://hipertextual.com/2017/02/bacterias-antibioticos-resistencia>.
6. Sellarés MF. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE [Internet]. Tdx.cat. [citado el 16 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2415/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
7. Agua de riego [Internet]. Lenntech.es. [citado el 17 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.lenntech.es/aplicaciones/riego/agua-de-riego.htm>
8. PérezI MMD, Martínez DCR, Zhurbenko DR. Aspectos fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2010;
9. Intagri.com. [citado el 18 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.intagri.com/articulos/agua-riego/sistema-de-riego-por-goteo>.

10. Capítulo 1 - CONTAMINACIÓN agrícola de los recursos hídricos: Introducción [Internet]. Fao.org. [citado el 17 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/w2598s/w2598s03.htm>
11. Parra R. Bacterias Acido Lacticas: Papel funcional en los alimentos [Internet]. Org.co. 2010 [citado el 10 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>
12. Infecciones por enterococos [Internet]. Msdmanuals.com. [citado el 17 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-enterococos>
13. T A, A S, U S, C F. In vitro activity of linezolid & quinupristin/dalfopristin against Gram-positive cocci. Vol. VI(120. US National Library of Medicine National Institutes of Health; 2004.
14. Guardado R, Asensi V, Torres JM, Pérez F, Blanco A, Maradona JA, et al. Post-surgical enterococcal meningitis: clinical and epidemiological study of 20 cases. *Scand J Infect Dis.* 2006;38(8):584–8.
15. Pedrosa Amado A. Reacción en cadena de la polimerasa. *Arch méd Camagüey.* 1999;3(2):0–0.
16. E B. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. US National Library of Medicine National Institutes of Health; 1990.
17. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335–50.
18. Díaz GC. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen [Internet]. Uma.es. 2014 [citado el 12 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>

19. Método: Gel de electroforesis Agarosa [Internet]. Conogasi.org. 2017 [citado el 23 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-electroforesis-agarosa>
20. CONABIO. Variabilidad genética [Internet]. Gob.mx. [citado el 17 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/genes/vargenetica.html>
21. Bello R. Papel de la variabilidad genética en las enfermedades mendelianas y multifactoriales. Vol. V(155. US National Library of Medicine National Institutes of Health; 2019.
22. National Food Institute. PROTOCOL FOR PCR AMPLIFICATION OF E. FAECIUM AND E. FAECALIS RECOMMENDED BY THE EURL-AR. 2014 [Internet]. Eurl-ar.eu. [citado el 11 de otoño de 2019]. Disponible en: https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/21-protocols/281_protocol-for-enterococcus-final-vs3.pdf
23. Lorena P, Beatrice H, Soledad P, Leonardo C. Enterococcus sp Parte I. Revista Chilena Infectol. 2007;24(3).
24. Díaz Pérez M, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos. Rev cuba hig epidemiol. 2013;51(1):97–110.
25. Dickinson B. BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar [Internet]. Wwww.bd.com. [citado el 12 de diciembre de 2019]. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
26. P. C. Electroforesis [Internet]. National Human Genom Research Institute. [citado el 23 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>

27. Schell C. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Enterococcus* spp aisladas de líquidos obtenidos por punción provenientes de infecciones invasivas humanas [Internet]. [Facultad de Ciencias Médicas]: Universidad Nacional de la Plata; 2018 [citado el 15 de noviembre de 2019]. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/73675/Documento_completo.pdf-PDFA2u.pdf?sequence=1&isAllowed=y
28. Protocols - EU reference laboratory – antimicrobial resistance [Internet]. Eurl-ar.eu. [citado el 7 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.eurl-ar.eu/protocols.aspx>
29. Galvis F, Carrillo y. M. Identificación y Caracterización Molecular de Aislados de *Burkholderia glumae*, Agente Causante del Añublo Bacterial en el Cultivo de Arroz. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v26n3/art06.pdf>
30. RCTA, editor. El riego con aguas de mala calidad en la agricultura urbana. Aspectos a considerar. II. Aguas residuales urbanas [Internet]. Vol. 16. RCTA; 2007 [citado el 7 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/932/93216306.pdf>
31. Garza-Velasco R, Hernández-Acosta K, Mejía-Chávez y. AG. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis* [Internet]. Unam.mx. [citado el 7 de diciembre de 2020]. Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Enterococcus.pdf>
32. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [Internet]. Khanacademy.org. [citado el 7 de diciembre de 2020]. Disponible en: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr>
33. Guerrero DLJ. Determinación del tipo de mecanismo de resistencia de *Enterococcus* spp resistentes a la vancomicina por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en aislados de muestras clínicas [Internet]. [Facultad de Ciencias Médicas]: Universidad Central del Ecuador; 2017 [citado el 11 de diciembre de

2019]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14147/1/T-UCE-0008-BC013-2018.pdf>

34. I. Martha Graciela Rocha Munive, Andrea González González y Xitlali Aguirre Dugua3 [Internet]. Gob.mx. [citado el 19 de diciembre de 2019]. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/adn.pdf>
35. Mishell del Rosario CS. Bacterias patógenas para el hombre aisladas en productos agrícolas provenientes de la cuenca del Rio Guano. Universidad Nacional de Chimborazo,2019; 2019.
36. Anyeli Yomira LC. Diagnóstico bacteriológico en productos agrícolas de la cuenca del rio Chanchán, 2019. Universidad Nacional de Chimborazo,2019; 2501.
37. Chicaiza Guanoluiza ED. Determinación de bacterias de interés clínico en productos agrícolas con riego del río Chibunga. Universidad Nacional de Chimborazo,2019; 2019.
38. Perucho M, Welsh J, Peinado MA, Ionov Y, McClelland M. Fingerprinting of DNA and RNA by arbitrarily primed polymerase chain reaction: applications in cancer research. *Methods Enzymol.* 1995; 254:275–90.
39. Arribas R, Tòrtola S, Welsh J, McClelland M, Peinado MA. Arbitrarily Primed PCR and RAPDs. En: Micheli MR, Bova R, editores. *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1997. p. 47–53.
40. Item 1006/929 [Internet]. Repositorioinstitucional.mx. 2019 [citado el 24 de enero de 2021]. Disponible en: <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/929>
41. Schell CMB. Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de líquidos obtenidos por punción provenientes de infecciones invasivas humanas. Universidad Nacional de La Plata; 2019.

ANEXO 1: Evidencias Fotográficas



Imagen 8: Preparación de las muestras 1) Preparación de agar TSB para inocular las bacterias y nutrirlas 2) Cultivo de las bacterias en Agar Sangre 3) microtubos codificados para crioconservarlos.
Elaborado por: Lara Klever y Suarez Leandro proyecto Patrón de bandas genéticas en diferentes *Enterococcus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo.

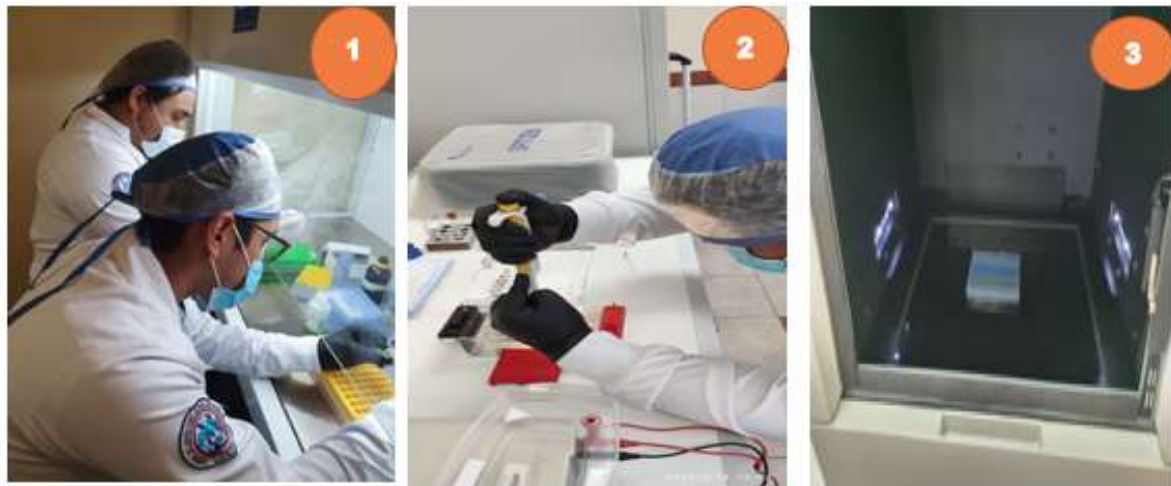


Imagen 9: Extracción de ADN 1) Extracción de ADN con el reactivo DNAzol 2) Depositando la muestra para verificar el ADN por electroforesis 3) Colocando el gel de Agarosa en el revelador
Elaborado por: Lara Klever y Suarez Leandro proyecto Patrón de bandas genéticas en diferentes *Enterococcus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo.



Imagen 10: Reacción en la cadena de la polimerasa PCR 1) Preparación de los reactivos para realizar la PCR 2) ubicación de las muestras en el Termociclador 3) preparación del gel de Agarosa

Elaborado por: Lara Klever y Suarez Leandro proyecto Patrón de bandas genéticas en diferentes *Enterococcus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo.



Imagen 11: Deposito de muestras para el recorrido por electroforesis 1) Deposito de las muestras en los pocillos del gel de agarosa 2) Recorrido en la cámara de electroforesis 3) revelado en el computador del gel de agarosa

Elaborado por: Lara Klever y Suarez Leandro proyecto Patrón de bandas genéticas en diferentes *Enterococcus* aislados en productos agrícolas y aguas de riego de la provincia de Chimborazo.