

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

VERÓNICA DANIELA HURTADO NARVÁEZ



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Colombia

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ
2022

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

VERÒNICA DANIELA HURTADO NARVÀEZ

Trabajo de tesis presentado para optar al título de

MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR

Hugo Díez Ortega, PhD.

CO – TUTORES

Adriana Rodríguez Ciodaro, MSC

Catalina Méndez de la Espriella, OD, Esp. Endodoncia

Oscar Gómez, MD, Farmacólogo, Cd. Psiquiatría

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BOGOTÁ

2022

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N°13 de Julio de 1946

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



VERÓNICA DANIELA HURTADO NARVÁEZ



Hugo Díez Ortega, PhD

Tutor



Adriana Rodríguez, MSc

Cotutor



Catalina Méndez, OD, Endo.

Tutor



Oscar Gómez, MD, MFar, Cd, Psiq.

Asesor

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

BOGOTÁ

2022

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

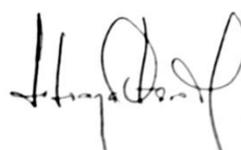
VERÓNICA DANIELA HURTADO NARVÁEZ

APROBADO



Beatriz Elena Ariza, MSc

Jurado



Liliana Margarita Otero, PhD

Jurado



María Cecilia Martínez, MSc

Jurado

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

VERÓNICA DANIELA HURTADO NARVÁEZ

APROBADO

ALBA ALICIA TRESPALACIOS, PhD

Decana

Facultad de Ciencias

JHON JAIROSUTACHAN, PhD

Director de posgrados

Facultad de Ciencias

Bogotá, septiembre de 2022

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y el apoyo en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

A mis padres José y Gloria quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir todas mis metas y sueños, agradecerles por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y constancia, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

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 acompañan en todos mis sueños y metas.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis tutores quienes me han brindado su tiempo y apoyo cuando más lo necesite, con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitieron el desarrollo de este trabajo.

Contenido

RESUMEN	12
1. ALCANCE Y DEFINICION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION	14
2. ESTADO DEL ARTE Y ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	17
2.1 Enterococcus faecalis – EF	17
2.1.1 Generalidades	17
2.1.2 Hábitat oral	17
2.1.3. Factores de virulencia	18
2.1.3.1. Proteína de superficie extracelular (Esp)	19
2.1.3.2. Adhesina de unión al colágeno (Ace)	19
2.1.3.3. Gelatinasa (GelE)	20
2.1.3.4 Sustancia de agregación (Asa) y su variante Asa 373	20
2.1.3.5. Factores de invasión tisular Citolisina (CylA)	21
2.1.3.6. Antígeno específico de endocarditis A (EFA)	21
2.1.4 Formación de Biopelícula	22
2.2 Fracaso tratamiento endodóntico	24
2.3 Análisis molecular y diversidad genética	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo general	28
4.2. Objetivos específicos	28
5. METODOLOGIA	29
5.1 Tipo de investigación:	29
5.2 Grupo de estudio:	29
5.3 Criterios de inclusión	30
5.4 Implicaciones éticas y legales:	30
5.5 Control de calidad	30
5.6 Propuesta metodológica	31
5.7 Protocolos y materiales	32
5.7.1. Recuperación de aislamientos Viables y libres de contaminación	32
5.7.2. Identificación microbiológica de EF	33
5.7.2.1. Fundamento de MALDI-TOF-MS	33
5.7.2.2. Cristalización de proteínas MALDI-TOF	33
5.7.2.3. Ionización y Lectura de MALDI TOF	34
5.7.3. Pruebas moleculares para detección de genes	34
5.7.3.1. Extracción de ADN	34
5.7.3.2. PCR para genes de virulencia	35
5.7.4. Prueba en placa de Micro titulación para biopelícula	36
5.7.5. Análisis de diversidad genética	37
5.7.5.1. Extracción de ADN	37
5.7.5.2. PCR 16s rRNA y Secuenciación	37
5.7.5.3. Análisis filogenético	38

5.8.Diversidad genética y factores de virulencia _____	38
6.RESULTADOS _____	38
6.1.Identificación de EF _____	38
6.1.1.Recuperación de aislamientos _____	38
6.1.2.Identificación microbiológica por MALDI-TOF _____	39
6.2.Detección de los genes de virulencia _____	40
6.2.1.Frecuencia absoluta genes de virulencia por aislamiento bacteriano _____	40
6.3.Frecuencia relativa genes de virulencia por tipo de muestra _____	41
6.4.Formación de biopelícula _____	42
6.4.1.Estandarización placa de micro titulación _____	42
6.4.2.Aislamientos formadores de biopelícula _____	43
6.5.Diversidad genética _____	43
6.5.1.PCR 16s rRNA _____	43
6.5.2.Secuenciación, BLASTn y cromatograma _____	44
6.5.3.Análisis filogenético _____	45
6.6.Relación factores virulencia / biopelícula / diversidad genética _____	46
6.6.1. Relación del origen de la muestra con las variables. _____	47
6.6.2. Relación del tipo de muestra con las variables. _____	48
7. DISCUSION _____	50
8. CONCLUSIONES _____	55
9. PERSPECTIVAS, APLICACIONES, LIMITANTES _____	55
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS _____	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen de las 30 muestras.....	29
Tabla 2. Cebadores de PCR, y producto de amplificación utilizado para la detección de los genes de virulencia en aislamientos de EF.....	35
Tabla 3. Datos de viabilidad, pureza y recuperación de aislamientos EF empleadas en el estudio.....	38
Tabla 4. Puntos de corte de los puntajes asignados en Bruker Daltonik MALDI Biotyper para la Identificación de EF	39
Tabla 5. 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.....	40
Tabla 6. Absorbancias obtenidos para evaluar en la micro titulación en placa la formación de biopelícula por EF.	42
Tabla 7. Relación del origen de la muestra (Endodontico y oral) con la presencia de los genes de virulencia.	47
Tabla 8. Relación del origen de la muestra con la agrupación genética.....	48
Tabla 9. Relación del origen de la muestra con la formación de biopelícula	48
Tabla 10. Relación del tipo de muestra con la presencia de los genes de virulencia.	49
Tabla 11. Relación del tipo de la muestra con la agrupación genética.	50
Tabla 12. Relación del tipo de la muestra con la formación de biopelícula	50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Propuesta metodológica para evaluar diversidad genética y su relación con factores de virulencia y formación de biopelícula en aislamientos de EF. Diagrama ilustra actividades secuenciales que se detallan en el texto del capítulo. Diagrama Hurtado,2022	31
Figura 2. Número total de genes de virulencia detectados en los 30 aislamientos de EF utilizados en el estudio.....	419
Figura 3. Distribución de genes de virulencia en los 5 orígenes de muestra usadas para el aislamiento de EF	43
Figura 4. Frecuencia absoluta y frecuencia relativa de la formación de biopelícula en los 30 aislamientos de EF usados en el estudio.....	43
Figura 5. Gel de agarosa 1% con los productos de amplificación de 960pb del fragmento 16s rRNA de EF.	442
Figura 6. 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.....	45
Figura 7. Cromatograma de la secuencia del amplificado PCR 16s rRNA de EF del estudio.....	45
Figura 8. Árbol filogenético de las secuencias del producto de PCR 16S rRNA que muestran cinco agrupaciones principales entre los aislamientos de EF del estudio.....	46

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.

1. ALCANCE Y DEFINICION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION

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 periapical, por lo que es imperativo comprender el papel específico de cada uno en la patogenicidad del contenido infeccioso de los conductos radiculares ⁷. 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, considerándose ubicuo por su capacidad de localizarse en animales, productos alimenticios y diferentes fluidos, tejidos y órganos a nivel humano. Se considera el agente etiológico de diferentes infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS). A nivel odontológico, es relevante, que *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 postula que la contaminación es de origen fecal, debido a que las heces son la principal fuente de aislamiento en el hombre, y por los malos hábitos higiénicos orales pueden llevar el microorganismo a boca. Esta 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 entre ellos los b-lactámicos, macrólidos, clindamicina, tetraciclina, metronidazol y aminoglucósidos principalmente; capacidad que en las bacterias se asocia a la diversidad genética, adquirida por evolución y por los mecanismos de transferencia de material genético como son transformación, transducción y conjugación ¹⁰. 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 patógenos ¹¹.

La metodología utilizada para analizar la diversidad genética es el análisis filogenético, que busca las relaciones de parentesco entre individuos de la misma especie, a través de métodos moleculares que proporcionan información más precisa de los genomas bacterianos, siendo los más utilizados: la electroforesis en gel de campo pulsado (PGFE), análisis con enzimas de restricción, polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), y el análisis bioinformático de la secuenciación de fragmentos o genes completos, entre otros ^{12,13}. En el caso de *EF*, diferentes estudios han mostrado que no

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*.

2. ESTADO DEL ARTE Y ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

La revisión teórica que se presenta en este trabajo se esquematiza bajo una secuencia de tres subtítulos, enfatizada en los aportes relevantes que hay del microorganismo a nivel de cavidad oral, razón por la cual se centra en infecciones odontológicas y la importancia de determinar las posibles agrupaciones genéticas para poder entender mejor la fisiopatología de éstas.

El primer capítulo define la característica microbiológica de *EF* y sus factores de virulencia; el segundo capítulo determina el impacto de *EF* en el fracaso del tratamiento endodóntico y el tercer capítulo habla de los análisis moleculares para determinar diversidad genética.

2.1 *Enterococcus faecalis* – *EF*

2.1.1 Generalidades

EF es un coco no fermentador, sus células son ovoides y tienen un diámetro de 0.5 a 1µm. Suelen encontrarse solos, en pares o en cadenas cortas y frecuentemente se alargan en la dirección de la cadena. La mayoría de los aislamientos son no hemolíticos y no móviles, poseen la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno. Además, sobreviven en ambientes adversos, como pH alcalino extremo de 9.6, resisten las sales biliares, detergentes, metales pesados, etanol, azida de sodio y desecación. Pueden crecer en el rango de 10 a 45 ° C y sobrevivir a una temperatura de 60° C durante 30 minutos ¹⁴.

2.1.2 Hábitat oral

En el microbioma oral se han identificado cerca de 700 especies bacterianas, no es habitual encontrar al *EF* pero se ha detectado en varias patologías orales, canales radiculares, bolsas periodontales, obturaciones desadaptadas, y con muy baja frecuencia en la mucosa oral, desde donde se podrían diseminar hacia otros sitios que favorezcan su colonización.²

EF tiene la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en microambientes que pudieran ser tóxicos para otras bacterias, como ocurre en la presencia de hidróxido de calcio; además puede sobrevivir a la instrumentación químico mecánica de los conductos radiculares, colonizando los túbulos dentinarios a una profundidad de 300 micras, adherirse a las paredes de los conductos radiculares, acumularse y formar comunidades organizadas en biopelículas, lo que lo ayuda a resistir la destrucción al permitir que las bacterias se vuelvan 1000 veces más resistentes a la fagocitosis y a la respuesta mediada por anticuerpos. Otra característica es su capacidad para infectar los conductos radiculares aún después de ser obturados y/o sellados, es por esto por lo que se ha identificado como la causa frecuente del fracaso en el tratamiento endodóntico.^{2,4}

Aún no se ha esclarecido la vía de colonización de este microorganismo a los canalículos dentales, probablemente no se derivan de la microbiota normal de los pacientes; otra vía es que pueden haber sobrevivido a los procedimientos biomecánicos previos que se realizan durante la ejecución de dicho tratamiento, o pueden haber invadido los conductos como consecuencia de las microfiltraciones que se dan desde la corona de los dientes. Por otro lado, no se puede descartar una ruta exógena como fuente de estas infecciones, como es la transmisión iatrogénica a través de instrumentos y material de endodoncia contaminados, o puede ser transmitido por alimentos, ya que se utiliza comúnmente en la fermentación de queso o presente en productos alimenticios fermentados, como salchichas y aceitunas.^{15,16}

2.1.3. Factores de virulencia

Las patologías a nivel de los tejidos periapicales, *EF* las produce bajo una triada que conjuga las condiciones inmunológicas del huésped, el tamaño del inóculo, presencia de factores de virulencia y formación de biopelícula en el sitio anatómico donde se ubica. Diversos estudios han permitido identificar los principales factores de virulencia, siendo los más estudiados, proteínas de adherencia celular como la proteína de superficie extracelular (Esp), adhesina de unión al colágeno (Ace); proteínas facilitadoras de la colonización como la sustancia de agregación (Asa) y su variante Asa 373; factores de invasión tisular como Citolisina (CylA), Gelatinasa (GelE), antígeno específico de

endocarditis A (Efa A), hialuronidasa (Hy); factores de evasión de la respuesta inmune como la cápsula de polisacárido enterococo (Cps), iones superóxido (O₂⁻), y factores complementarios como lipoproteínas, enzimas proteolíticas y carbohidratos de pared entre otros.^{17,18,19}

2.1.3.1. Proteína de superficie extracelular (*Esp*)

La proteína de superficie extracelular (*Esp*) es una proteína asociada a la pared celular descrita por primera vez en especies de *Enterococcus* por Shankar y cols. en el año de 1999, el gen *esp* se encuentra con alta frecuencia en aislamientos derivados de infecciones. Se cree que promueve la adhesión, la colonización y la evasión del sistema inmunitario y que desempeña algún papel en la resistencia a los antibióticos. Además, contribuye a la formación de biopelículas enterocócicas. Los estudios han demostrado que la interrupción del gen *esp* afecta la capacidad de *EF* para formar biopelículas. Los aislamientos de *EF* negativas para *Esp*, después de recibir la transferencia del plásmido del gen *Esp*, pudieron producir biopelículas.²⁰

2.1.3.2. Adhesina de unión al colágeno (*Ace*)

Otra proteína de superficie celular presente en *EF* es *Ace*, fue la primera proteína descrita perteneciente a la familia de las adhesinas en *Enterococcus*. Esta adhesina media la unión al colágeno tipo I, colágeno tipo IV, laminina y dentina. Una investigación importante relacionada con la función de esta proteína es la realizada por Nallapareddy y cols. quienes evaluaron la capacidad de mediar la adhesión de la proteína de superficie *Ace* de *EF* a las proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo IV y la Laminina, ellos utilizaron aislamientos de *EF* mutadas y evidenciaron que la proteína de superficie *Ace* si interviene en la adhesión de la cepa OG1RF de *EF* al colágeno tipo IV y a la laminina, así como también al colágeno tipo I. Además, señalaron que se pudiera pensar que esta proteína de superficie es la responsable de la adhesión a estas tres proteínas de la matriz extracelular, debido a la reducción importante en la adhesión.²⁰

,21

2.1.3.3. Gelatinasa (*GelE*)

La gelatinasa es una metaloproteinasa hidrofóbica con la capacidad de romper insulina, caseína, hemoglobina, colágeno y fibrina. Algunos estudios han asociado estas propiedades proteolíticas y la alta aparición de especies de *Enterococcus* en bacteriemias, endocarditis, infecciones urinarias, así como en infecciones intrarradiculares, donde se ha encontrado formando biopelículas en la hidroxiapatita. Sin embargo, los microorganismos no siempre expresan la gelatinasa aunque tengan el gen *gelE*. El gen *gelE* codifica para una proteína secretada de tipo extracelular metaloproteasa dependiente de zinc denominada gelatinasa, la cual, al hidrolizar gelatina, colágeno y caseína, suministra nutrientes a la bacteria por degradación del tejido del huésped. Adicionalmente, esta proteína se encuentra relacionada con la producción de biopelícula y también se ha demostrado que la gelatinasa presenta un papel importante en virulencia in vivo cuando se ha evaluado en los modelos animales de peritonitis, endocarditis, endoftalmitis. El gen *gelE* se encuentra en el cromosoma, abajo de este se encuentra un gen adicional denominado *sprE*, que codifica para una proteasa de serina y es cotranscrito con *gelE*. La transcripción de estos genes es regulada de una forma dependiente por medio del sistema *fsr* (fecal streptococci regulator), el cual está formado por los genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, que se encuentran corriente arriba de los genes *gelE* y *sprE*²¹.

2.1.3.4 Sustancia de agregación (*Asa*) y su variante *Asa 373*

La sustancia de agregación es una adhesina bacteriana plásmido-codificada receptiva a las feromonas, que media el contacto entre el donador y la bacteria receptora causando agregación o agrupación y a su vez facilitando el intercambio de plásmidos. Mientras que la sustancia de agregación es expresada por la célula donadora, el proceso de conjugación bacteriana requiere que la "sustancia vinculante" sea expresada en la superficie de la célula receptora. En este sentido, tanto el material genético como la resistencia antibiótica pueden ser transferidos de los aislamientos de *EF* a otras especies²¹. La sustancia de agregación puede servir como determinante de virulencia al *EF* en diferentes formas: juega un papel importante en la diseminación de los factores de virulencia codificados por plásmidos, como la citolisina enterocócica y

determinadas resistencias antibióticas, entre las especies; esta sustancia de agregación facilita la adherencia del *EF* a las células epiteliales renales e intestinales, y a la colonización de estas superficies; protege al microorganismo contra los leucocitos polimorfonucleares y de la lisis mediada por macrófagos. El mecanismo para esta protección puede deberse a una modificación de la maduración en el fagosoma. La sustancia de agregación y las citolisina tienen acciones sinérgicas, lo cual aumenta la virulencia; esto resulta en daño e invasión tisular profunda. Además, esta media la unión con proteínas de la matriz extracelular, incluyendo colágeno tipo I, siendo de especial importancia para las infecciones endodónticas ya que es el principal componente orgánico de la dentina ²¹.

Se informó que un nuevo representante de la familia Asa, Asa 373, que difiere en su estructura proteica del Asa clásico, exhibe algunos motivos de aminoácidos moderadamente conservados cuando se compara su secuencia de base de datos con la de algunas otras adhesinas bacterianas. La mayor similitud fue con la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos Ag I/II de los estreptococos orales. Se ha encontrado que la familia de polipéptidos Ag I/II media en el reconocimiento de colágeno en algunos estreptococos orales y esto se ha asociado con su capacidad para invadir los túbulos dentinarios. Sin embargo, no hay evidencia directa que respalde el papel de Asa 373 para mediar la unión al colágeno²².

2.1.3.5. Factores de invasión tisular Citolisina (CylA)

Citolisina (Cyl) es una enzima tóxica codificada por plásmidos, capaz de destruir eritrocitos, neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos, células bacterianas y reducir el acto de la fagocitosis. Jett y cols. señalan que, si los aislamientos de *EF* producen citolisinas, el efecto beneficioso combinado de la terapia antimicrobiana y antiinflamatoria se vería completamente contrarrestado debido a la actividad organotóxica de esta sustancia, la cual destruye completamente el órgano a pesar de que los otros aspectos importantes de la infección estén satisfactoriamente controlados.²¹

2.1.3.6. Antígeno específico de endocarditis A (Efa A)

Efa A se identificó con el uso de un antisuero de un paciente con endocarditis por *E. faecalis*. La secuencia de aminoácidos de la proteína asociada, Efa A, reveló una homología del 55 al 60 % con un grupo de proteínas estreptocócicas conocidas como adhesinas. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que Efa A podría estar funcionando como una adhesina en la endocarditis. La producción de Efa A por aislamientos de *E. faecalis* es común. Este gen se ha detectó en todos los aislados médicos (sangre, pus, orina, heces, ambiente hospitalario) y casi todos los alimentos (leche, queso, carne) de *E. faecalis*. Estudios recientes sugieren que Efa A es un receptor de proteína de unión a soluto para un sistema de transporte de manganeso en *EF*, el manganeso es necesario para el crecimiento y la supervivencia de la mayoría de los microorganismos, Efa A se expresa fuertemente en un entorno sin iones de manganeso, probablemente para la regulación de la homeostasis citoplasmática del catión.²²

2.1.4 Formación de Biopelícula

Una biopelícula es definida como una población microbiana adherida a un sustrato orgánico o inorgánico rodeada de productos extracelulares la cual forma una matriz intermicrobiana. Los microorganismos, organizados en biopelículas muestran una alta resistencia tanto a los agentes antimicrobianos como a los mecanismos de defensa del hospedero.^{4, 23}

Cada comunidad microbiana en las biopelículas es única, aunque algunos atributos estructurales pueden ser generalmente considerados universales, como la autoagregación y la coagregación, la segunda está considerada una forma de biopelícula más compleja y difícil de eliminar, ya que bacterias de distinta especie pueden compartir distintos mecanismos de defensa en pos del mantenimiento de la comunidad asociada⁴.

La biopelícula bacteriana apical es clínicamente importante porque es inherentemente resistente a los agentes antimicrobianos, no pueden ser removidos por la preparación biomecánica sola y podrían conducir a fracasos del tratamiento endodóntico como consecuencia de una infección persistente.^{4, 23}

Las formas de biopelícula son muy variadas, desde pequeñas formaciones hasta cadenas, pero la formación más característica encontrada es la de forma de champiñón. Estas colonias se observan al microscopio como estructuras unitarias de la forma señalada, separadas de otras por canales de agua, todo dentro de la matriz de polisacárido. Se piensa que estos canales permiten la distribución de los nutrientes y la eliminación de los residuos de las colonias, así como la atenuación de los agentes biocidas externos, tales como antibióticos, irrigantes y medicaciones intraconducto. ^{4, 23}

El proceso de formación de la biopelícula en el conducto radicular no es aún muy claro, la teoría más aceptada consta de cuatro fases y fue descrita por Svensater y Bergenholtz. En la primera fase se forma una película adhesiva sobre la dentina promovida por el depósito de proteínas y otros compuestos derivados de las bacterias en suspensión, del proceso necrosis o inflamación, etc. En la segunda fase, sobre esa película pegajosa, se fijan algunas bacterias específicas con capacidad de adhesión, de todas las que están en suspensión. En la tercera fase, la primera capa de bacterias ya adherida segrega mediadores que, por un lado, van fijando más y más bacterias y, por otro lado, va formando la matriz extracelular de polisacárido. En la cuarta y última, la biopelícula va madurando y creando sistemas de defensa más complejos. Al mismo tiempo, arroja bacterias al exterior que cronifican la respuesta inflamatoria del huésped. ^{4, 23}

Otra característica importante de la evolución del Biopelícula es que puede aislarse del hábitat que le rodea si éste se vuelve exageradamente hostil y se han descrito formaciones en estado inerte en medios extremos. El Biopelícula puede mantener dicho estatus por un tiempo, a la espera de que la situación del medio mejore, antes de perecer. Si el medio cambia a mejor, el Biopelícula abandona el estado de latencia y sigue desarrollándose. Si el ambiente extremo se mantiene tiempo suficiente, puede hacer inviable la existencia del Biopelícula. Por ello, los estudios enfocan el tratamiento hacia la eliminación directa o indirecta del Biopelícula. ^{4, 23}

Con respecto al mecanismo de acción, la característica fundamental, es una gran capacidad de resistencia, que se ve aún más aumentada en el interior del sistema de

conductos ya que su anatomía proporciona zonas de difícil acceso a las soluciones irrigantes. La matriz de polisacáridos supone una barrera física y química, evitando así la penetración de agentes externos indeseables, cambios de pH, etc., manteniendo un ambiente interior adecuado para la supervivencia y es considerado actualmente uno de los mecanismos más importantes.^{4,23}

2.2 Fracaso tratamiento endodóntico

Aunque *EF* no se considera comúnmente un microorganismo de la microbiota oral normal, con frecuencia se aísla de los conductos radiculares obturados de los dientes asociados con la periodontitis crónica, lo que indica su papel patógeno en el fracaso del tratamiento endodóntico crónico. La elevada virulencia que presenta *EF* hace que este microorganismo genere fracasos en la terapia endodóntica, debido a que, una vez logra entrar en el conducto radicular, puede adherirse al colágeno de la dentina y al colágeno de hueso y de otros tejidos, penetrar en los túbulos dentinarios, resistir a medicamentos como hidróxido de calcio, sobrevivir a la irrigación con hipoclorito de sodio y formar biopelícula, tanto intrarradicular como extrarradicular, originando lesiones periapicales persistentes.²⁴ Una segunda causa que podría explicar la falla en los tratamientos endodónticos es la formación de biopelículas y la interacción con otros microorganismos que pueden alcanzar en el canal intrarradicular. Al respecto, el estudio más representativo a la fecha es una revisión de literatura efectuada por Ilaria Prada y col.²⁵, sobre la influencia de la microbiología en la falla endodóntica. Dicha revisión, considera que la principal causa de insuficiencia endodóntica es la persistencia de microorganismos que causan una infección intrarradicular o extrarradicular y que se vuelven resistentes a las medidas de desinfección, y postulan adicionalmente estudios recientes que aíslan, en mayor medida, otras bacterias como *Fusobacterium nucleatum* y *Propionibacterium spp.*

Dentro de las características adicionales a la persistencia de la lesión de origen endodóntico, los autores mencionan que *EF* posee características específicas que les permiten sobrevivir a la instrumentación mecánica y química realizada durante el procedimiento en el tratamiento endodóntico. Entre las características de este

microrganismo tenemos: la capacidad de crear biopelículas fuertemente unidas que colonizan áreas distantes de los canales principales (deltas apicales, istmos, canales laterales) que son imposibles de alcanzar con la instrumentación, al estar protegidos por residuos (debrí dentario) también no lo logra alcanzar el irrigante a menos que se active.²⁵

Adicional a la capacidad de sobrevivir a nivel del sistema de conductos como también dentro del material de obturación como gutapercha y cemento sellador, está la multi-resistencia antibiótica.^{17,26} *EF* presenta resistencia intrínseca a cefalosporinas, aminoglucósidos no de alta carga, Trimetropin, y Trimetropin sulfa, clindamicina, ácido fusídico, quinupristina – dalfopristina (estreptograminas A y B), aztreonam, polimixina B, colistina y ácido nalidíxico, y diferentes autores han realizado estudios de resistencia adquirida, evidenciando resistencia a b-lactámicos, cloranfenicol, aminoglucósidos de alta carga, macrólidos, tetraciclinas y vancomicina entre otros. Sin embargo, los resultados a la fecha son controversiales, muy heterogéneos y no han permitido establecer si hay una asociación estadísticamente significativa entre resistencia y virulencia/formación de biopelícula o entre resistencia y clones específicos.^{27,28,29}

2.3 Análisis molecular y diversidad genética

La diversidad genética bacteriana puede estudiarse a través de las diferentes herramientas existentes para análisis filogenético. La filogenia estudia el origen y el desarrollo de las especies, así como los cambios y evoluciones que presentan con el pasar del tiempo.³⁰ Estos cambios y evoluciones reflejan la descendencia y grado de parentesco entre unos y otros grupos de seres vivos, los cuales se denominan líneas filogenéticas. Esos cambios son detectables en las cadenas de ADN, donde el análisis de las secuencias permite establecer diferencias y similitudes intra e interespecie.¹² Dichos cambios son mutaciones que le permiten a los microorganismos adaptarse a diferentes ambientes y ayudan a su adaptación a nuevos ecosistemas.³⁰ Los datos analizados, permiten crear los árboles filogenéticos, que detallan las relaciones evolutivas entre aquellas especies que tienen un antepasado en común. Los árboles filogenéticos, a su

vez, permiten desarrollar la clasificación filogenética 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 Esta información además de ser vital a la hora de conocer una especie, saber por qué tiene determinadas 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 otros.³¹

Los métodos para determinar estos cambios y realizar estas clasificaciones son moleculares. Actualmente se considera que hay casi 800 taxones bacterianos distintos, de los cuales un individuo en particular puede albergar alrededor entre 100-200 de ellos, lo que indica que existe una diversidad sustancial entre diferentes personas.³² A nivel de infecciones endodónticas se ha demostrado que hay importantes reorganizaciones como resultado de enfoques taxonómicos filogenéticos. Donde se han renombrado especies antiguas y se han propuesto especies nuevas, identificando taxones microbianos nunca encontrados en infecciones endodónticas. Estas nuevas clasificaciones son fundamentales para explicar las interacciones hospedero-bacteria y la asociación bacteriana con la enfermedad, y para el desarrollo de medidas terapéuticas más efectivas y predecibles para tratar las enfermedades endodónticas.³³

La filogenia ha permitido identificar diferentes especies existentes en la cavidad oral, y específicamente poder estudiar los microorganismos que se encuentran en los conductos radiculares. Autores como Vickerman MM y col. , confirmaron la presencia de arqueas en los conductos radiculares y proporcionaron información adicional sobre las comunidades polimicrobianas en infecciones endodónticas asociadas con síntomas clínicos³⁴; Adriana C y col. , mediante clonado y secuenciación 16S rRNA, establecieron que la infección endodóntica primaria está representada principalmente por miembros del filo *Formicutes* pertenecientes a la clase *Clostridia* seguidos por el filo *Bacteroidetes*³⁵; Bo-Young Hong BS y col., mediante el uso de pirosecuenciación demostraron que las infecciones persistentes tienen una comunidad bacteriana tan diversa como las infecciones primarias³⁶; HJ Rolph y col., mediante PCR 16S rRNA demostró la presencia de bacterias no cultivables en conducto radicular infectado

postulando nuevos filotipos bacterianos, que pueden estar involucrados en infecciones endodónticas.³⁷

PCR primer específica, AP-PCR y Rep-PCR han servido para detectar *EF* en múltiples sitios orales, determinar el genotipo circulante y postular que la microfiltración coronal es una causa concebible de falla endodóntica. Sin embargo, no se sabe si estos genotipos únicos difieren en términos de virulencia o actividad antimicrobiana.^{41,51} En relación al posible origen de *EF* y el genotipo circulante, diversos estudios como el de Xiaofei Zhu y col.³⁸, no encontraron diferencias significativas en la prevalencia de *EF* entre muestras de saliva y muestras del conducto radicular, pero sí diferentes genotipos en las muestras analizadas; Vidana y col.³⁹, postuló que *EF* aislado en infecciones endodónticas probablemente no se deriva de la microbiota normal de los pacientes, sino de fuentes exógenas como es la transmisión iatrogénica a través de instrumentos y material de uso endodóntico contaminado, o a través de alimentos; Ashraf F.Fouad y col.⁴⁰, lograron detectar *EF* en lesiones perirradiculares sin cicatrización atribuyéndolos a una mala técnica de desinfección; Gomes BP y col.⁴¹, sobre un análisis microbiano de canales de dientes obturados con lesiones periapicales mostró que *EF* fue el microorganismo identificado con mayor frecuencia en pacientes con tratamiento endodóntico fallido y Maryam Pourhajibagher y col.⁴², concluyeron que *V. parvula* y *EF* se encontraron con una mayor frecuencia en infecciones endodónticas primarias y secundarias, respectivamente. Sin embargo, dado que no se ha logrado una real caracterización de genotipos o clones circulantes en boca, lengua, saliva, canal radicular, todos los autores sugieren realizar árboles filogenéticos que partan de una secuenciación que permita realizar agrupaciones en torno a una característica determinada, ya sea un factor de virulencia, o un gen de resistencia a los desinfectantes y antibióticos utilizados en endodoncia o hacer análisis bivariados que incluyan más de uno de estos factores.

3.HIPÓTESIS

Existe diversidad genética entre aislamientos de *EF* aisladas de muestras de cavidad oral relacionadas con el tratamiento de endodoncia.

4.OBJETIVOS

4.1.Objetivo general

4.1.1.Evaluar la relación de genes de virulencia y formación de biopelícula con la diversidad genética de aislamientos de *EF* aisladas de muestras de cavidad oral relacionadas con el tratamiento de endodoncia

4.2.Objetivos específicos

4.2.1. Realizar la identificación microbiológica de *EF* en muestras de cavidad oral relacionadas con el tratamiento de endodoncia

4.2.2. Detectar la presencia de genes de virulencia *Asa* y *Asa373* (sustancia de agregación), *Esp* (proteína superficie), *Efa A* (Ag superficie), *Ace* (Unión a colágeno), *gelE* (gelatinasa) y *CylA* (citolisina) en aislamientos de *EF* aislados de muestras de cavidad oral relacionadas con el tratamiento de endodoncia

4.2.3. Evaluar la formación de biopelículas en estado planctónico por aislamientos de *EF* aisladas de muestras de cavidad oral relacionadas con el tratamiento de endodoncia

4.2.4. Determinar la diversidad genética de los aislamientos de *EF* provenientes de muestras de cavidad oral relacionadas con el tratamiento de endodoncia

4.2.5. Analizar la relación entre la formación de biopelícula, factores de virulencia y diversidad genética de aislamientos de *EF* aislados de muestras de cavidad oral relacionadas con el tratamiento de endodoncia.

5.METODOLOGIA

5.1 Tipo de investigación:

Estudio observacional, descriptivo, transversal de muestreo por conveniencia a partir de aislamientos de *EF* criopreservados, provenientes de proyectos en paralelo, aislados de individuos que acudieron a procedimientos dentales en consulta de endodoncia, y de los cuales se tenía consentimiento para su en más de una investigación.

5.2 Grupo de estudio:

Incluyó 30 aislamientos viables y puros de *EF*, provenientes de eyectores (muestras # 1-6), Limas K (muestras # 7-12), Conos de papel (muestras # 13-18), Material de obturación gutapercha (muestras # 19-24) e hisopado de mucosa (muestras # 25-30).

Tabla 1. Origen de las 30 muestras.

Número de Muestra	Origen
No 001	EYECTOR
No 002	EYECTOR
No 006	EYECTOR
No 005	EYECTOR
No 017	CONO PAPEL
No 020	GUTAPERCHA
No 027	MUCOSA (Grupo A - Mucosa solo)
No 003	EYECTOR
No 004	EYECTOR
No 030	MUCOSA Grupo E (Mucosa+lima+eyector+cono+gutapercha)
No 016	Cono PAPEL
No 024	GUTAPERCHA
No 023	GUTAPERCHA
No 014	CONO PAPEL
No 015	CONO PAPEL
No 028	MUCOSA Grupo E (Mucosa+lima+eyector+cono+gutapercha)
No 021	GUTAPERCHA
No 022	GUTAPERCHA
No 008	LIMA K
No 009	LIMA K
No 026	MUCOSA (Grupo B - Mucosa+eyector)
No 012	LIMA K
No 013	CONO PAPEL
No 029	MUCOSA Grupo E (Mucosa+lima+eyector+cono+gutapercha)
No 010	LIMA K
No 007	LIMA K
No 011	LIMA K
No 018	CONO PAPEL
No 019	GUTAPERCHA
No 025	MUCOSA (Grupo A - Mucosa solo)

5.3 Criterios de inclusión:

Aislamientos libres de contaminación, viables y que permitieran la confirmación microbiológica del género y especie en estudio. Tomados de pacientes mayores de edad, que no estuviesen recibiendo tratamiento antibiótico en los últimos 3 meses, que hubiesen firmado consentimiento informado con permiso de reutilización de aislamientos, que fueran pacientes referidos para tratamiento endodóntico, clínicamente sanos que no presentaran patologías sistémicas o subyacentes.

5.4 Implicaciones éticas y legales:

Trabajo de grado enmarcado dentro de la propuesta SIAP ID 00007699, contó con el respaldo de la Vicerrectoría de Investigaciones y el aval institucional del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias y la Facultad de Odontología para los investigadores vinculados, y de acuerdo con resolución 8430 no involucra investigación directa en seres humanos. Los protocolos de bioseguridad y manejo de residuos se realizaron bajo las normas establecidas en el Decreto 2676 de 2000, y lineamientos de manual institucional para manejo de residuos IF-P71-IN01-IN02-IN03, IF-P71-MN01, OD Y PR01. Los autores manifiestan no tener conflictos de intereses en el trabajo desarrollado.

5.5 Control de calidad

Todos los ensayos técnicos que a continuación se describen fueron hechos por duplicado, supervisados por técnico del área, con controles internos positivos y

negativos según el caso, y como aislamientos control se usaron *EF* ATCC 29212, *EF* ATCC 700802, *EF* ATCC 12030.

5.6 Propuesta metodológica

Para cumplir con cada uno de los objetivos específicos propuestos se propusieron las actividades que ilustra la figura 1 y se detallan en los siguientes párrafos:

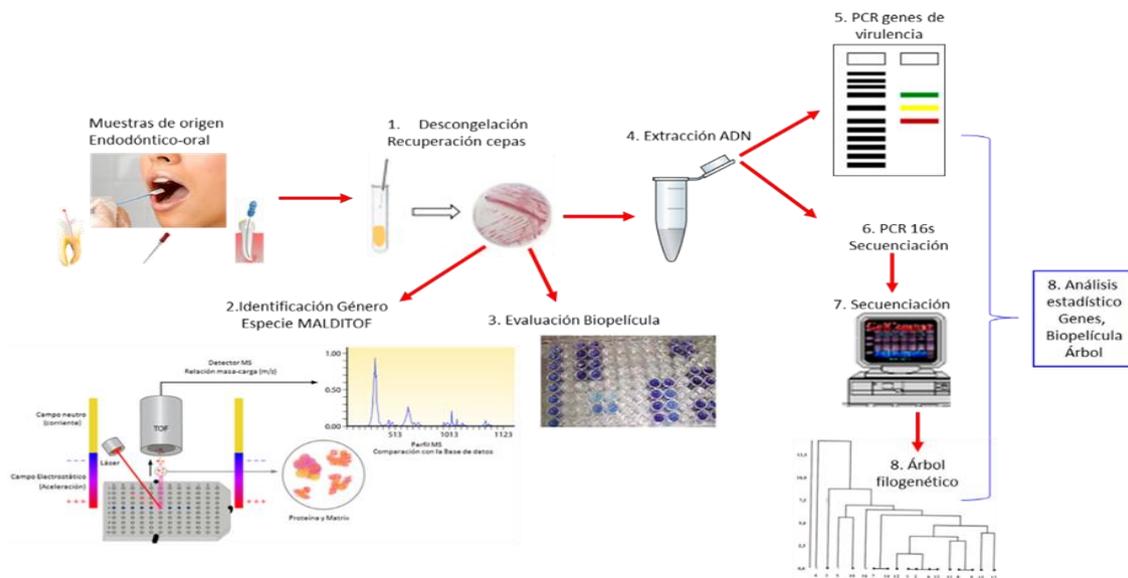


Figura 1. Propuesta metodológica para evaluar diversidad genética y su relación con factores de virulencia y formación de biopelícula en aislamientos de *EF*. Diagrama ilustra actividades secuenciales que se detallan en el texto del capítulo. Diagrama Hurtado,2022

- **Objetivo 1** – Para la identificación microbiológica de los aislamientos se desarrollaron como actividades: recuperación de aislamientos viables y puras; Identificación de género y especie por MALDI-TOF-S Biotyper de Bruker, Daltonics, Alemania bajo base de datos estándar BrukerTaxonomy database versión 3.3.1.
- **Objetivo 2** – Para la identificación de los genes de virulencia en los aislamientos recuperados se desarrollaron las siguientes actividades: extracción de ADN bacteriano, detección de los genes de virulencia por PCR con primer específico para cada uno de los genes *Asa*, *Asa373*, *Esp*, *Efa A*, *Ace*, *gelE* y *CylA*, visualización de productos de amplificación de PCR en geles de agarosa 1% Sybergreen leídos en fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System BioRad Laboratories Inc.

- **Objetivo 3** – Para evaluar la formación de biopelícula de los aislamientos recuperados se desarrolló la siguiente actividad: prueba en placa de microtitulación en placas Labsystems Multiskan evaluando densidad de crecimiento por turbidez a 595nm.
- **Objetivo 4** – Para determinar la diversidad genética de los aislamientos, a partir del ADN extraído se efectuó una PCR 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).
- **Objetivo 5** – Para analizar la relación entre genes y biopelícula, y estos con los Cluster de agrupación del árbol filogenético generado, se usaron pruebas no paramétricas, Test exacto de Fisher con un valor p menor a 0.05 como estadísticamente significativo, y los análisis efectuados a través de Stata 14.

5.7 Protocolos y materiales

Objetivo 1 – Identificación microbiológica de *EF*

5.7.1. Recuperación de aislamientos Viables y libres de contaminación

Los aislamientos de *EF* criopreservados, fueron recuperados mediante un proceso de descongelamiento gradual propuesto por Daryousb, 2010⁴³ El caldo BHI con 30 % de glicerol/oxacilina suplementada se descongeló por 30 minutos a 4°C seguido por 30 minutos a temperatura ambiente y 10 minutos a 37°C. El producto descongelado se homogenizó en vortex simple 20 segundos, y una alícuota de 100 μ l se sembró en 5 μ l de Caldo Enterococos (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) e incubó 24 horas a 37°C en agitación continua Shaker orbital a 180rpm. Del medio líquido ya crecido se realizó siembra con asa en Agar Chromocult Enterococci 37°C 5% CO₂ por 48 horas. A partir del medio sólido se seleccionaron colonias color malva compatibles con morfología de *EF*. Pureza fue determinada mediante coloración.

Colonias puras, aisladas y libres de contaminación se seleccionaron para los siguientes procesos.

5.7.2. Identificación microbiológica de EF

5.7.2.1. Fundamento de MALDI-TOF-MS

Los *EF* criopreservados, en trabajos anteriores habían sido identificados por otras metodologías como métodos manuales, Rapid ID32 Strept, BBL™ Crystal™ Identification Systems Rapid Gram-Positive ID Kit, Dade/MicroScan. Con el fin de utilizar una metodología unificada para los 30 aislamientos, y que fuera rápida, sensible y de baja contaminación, se utilizó MALDI-TOF-MS siguiendo el protocolo propuesto por Clark, y cols. 2013⁴⁴ para bacterias Gram positivas, y el análisis de espectros para identificar género y especie se realizó con software BioExplorer 1.0 siguiendo la metodología propuesta por Van Veen y cols. 2010⁴⁵

MALDI (Matrix Assisted Laser) TOF (Time of flight) MS (mass spectrometry) es un método en el cual proteínas específicas de un determinado microorganismo son extraídas y cristalizadas sobre una matriz metálica, con el fin de poder incidir sobre ellas una luz laser que es capaz de crear desorción/ionización de las moléculas, separándolas en partículas de diferente tamaño, separación que genera un espectro que es detectado por un espectrofotómetro de masas. Los espectros de los datos obtenidos se comparan contra una base de datos espectral de las proteínas ribosómicas 16S y glucoproteínas de pared de 5000 especies de 2000 a 20000 dalton, utilizadas como referencia. En la comparación con los picos de la base de datos se considera que similitudes con un score logarítmico mayores a 2.000 identifican el género y especie en estudio. Dependiendo del microorganismo a cada score espectral se le asigna un puntaje determinado, y el valor de ese score valida la identificación del género y especie.

5.7.2.2. Cristalización de proteínas MALDI-TOF

Con el fin de obtener una matriz de proteínas de *EF* que se puedan extraer y cristalizar, los aislamientos son sometidas a una digestión de proteínas, que se inició agregando en un tubo eppendorf 300 µl de agua grado HPLC y unas colonias del microorganismo; se

realizó vórtex hasta homogenizar. Al homogenizado se le agregaron 900 µl de etanol grado HPLC, se realizó vortex para mezclar, y se centrifugó a 13000 rpm por 2 minutos. Del centrifugado se decantó el etanol y se repitió nuevamente este paso con alcohol. Decantado el etanol, se agregó 50 µl de ácido fórmico al 70%, vortex para emulsionar muestra, y se dejó en reposo 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 50 µl de acetonitrilo al 100%, se realizó vortex hasta disolver a fondo y se centrifugó 13000 rpm por 2 minutos. Del centrifugado se tomó 1 µl del sobrenadante a la posición de la placa de acero, y se adicionó 1 µl de la matriz, la cual se dejó secar, y se colocó sobre el MALDI-TOF para realizar lectura ⁴⁴.

5.7.2.3. Ionización y Lectura de MALDI TOF

Para generar la desorción/Ionización de las proteínas digeridas, la matriz se colocó sobre un ángulo que recibiera un rayo de luz láser, el cual transforma especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones. Los campos eléctricos del aparato toman estos iones, y el equipo calcula la medida de las masas de los péptidos resultantes mediante un reflector que genera unos espectros de acuerdo con las distancias o separación de los iones. Los espectros son captados mediante un software interno Bioexplorer 1.0 que genera un espectro de masas que es específico para proteínas ribosomales entre 2000 a 20000 Dalton para el microorganismo en análisis. Los espectros son comparados contra el espectro de todas las proteínas que tiene la base de datos y mediante un algoritmo se asigna un puntaje específico para género y especie de cada bacteria. Para este caso, un puntaje >2.3 identifica género y especie correctamente ⁴⁵.

Objetivo 2 – Detección de genes de virulencia Asa, Asa373, Esp, Efa A, Ace, gelE, y CylA

5.7.3. Pruebas moleculares para detección de genes

A partir de los viales puros y libres de contaminación, se tomó una alícuota para extraer ADN, y siguiendo protocolos previamente estandarizados y ya reportados en la literatura por otros autores, se montaron PCR específicas para cada uno de los genes de virulencia mencionados.

5.7.3.1. Extracción de ADN

Previo a la extracción del ADN, se realizó una fase de enriquecimiento bacteriano en el cual las bacterias fueron concentradas en BHI a 2×10^9 bact/ml – 0,200 absorbancia, y de

una centrifugación a 6000g por 1 minuto se obtuvo un pellet bacteriano. Para la fase de extracción del ADN, se siguieron los lineamientos del Kit comercial DNeasy Blood & Tissue 69504 (Qiagen, Santa Clarita, California) usando el protocolo para bacterias Gram positivas. Protocolo que tenía 5 fases secuenciales: lisis, extracción, ligación, lavado, y elución. Para la **fase de lisis** celular el pellet fue resuspendido en un eppendorf que contenía 180 µl de buffer de lisis, el cual se incubó inicialmente por 30 min a 37°C, seguida de una incubación 56°C por 30 min después de adicionar 25 µl de proteinasa K, y 200 µl de buffer de extracción. Para el **paso de extracción**, sobre la mezcla anterior, se adicionaron 200µl de etanol 96-100%, se mezcló por vortex fuertemente hasta obtener un lisado de la mezcla. Para la **fase de ligación**, 700µl del lisado anterior, se transfirieron a una columna mini Spin y una vez centrifugado 6000g por 1 minuto, se descartó el filtrado. Este paso se realizó dos veces. Para la **fase de lavado** de la columna, esta se colocó en un nuevo eppendorf al que se le adicionaron 500µl de buffer lavado AW2, se centrifugó a 6000g rpm por 1 minuto, se descartó tanto eppendorf como filtrado. Para la **fase de Elución** se colocó la columna Mini spin en un nuevo eppendorf, se le adicionaron 150µl de buffer AE, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 6000g por 1 minuto. La concentración y pureza del ADN se evaluó espectrofotométricamente a 260/280nm (Nanodrop 2000; thermo Scientific, Wilmintong, DE, USA). Para la PCR solo se usaron muestras que mostraran una relación ADN/Proteína cercana a 1.7 ± 0.3 .

5.7.3.2. PCR para genes de virulencia

Se detectaron los genes ya mencionados siguiendo las metodologías estandarizadas y reportadas por otros autores. Los primer específicos e información general de cada PCR se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Cebadores de PCR, y producto de amplificación utilizado para la detección de los genes de virulencia en aislamientos de *EF*.

Genes detectados	SECUENCIA NUCLEÓTIDA (5`-3`)	Tamaño amplicon	REFERENCIA
Asa (agregación)	F5: GCACGCTATTACGAACTATGA-3	375pb	Dupré y col, 2003 ⁴⁶
	R5: TAAGAAAGAACATCACCACGA-3		
Asa 373 (Agregación mutada)	F5: GGACGCACGTACACAAAGCTAC-3	619pb	Dupre y col, 2003
	R5: CTGGGTGTGATTCCGCTGTTA-3		

Ace (Unión a colágeno)	F5' AAAGTAGAATTAGATCACAC'3'	320pb	Dupre y col, 2003
	R5' TCTATCACATTCGGTTGCG'3		
gelE (Gelatinasa)	F5'- AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC-3'	402pb	Dupre y col, 2003
	R5'- CTTCATTATTTACACGTTTG-3		
Esp (Proteína superficie)	F5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3'	933pb	Leavis y col, 2003 ⁴⁷
	R5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'		
Cyl A	F5' ACTCGGGGATTGATAGGC-3'	688pb	Vankerckhoven y col, 2004 ⁴⁸
	R5' GCTGCTAAAGCTGCGCTT – 3'		
	R5' GACTGACGTCCAAGTTTCAA – 3'		
Efa A	F5' CGTGAGAAAGAAATGGAGGA-3'	499pb	Dupre y col, 2003
	R5' CTAATAACACGTCACGAATG-3'		

Los productos de amplificación para cada uno de los genes, y mencionados en la tabla, se corrieron en geles de agarosa al 1% en solución TBE 1X – Syber Green, y analizados en fotodocumentador (ChemiDoc™ MP Imaging System BioRad Laboratories Inc). El tamaño de cada amplicón, se referenció respecto al valor reportado por cada uno de los autores y el tamaño en pb se comparó contra el patrón de peso molecular 1Kb Plus ladder (invitrogen).

Objetivo 3 – Evaluación de la formación de Biopelículas

5.7.4. Prueba en placa de Micro titulación para biopelícula

Para la producción de biopelículas se usó el ensayo propuesto por Al-Ahmad y cols. 2014 con algunas modificaciones ⁴⁹. Dicho método se fundamenta en evaluar la formación de biopelículas bacterianas adherida sobre una matriz de poliestireno, mediante turbidimetría asociada a un colorante base, donde la densidad óptica es proporcional a la placa en formación. Se debe estandarizar puntos de corte con el uso de aislamientos control positivas y negativas para la formación de biopelícula.

Para la técnica, en una placa de 96 pozos de poliestireno (Nunc Maxisort, Life Technologies Ltd., CA, USA) se sembraron 20µl del inóculo preparado más 180 µl de caldo BHI, y se incubó a 37°C por 48 horas. Se decantó el medio de cultivo líquido por aspiración con pipeta y las células no adheridas se eliminaron por lavado 3 veces con 300µl de PBS 1X (PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Una vez se dejó secar la placa a temperatura ambiente por 2 horas, se adicionaron 200µl de cristal violeta al 0.1% (Median Diagnostics GmbH, Dunningen, Suiza) durante 10 minutos. El colorante se decantó y se lavó 3 veces con agua destilada, y después de secar las placas a 60°C durante 10 min se adicionaron 50µl de etanol (99,9%, absoluto para análisis; Merck,

Darmstadt, Alemania) a cada pocillo hasta solubilizar el cristal violeta (30 minutos aproximadamente). Se realizó lectura a 595nm en un lector de placas Labsystems Multiskan y los resultados se expresaron como densidad óptica (DO). El ensayo se realizó por cuadruplicado y doble ciego, y se calcularon los valores medios de cada muestra. Se usa un blanco de pruebas, controles negativos sin crecimiento bacteriano, aislamientos control negativo no formadoras de biopelícula, aislamientos control positivo formadora de biopelícula ATCC 29212, controles internos positivos de especímenes clínicos positivos para formación de biopelícula verificados por otras metodologías. Se fijó un valor de corte bajo agregando 3 desviaciones estándar al blanco del control negativo, y se determinó como punto de corte alto o valor positivo, valores de los controles positivos que estuvieran 3 veces sobre el valor de corte bajo.

Objetivo 4 – Diversidad genética de los aislamientos

5.7.5. Análisis de diversidad genética

Con el fin de determinar la diversidad genética y los diferentes tipos de agrupamiento que tienen los 30 aislados de *EF*, se buscó una metodología que permitiera hacer un ensayo piloto donde se pudiesen analizar semejanzas y diferencias genéticas entre los aislamientos. Para tal fin, del ADN extraído se realizó una PCR 16s con primer universales, el producto de amplificación fue secuenciado mediante un servicio técnico y la construcción de árboles genéticos de las secuencias generadas se realizó mediante software comerciales que se describirán en los siguientes párrafos.

5.7.5.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó bajo el mismo protocolo ya descrito en la extracción de ADN para la detección de los genes de virulencia.

5.7.5.2. PCR 16s rRNA y Secuenciación

La amplificación se realizó por medio de la técnica PCR para el gen que codifica para la subunidad del ribosoma bacteriano 16S rRNA utilizando como primers 16S Forward 5' GGA GGA AGG TGG GGA TGA CG 3' y 16S reverse 5' ATG GTG TGA CGG GCG GTG TG 3'. En la reacción se utilizó una mezcla de reacción compuesta por Buffer 0,5X, DNTPs 200µM, primers 16s rDNA 0,5µM, MgCl₂ 2µM, Taq 0,45U a un volumen final de 25µL y se amplificó bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos a 95 °C, 30 s a 52 °C, y 1min a 72

°C con una extensión adicional de 10 min a 72 °C. El ADN amplificado se observó por electroforesis en agarosa al 1% con 5 alícuotas del producto de PCR utilizando un control negativo con ADN no amplificado ⁵⁰.

Los productos de PCR fueron secuenciados mediante un servicio técnico externo, y estos resultados se compararon con la base de datos del Gen Bank utilizando el programa BLAST. Las secuencias están pendientes de ser registradas en Gen Bank debido a que faltan algunos datos de la caracterización molecular que se trabajan en un proyecto paralelo a este.

5.7.5.3. Análisis filogenético

Se realizó con el programa MEGA versión 6 siguiendo lineamientos de Tamura y cols., 2021⁵¹ realizando 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) ⁵².

Objetivo 5 – Relación factores de virulencia, Biopelícula, diversidad genética

5.8. Diversidad genética y factores de virulencia

Con el fin de explorar la posible relación que hay entre estas variables del estudio se usaron pruebas no paramétricas, Test exacto de Fisher con un valor p menor a 0.05 como estadísticamente significativo, y los análisis efectuados a través de Stata 14. Los datos se muestran de manera descriptiva y en porcentajes.

6.RESULTADOS

6.1. Identificación de *EF*

6.1.1. Recuperación de aislamientos

La metodología de descongelamiento gradual permitió la recuperación de 30 aislamientos que fueron incluidos en el estudio, cuya pureza y viabilidad, se evaluó por los parámetros especificados en la siguiente tabla.

Tabla 3. Datos de viabilidad, pureza y recuperación de aislamientos *EF* empleadas en el estudio

Parámetro	Valor
Número de aislamientos incluidas en el estudio	30
% de aislamientos recuperadas como viables en el estudio	100%
CGP detectados en Gram de medios líquidos	100%
Otros resultados diferentes a CGP en Gram de medios líquidos	0%
% de tubos medio líquido positivos para cultivo CGP	100%
Otros resultados diferentes a CGP en cultivo de medios líquidos	0%
% de Cajas Agar Cromocult positivos para cultivo <i>Enterococcus</i>	100%
Otros resultados diferentes a <i>Enterococcus</i> en cultivo de medios sólidos	0%
Cajas o tubos con identificación de <i>EF</i> en el proceso	100%
Cajas o tubos con identificación diferente a <i>EF</i> en proceso	0%

Si bien estos resultados no forman parte de la investigación, y son inherentes a los procesos técnicos, constituyen un importante soporte para la validez de los procesos realizados en las aislamientos, pues verifican la calidad microbiológica de los aislamientos utilizados.

6.1.2. Identificación microbiológica por MALDI-TOF

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 4 muestra los puntos de corte usados por el software para la interpretación de resultados, y la tabla 5 los datos obtenidos para las 30 aislamientos testeadas.

Tabla 4. 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 5. 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

6.2. Detección de los genes de virulencia

6.2.1. 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).

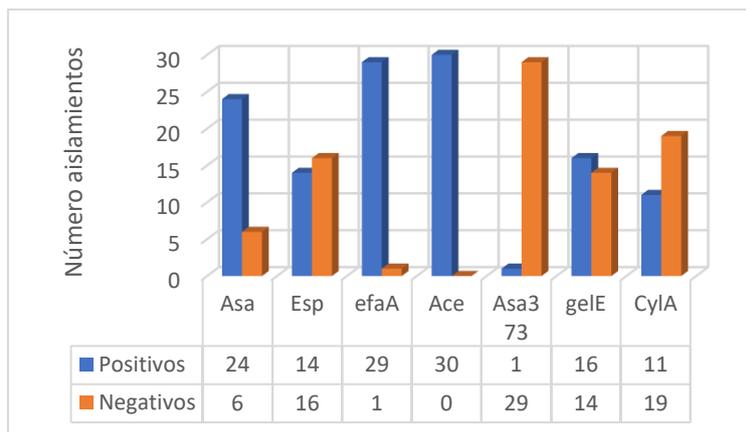


Figura 2. Número total de genes de virulencia detectados en los 30 aislamientos de *EF* utilizados en el estudio.

6.3. 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.

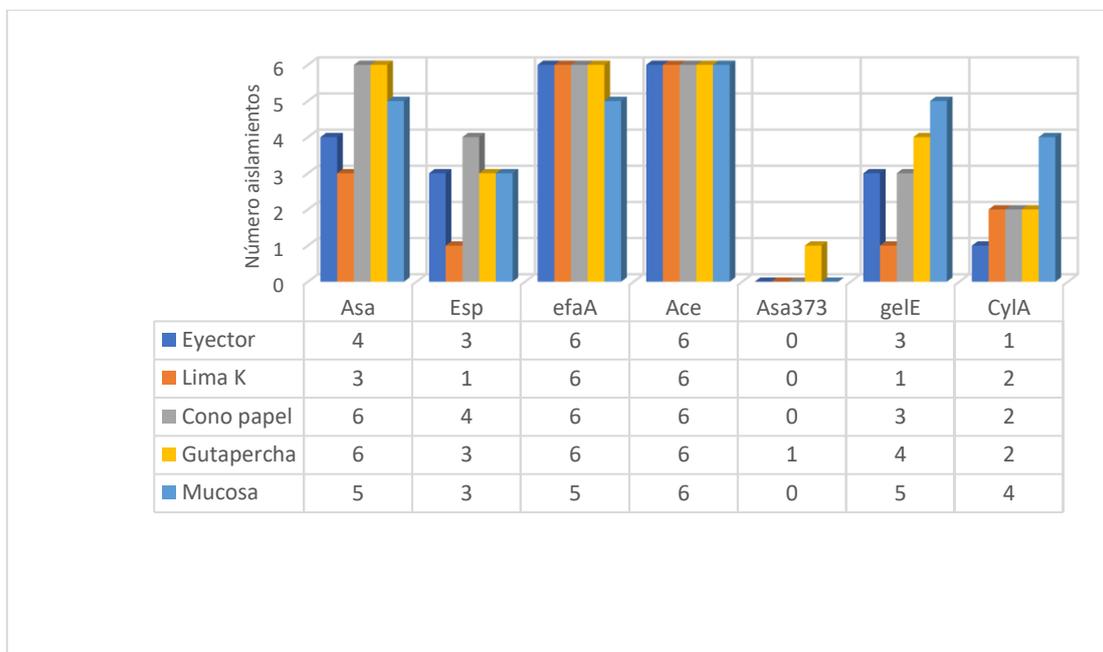


Figura 3. Distribución de genes de virulencia en los 5 orígenes de muestra usadas para el aislamiento de *EF*

6.4. Formación de biopelícula

6.4.1. 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 6. 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

6.4.2. 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).

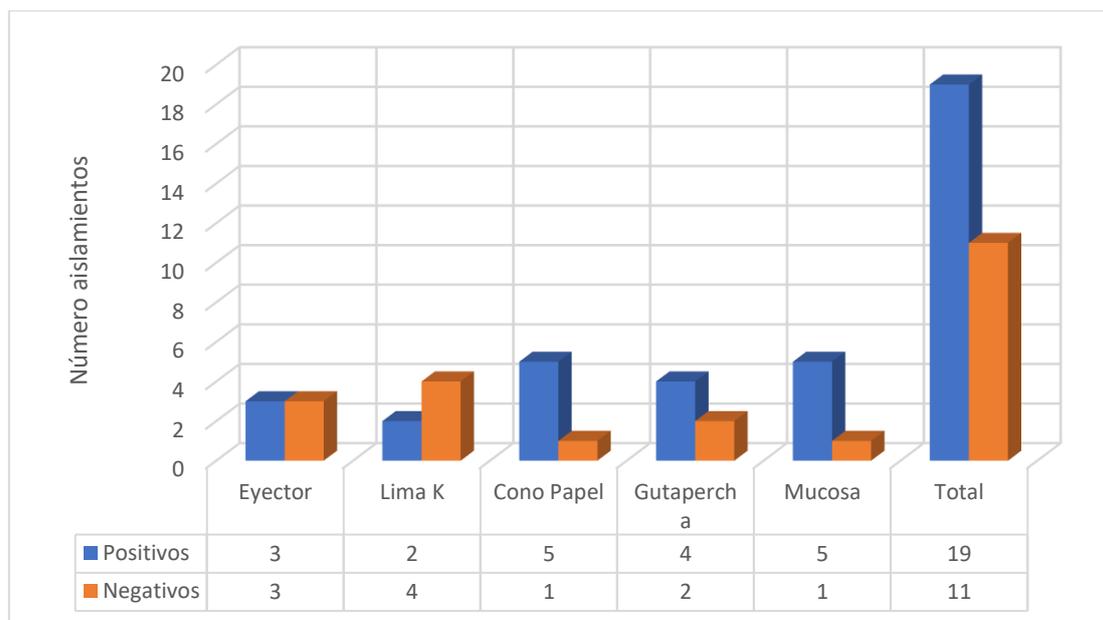


Figura 4. Frecuencia absoluta y frecuencia relativa de la formación de biopelícula en los 30 aislamientos de EF usados en el estudio

6.5. Diversidad genética

6.5.1. 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.

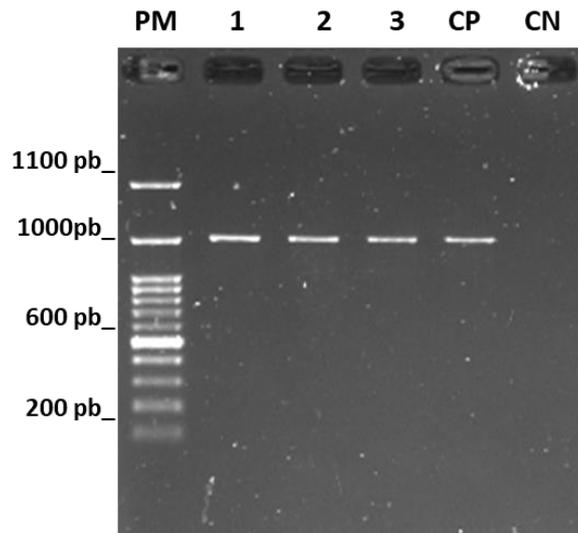


Figura 5. Gel de agarosa 1% con los productos de amplificación de 960pb del fragmento 16s rRNA de *EF*.
 PM Marcador de peso molecular, 1-3 aislamientos positivos, CP Control positivo, CN control negativo.

6.5.2. 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.

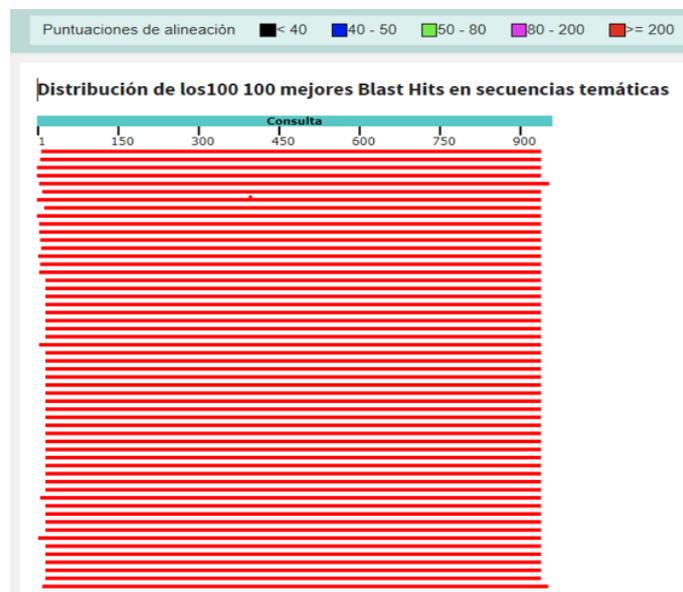


Figura 6. BLASTn de la secuencia de los productos de amplificación por PCR 16s rRNA de *EF*. Las líneas rojas corresponden a secuencias de *EF* reportados en otros estudios donde todos tienen similitud elevada en el score de identidad.

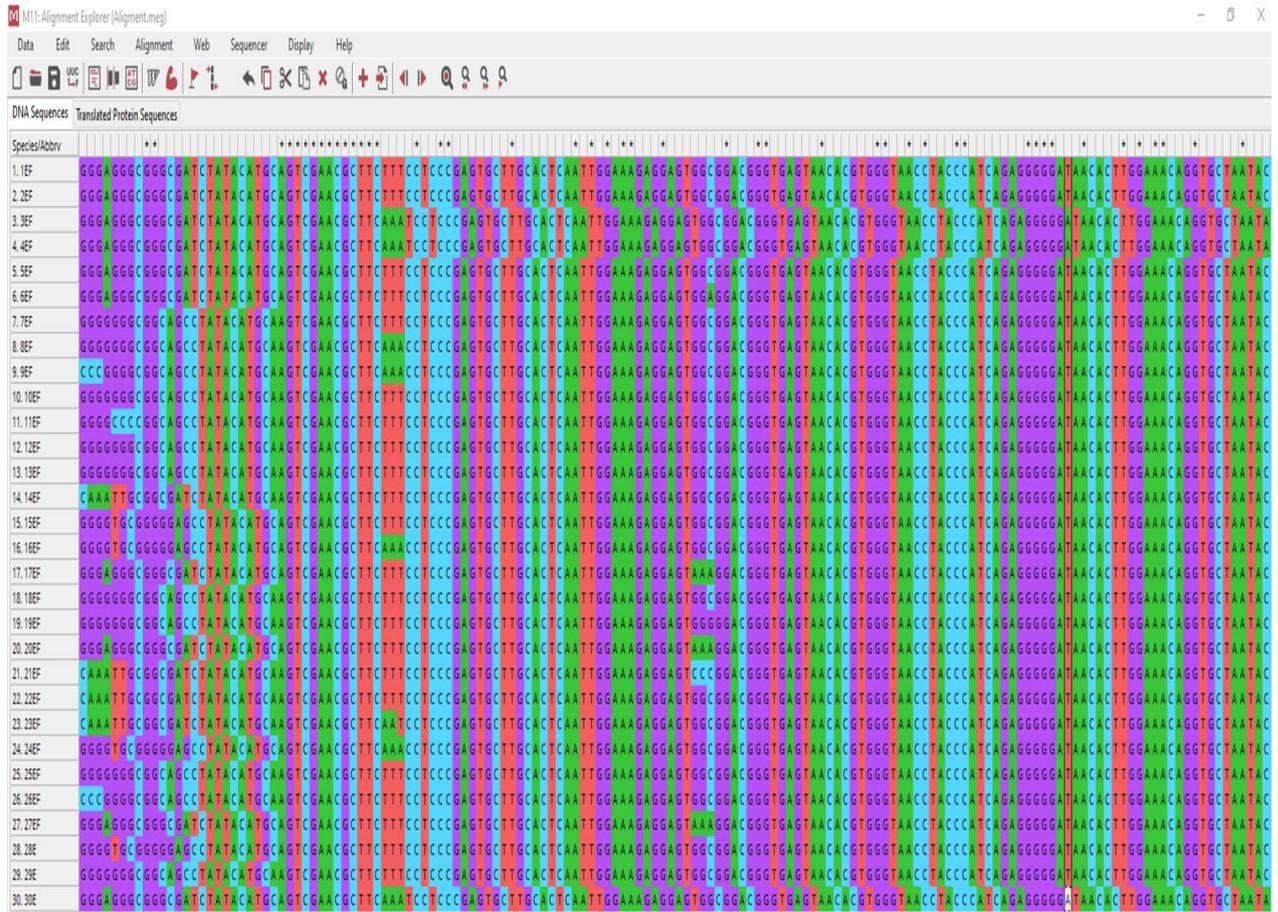


Figura 7. Cromatograma de la secuencia del amplificado de la PCR 16s rRNA de *EF* del estudio.

6.5.3. 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 clústeres 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).

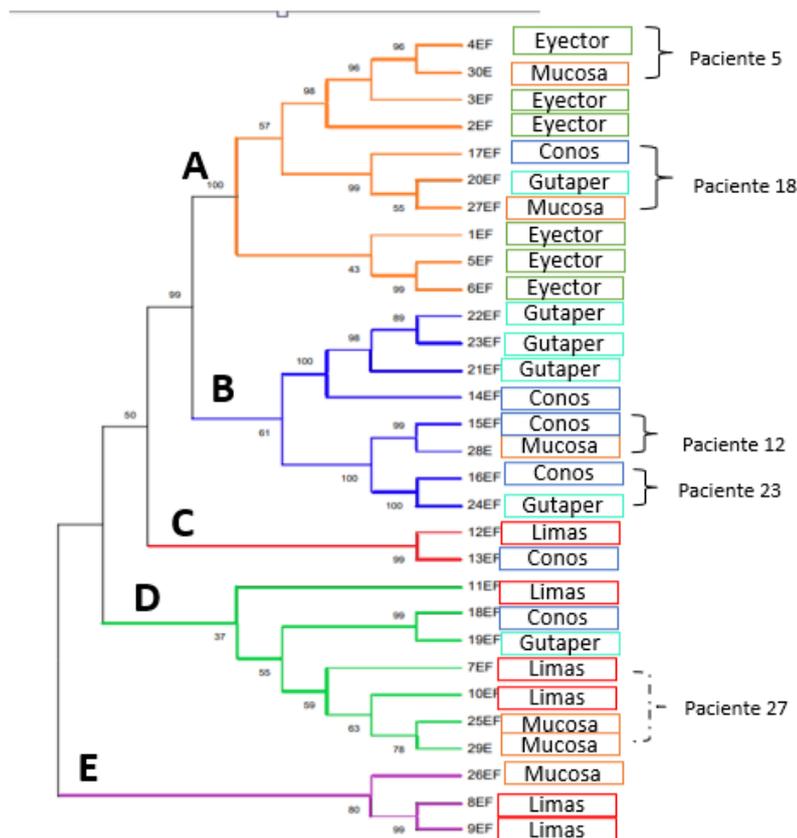


Figura 8. Árbol filogenético de las secuencias del producto de PCR 16S rRNA que muestran cinco agrupaciones principales entre los aislamientos de *EF* del estudio.

*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.

6.6. Relación factores virulencia / biopelícula / diversidad genética

Para mirar las posibles relaciones, se realizaron dos tipos de análisis. Uno grupal donde las muestras se agruparon según su ORIGEN en orales y endodónticas, donde se tomó como origen oral a las muestras de mucosa y como origen endodóntico a las otras muestras que hacían contacto con conducto radicular como eyector, gutapercha, lima K, cono de papel. Un segundo análisis individual por tipo de muestra, donde fue analizado por separado cada grupo limas K, cono papel, mucosa, gutapercha, eyectores. Cada grupo de análisis grupal y análisis individual se analizó su posible relación contra las variables del estudio como eran los genes de virulencia, la formación de biopelícula y la agrupación genética, y posteriormente se realizó el mismo análisis con el tipo de muestra (Cono de papel, eyector, gutapercha, mucosa, Lima K).

6.6.1. Relación del origen de la muestra con las variables.

Las tablas 6,7,8 muestran los resultados obtenidos para la relación del origen de la muestra con las variables analizadas, observándose que no hay asociación estadísticamente significativa en ninguno de los casos. Sin embargo, al analizar el comportamiento de los datos de cada uno de los grupos, se observan algunas tendencias que se detallan a continuación.

En la relación origen de la muestra con la presencia de genes (Tabla 6), no hay asociación estadísticamente significativa, pero se observa que a nivel oral hay una mayor expresión de los genes de invasión Asa, Efa A y GelE, en tanto que las muestras de origen endodóntico usan más el gen EFA y el Asa. Además, se observa que el gen Ace no presenta expresión de genes en ninguno de los dos orígenes.

Tabla 7. Relación del origen de la muestra (Endodóntico y oral) con la presencia de los genes de virulencia.

Variable analizada	Factor	Endodóntico	Oral	p-value Fisher's exact
	n	24	6	
Gen Asa	Negativo	5 (21%)	1 (17%)	1.0
	Positivo	19 (79%)	5 (83%)	
Gen Esp	Negativo	13 (54%)	3 (50%)	1.0
	Positivo	11 (46%)	3 (50%)	
Gen Efa A	Negativo	0 (0%)	1 (17%)	0.20
	Positivo	24 (100%)	5 (83%)	
Gen Ace	Negativo	24 (100%)	6 (100%)	1.0

	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	
Gen Asa 373	Negativo	23 (96%)	6 (100%)	1.0
	Positivo	1 (4%)	0 (0%)	
Gen gelE	Negativo	13 (54%)	1 (17%)	0.18
	Positivo	11 (46%)	5 (83%)	
Gen Cyl A	Negativo	17 (71%)	2 (33%)	0.16
	Positivo	7 (29%)	4 (67%)	

Columna 1 genes analizados; columna 2 resultado de la PCR; columna 3 y 4 datos obtenidos; columna 5 valor p.

Analizado el origen de las muestras respecto a la agrupación genética (Tabla 7), se observa que el Clúster A presenta los mayores porcentajes en ambos orígenes (endodóntico y oral), mientras que el Cluster D no está presente en origen endodóntico, mientras el Cluster B no está presente en el origen oral.

Tabla 8. Relación del origen de la muestra con la agrupación genética.

Variable analizada	Endodóntico	Oral	p-value Fisher's exact
Cluster A	9 (38%)	3 (50%)	0.22
Cluster B	6 (25%)	0 (0%)	
Cluster C	7 (29%)	1 (17%)	
Cluster D	0 (0%)	1 (17%)	
Cluster E	2 (8%)	1 (17%)	

Columna 1 agrupación genética; columna 2 y 3 resultados obtenidos; columna 4 valor p.

Analizado el origen de las muestras respecto a la formación de biopelícula (Tabla 8), aunque no hay diferencia estadísticamente significativa, si es claro que las muestras de origen endodóntico presentan el mayor número de aislamientos con formación de biopelícula.

Tabla 9. Relación del origen de la muestra con la formación de biopelícula

Variable analizada	Endodóntico	Oral	p-value Fisher's exact
Negativo	10 (42%)	1 (17%)	0.37
Positivo	14 (58%)	5 (83%)	

Columna 1 resultado biopelícula; 2 y 3 resultados obtenidos; columna 4 valor p

6.6.2. Relación del tipo de muestra con las variables.

Como ya se mencionó, para tipo de muestra, se analizó individual cada muestra (Cono papel, lima K, mucosa, gutapercha, eyector) respecto a los genes de virulencia, formación de biopelícula y las agrupaciones genéticas. Las tablas 9,10,11 muestran los resultados obtenidos para la relación del tipo de muestra con cada una de las variables.

Analizada la relación de cada grupo de muestra con los genes de virulencia (Tabla 9), se observa que no hay asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, es clara la tendencia que las muestras de gutapercha expresan un mayor número de genes como son Asa, Efa A, GelE. Además, el gen Efa A se encuentra presente en todos los tipos de muestra, contrario al gen Ace que se encuentra ausente en todos los tipos de muestra.

Tabla 10. Relación del tipo de muestra con la presencia de los genes de virulencia.

Variable analizada	Factor	Cono papel	Eyector	Gutapercha	Lima K	Mucosa	p-value Fisher's exact
	n	6	6	6	6	6	
Gen Asa	Negativo	0 (0%)	2 (33%)	0 (0%)	3 (50%)	1 (17%)	0.22
	Positivo	6 (100%)	4 (67%)	6 (100%)	3 (50%)	5 (83%)	
Gen Esp	Negativo	2 (33%)	3 (50%)	3 (50%)	5 (87%)	3 (50%)	0.59
	Positivo	4 (67%)	3 (50%)	3 (50%)	1 (13%)	3 (50%)	
Gen EfaA	Negativo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	1.0
	Positivo	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	5 (83%)	
Gen Ace	Negativo	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	6 (100%)	1.0
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Gen Asa 373	Negativo	6 (100%)	6 (100%)	5 (87%)	6 (100%)	6 (100%)	1.0
	Positivo	0 (0%)	0 (0%)	1 (13%)	0 (0%)	0 (0%)	
Gen gelE	Negativo	3 (50%)	3 (50%)	2 (33%)	5 (87%)	1 (17%)	0.26
	Positivo	3 (50%)	3 (50%)	4 (67%)	1 (13%)	5 (83%)	
Gen Cyl A	Negativo	4 (67%)	5 (87%)	4 (67%)	4 (67%)	2 (33%)	0.61
	Positivo	2 (33%)	1 (13%)	2 (33%)	2 (33%)	4 (67%)	

Columna 1 genes analizados; columna 2 resultado de la PCR; columna 3 y 4 datos obtenidos; columna 5 valor p.

Analizada la relación del tipo de muestra con los grupos genéticos (Tabla 10), se encontró una fuerte asociación significativa entre el sitio de toma de muestra y el clúster de heterogeneidad, sugiriendo, que la agrupación para cada muestra es dependiente de sus características genéticas. Adicionalmente se observa que el 100%

de limas K está en el clúster A, el mayor número de eyectores en el B y el de gutapercha en el grupo C.

Tabla 11. Relación del tipo de la muestra con la agrupación genética.

Variable analizada	Cono papel	Eyector	Gutapercha	Lima K	Mucosa	p-value Fisher's exact
Cluster A	2 (33%)	0 (0%)	1 (17%)	6 (100%)	3 (50%)	<0.001
Cluster B	1 (17%)	4 (67%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	
Cluster C	3 (50%)	0 (0%)	4 (67%)	0 (0%)	1 (17%)	
Cluster D	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	
Cluster E	0 (0%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	

Columna 1 agrupación genética; columna 2 y 3 resultados obtenidos; columna 4 valor p.

Analizado el tipo de muestra respecto a la formación de biopelícula (Tabla 11), aunque no hay diferencia estadísticamente significativa, los aislamientos forman biopelícula en cualquiera de las muestras, pero con un mayor predominio en mucosa y gutapercha.

Tabla 12. Relación del tipo de la muestra con la formación de biopelícula

Variable analizada	Cono papel	Eyector	Gutapercha	Lima K	Mucosa	p-value Fisher's exact
Negativo	1 (17%)	3 (50%)	2 (33%)	4 (67%)	1 (17%)	0.45
Positivo	5 (83%)	3 (50%)	4 (67%)	2 (33%)	5 (83%)	

Columna 1 resultado biopelícula; 2 y 3 resultados obtenidos; columna 4 valor p

7. 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 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.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos el estudio genero el siguiente conocimiento:

- *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.

9. PERSPECTIVAS, APLICACIONES, LIMITANTES

El estudio presentó algunas limitantes como fueron:

- Bajo número de muestras, limitaciones en protocolos técnicos, restricciones en el procesamiento de muestras debido a las restricciones por la pandemia COVID – 19.

- No haber incluido otros genes como hialuronidasa (Hy), cápsula de polisacárido Enterococo (Cps), determinantes de feromonas (Eep) debido a los problemas de compra y transporte de reactivos en pandemia.
- No haber registrado muestras en genbank debido a que faltan otros datos para la caracterización molecular de los aislamientos.

Como perspectivas para futuros trabajos y aplicaciones de este proyecto se sugiere:

- Ampliar el número de muestras para el análisis filogenético y el análisis de la relación de las diferentes variables testeadas.
- Realizar el estudio a nivel de RNA para mirar verdadera expresión de genes.
- Realizar el aislamiento a partir de un modelo Ex - vivo usando simuladores de cámara dental que permitan reproducir las condiciones sésiles del hábitat real de *EF*.
- Usar aislamientos mutadas que permitan verificar la expresión o no de los genes de virulencia.
- Dado que se observaron diferentes tipos de agrupaciones, y diferencias entre ellas, se sugiere utilizar una técnica más robusta para el análisis filogenético como PGFE acoplado a enzimas de restricción.

10. 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 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.
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, Lepasqueur 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 BPF, 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 Oskoueï D, Bekmen N, Ellidokuz H, Yılmaz 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, J, W, T, E, S, E, M, M, A, C, F, A, H, A, J de N and M, J, M, B. 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 SCS. 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 BPA, 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 rRNA 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