

**Marcadores moleculares para la taxonomía e identificación del género  
*Brucella* (Alphaproteobacteria)**

Molecular markers for the taxonomy and identification of the genus *Brucella*  
(Alphaproteobacteria)

Vivian de la Puente López<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4912-2984>

Ania M. Cutiño Jiménez<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6682-0752>

Tania López González<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8172-1912>

<sup>1</sup>Universidad de Oriente, Departamento de Ciencia e Innovación, Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado. Santiago de Cuba, Cuba

<sup>2</sup>Universidad de Oriente, Centro de Estudios en Biotecnología Industrial, Santiago de Cuba, Cuba

<sup>3</sup>Universidad de Oriente, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Farmacia. Santiago de Cuba, Cuba

\*Autor para la correspondencia: [vivianp@uo.edu.cu](mailto:vivianp@uo.edu.cu)

**RESUMEN:**

**Introducción:** El género *Brucella* está incluido en la familia Brucellaceae que pertenece al orden Rhizobiales y es reconocido por su alto grado de patogenicidad. Las bacterias de este género son responsables de la brucelosis, enfermedad que ha sido reportada como una de las zoonosis más importantes a nivel mundial por su incidencia en el ganado y el hombre. Los estudios previos para la clasificación taxonómica del género, se han basado fundamentalmente en el análisis del gen 16S ARNr. Sin embargo, pocas investigaciones se han dirigido a la identificación de marcadores moleculares que distingan a sus miembros de otros grupos de bacterias.

**Objetivo:** Identificar inserciones en secuencias de proteínas conservadas, que pudieran ser utilizados como marcadores moleculares para la taxonomía y diagnóstico de especies del género *Brucella*.

**Métodos:** Las secuencias homólogas de las proteínas analizadas fueron obtenidas de bases de datos internacionales y, posteriormente, alineadas con el programa ClustalX2, para ello fueron considerados los parámetros sugeridos en la literatura.

**Resultados:** Se identificaron inserciones en las proteínas oxoglutarato deshidrogenasa (componente E1) y ADN ligasa A específicas del género *Brucella*.

**Conclusiones:** Las inserciones halladas pueden ser empleadas como complemento a los métodos tradicionales de clasificación taxonómica y para el diagnóstico molecular de bacterias incluidas en el género *Brucella*.

**Palabras clave:** *Brucella*; marcadores moleculares; inserciones; oxoglutarato deshidrogenasa; ADN ligasa A.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Brucella* is a genus from the *Brucellaceae* family, *Rhizobiales* order. This genus is recognized for its high pathogenicity. *Brucella* bacteria cause brucellosis, a disease reported as one of the most important zoonoses worldwide due to its incidence in cattle and people. Previous studies on taxonomic classification of the genus have been mainly based on the analysis of gene 16S rDNA. However, few studies have been aimed at identification of molecular markers distinguishing its members from other groups of bacteria.

**Objective:** Identify insertions in preserved protein sequences which could be used as molecular markers for the taxonomy and diagnosis of species from the *Brucella* genus.

**Methods:** The homologous sequences for the proteins analyzed were obtained from international databases and aligned with the software ClustalX2, considering the parameters suggested in the literature.

**Results:** Insertions were identified in the proteins oxoglutarate dehydrogenase (component E1) and DNA ligase A, specific of the genus *Brucella*.

**Conclusions:** The insertions found may be used as complements to the traditional methods for taxonomic classification and for the molecular diagnosis of bacteria from the genus *Brucella*.

**Key words:** *Brucella*; molecular markers; insertions; oxoglutarate dehydrogenase; DNA ligase A.

Recibido: 19/09/2019

Aceptado: 20/11/2019

## Introducción

La familia Brucellaceae, miembro del orden Rhizobiales (clase Alphaproteobacteria) incluye al género *Brucella*, que comprende especies con un alto grado de patogenicidad y constituye el agente etiológico de la brucelosis. Esta enfermedad es una de las zoonosis más difundidas y que incide negativamente en la salud del hombre y los animales, a la vez que ocasiona cuantiosas pérdidas económicas. Entre el año 2006 y 2015, a nivel mundial fueron registrados 924 121 casos de brucelosis por *Brucella abortus* en ganado bovino y se han reportado 931 926 casos de brucelosis por *Brucella mellitensis*, el mayor número de casos se encuentra en Europa (625 266); cifras sin duda alarmantes. Esta enfermedad, además, se encuentra ampliamente difundida en América y ha sido diagnosticada en especies tanto domésticas como de vida silvestre. En países de América del Sur se reportan casos en casi todos los países, sobre todo en especies domésticas.<sup>(1)</sup>

En Cuba, el primer caso de brucelosis fue reportado en 1935, y solamente entre los años 1962 y 1966 se registraron 152 bovinos que portaban la enfermedad. La región oriental ha sido de las más afectadas, en el año 2013 fue reportada como la de mayor número de focos (25 % de los existentes en el país) y la población vacuna afectada por la brucelosis se elevó a 31 683 cabezas de ganado.<sup>(2)</sup> De manera general, la incidencia de esta enfermedad se ha visto elevada debido a la ganadería no controlada, para la producción de alimentos, lo que puede incidir en el incremento de la morbilidad por esta enfermedad.<sup>(3)</sup>

A pesar de que las brucelas son ampliamente estudiadas desde el punto de vista clínico, pocos estudios se han enfocado en la determinación de marcadores que puedan ser utilizados para la clasificación taxonómica y el diagnóstico molecular de estos patógenos en el ganado y en humanos. La comparación de secuencias de proteínas de diferentes especies, siguiendo la metodología de Gupta, permite la identificación de indeles (inserciones o deleciones) que pueden ser utilizados como marcadores moleculares para la taxonomía en bacterias.

Teniendo en cuenta que *Brucella* comprende especies de gran importancia desde el punto de vista médico y económico, el presente trabajo se basa en la metodología de Gupta para la identificación de inserciones en secuencias de proteínas, que puedan ser utilizados como marcadores moleculares para la clasificación taxonómica y el diagnóstico molecular de especies incluidas en este género.

## Métodos

El estudio se desarrolló en el Departamento de Biología y Geografía de la Universidad de Oriente, en Santiago de Cuba, Cuba. Se analizaron secuencias de las proteínas ADN ligasa NAD<sup>+</sup> dependiente y oxoglutarato deshidrogenasa (componente E1) pertenecientes al orden Rhizobiales de la clase Alphaproteobacteria. Estas se obtuvieron de la base de datos de proteínas UniProt<sup>(4)</sup>, y enriquecidas mediante búsquedas en otras bases de datos disponibles en el sitio National Center of Biotechnology Information utilizando el algoritmo BlastP de la herramienta BLAST.<sup>(5)</sup> El resultado de la búsqueda fue analizado a fin de escoger secuencias con un alto grado de similitud, aquellas con un valor  $E < 1e^{-20}$ .

Las secuencias escogidas fueron organizadas en conjuntos, archivadas en formato FASTA y posteriormente alineadas mediante el programa CLUSTALX 2.0.<sup>(6)</sup> Para el alineamiento fueron considerados los siguientes parámetros: alineamiento par a par: apertura de gap 35,00 y extensión de gap 0,75 y para el alineamiento múltiple: apertura de gap 15,00 y extensión de gap 0,30, además de la matriz Gonnet.<sup>(7)</sup>

Se utilizó la metodología desarrollada por Gupta en 1998, la cual se basa en el estudio de marcadores conservados en secuencias de proteínas homólogas. Acorde a esta metodología, los alineamientos obtenidos fueron analizados mediante inspección visual para identificar marcadores indeles de tipo inserción. Se tomaron en cuenta aquellas inserciones que presentaron una longitud constante en todos los miembros que la compartieron y estuvieron delimitadas por regiones conservadas en todas las secuencias.<sup>(8,9,10)</sup> Basado en las inserciones halladas, se analizaron los patrones de presencia o ausencia de estas, con el fin de determinar marcadores específicos del género *Brucella*.

## Resultados

A continuación, se describen las inserciones halladas, el nombre científico de cada especie incluida en el estudio es seguido por el número de acceso de su secuencia en la base de datos. Los puntos en las figuras muestran identidad con el aminoácido de la primera secuencia en el alineamiento, los guiones (-) representan brechas que indican ausencia del marcador y las inserciones están señaladas por cuadros.

La figura 1 muestra una inserción de 4 aminoácidos, identificados a partir del alineamiento del componente E1 de la proteína oxoglutarato deshidrogenasa. Esta inserción es característica del género *Brucella* y está ausente en el resto de los miembros del orden Rhizobiales. El alineamiento de las proteínas ADN Ligasa A evidenció una inserción de un aminoácido igualmente exclusiva del género *Brucella* (Fig. 2).

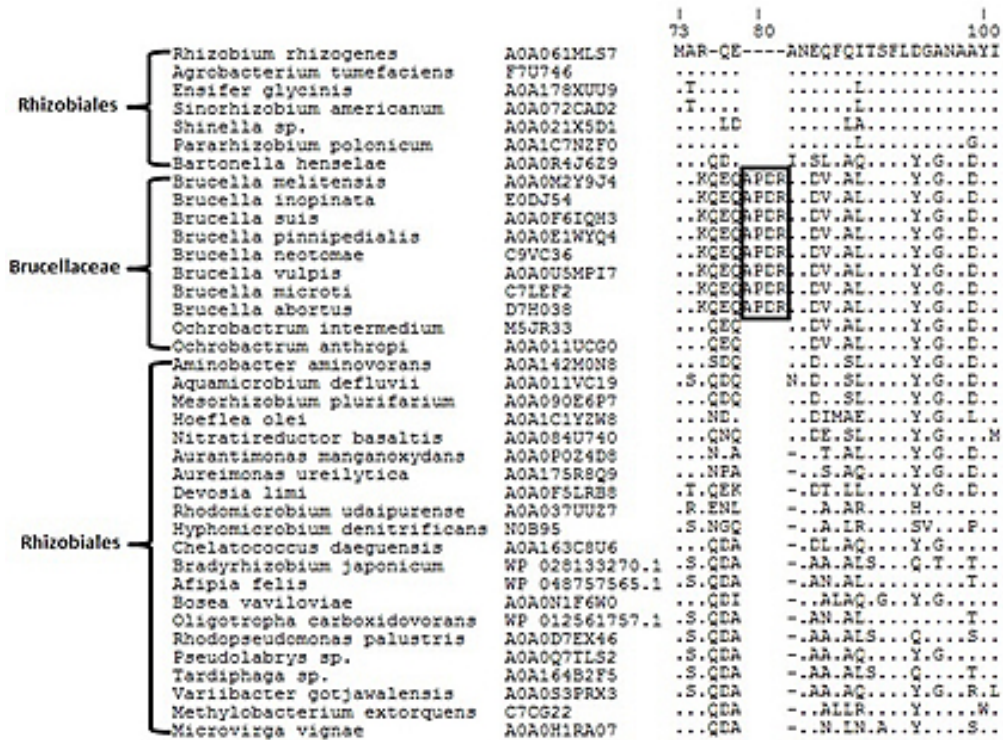


Fig. 1 - Inserción de 4 aa en la proteína oxoglutarato deshidrogenasa en el género *Brucella*.

		i	i
		110	150
	Rhodopseudomonas palustris	Q07FR9	FELVSGASPSQKVGAAAP-ARGFAKVCBAVFMLSLGSASFSCDE
	Bradyrhizobium japonicum	NP 773231	..F..AK.....SGR.R..R.....D...AKED
	Afpia felis	A0A090MIC7	...AKD.....C..S.A...IR.....D.....ED
	Bessea thiooxidans	A0A0Q1KMK5	...KETGGV.D...R..SGK...IR.R.....D.....EA
	Oligotropha carboxidovorans	B6JB45	...TTD.....C..S.A...IR.....D.....E.
	Mesorhizobium loti	NP 103104	.G..RED...RR...P..E.....R.....AK.YT.ED
	Aminobacter aminovorans	A0A142M5X3	.Q..RED...KS...V..SEK.G..T.V.....D...A.ED
	Nitratireductor aquibiodomus	ISC2Y8	...RED...RR...PV..SEK.E..R.K.....D.....ED
	Neeflea olei	A0A1C1YYT0	.H.KLVD...D...V..E..S.IT.T.....D.....ED
	Chelatococcus daeguensis	A0A165EW86	.D.ATCE.LTK...TR..SEK...R.R.....S...A.ED
	Bartonella henselae	YP 033886	...IRED...H.I-G...SEK.E.SV.SQ.....D...3ED
	Rhizobium leguminosarum	Q1ME47	...IRED...RH.....SVT.SP.V.R.....D.T...CED
	Agrobacterium tumefaciens	NP 532757	.A..RAD...K...FT..LFT..PIV.R.....D.T...EED
	Sinorhizobium medicae	A6UB73	.A.IRED.....SLT..P.V.R.....D.S...E
	Ensifer adhaerens	W8ICCS	.A.ARED...K.....SVT.QP.V.R.....D.T...E
	Ochrobactrum anthropi	A6WZR6	.H..RTD...LR..T...VSK..Q.V.R.....D.....D
	Brucella sp.	E2FS79	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella melitensis	AAL51770	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella melitensis	Q8Y156	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella abortus	B286P4	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella abortus	YP 222106	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella suis	AS9R05	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella canis	Q8F2Q3	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella canis	A9K679	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella ceti	CGS517	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella microti	E7LD13	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella inopinata	EDLFP0	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella pinnipedialis	A0A0E1KDW5	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella vulpis	A0A0G518G5	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Brucella neotomae	C9VB39	.A..RED...RR.....AAT..P.V.R.....D.....ED
	Nitrobacter hamburgensis	EP 00625900	.D.IIAN..T.T.....S.....D.....E.
	Methylobacterium extorquens	C5AT26	.A.TGTTEA.AG...K..SEK...R.....D.....A.ED
	Microvirga vignae	A0A081REM4	...KTSE.LT....PA..SEK...IR.RM.....A...A.E.
	Nyctimicrobium denitrificans	D8JQ85	...KPAQ...E...S...VA.A.G.IA.D.....D...CD
	Devosia limi	A0A0F5LRE9	.A..RMD...VA...V..D.....R.GI.....A...A.ED
	Rhodomicrobium vannielii	E31229	.S.ITFE...T...T..SEK...R.T.R.....V...ED
	Starkeya novella	D7A7V0	...KCID.L.E.....SSK...R.R.....D...A.E.
	Xanthobacter autotrophicus	A7IG64	.G.RGED.L.E.....SEK.G..A.K.....A.C...E.
	Felagibacterium halotolerans	G4RFP7	...RRAD.L.E.R...VD.....R.....D...D.AD
	Frosthecomicrobium hirschii	A0A0P6VHC1	.H.KRAD...ER..L.V..SAK...LR.....D...A.GD
	Rhizomicrobium sp.	A0A177QCR9	.L..RAD...NR...PA..SEK...V.KK.....D...ED
	Blastochloris viridis	A0A0M5B818	...RFD...R.....PK...K.H.....Q..M.EG.
	Methyloceanibacter caenitepidi	A0A0A8K3C2	.G.IRED...AKR...D...T.....V.D..G
	Tepidicaulis marinus	A0A0S1B9E9	.D..RED...RI.....SEK.E..V.K.....S...ED
	Lutibaculum baratangense	V4TNP7	.D..RED...LR.....SEK...R.T.....D...AED
	Aurantimonas manganoxydans	Q1YX75	...IRED...AR..TEV..SEK.G..R.....D...ED
	Aureimonas urelytica	A0A175RN63	.G..RAD...A...S...SSK...IR.....D...ED

Fig. 2 - Inserción de 1aa en la proteína Ligasa A en el género *Brucella*.

## Discusión

Como se mencionó anteriormente, este género constituye el agente etiológico de la brucelosis, una enfermedad de animales de granja que ha sido reportada como una enfermedad antropozoonótica de distribución mundial, que constituye un problema sanitario y económico de gran envergadura, que ha ocasionado importantes problemas de salud entre los individuos que ingieren alimentos contaminados o mantienen un estrecho contacto con el ganado.<sup>(11)</sup> Sus hospederos son variables en cuanto a la especie, *B. melitensis* afecta a pequeños rumiantes, *B. abortus* utiliza a bovinos como hospederos y *B. suis* a los cerdos. Estas especies también están presentes en humanos que mantienen estrecho contacto con el ganado o sus productos, o que practican, por ejemplo, la caza de jabalíes salvajes y más recientemente, *B. inopinata* se ha encontrado en humanos, aislada de un paciente con osteomielitis espinal.<sup>(12)</sup> Esta enfermedad en el hombre, normalmente se caracteriza por provocar un estado febril agudo acompañado de malestar, anorexia y postración, síntomas que progresan y llevan a severas complicaciones.<sup>(11,13)</sup> Los síntomas comunes son: fatiga y astenia acompañadas por cefalea, debilidad, respiración profusa

con olor característico, depresión y pérdida de peso, así como desórdenes reproductivos en el hombre como la orquitis o disfunción eréctil y abortos e infertilidad en la mujer.<sup>(14)</sup>

Otras fuentes de brucelosis en el hombre son el consumo de leche, queso fresco y otros derivados lácteos, fundamentalmente de origen caprino, contaminados y no pasteurizados; por contacto con productos, subproductos y desechos como tejidos o excreciones de animales enfermos y por inoculación de brucelas o inhalación del polvo de corrales o mataderos donde estas se encuentren; de ahí que el atender animales enfermos o estar en contacto con el agente, manipular carne y vísceras de animales infectados y trabajar en laboratorios, se consideren actividades ocupacionales de alto riesgo, situaciones en las que Cuba como país, que incluye la ganadería como actividad económica, no está exenta.<sup>(15)</sup>

En el periodo de 2008-2012, según la Dirección Nacional de Estadísticas del Ministerio de Salud Pública (MINSAP), fueron registrados 74 casos de brucelosis humana en Cuba, Pinar del Río fue la provincia que mayor incidencia reporta, con 41 pacientes confirmados. Asimismo, se informaron 33 nuevos focos de brucelosis bovina, con 2287 casos de animales domésticos infectados y no se reportaron casos de la infección en animales salvajes. Ese mismo año, se reportaron además, 3 nuevos focos de brucelosis porcina con 17 animales infectados.<sup>(15)</sup> Estos hallazgos pueden estar sesgados por un subregistro a nivel nacional y las debilidades en el diagnóstico microbiológico, pilar fundamental en la confirmación de la enfermedad, que se realiza en lo fundamental mediante la detección de títulos de anticuerpos específicos en muestras pareadas de sueros de los casos sospechosos.<sup>(3)</sup>

La morbilidad producto de la brucelosis en la sociedad cubana actual, se ve incrementada a medida que aumenta la cría de animales de granja con propósitos alimentarios y la producción casera de los derivados lácteos.<sup>(16)</sup> En el primer caso, al haber más animales de granja, aumenta el riesgo de contagio por esta enfermedad, a lo que hay que añadir la alta mortalidad animal provocada por los síntomas propios de la enfermedad y las alteraciones al aparato reproductor referidos anteriormente, esto último provoca una baja tasa de nacimientos en animales infectados. En cualquiera de los casos, la brucelosis supone un problema para el país.

Esta bacteria se reporta como Gram negativa, no móvil, sin actividad hemolítica e intracelular facultativa según el Manual Bergey de Sistemática de Bacterias.<sup>(17)</sup> No obstante, el genoma de *Brucella* contiene genes que codifican para flagelos y varias hemolisinas que permanecen inactivados. Bajo ciertas condiciones de presión selectiva,

estos genes se activan y provocan fenotipos móviles y hemolíticos.<sup>(11)</sup> La capacidad de *Brucella* de alternar entre estos fenotipos puede influenciar su grado de patogenicidad y podría proporcionar una visión sustancial para explicar la correlación entre la brucelosis y la anemia hemolítica que manifiestan los pacientes que la padecen.<sup>(18)</sup>

Por todo lo antes expuesto y la importancia de conocer los mecanismos por los que se rige la enfermedad, se hace necesario un mejor entendimiento de este género en términos moleculares. En este escenario, el descubrimiento de marcadores moleculares específicos de este grupo puede proporcionar una solución. Estos marcadores constituyen herramientas importantes y útiles para proveer de posibles regiones blancas para la acción de antibióticos en futuras investigaciones de esta temática, encaminadas a la identificación de características bioquímicas y/o fisiológicas únicas a *Brucella*. Además, la presencia de inserciones como marcadores moleculares pueden ser utilizadas como carácter distintivo para la identificación, clasificación y diagnóstico de especies del género. Las inserciones halladas en el presente estudio proporcionan herramientas moleculares para el diseño futuro de protocolos de diagnóstico, útiles para la epidemiología y el tratamiento de la brucelosis en el ganado y humanos.

De manera general, en la sistemática bacteriana, resulta de gran valor la identificación de marcadores moleculares o características exclusivas de los diferentes grupos de bacterias que puedan complementar los métodos convencionales de identificación y clasificación. La metodología de Gupta ha sido utilizada en estudios previos en el análisis de diferentes grupos de organismos<sup>(19, 20)</sup> y específicamente, en bacteria.<sup>(21, 22)</sup> Para concluir, el análisis de las proteínas mediante el alineamiento de secuencias homólogas del orden Rhizobiales permitió identificar inserciones que constituyen marcadores moleculares de utilidad para la clasificación taxonómica y el diagnóstico de especies del género *Brucella*.

### Referencias Bibliográficas

1. Cárdenas FR, Herrera JKL. Revisión actualizada de la epidemiología de Brucelosis (*Brucella abortus*, *Brucella mellitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*) en el Ecuador y el mundo. Centro de Biotecnología. 2018;6(1).
2. Mendoza O, Ramírez W, Yera G, Rosales Y, Mora E. La Brucelosis en bovinos de una provincia oriental de Cuba, en el período 2012-2014. REDVET Revista Electrónica de Veterinaria. 2015;16(5):1-11.



3. Obregón Fuentes AM, Muñoz Núñez K, Echevarría Pérez E, Rodríguez Olivera Y, Rodríguez Silveira J, Valdés Labrador Y, *et al.* Evaluación del sistema serológico Febrille Antigen Brucella para la pesquisa de anticuerpos contra brucelas, en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 2015;67(3):0-.
4. Consortium U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic acids research.* 2018;47(D1):D506-D15.
5. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research.* 1997;25(17):3389-402.
6. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research.* 1997;25(24):4876-82.
7. Hall BG. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences. *Molecular biology and evolution.* 2005;22(3):792-802.
8. Gupta RS. Protein Signatures Distinctive of Alpha Proteobacteria and Its Subgroups and a Model for  $\alpha$ -Proteobacterial Evolution. *Critical reviews in microbiology.* 2005;31(2):101-35.
9. Naushad S. Discovery and applications of novel protein based molecular markers for bacterial classification and identification 2015.
10. Gupta RS. Impact of genomics on the understanding of microbial evolution and classification: the importance of Darwin's views on classification. *FEMS microbiology reviews.* 2016;40(4):520-53.
11. Wareth G, Melzer F, Neubauer H. In Brucella: Selective pressure may turn some genes on instead of default off position. *Medical hypotheses.* 2017;103:29-31.
12. McDonald W, Jamaludin R, Mackereth G, Hansen M, Humphrey S, Short P, *et al.* Characterization of a Brucella sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *Journal of clinical microbiology.* 2006;44(12):4363-70.
13. Colmenero J. Infecciones bacterianas crónicas (II). Brucelosis. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado.* 2018;12(53):3124-31.
14. Oliveira Cavalcanti Soares CdP, Almeida Teles JA, Feitosa dos Santos A, Oliveira Firmino Silva S, Rocha Andrade Cruz MV, da Silva-Júnior FF. Prevalência da Brucella spp em humanos. *Revista Latino-Americana de Enfermagem.* 2015;23(5).

15. Díaz Herrera DF, Cruz Santana Y, Cruz Sui O, Martín Alfonso D, Alfonso González MJ, Ortiz Losada E, et al. Desarrollo y evaluación del desempeño de una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la brucelosis. *Revista de Salud Animal*. 2015;37:105-11.
16. Obregón Fuentes AM, Cabrera Alvarado A, Echevarría Pérez E, Rodríguez Olivera Y, Rodríguez Silveira J. Detección de *Brucella* spp. por un sistema inmunocromatográfico comercial, en muestras ambientales cubanas. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2015;67:0-.
17. Kuykendall L, Young J, Martínez-Romero E, Kerr A, Sawada H. *Rhizobium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2005:325-40.
18. Eskazan AE, Dal MS, Kaya S, Dal T, Ayyildiz O, Soysal T. Two cases of autoimmune hemolytic anemia secondary to brucellosis: a review of hemolytic disorders in patients with brucellosis. *Internal Medicine*. 2014;53(11):1153-8.
19. Khadka B, Adeolu M, Blankenship RE, Gupta RS. Novel insights into the origin and diversification of photosynthesis based on analyses of conserved indels in the core reaction center proteins. *Photosynthesis research*. 2017;131(2):159-71.
20. Ajawatanawong P, Baldauf SL. Evolution of protein indels in plants, animals and fungi. *BMC evolutionary biology*. 2013;13(1):140
21. Cutiño Jiménez AM, Barrera Roca L, de la Puente López V, Peña Cutiño HA. Molecular markers of insertion type in bacterias of the Moraxellaceae and Helicobacteraceae (phylum Proteobacteria) families. *MediSan*. 2018;22(01):40-7
22. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2016; 66(12):5575-99

### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### **Contribución de los autores**

*Vivian de la Puente López*: realizó la búsqueda bibliográfica, llevó a cabo la investigación con el método propuesto, elaboró las figuras presentadas y redactó el informe final.

*Ania Margarita Cutiño Jiménez*: diseñó la investigación y propuso el método, además, participó en la redacción y aprobación del informe final.

*Tania López González*: contribuyó a la búsqueda bibliográfica y participó en la redacción y aprobación del informe final.