

Diversidad genética, formación de biopelícula y genes de virulencia de *Enterococcus faecalis* aislados de muestras de cavidad oral relacionadas con el tratamiento de endodoncia

Ortega Hugo, Rodríguez Adriana, Méndez Catalina, Gómez Oscar, Hurtado Daniela

RESUMEN

El fracaso de la terapia endodóntica está relacionado a la persistencia de *Enterococcus faecalis*, y su patogenicidad se asocia a la capacidad de formar biopelículas, expresar genes de virulencia, resistencia a los antibióticos, y sobrevivir tanto a condiciones ambientales adversas como a los procesos de irrigación, preparación biomecánica y materiales de obturación empleados en endodoncia. Sin embargo, se desconoce si existe un genotipo característico de los aislamientos de *Enterococcus faecalis* aislados de cavidad oral, y cuál es la relación de estos con los factores de virulencia.

Este estudio analiza la diversidad genética en aislamientos provenientes de muestras de cavidad oral y de origen endodóntico, a los cuales se les detectó la presencia de los genes *Asa*, *Esp*, *Efa A*, *Ace*, *Asa373*, *gelE*, *CylA*, formación de biopelícula, y se analizó la diversidad genética mediante árboles filogenéticos elaborados a partir del alineamiento de secuencias del producto amplificado de una PCR 16S rRNA. El análisis bioinformático permitió observar que existen varias agrupaciones genéticas, siendo estas, diferentes entre todos los pacientes, pero con un alto grado de similitud entre muestras de un mismo paciente. La presencia de genes de virulencia y formación de biopelícula es independiente a la agrupación genética, pero está relacionada al tipo de muestra.

Palabras Claves: *Enterococcus faecalis*, Gen 16s ribosomal, filogenia.

ABSTRACT

The failure of endodontic therapy is related to the persistence of *Enterococcus faecalis* and its pathogenicity is associated with the ability to form biopelículas, express virulence genes, resistance to antibiotics, and survive both adverse environmental conditions and irrigation processes. preparation and filling materials used in endodontics. However, it is unknown whether there is a characteristic genotype of *Enterococcus faecalis* strains isolated from the oral cavity, and what is the relationship between these and virulence factors.

This study analyzes the genetic diversity in isolates from oral cavity samples and endodontic origin, in which the presence of genes *Asa*, *Esp*, *EFA*, *Ace*, *Asa373*, *gelE*, *CylA*, biopelícula formation was detected, and the presence of the genes was analyzed. Genetic diversity through phylogenetic trees made from the sequence alignment of the amplified product of a 16S rRNA PCR. The bioinformatic analysis allowed us to observe that there are several gene groups, these being different among all patients, but with a high degree of similarity between samples from the same patient. The presence of virulence genes and formation of biopelícula is independent of gene cluster but is related to the type of sample.

Key Words: *Enterococcus faecalis*, Gen 16s ribosomal, phylogeny.

INTRODUCCIÓN

El factor principal asociado al fracaso en el tratamiento de endodoncia es la persistencia de la infección microbiana en el sistema de conductos radiculares. Los microorganismos implicados pueden sobrevivir a los procedimientos biomecánicos que se realizan durante la ejecución de dicho tratamiento, o pueden invadir los conductos como consecuencia de las filtraciones que se suscitan desde la corona de los dientes^{1,2,3}.

Diversos estudios han revelado que los microorganismos que se encuentran en la infección endodóntica y en dientes que presentan fracaso del tratamiento de endodoncia son predominantemente anaerobios facultativos y Gram positivos, siendo *Enterococcus faecalis* (EF), la especie que se aísla con mayor frecuencia. El papel de los factores de virulencia de EF a nivel de cavidad oral, no se ha dilucidado por completo y ha llamado la atención su capacidad para potenciar la infección y generar respuestas exacerbadas. Estos aislamientos a nivel del diente, incluso en presencia de un ambiente nutricional restringido pueden poseer diversos mecanismos de virulencia dependientes del proceso de intercambio genético entre ellos, durante la infección^{4,5,6}.

Los factores de virulencia relacionados a esta capacidad de supervivencia son: la proteína fijadora de colágeno (*ace*), la sustancia de agregación (*asa* y su variante *asa373*), activador de hemolisina (*CylA*), el antígeno de endocarditis (*Efa A*), la proteína de superficie (*esp*), la enzima Gelatinasa (*gelE*). La expresión de estos genes en la biopelícula endodóntica puede permitir o exacerbar distintas respuestas tisulares en la región periapical⁷. Por esta razón, se sugiere que las investigaciones evalúen los mecanismos de persistencia y su asociación a factores de virulencia, con el fin de comprender su papel en las infecciones endodónticas^{8,9}.

EF está ampliamente distribuido en la naturaleza, a nivel odontológico EF ha sido aislado de mucosa oral, dorso de la lengua, infecciones pulpares y periapicales, y por último en bolsas periodontales. Aunque se desconoce como llegan a esta parte del cuerpo, se conoce que tiene la capacidad de evolucionar adaptándose a diferentes medios biológicos, y causando diversas infecciones, ha hecho que su epidemiología cambie, pues los aislamientos en el conducto radicular no sólo tienen capacidad de sobrevivir a la adversidad del medio, sino que expresan diversos genes de virulencia, y muestran resistencia antimicrobiana a los regímenes de tratamiento convencionales recomendados para procedimientos dentales^{10,11}.

Teniendo en cuenta la importancia clínica de EF y su amplia distribución en la naturaleza y en el cuerpo humano, un objetivo de su estudio ha sido la comprensión de las relaciones entre aislados de diferentes fuentes, como un mecanismo para establecer el origen de la contaminación o de la infección, o la capacidad de transferir genes de resistencia a antimicrobianos o de virulencia a aislamientos no patógenos¹¹.

todos los aislamientos expresan los mismos genes de virulencia y resistencia, razón por la cual se sugiere que un análisis de diversidad genética debe realizarse con genes cuya expresión sea común para todos los aislamientos, pero que, a su vez permita ver diferencias significativas para poderlas clasificar en agrupaciones genéticas o cluster siendo la subunidad ribosomal 16S rRNA la de mejor aplicación para EF^{8,9,13}.

Bajo el contexto dado y el vacío de conocimientos planteado para el tema, el presente trabajo busca evaluar si en una población de EF provenientes de aislamientos realizados en pacientes que acuden a consulta de endodoncia, existe algún tipo de agrupación genética, y si la diversidad de esta se asocia a la presencia de genes de virulencia, la formación de biopelícula o al tipo de muestra de la cual fue aislado el EF.

METODOLOGIA

Estudio transversal de muestreo por conveniencia, a partir de 30 aislamientos de *E. faecalis* provenientes de hisopado de mucosa oral, conos de papel, eyectores, limas endodónticas K, y material de obturación gutapercha, tomado de individuos que acudieron a tratamiento endodóntico. La identificación del microorganismo se realizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOFMS Biotyperidentification (Bruker, Daltonics, Alemania) y la base de datos estándar (BrukerTaxonomy database version3.3.1); la detección de los genes de virulencia se realizó por PCR con primer específicos para cada gen; la formación de la biopelícula se realizó mediante análisis espectrofotométrico a 595nm de un cultivo continuo en placas de poliestireno. Para el análisis de la diversidad genética de las cepas, se realizó amplificación del gen que codifica para la subunidad del ribosoma bacteriano 16S rRNA con primer universales, y posterior secuenciación. La secuencia del producto amplificado fue analizada en el programa MEGA versión 6, y el alineamiento múltiple realizado en Clustal - Múltiple Sequence Alignments. Para mirar la diversidad genética, se construyó a partir de los alineamientos, un árbol filogenético por medio de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). La relación entre genes – biopelículas, y diversidad genética mostrada en el árbol, se evaluó mediante pruebas estadísticas no paramétricas.

RESULTADOS

Para cumplir el primer objetivo *EF* fue identificado mediante MALDI-TOF-MS Biotyperidentification (Bruker, Daltonics, Alemania) y la base de datos estándar (BrukerTaxonomy database version3.3.1). Se identificaron el 100% de los aislamientos mediante comparación de los espectros de los datos obtenidos contra la base espectral de las proteínas ribosómicas 16S y glucoproteínas de pared de 5000 especies que referenciaban marcadores de 2000 a 20000 dalton ⁵³De acuerdo con los puntos de corte establecidos para identificar género y especie los 30 aislamientos se ubicaron en puntajes mayores a 2.300 (color verde), valores que son considerados consistentes y de alta probabilidad para la identificación de género y especie. La Tabla 1 muestra los puntos de corte usados por el software para la interpretación de resultados, y la tabla 2 los datos obtenidos para las 30 aislamientos testeadas.

Tabla 1. Puntos de corte de los puntajes asignados en Bruker Daltonik MALDI Biotyper para la Identificación de *EF*

Rango del puntaje	Descripción	Simbología	Color
2.300 ... 3.000	Alta probabilidad de identificación que incluye especie, subespecie	(+++)	Verde
2.000 ... 2.299	Segura identificación del género con probable identificación de especie	(++)	Verde
1.700 ... 1.999	Probable identificación de género sin identificación segura de especie	(+)	Amarilla
0.000 ... 1.699	Identificación no confiable	(-)	Roja

Tabla 2. Puntajes obtenidos en el programa BrukerTaxonomy database versión 3.3.1 para identificar género y especie en los 30 aislamientos de *EF* utilizados en el estudio

Aislamiento	Score	Aislamiento	Score	Aislamiento	Score
No 01	2.385	No 11	2.924	No 21	2.508
No 02	2.235	No 12	2.982	No 22	2.367
No 03	2.408	No 13	2.319	No 23	2.300
No 04	2.451	No 14	2.389	No 24	2.300
No 05	2.306	No 15	2.316	No 25	2.300
No 06	2.381	No 16	2.415	No 26	2.400
No 07	2.584	No 17	2.319	No 27	2.500
No 08	2.532	No 18	2.375	No 28	2.350
No 09	2.426	No 19	2.359	No 29	2.450
No 10	2.453	No 20	2.474	No 30	2.510

Detección de los genes de virulencia

1.Frecuencia absoluta genes de virulencia por aislamiento bacteriano

En cumplimiento del segundo objetivo específico, las PCR primer-específica para genes de virulencia permitieron observar que en el 100% de los aislamientos se detectó al menos la presencia de un gen. El gen que se presentó en mayor proporción fue Ace 100% (30 aislamientos), seguido de Efa A 96.7% (29 aislamientos), y Asa 80% (24 aislamientos). El gen que presentó el menor número de casos fue Asa373 en un 3.3% (1 aislamiento).

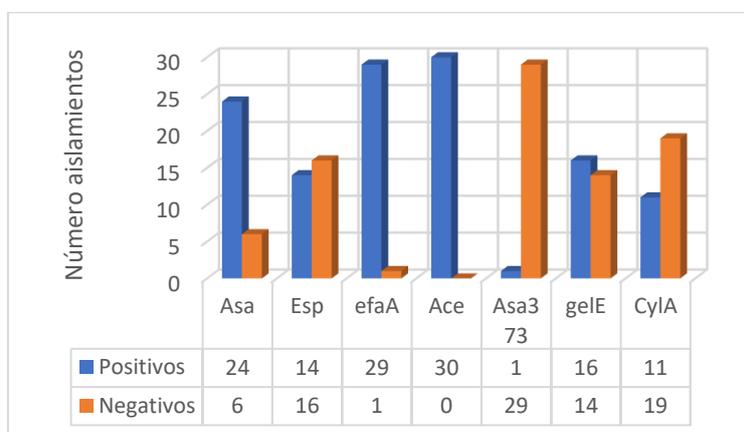


Figura 1. Número total de genes de virulencia detectados en los 30 aislamientos de *EF* utilizados en el estudio.

2.Frecuencia relativa genes de virulencia por tipo de muestra

Analizando los genes por tipo de muestra, pudo observarse que se detectó un número similar de casos para cada uno de los tipos de muestra usados para el aislamiento. La muestra que presenta mayores factores de virulencia es gutapercha y mucosa, cada uno con un 93.3% correspondiente a 28 genes detectados. La muestra en que se detectó el menor número de genes es el cono de papel con un 63.3% correspondiente a 19 genes detectados. En todas las muestras se detectaron 6 genes, y solo en gutapercha hay un caso que reúne la totalidad de los 7 genes analizados.

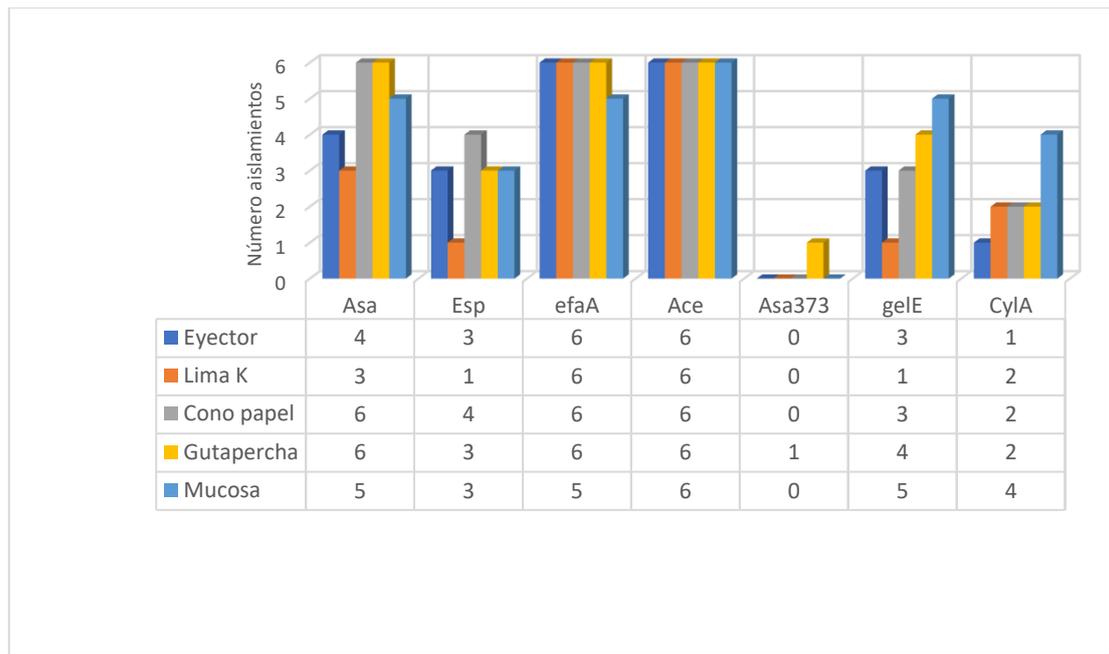


Figura 2. Distribución de genes de virulencia en los 5 orígenes de muestra usadas para el aislamiento de *EF*

3. Formación de biopelícula

3.1. Estandarización placa de micro titulación

En cumplimiento del tercer objetivo específico, se realizó una micro titulación en placa para observar la formación de biopelícula. Los datos mostraron que todos los aislamientos que se consideraron formadores de biopelícula estuvieron por encima del valor del punto de corte positivo, y los que no formaban biopelícula estuvieron por debajo del mismo. Los resultados se validaron solo cuando había reproducibilidad en las réplicas y los controles funcionaban correctamente. La tabla 5 muestra los valores usados para la interpretación. Las mayores densidades ópticas se presentan a nivel de gutapercha (19 a 24), y las más bajas en los eyectores (1 a 6).

Tabla 3. Absorbancias obtenidas para evaluar en la micro titulación en placa la formación de biopelícula por *EF* (Punto de corte base 0.040, en rojo negativo, verde positivo.)

Aislamiento	Score	Aislamiento	Score	Aislamiento	Score
No 01	0.010	No 11	0.060	No 21	0.118
No 02	0.010	No 12	0.019	No 22	0.099
No 03	0.043	No 13	0.041	No 23	0.039
No 04	0.075	No 14	0.050	No 24	0.022
No 05	0.045	No 15	0.077	No 25	0.045
No 06	0.011	No 16	0.020	No 26	0.082
No 07	0.041	No 17	0.049	No 27	0.101
No 08	0.011	No 18	0.042	No 28	0.081
No 09	0.030	No 19	0.120	No 29	0.014
No 10	0.011	No 20	0.100	No 30	0.076

3.2. Aislamientos formadores de biopelícula

A nivel de los aislamientos se pudo observar que en el 63.3% (19 casos) se indujo formación de biopelícula. Todos los tipos de muestras mostraron la formación de biopelícula siendo mayor el número en mucosa y cono de papel, cada uno con 16.6% (5 casos) y los que presentaron el menor número de casos fueron las limas K 6.6% (2 casos).

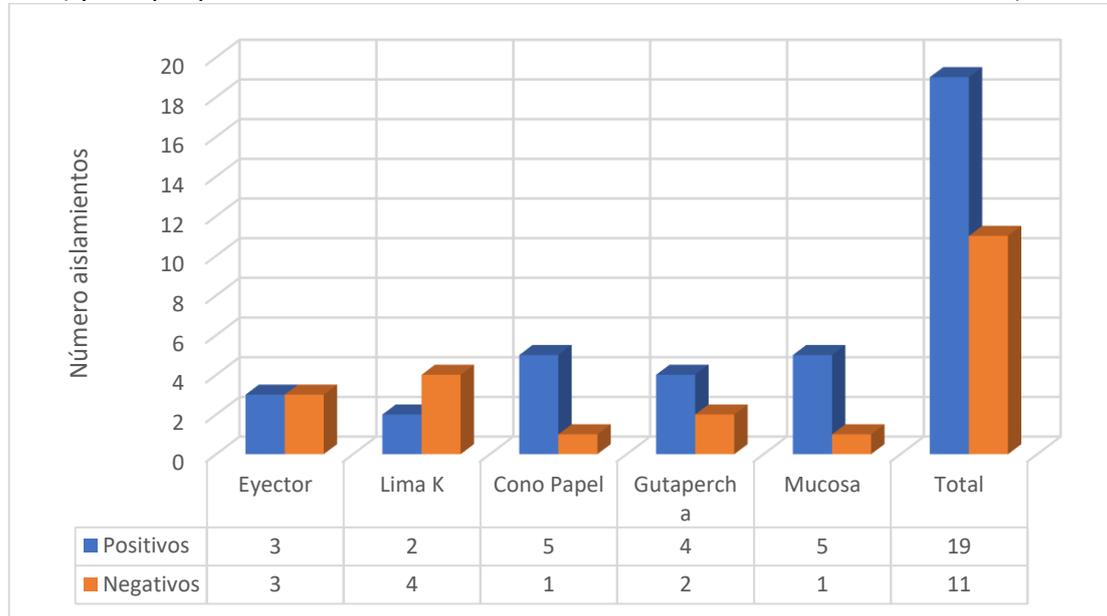


Figura 3. Frecuencia absoluta y frecuencia relativa de la formación de biopelícula en los 30 aislamientos de *EF* usados en el estudio

4. Diversidad genética

4.1. PCR 16s rRNA

En cumplimiento del cuarto objetivo, inicialmente se realizó una PCR 16s rRNA, donde se obtuvo un fragmento aproximado de 960pb en cada uno de los aislamientos realizados, el cual concordaba con lo reportado en literatura, con los aislamientos control utilizadas en el estudio, y posteriormente con la secuenciación realizada.

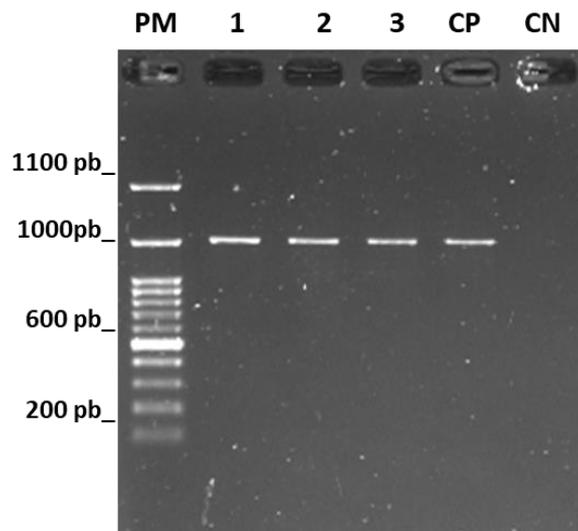


Figura 4. Gel de agarosa 1% con los productos de amplificación de 960pb del fragmento 16s rRNA de *EF*.

PM Marcador de peso molecular, 1-3 aislamientos positivos, CP Control positivo, CN control negativo.

4.2. Secuenciación, BLASTn y cromatograma

Como segundo paso en el cumplimiento de este objetivo, los productos de amplificación de la PCR 16s rRNA se secuenciaron a través de un servicio técnico. Dicha secuencia se utilizó para hacer un análisis BLASTn de cada muestra y verificar que correspondía a un *EF* y en segundo lugar para realizar un análisis filogenético.

El análisis BLASTn mostró que para la subunidad 16s ribosomal, la secuencia obtenida guarda una identidad mayor al 98.5% con más de 100 aislamientos de *EF* reportadas en el Gen bank.

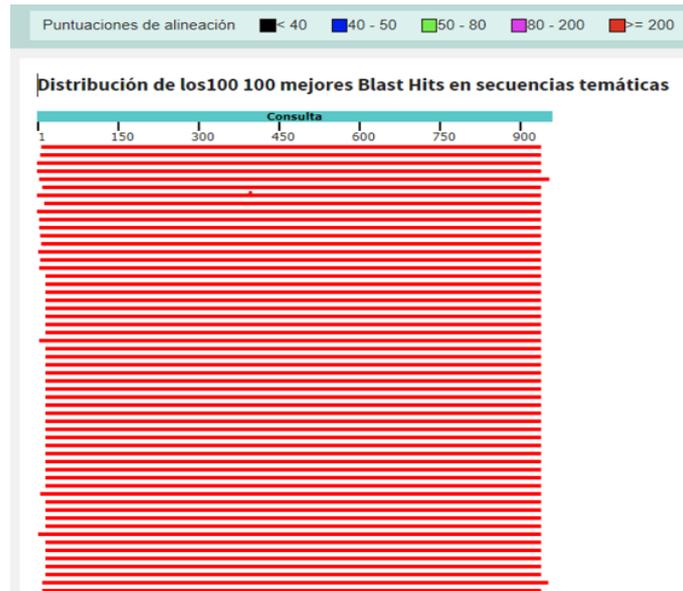


Figura 5. BLASTn de la secuencia de los productos de amplificación por PCR 16s rRNA de *EF*. Las líneas rojas corresponden a secuencias de *EF* reportados en otros estudios donde todos tienen similitud elevada en el score de identidad.

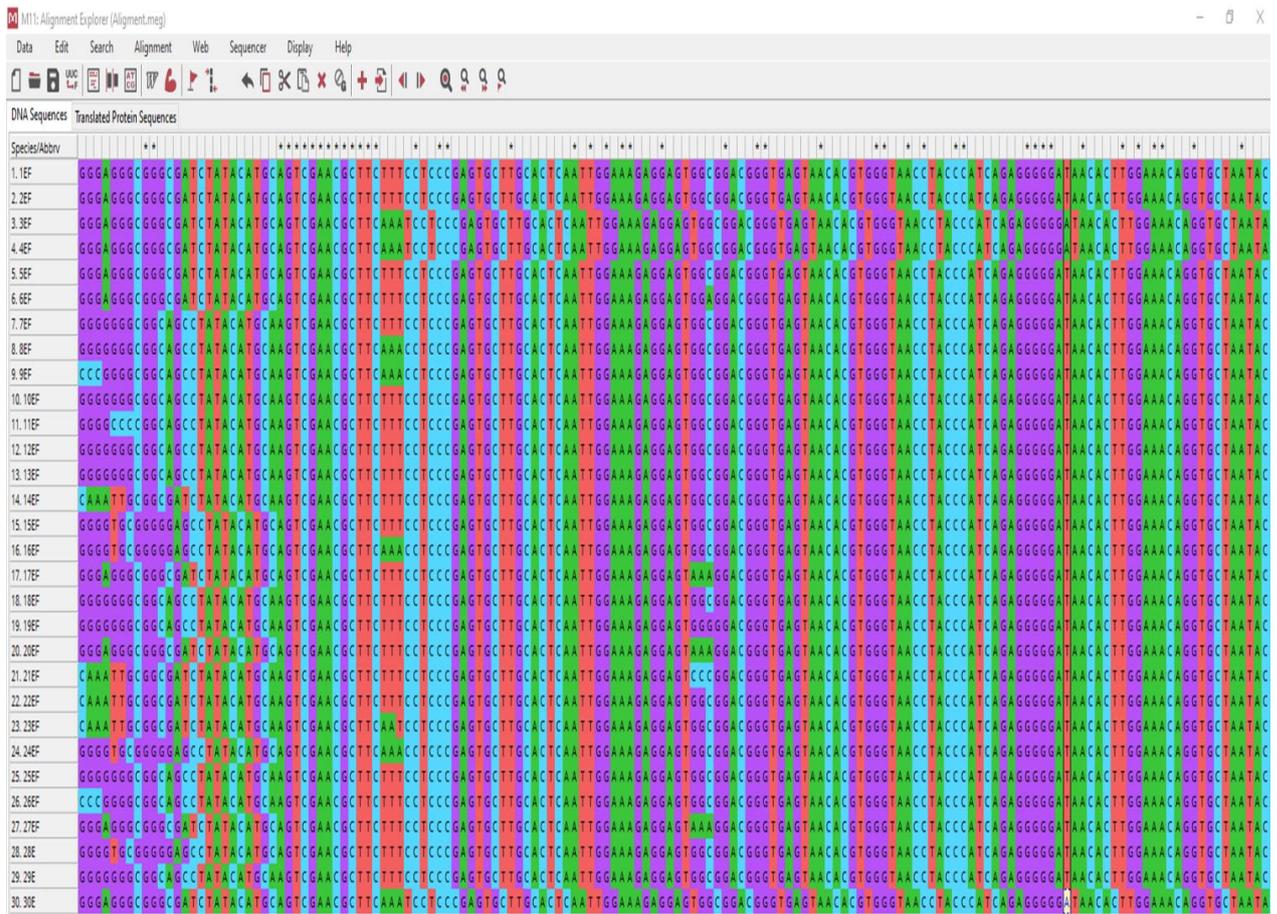


Figura 6. Cromatograma de la secuencia del amplificado de la PCR 16s rRNA de *EF* del estudio.

5. Análisis filogenético

Como segunda actividad en el cumplimiento del cuarto objetivo, a partir del cromatograma obtenido se realizó el alineamiento múltiple (Clustal- Multiple Sequence Alignments) para la construcción del árbol a partir de las distancias evolutivas usando la metodología UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

El árbol mostró que a nivel de muestras Inter paciente, hay diversidad genética en los aislamientos, y que estos se agrupan en 5 clúster diferentes (líneas de color).

Sin embargo, en muestras intra paciente (encerradas en cuadro de color azul claro), existe un elevado grado de similitud. Es así como, como 4 y 30; 15 y 28; 16 y 24 se ubican en la misma rama indicándonos que tienen un alto grado de homología, en tanto, que las muestras 7 y 29 aunque parten de la misma rama al final se ubican en diferente posición. Igual situación se presenta con las muestras 17, 20, 27, donde comparten homología, pero al final la 17 se ubica aparte de las otras dos.

Analizados los aislamientos por origen de la muestra, hay un comportamiento heterogéneo en los resultados. Se ubican en tres diferentes agrupaciones como las de lima K (muestras 7 a 12), conos de papel (muestras 13 a 18), gutapercha (muestras 19 a

24), mucosa (muestras 25 a 30). Solo las del eyector (muestras 1 a 6) parten de un ancestro común (cuadro de fondo amarillo).

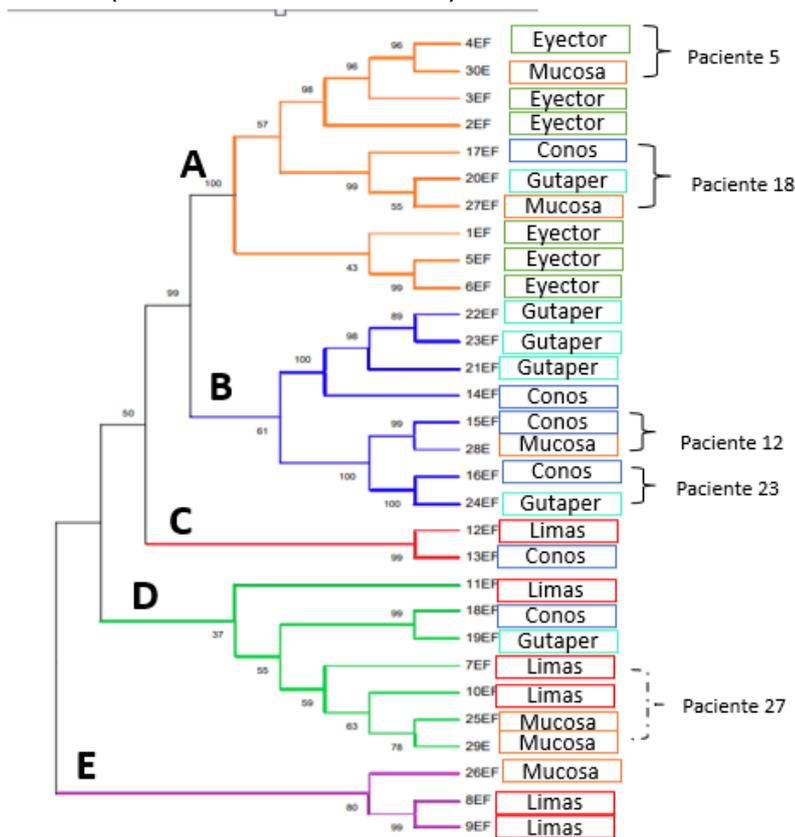


Figura 7. Árbol filogenético de las secuencias del producto de PCR 16S rRNA que muestran cinco agrupaciones principales entre los aislamientos de *EF* del estudio.

*Las agrupaciones parte de una línea de color diferente para cada agrupación; cuadros azules son muestras de un mismo paciente y cuadros amarillos son muestras del mismo origen.

DISCUSIÓN

EF es ubicuo y ha sido aislado de diferentes nichos, incluidos el tracto gastrointestinal, las heces, la sangre, la orina, el agua, alimentos fermentados y en la cavidad oral, aunque este constituye solo una pequeña proporción de la flora inicial de los dientes con pulpas necróticas no tratadas, los enterococos, particularmente *EF* se ha encontrado con frecuencia en conductos radiculares obturados, dando como resultado el fracaso de este tratamiento²². Estos datos concuerdan con Pinheiro y cols. destacan que *E. faecalis* fue la bacteria más frecuentemente aislada de los sistemas de conductos radiculares (45,8%) en casos previamente tratados.⁵⁴ Siqueira y Roças y Sedgley y cols. informaron resultados similares.⁵⁵⁵⁶ Observaron que la prevalencia de *E. faecalis* fue del 77 % y el 79,5 %, respectivamente, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.⁵⁷

Existen diferentes técnicas para la identificación de microbiológica de *EF* como cultivos, pero estos presentan ciertas desventajas como el alto riesgo de contaminación de la muestra, se necesita un alto nivel de habilidad para obtener resultados óptimos, prolongado tiempo y dependiendo de las características del método y el fundamento bioquímico del medio, algunos identifican solo género o género especie, pero no llegan a subespecie.⁵⁸ Mientras que el análisis de identificación por MALDI TOF presenta unas características operativas ventajosas como es la rapidez, automatización, fácil manejo,

y a nivel microbiológico permite una identificación a nivel de género y especie, en ocasiones subespecies, eliminando los sesgos de falsos positivos/negativos o resultados incompletos que se pueden presentar en métodos convencionales.^{59,60} En este estudio se identificó al *EF* con una puntuación muy alta de los aislamientos mediante MALDI-TOF-MS, dando un alto grado de confianza de los resultados de la identificación para cada muestra, indicando una alta congruencia con los resultados de otros estudios como el de Saha y cols.⁶¹ sobre la identificación bacteriana alrededor de implantes dentales donde todos los aislados bacterianos fueron identificados en el sistema MALDI-TOF sin fallar. De la misma manera Werner y cols.⁶² en su estudio sobre la identificación de estreptococos de mastitis confirman la superioridad de MALDI-TOF MS comparado con los esquemas de identificación clásicos, indicando una alta calidad en la identificación de especies. Amitabh y cols.⁶³ igualmente indicaron que el uso de técnicas avanzadas como MALDI-TOF MS es útil presentando una alta identificación para la detección de patógenos periodontales.

Los *EF* identificados en cavidad oral y endodoncia se caracterizan por presentar genes de virulencia como son *Asa*, *Asa373*, *Esp*, *Efa A*, *Ace*, *gelE* y *CylA*, en este estudio en todos los aislamientos se detectó al menos la presencia de un gen. El gen que se presentó en mayor proporción fue *Ace* 100%, seguido de *EFA* 96.7%, y *Asa* 80%. El gen que presentó el menor número de casos fue *Asa373* en un 3.3%. Estos resultados son similares al estudio de Barbosa y cols.⁷ que detectaron *Ace* en un 100% de los aislamientos, seguido de *EFA* con un 95% y el *Asa* con un 60%, igual que en el presente estudio *Asa373* obtuvo el menor porcentaje con un 15%. *Ace* es una adhesina al colágeno de *EF* expresada condicionalmente después del crecimiento en suero o en presencia de colágeno, es un factor importante para el establecimiento de estas bacterias en la dentina de los conductos radiculares infectados. Por otra parte, se planteó la hipótesis de que *EFA* podría ser una adhesina en la endocarditis, la producción de *EFA* por aislamientos de *E. faecalis* es común. Al igual que en el presente estudio Sedgley y Zhu y cols.^{38,64} encontraron una alta prevalencia de *Ace* y *EFA* en todas las muestras endodónticas. El gen *Asa* con altos porcentajes al igual que el estudio de Zhu y cols. se indica que esta es una adhesina bacteriana codificada por un plásmido sensible a las feromonas que media el contacto eficiente entre la bacteria donante y la receptora, lo que facilita el intercambio de plásmidos, además media la unión a las proteínas de la matriz extracelular, incluido el colágeno tipo I, la unión al colágeno tipo I por bacterias puede ser de particular importancia con respecto a las infecciones endodónticas porque este es el principal componente orgánico de la dentina.

El gen *Asa373* difiere del *asa* clásico en su estructura proteica y se informó que exhibe algunos motivos de aminoácidos moderadamente conservados cuando se comparó su secuencia de base de datos con la de algunas otras adhesinas bacterianas. El gen *Asa373* se identificó con un 3,3% de los aislamientos en nuestro estudio, lo que no concuerda con los hallazgos de Sedgley y Zhu y cols.^{38,64} en donde no detectaron este gen en las muestras, esto puede deberse a que en los estudios de Sedgley y Zhu y cols.^{38,64} se toman solo muestras endodónticas y en nuestro estudio se toman muestras endodónticas y orales.

Adicional a factores de virulencia, se ha visto la formación de biopelículas debido a la persistencia del *EF* después del tratamiento del conducto radicular, esto puede estar

asociado con su capacidad para inducir precipitación de apatita en las biopelículas maduras, la habilidad del *EF* para formar una biopelícula calcificada sobre la dentina de los conductos radiculares puede ser un factor que contribuya a su persistencia después del tratamiento endodóntico. En este estudio se encontró a nivel de los aislamientos que en el 63.3% se indujo formación de biopelícula y eso es similar a lo reportado por Francisco y cols., donde evaluaron aislamientos de *EF* presentaron formación de biopelícula en un 84%, de igual manera en el estudio de Wang y cols. confirmó un total de 75,47% de las cepas fueron biopelículas positivas, el porcentaje mayor comparado con nuestro estudio puede deberse a que en este trabajo se tomó solo muestras de origen endodóntico y no se tomaron de origen oral. La biopelícula puede localizarse dentro del sistema de conductos pudiéndose ocultar en diversas irregularidades anatómicas lo cual complicaría el tratamiento para erradicarlo, o también en la región periapical cuyo aporte nutritivo circulatorio, mucho más importante que el de la pulpa, les propiciará a los microorganismos una poderosa vía de difusión y diseminación para localizarse extrarradicularmente²³. Duggan y cols.⁶⁵ evaluaron la formación de biopelículas por parte de aislamientos aisladas de *E. faecalis*, provenientes de conductos radiculares y de la cavidad oral, sus resultados señalan al igual que el presente estudio que no existe diferencia significativa entre la habilidad de *E. faecalis* de formar biopelículas y la fuente de aislamiento. Esto se debe a que tanto los conductos radiculares y la cavidad oral presentan condiciones ambientales y nutricionales para la formación de biopelícula.

Se considera que *EF* es el responsable de los fracasos endodónticos, pero se desconoce cómo estos llegan a cavidad oral. En este estudio se encontró que está distribuido en lima K, conos de papel, gutapercha, mucosa, eyector y esto difiere de otros estudios que han tomado muestras de diferentes partes como es el reportado por Anderson y cols.²⁷ quienes tomaron muestras del conducto radicular obturado, placa dental-saliva, infección nosocomial y de alimentos. De la misma manera Delboni y cols.⁶⁶ tomaron de 3 sitios diferentes que fueron la saliva, cámara pulpar y conductos radiculares. Al igual que Segdeley y cols.⁵⁶ que tomaron muestras de lengua, enjuague bucal, surco gingival y en los conductos radiculares. Se observa una que no hay lugares establecidos para la recolección de muestras, debido a que cada estudio toma muestras dependiendo a su conveniencia.

Si bien este trabajo no permite conocer la fuente de contaminación, algunos autores sugieren que existe una gran incertidumbre si esas bacterias que persisten en los conductos radiculares se mantuvieron de la infección original, pudiendo resistir los protocolos de desinfección, irrigación y obturación endodóntica, o si provinieron de la saliva y pudieron invadir el sistema de conductos radiculares a través de una filtración por un material de restauración defectuoso.^{66,67} Existe otra hipótesis es que *EF* coloniza transitoriamente la cavidad oral por una vía exógena de infección transmitida por los alimentos^{39,66,68}. *EF* sobrevive en estos sitios como lo indicaron ciertos autores como Montero, Kayaoglu y cols.^{22,69} quienes demostrando que los conos de gutapercha comercialmente disponibles, tomados directamente del paquete sellado del fabricante, albergan microorganismos cultivables, mientras mayor fue el uso clínico de los paquetes igualmente aumentó el número de microorganismos que contaminan los conos de gutapercha.

Para sobrevivir y adaptarse a estos sitios, *EF* necesita tener una plasticidad genética que le permita adaptarse a los diferentes ambientes. Esa plasticidad se evalúa mediante

Filogenia, que es un tipo de clasificación científica que considera de manera única las relaciones evolutivamente cercanas entre las especies que habitan en nuestro planeta.^{30,70,71} Esta información además de ser vital a la hora de conocer una especie, saber por qué tiene tales o cuales características, es súper enriquecedora porque también nos permite conocer a ciencia cierta qué especies provienen de otras, las desapariciones intempestivas de algunas, sus mutaciones, entre otras cuestiones.^{31,34} El ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas, se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana., presentando varias ventajas como en precisión, llegando incluso a competir de manera favorable con otras técnicas rápidas y eficaces, como las inmunológicas.^{72,73}

En este estudio el análisis filogenético mostró una diversidad genética en los aislamientos, en el que se muestra fueron agrupados en 5 cluster diferentes, se observó heterogeneidad genética cuando se compararon entre diferentes sujetos y son similares en un mismo individuo, lo que corrobora los resultados de estudios previos Delboni y cols.⁶⁶ que utilizaron Rep-PCR y AP-PCR con electroforesis en gel con un gel de agarosa y sus muestra provienen de 3 lugares: conducto radicular, cámara pulpar y saliva, mientras que Pinheiro y cols.⁷⁴ que utilizaron métodos de tipificación basados en secuencias electroforesis en gel de campo pulsado y métodos de tipificación basados en secuencias, solo tomaron muestras de conductos radiculares.

Encontrar EF en diferentes partes orales y endodónticas, que se desconoce aún la vía de colonización, con agrupaciones que expresan genes de virulencia, biopelículas y con heterogeneidad genética entre pacientes, presenta un problema por la persistencia de la infección microbiana en el sistema de los conductos radiculares y la dificultad para su eliminación completa de este microorganismo, produciendo en gran medida que se dé el fracaso del tratamiento endodóntico.

CONCLUSIONES

- *EF* es un microorganismo que puede aislarse en diferentes materiales de uso endodóntico como son limas K, eyectores, gutapercha y conos de papel.
- Los aislamientos de *EF* de diferente origen endodóntico expresan de manera diferencial y heterogénea los factores de virulencia, y la generación de biopelícula.
- Existe diversidad genética en los aislamientos de *EF* a nivel endodóntico, y esta varía entre un individuo y otro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fariñas MC, Torres C. Enterococo ¿un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2007;25(8):500-502. doi:10.1157/13109985
2. Díaz A, ed. Aspectos relevantes de *Enterococcus Faecalis* y su participación en las infecciones de origen endodóntico. In: *Aspectos Relevantes de Enterococcus Faecalis y Su Participación En Las Infecciones de Origen Endodóntico*. Carlos

Bóveda;2002:15.http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_55.htm

3. Zischka M, Künne CT, Blom J, et al. Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40. *BMC Genomics*. 2015;16(1):1-20. doi:10.1186/s12864-015-1367-x
4. Pardi, Germán (Profesor Titular, Jefe de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología UCV), Guilarte C (Profesora A de la C de MicrobiologíaJ del D de C, Básicas II, Facultad de Odontología UCV), Cardozo, Elba Inés (Profesora Asociado de la Cátedra de Farmacología y Terapéutica Odontológica, Facultad de Odontología UCV). Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. *Acta Odontológica Venezolana*. 2009;47 N1:1-11.
5. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*. 1998;31(1):1-7. doi:10.1046/j.1365-2591.1998.t01-1-00111.x
6. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a lithuanian population. *Journal of Endodontics*. 2000;26(10):593-595. doi:10.1097/00004770-200010000-00004.
7. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *Journal of Endodontics*. 2016;42(7):1022-1028. doi:10.1016/j.joen.2016.03.015
8. Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira D v, et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. Published online 2014:327-332.
9. Wang L, Dong M, Zheng J, et al. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *Journal of Endodontics*. 2011;37(5):631-636. doi:10.1016/j.joen.2011.02.006.
10. He Q, Hou Q, Wang Y, et al. Comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis*: Insights into their environmental adaptations. *BMC Genomics*. 2018;19(1):1-12. doi:10.1186/s12864-018-4887-3.
11. Padilla C, Núñez M, Padilla A, Lobos O. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de. *Microbiología*. Published online 2011:55-61.
12. Emilio, López Caballero Gonzalo PS. Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. *Sociedad Entomologica Aragonesa*. 1999;26:45-56.

13. Cortés-López NG, Ordóñez-Baquera PL, Domínguez-Viveros J. Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*. 2021;11(4):1150-1173. doi:10.22319/RMCP.V11I4.5202
14. Braga JFV, Leal CAG, Silva CC, Fernandes AA, Martins NR da S, Ecco R. Genetic diversity and antimicrobial resistance profile of *Enterococcus faecalis* isolated from broilers with vertebral osteomyelitis in Southeast Brazil. *Avian Pathology*. 2018;47(1):14-22. doi:10.1080/03079457.2017.1359403
15. Dahln G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiology and Immunology*. 2000;15(5):309-312. doi:10.1034/j.1399-302X.2000.150507.x
16. Carrero Martínez C, Cristina M, Gilbert G, et al. BAJA FRECUENCIA DE *Enterococcus faecalis* EN MUCOSA ORAL DE SUJETOS QUE ACUDEN A CONSULTA ODONTOLÓGICA. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*. 2015;26(2):261-270.
17. Martínez CC, Cristina M, Gilbert G, Alexandra M, Lapiolo M. BAJA FRECUENCIA DE *Enterococcus faecalis* EN MUCOSA ORAL DE SUJETOS QUE ACUDEN A CONSULTA ODONTOLÓGICA. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*. 2015;26(2):261-270.
18. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF, Dos Santos KRN. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Research in Microbiology*. 2011;162(2):151-158. doi:10.1016/j.resmic.2010.09.018
19. Saffari F, Sobhanipoor MH, Shahravan A, Ahmadrajabi R. Virulence genes, antibiotic resistance and capsule locus polymorphisms in *enterococcus faecalis* isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Infection and Chemotherapy*. 2018;50(4):340-345. doi:10.3947/ic.2018.50.4.340
20. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology (N Y)*. 2009;155(6):1749-1757. doi:10.1099/mic.0.026385-0.
21. Covo Morales Eduardo Enrique. EXPRESIÓN DEL GEN Esp (ENTEROCOCCAL SURFACE PROTEIN) DE E *Faecalis* En Un Modelo in Vitro de Dientes Extraídos. 2014.
22. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2004;15(5):308-320. doi:10.1177/154411130401500506.
23. Zambrano de la Peña S, Salcedo-Moncada D, Petkova- Gueorguieva M, Ventocilla Huasupoma M. Biofilm en Endodoncia: una revisión. *Odontología Sanmarquina*. 2017;19(2):45. doi:10.15381/os.v19i2.12918.
24. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto V GH. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados:

Revisión de la literatura. Revista Odontológica Mexicana. 2015;19(3):181-186. doi:10.1016/j.rodex.2015.04.002.

25. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2019;24(3):e364-e372. doi:10.4317/medoral.22907.
26. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPF. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of enterococcus faecalis isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *Journal of Endodontics*. 2016;42(7):1022-1028. doi:10.1016/j.joen.2016.03.015.
27. Anderson AC, Jonas D, Huber I, et al. Enterococcus faecalis from food, clinical specimens, and oral sites: Prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*. 2016;6(JAN). doi:10.3389/fmicb.2015.01534.
28. Komiyama EY, Lepesqueur LSS, Yassuda CG, et al. Enterococcus species in the oral cavity: Prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. *PLoS ONE*. 2016;11(9). doi:10.1371/journal.pone.0163001.
29. Dolinsky AL. A Consumer Complaint Framework with Resulting Strategies : An Application to Higher Education. *Journal of Services Marketing*. 1994;8(3):27-39. doi:10.1108/08876049410065598.
30. Caponi G. Tipología y filogenia de lo humano. *Ludus vitalis: revista de filosofía de las ciencias de la vida = journal of philosophy of life sciences = revue de philosophie des sciences de la vie*. 2012;20(37):175-191.
31. Pace NR, Sapp J, Goldenfeld N. Phylogeny and beyond: Scientific, historical, and conceptual significance of the first tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1011-1018. doi:10.1073/pnas.1109716109.
32. Siqueira JF, Rôças IN, Janeiro R De. *Catonella morbi* and *Granulicatella adiacens* : new species in endodontic infections. Published online 2006:259-264. doi:10.1016/j.tripleo.2005.09.021.
33. SIQUEIRAJR J. Taxonomic Changes of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*. 2003;29(10):619-623. doi:10.1097/00004770-200310000-00001.
34. Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *Journal of Medical Microbiology*. 2007;56(1):110-118. doi:10.1099/jmm.0.46835-0.

35. Ribeiro AC, Matarazzo F, Favari M, Zezell DM, Mayer MPA. Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *Journal of Endodontics*. 2011;37(7):922-926. doi:10.1016/j.joen.2011.04.007.
36. Hong BY, Lee TK, Lim SM, et al. Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing. *Journal of Endodontics*. 2013;39(9):1136-1140. doi:10.1016/j.joen.2013.05.001.
37. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(9):3282-3289. doi:10.1128/JCM.39.9.3282-3289.2001.
38. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GSP, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of enterococcus faecalis isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*. 2010;36(12):1950-1955. doi:10.1016/j.joen.2010.08.053.
39. Vidana R, Sullivan A, Billström H, Ahlquist M, Lund B. Enterococcus faecalis infection in root canals - host-derived or exogenous source? *Letters in Applied Microbiology*. 2011;52(2):109-115. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02972.x.
40. Mahmoud Torabinejad DMD MSD PhD, Ashraf Fouad REWDM. *Endodontics: principles and practice*. Elsevier Health Sciences. Published online 2014.
41. Gomes BPPA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Endodontics*. 2008;34(5):537-540. doi:10.1016/j.joen.2008.01.016.
42. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. *Braz Oral Res*. 2017;31:e108. doi:10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0108.
43. Davoudi Oskouei D, Bekmen N, Ellidokuz H, Yilmaz Ö. EVALUATION OF DIFFERENT CRYOPROTECTIVE AGENTS IN MAINTENANCE OF VIABILITY OF HELICOBACTER PYLORI IN STOCK CULTURE MEDIA. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41:1038-1046.
44. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;26(3):547-603. doi:10.1128/CMR.00072-12.
45. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(3):900-907. doi:10.1128/JCM.02071-09.
46. Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates collected in Sardinia

(Italy). *Journal of Medical Microbiology*. 2003;52(6):491-498. doi:10.1099/jmm.0.05038-0.

47. Helen L. Leavis R, LWJTESEMMACFAHAJ de N and MJMB. The epidemiology of vancomycin-resistant. *Emerging Infectious Diseases*. 2003;9:1108-1115.
48. Vankerckhoven V, van Autgaerden T, Vael C, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(10):4473-4479. doi:10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004.
49. Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, et al. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. *Journal of Endodontics*. 2014;40(2):223-230. doi:10.1016/j.joen.2013.07.023.
50. Kumar A, Kumar D. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*. 2015;33:117-123. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.03.004.
51. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021;38(7):3022-3027. doi:10.1093/molbev/msab120
52. A. PHS SRR. *The Principles and Practice of Numerical Classification*. Numerical Taxonomy.; 1975.
53. García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S, Gajardo SS. Identificación Bacteriana Basada En El Espectro de Masas de Proteínas: Una Nueva Mirada a La Microbiología Del Siglo XXI. Vol 29.; 2012.
54. Et P, Bpfa G, Ccr F, Fb T, Aa Z, Fj S filho. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003;18:100-103.
55. Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a south Korean population. *Journal of Endodontics*. 2004;30(7):504-508. doi:10.1097/00004770-200407000-00011
56. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *Journal of Endodontics*. 2006;32(3):173-177. doi:10.1016/j.joen.2005.10.037
57. Alghamdi F, Shakir M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*. Published online March 13, 2020. doi:10.7759/cureus.7257

58. FIGDOR D, GULABIVALA K. Survival against the odds: microbiology of root canals associated with post-treatment disease. *Endodontic Topics*. 2008;18(1):62-77. doi:10.1111/j.1601-1546.2011.00259.x
59. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011;29(8):601-608. doi:10.1016/j.eimc.2011.03.012
60. Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*. 2018;22:35-45.
61. Saha S, Meenawat A, Sahu C, Srivastava V, Yadav S, Kumar V. Bacterial Identification and Monitoring Around Two-Piece Dental Implants by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *Journal of Laboratory Physicians*. 2020;12(01):49-55. doi:10.1055/s-0040-1714934
62. Werner G, Fleige C, Feßler AT, et al. Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Veterinary Microbiology*. 2012;160(1-2):162-169. doi:10.1016/j.vetmic.2012.05.019
63. Amitabh Srivastava SSCS. Early and accurate detection of bacterial isolates from dental plaque in subjects with primary, mixed, and permanent dentition by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry technique. *J Indian Soc Periodontol*. 2020;24.
64. C. M. Sedgley AMEFACNKADBCD. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiology and Immunology*. 2005;20:10-19.
65. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm Formation of Oral and Endodontic *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2007;33(7):815-818. doi:10.1016/j.joen.2007.02.016
66. Delboni MG, Gomes BPFA, Francisco PA, Teixeira FB, Drake D. Diversity of *Enterococcus faecalis* Genotypes from Multiple Oral Sites Associated with Endodontic Failure Using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. *Journal of Endodontics*. 2017;43(3):377-382. doi:10.1016/j.joen.2016.10.042
67. Estrela C, Rodrigues C, César A, Hollanda B, Moura MS, Pécora JD. Prevalence and Risk Factors of Apical Periodontitis in Endodontically Treated Teeth in a Selected Population of Brazilian Adults. *Braz Dent J*. 2008;19(1).
68. A. Razavi RGTIZ. Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. *Oral Microbiology and Immunology*. 2007;22:248-251.

69. Montero-Aguilar Mauricio JBKMCVCRCZMRodolfo. EFICIENCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESINFECCIÓN DE CONOS DE GUTAPERCHA CON NAOCL, ANTE LAS ESPECIES S. AUREUS Y E. FAECALIS. Published online 2014.
70. Bigoni F, Barsanti G. Evolutionary trees and the rise of modern primatology: The forgotten contribution of St. George Mivart. *Journal of Anthropological Sciences*. 2011;89:93-107. doi:10.4436/jass.89005
71. Cavalier-Smith T. Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;365(1537):111-132. doi:10.1098/rstb.2009.0161
72. Rodicio M del R, Mendoza C. FORMACIÓN MÉDICA CONTINUADA Identificación Bacteriana Mediante Secuenciación Del ARNr 16S: Fundamento, Metodología y Aplicaciones En Microbiología Clínica. Vol 22.; 2004.
73. Valenzuela-González F, Casillas-Hernández R, Villalpando E, Vargas-Albores F. El Gen aARNR 16s en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias Marinas*. 2015;41(4):297-313. doi:10.7773/cm.v41i4.2492
74. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, et al. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006;102(2):247-253. doi:10.1016/j.tripleo.2005.11.031