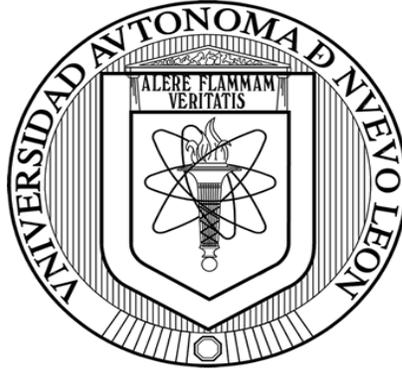


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Enterococcus faecalis* DE TRES HOSPITALES DE TERCER
NIVEL DE MÉXICO**

POR:

Q.B.P PERLA ELIZABETH LÓPEZ SALAS

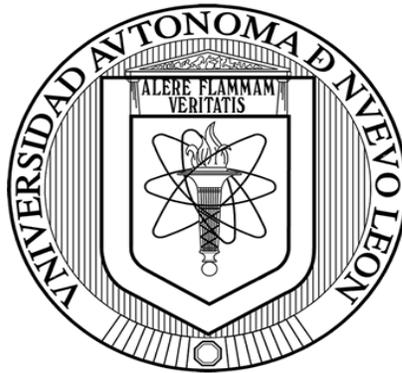
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA
MÉDICA**

MONTERREY, N.L.

JULIO, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Enterococcus faecalis* DE TRES HOSPITALES DE TERCER
NIVEL DE MÉXICO**

Por:

Q.B.P PERLA ELIZABETH LÓPEZ SALAS

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias
con especialidad en Microbiología Médica**

Julio, 2012

**“EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS
DE *Enterococcus faecalis* DE TRES HOSPITALES DE TERCER
NIVEL DE MÉXICO”**

Presentado por Q.B.P Perla Elizabeth López Salas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Bacteriología Molecular, ambos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología Médica de la Facultad de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en colaboración con el Hospital Civil de Guadalajara, y el Hospital General de Durango, bajo la supervisión de la Dra. C. Elvira Garza González.

Dr. C. Elvira Garza González

Director de Tesis

DEDICATORIA

A mis Padres

Quienes fueron mi motivación principal
para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a DIOS, por haberme permitido llegar al final de esta etapa y así mismo cumplir con un objetivo más en mi vida Profesional.

A mi Director de tesis Dr. C. Elvira Garza González, que sin su ayuda esto no hubiese sido posible, por toda la paciencia, gracias por brindarme su conocimiento, con todo mi corazón le agradezco por sacarme adelante en mi Maestría.

A mi comisión de tesis: Dr. C. Gloria Ma. González González y el M.S.P Jorge M. Llaca Díaz, por el interés y el esfuerzo para que el proyecto saliera adelantepor todo muchas Gracias.

Agradezco de todo corazón al Dr. Rolando Tijerina Menchaca, por la gran oportunidad que me brindó en el Departamento de Microbiología y su apoyo moral.

Rayo Morfín Otero, Dr. Juan Carlos Tinoco Favila, por proporcionarme los aislamientos para el estudio y su gran ayuda en el transcurso de mi Posgrado.

A mis compañeros de cubículo Samantha, Paola, Mariana y Rogelio, gracias por su apoyo incondicional, y sobre todo gracias por brindarme su Amistad.

Gracias Soraya y Néstor, sin ustedes esto no hubiese sido lo mismo, gracias por compartir su conocimiento y por todas las ocasiones en las que los necesité, siempre juntos

Al personal técnico, Angelitos, Lucy y Carlos..... muchas gracias por su ayuda, por escucharme y estar hay siempre que los necesite.

Maestra Karina, Maestra Coco y Maestra Marce muchas gracias por el apoyo tanto moral como en el apoyo de las clases de laboratorio, eso nunca se olvida, Gracias por Confiar en Mi.

Agradezco a todo el personal del Departamento de Microbiología, por el apoyo brindado durante mi Posgrado.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme brindado el apoyo económico para la realización del Posgrado.

A mis Padres Rogelio e Irma por todo su apoyo incondicional, por escucharme en los momentos difíciles y los momentos agradables, gracias por todos los consejos, son el motor de cada día de mi vida.... LOS AMO.

Gracias a mis hermanos, Jesús, Esthela, Roy y Lupin, a mis Cuñados Lucy, Yuliana e Israel, por aguantarme en esos días de estrés y escuchar mi seminario cada vez que lo presenté. Los amo mucho.

A mis sobrinos hermosos, Yayel, Joca, Mayi, Miri e Isabella, gracias por su comprensión, por levantarme el ánimo cada vez que lo necesité, por hacer que mis dificultades fuesen más sencillas. Están en mi Corazón y en mi mente siempre.

A mis Abuelitos, Graciano y Rita, quienes ya no están conmigo físicamente, pero en mi Corazón toda la vida. Gracias por ser mis Ángeles.

A mis Tíos en especial a mi Tío Chuy y mi Tía Hermelinda, por confiar en Mí y estar a mi lado cada vez que los necesité.

A todos mis Primos en especial a mis primas Claudia y Janeth por darme buena vibra y echarme porras... Las quiero mucho.

A mis amigas Caro, Brenda, Selene, Jaz y Angie... por todos sus buenos consejos, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por confiar en Mí.. Gracias Hermanas las Amo.

Gracias Violeta y Gil, por darme ánimo cuando lo necesité, por la presión para terminar la tesis.....pero sobre todo por su Amistad.

Gracias por estar conmigo en todo momento, por ser mi brazo derecho, por confiar en mí, por ser mi paño de lagrimas en las situaciones difíciles y a aquellas agradables, por tu paciencia al escucharme 1000 veces el seminario.....no acabaría de agradecerte..... Gracias Orlando.....TMT.

A todas esas personas que están en mi mente y mi corazón mil Gracias por su apoyo.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO

1. INTRODUCCIÓN	Página
1.1 Características microbiológicas de <i>Enterococcus faecalis</i>	1
1.2 Ecología de <i>E. faecalis</i>	2
1.2.1 Factores de riesgo	2
1.3 Infecciones asociadas a <i>E. faecalis</i>	3
1.3.1 Infecciones urinarias	3
1.3.2 Bacteremia	4
1.3.3 Endocarditis	4
1.3.4 Infección en heridas quirúrgicas	5
1.3.5 Infecciones del sistema nervioso central	5
1.4 Tasa de infección por <i>E. faecalis</i>	6
1.5 Factores de virulencia	6
1.5.1 Determinantes de patogenicidad	6
1.5.2 Gelatinasa	7
1.5.3 Producción de biopelícula	7
1.5.4 Sustancia de agregación (Agg)	8
1.5.5 Proteína enterocócica de superficie (Esp)	9
1.5.6 Proteína de unión a colágeno (Ace)	11
1.6 Resistencia a los antibióticos	12
1.7 Resistencia a los glucopéptidos	13

2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1 Estrategia general	20
4.2 Aislamientos	21
4.3 Identificación de aislamientos	21
4.3.1 Prueba de catalasa	22
4.3.2 Hidrólisis de esculina	22
4.3.3 Tolerancia a la sal	23
4.3.4 Reducción de telurito de potasio	23
4.3.5 Fermentación de piruvato	23
4.3.6 Fermentación de sorbitol	24
4.4 Selección de clonas (Electroforesis en gel de campos pulsados)	24
4.5 Obtención del ADN	28
4.6 Pruebas de susceptibilidad	29
4.6.1 Preparación del inóculo	29
4.6.2 Antibióticos y rangos utilizados	30
4.6.3 Preparación de las placas	31
4.7 Producción de biopelícula	33
4.7.1 Identificación de genes asociados a la producción de biopelícula	34

5. RESULTADOS	36
5.1 Identificación de aislamientos	36
5.2 Caracterización por PFGE	37
5.3 Susceptibilidad antimicrobiana	38
5.4 Producción de biopelícula	40
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES	48
8. PERSPECTIVAS	50
9. REFERENCIAS	51
10. APENDICES	55

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Comparación de la producción de biopelícula entre las especies de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> .	12
2	Rangos de concentraciones de los antibióticos.	30
3	Primers utilizados en el estudio, para la identificación de los genes asociados a la producción de biopelícula.	34
4	Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>E. faecalis</i> .	39
5	Aislamientos productores de biopelícula, clasificados en altos, moderados, bajos y no productores.	41
6	Asociación del gen <i>esp</i> , en aislamientos productores y no productores de biopelícula.	42
7	Producción de biopelícula en los diferentes tipos de muestra, y la frecuencia de los genes asociados a la producción.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sustancia de agregación que presenta el motivo LPxTG en la especie de <i>E. faecalis</i> .	9
2	Proteína enterococcica de superficie (Esp), de <i>E. faecalis</i> .	10
3	Proteína de unión a colágeno (Ace).	11
4	Formación de la biopelícula bacteriana.	12
5	Biosíntesis del peptidoglicano y mecanismo de acción de la vancomicina.	14
6	Resistencia a glucopéptido tipo <i>vanA</i> .	16
7	Esquema que muestra la estrategia general.	20
8	Identificación de aislamientos de <i>E. faecalis</i> .	36
9	Eelectroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), se muestran los 109 patrones de restricción. Con un porcentaje de similitud que fue desde el 0% al 95%.	37

ABREVIATURAS

AS	Sustancia de agregación
aa	Aminoácido
Ace	Proteína de unión a colágeno
°C	Grados centígrados
Cols	Colaboradores
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio
DO	Densidad óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGPC	Electroforesis en gel de campos pulsados
Esp	Proteína enterocócica de superficie
EUA	Estados Unidos de América
GC	Guanina – Citocinas
<i>GelE</i>	Gelatinasa
h	Horas

ITU	Infecciones del tracto urinario
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L	Prolina
mm	Milímetros
mL	Mililitro o mililitros
min	Minutos
mg	Miligramos
mM	Milimolar
n	Número de aislamientos
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PAI	Isla de patogenicidad
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundos

T	Glicina
TSB	Caldo triptona soya
TBE	Amortiguador Tris - Ácido bórico – EDTA
U	Unidad de actividad enzimática
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UV	Ultra violeta
UFC	Unidades formadoras de colonia
VRE	Enterococo resistentes a vancomicina
X	Treonina
μL	Microlitro o microlitros
μg	Microgramo o microgramos

RESUMEN

Antecedentes: La patogenicidad de *Enterococcus faecalis* se ha asociado con la formación de biopelícula. Esto se relaciona principalmente con tres proteínas: la proteína enterocócica de superficie (Esp), proteína de unión a colágeno (Ace) y la sustancia de agregación (AS). La producción de biopelícula también se ha asociado con la resistencia a los medicamentos. La resistencia a los múltiples antibióticos se destaca por la rápida disminución de la efectividad terapéutica en las infecciones por *E. faecalis*.

Material y Métodos: Se estudiaron 109 aislamientos clínicos (53 a partir de sangre, 24 de LCR, 17 de muestra de hueso, y 15 de orina). La resistencia a antibióticos se determinó por el método de microdilución en caldo. La relación clonal se determinó por electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE). La formación de biopelícula se llevó a cabo utilizando el método de cristal violeta y los genes asociados a su producción se determinaron por PCR.

Resultados: Se presentó una alta resistencia a la tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina y gentamicina (> 77%). No hubo resistencia a la vancomicina. La PFGE reveló 109 patrones de restricción diferentes con similitud de 0% a 95%. No se observó relación clonal entre los aislamientos. De los aislamientos estudiados el 4.6% de los aislamientos (5/109) fueron altos productores de biopelícula, el 48% (52/109) moderados productores, el 20% (39/109) bajos productores y el 11% (12/109) fueron no productores de biopelícula. El 44% (48/109) de los aislamientos presentaron el gen *agg*, el 39% (43/109) el gen *ace* y el 33% (36/109) el gen *esp*. La presencia del gen *esp* se asoció con la producción de biopelícula ($p < 0.001$).

Conclusiones: De los 109 aislamientos del estudio no mostraron relación clonal. Se presentó una resistencia entre el 40 y 70% a eritromicina, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacino y cloranfenicol. No hubo resistencia a la vancomicina. El 89 % (97/109) de los aislamientos fueron productores de biopelícula. La presencia del gen *esp* se asoció a la formación de biopelícula en los aislamientos de *E. faecalis*.

ABSTRACT

Background: The pathogenicity of *Enterococcus faecalis* has been associated with biofilm formation. This is related mainly to three proteins: extracellular protein (Esp), collagen binding protein (Ace) and aggregation substance (AS). Biofilm production has also been associated with drug resistance. This is highlighted by the rapid decline in effectiveness of the therapeutic in *E. faecalis* infections.

Material and Methods: We studied 109 clinical isolates (53 from blood, 24 from CSF, 17 from bone, and 15 from urine). Antibiotic resistance was determined by the broth microdilution method. Clonal relatedness was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Biofilm formation was carried out using the crystal violet method and genes associated to its production were determined by PCR.

Results: The isolates had high resistance to tetracycline, erythromycin, ciprofloxacin and gentamicin (>77%). There was no resistance to vancomycin. PFGE revealed 109 different restriction patterns with similitude of 0% to 95%. Of the isolates studied, 4.6% (5/109) were high biofilm producers, 48% (52/109) were moderate producers, 20% (39/109) were low producers and 11% (12/109) were non-producers. The *agg* gene was present in 44% (48/109) of isolates, the *ace* gene in 39% (43/109) and the *esp* gene in 33% (36/109). The presence of *esp* was associated with biofilm production ($p < 0.001$).

Conclusions: There was a resistance form 40% to 70% to erythromycin, tetracycline, gentamicin, ciprofloxacin and chloramphenicol. There was no vancomycin resistance. The isolates analyzed showed no clonal relationship and moderate biofilm production. The presence of *esp* was associated with biofilm production.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Características microbiológicas de *Enterococcus faecalis*

El género de *Enterococcus* contiene más de 40 especies, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, destacan principalmente a nivel hospitalario como agentes causales de infecciones en humanos, con una incidencia *E. faecalis* del 80% y tan solo un 15% *E. faecium* (1) . Los enterococos son células esféricas u ovoides que miden de 0.6 a 2.0 x 0.6 a 2.5 mm; son cocos Gram positivos que se pueden observar al microscopio en parejas o en cadenas cortas en medio líquido; son no capsulados; no forman esporas; son anaerobios facultativos; son catalasa negativa, aunque algunas cepas de *E. faecalis* pueden ser positivas, por la producción de una pseudocatalasa cuando crecen en medios que contienen sangre. Fermentan una amplia variedad de carbohidratos; la temperatura óptima de crecimiento es de 35°C, sin embargo pueden crecer en un rango de temperatura entre 10-45°C; son capaces de crecer en medios con concentraciones de sal hasta del 6.5%. Estos microorganismos hidrolizan la esculina a esculetina (2); toleran altas condiciones de pH: 9.6; por lo general producen β o γ hemólisis (3).

1.2 Ecología de *E. faecalis*

Los orígenes de las especies de enterococos varían en el medio ambiente de origen animal y humano. *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies más comunes del tracto digestivo del humano, y de animales (4, 5), se ha determinado que estos microorganismos se localizan esencialmente en el intestino delgado, especialmente estudios de identificación de especies empleando cultivo y análisis por el RNA 16S han mostrado que se presentan de forma abundante en el yeyuno y el íleon (6). El número de *E. faecalis* en las heces humanas varía entre 10^5 - 10^7 por gramo, y los de *E. faecium* de 10^4 - 10^5 por gramo (7), así mismo se ha encontrado la especie de *E. faecalis* en ambientes como: tierra, agua y en alimentos (8), esto debido a la capacidad de crecer y sobrevivir a condiciones adversas.

1.2.1 Factores de riesgo

En el pasado, se consideraba que la fuente de infección por enterococos hacia los pacientes era la flora endógena; sin embargo, muchos estudios muestra que la transmisión de *E. faecalis* entre pacientes, puede estar dada por las manos del personal de salud, o bien tras la inoculación directa en dispositivos médicos como el uso de catéteres intravenosos (7).

Los factores que contribuyen a la colonización o infección con enterococos de pacientes incluyen aquellos que brindan una ventaja selectiva a estos organismos al incrementar la probabilidad de diseminarse en un ambiente determinado, dentro de ellos se encuentra la hospitalización prolongada especialmente en el área de unidad de cuidados intensivos (UCI), la presencia de catéteres urinarios o vasculares y la administración de glucopéptidos orales (9, 10).

1.3 Infecciones asociadas a *E. faecalis*

Durante las últimas tres décadas, los enterococos han emergido como importantes patógenos intrahospitalarios, se han asociado a infecciones del tracto urinario, bacteremia, endocarditis, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones de tejidos blandos y en casos muy extremos, meningitis (11-13).

1.3.1 Infecciones urinarias

Las infecciones del tracto urinario bajo (ITU) son comúnmente causadas por los enterococos (13). Esta patología se considera como la más frecuente entre los pacientes de UCI, en algunos casos, se ha observado la producción de infecciones urinarias complicadas que generan pielonefritis y abscesos perinefríticos los cuales pueden conducir a bacteriemias (4).

Un reporte reciente de la red de hospitales en los Estados Unidos, indicó que los enterococos ocupan el tercer lugar entre los microorganismos más comúnmente aislados a partir de catéteres asociados a ITU, con una frecuencia del 80% para *E. faecalis* y del 20 % para *E. faecium* (14).

1.3.2 Bacteremia

El género *Enterococcus* se cataloga como el tercer agente causal de bacteremia intrahospitalaria en Estados Unidos (15). El origen de las bacteremias proviene principalmente de infecciones del tracto urinario y del tracto gastrointestinal, pero también se han reportado provenientes de la vía biliar, de catéteres intravenosos o urinarios infectados, heridas de pacientes con quemaduras o infecciones de tejidos blandos. Este tipo de infecciones ocurren generalmente en pacientes que se encuentran en condiciones críticas, los cuales han recibido gran cantidad de antibióticos. Las infecciones producidas por *E. faecium* tienen mal pronóstico comparadas con las producidas por *E. faecalis*. *E. faecium* presenta un alto grado de resistencia a los antibióticos por lo que estas infecciones son difíciles de erradicar (16).

1.3.3 Endocarditis

La endocarditis es una de las infecciones más serias causadas por enterococos, debido a la resistencia intrínseca de estos microorganismos a diversos antibióticos. Los enterococos causan del 5 al 15 % de los casos de endocarditis (1) y generalmente producen endocarditis del lado izquierdo, donde la válvula mitral es generalmente más

afectada que la aórtica (17). La infección se puede generar tanto en las válvulas nativas como en las prostéticas, siendo *E. faecalis* la especie más comúnmente aislada en estos procesos (18). Este tipo de infecciones se ha observado en personas de edad avanzada, la afección predomina en el sexo masculino; la frecuencia hombre/mujer es de 2:1 y la edad promedio rebasa los 60 años.

1.3.4 Infección en heridas quirúrgicas

Este tipo de cuadros constituyen la tercera causa de enfermedades intrahospitalarias. Se estima que entre el 5 y 12% de los pacientes intervenidos quirúrgicamente desarrollan infecciones post-operatorias. Cuando la cirugía involucra a los tractos gastrointestinal, respiratorio o genitourinario, la probabilidad de que ocurra una infección varía alrededor del 30%, esto debido a que esas regiones anatómicas albergan una gran cantidad de microorganismos de la flora normal (19).

1.3.5 Infecciones del sistema nervioso central

Los enterococos causan meningitis neonatal, pero también se han visto relacionados con infecciones del sistema nervioso central en niños y adultos (4). Generalmente en estos casos se han visto asociados a enfermedades previas, pacientes que han sufrido procedimientos invasivos del sistema nervioso central como cirugías, individuos con malformaciones que han sido tratados con antibióticos (20).

1.4 Tasa de infección por *E. faecalis*

Entre las especies del género de *Enterococcus*, *E. faecalis* es la especie aislada con mayor frecuencia de ambientes hospitalarios, sin embargo la frecuencia es menor en muestras del ambiente y de muestras de animales y se ha encontrado en este tipo de ambientes con mayor incidencia a la especie de *E. faecium* (21). La razón de esta falta de diversidad puede estar relacionada con los factores de virulencia asociados a la especie de *E. faecalis*.

Los pacientes hospitalizados tienen una mayor incidencia a la infección por *E. faecalis*, no solo por la virulencia que presenta esta especie, sino también por el propio hospital, esto fue reportado por el Departamento de Salud del Reino Unido (22).

1.5 Factores de virulencia

1.5.1 Determinantes de patogenicidad

En el género enterococos, los determinantes genéticos que han adquirido algunas especies han incrementado la capacidad de este género para causar infecciones en el humano, por medio de la producción de toxinas citolíticas, gelatinasa, hemolisina, sin embargo el factor de virulencia más estudiado en esta especie es la producción de biopelícula el cual está asociado a tres proteínas principalmente: la sustancia de agregación, proteínas de superficie (proteína enterococcica de superficie y proteína de unión a colágeno) (23, 24).

1.5.2 Gelatinasa

El gen *gelE* codifica para una proteína secretada de tipo extracelular metaloproteasa dependiente de zinc (25) denominada gelatinasa, la cual al hidrolizar gelatina, colágeno y caseína, suministra nutrientes a la bacteria por la degradación del tejido del huésped. Adicionalmente, esta proteína se encuentra relacionada con la producción de biopelículas (26).

1.5.3 Producción de biopelícula

La biopelícula es una población de células irreversiblemente unida en varias superficies bióticas y abióticas, dentro de una matriz hidratada de sustancias exopoliméricas, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (27).

La formación de biopelícula es un proceso complejo, el cual comprende el apego y la inmovilización sobre una superficie, célula a célula, la interacción, la formación de microcolonias, y el desarrollo de una estructura denominada biopelícula en tres dimensiones (28). Las bacterias que se encuentran formando una biopelícula se comportan de manera diferente en comparación de las bacterias libres (células planctónicas) (figura 4).

La producción de biopelícula está regulada por sistemas de detección de quórum en varios patógenos bacterianos. Las biopelículas son muy difíciles de erradicar y son una fuente de muchas infecciones crónicas.

Una biopelícula madura puede tolerar los antibióticos en concentraciones de 10 hasta 1000 veces más que las requeridas para matar las bacterias planctónicas.

Las bacterias en las biopelículas son resistentes a la fagocitosis, por lo que las biopelículas son extremadamente difíciles de erradicar de los hospederos (29). Las bacterias en las biopelículas colonizan una amplia variedad de dispositivos médicos, como catéteres, marcapasos artificiales, válvulas cardíacas protésicas y en aparatos ortopédicos, y están asociados con varias enfermedades humanas.

1.5.4 Sustancia de agregación (AS)

Dentro de los factores de virulencia más importantes en *E. faecalis* se encuentra la sustancia de agregación, proteína que ha sido bien caracterizada en términos de función y de contribución a nivel de virulencia siendo la primera proteína descrita en enterococo que presenta el motivo LPxTG.

Este motivo se localiza en el C-terminal de las proteínas, es el sitio de acción de las enzimas sortasas y está formado por una región de aminoácidos conservados como leucina (L), prolina, (P) cualquier aminoácido (X), treonina (T) y glicina (G), (figura 1) (30). Esta proteína está codificada por los genes *asp1*, *asc10* y *asal* los cuales se localizan en plásmidos inducibles a feromonas denominados pPD1, pCF10, pAD1, respectivamente. La expresión de los genes que codifican para la sustancia de agregación es inducida por feromonas (los cuales son oligopéptidos de 7 a 8 aminoácidos (aa) generalmente de tipo hidrofóbico) que son secretados por enterococos libres de plásmidos (31).

Estos péptidos promueven la expresión de la sustancia de agregación en la superficie celular estimulando el contacto físico entre una cepa donadora portadora del plásmido y una cepa receptora (32). La sustancia de agregación desempeña las siguientes funciones, potenciación de la conjugación de plásmidos, adhesión a los tejidos del hospedero, promoción de la internalización y la supervivencia en los fagocitos.

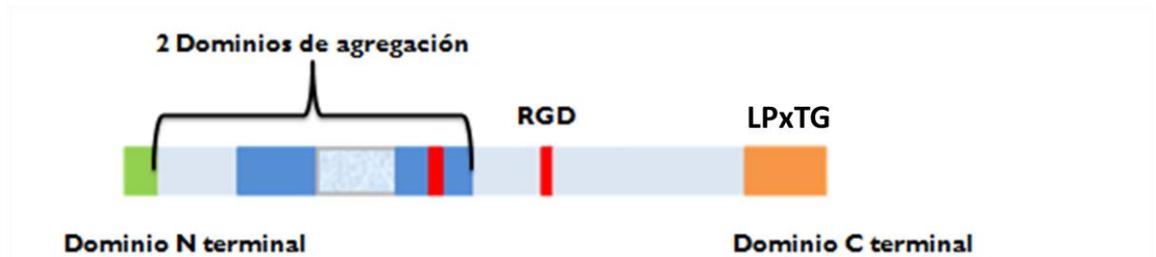


Figura 1. Sustancia de agregación que presenta el motivo LPxTG en la especie de *E. faecalis*.

1.5.5 Proteína enterocócica de superficie (Esp)

El gen *esp* fue inicialmente detectado en un *E. faecalis* resistente a gentamicina, este gen se presenta en una isla de patogenicidad (PAI) con un bajo contenido de GC (32.2%) comparado con el resto del genoma de *E. faecalis* el cual es de 37.5%. Esta PAI presenta determinantes de virulencia, reguladores transcripcionales y transposasas (31). El gen *esp* codifica para la proteína enterocócica de superficie denominada Esp, el cual es un polipéptido de gran tamaño que es altamente conservado en sus dominios repetitivos y es detectado frecuentemente en aislamientos de origen clínico (33).

Esta proteína tiene en su N-terminal un péptido señal, un dominio supuesto que podría estar implicado en la formación de biopelículas y en el C-terminal un dominio de anclaje al peptidoglicano con un motivo (Y/F PXTG) el cual es reconocido por sortasas, las cuales permiten anclar covalentemente la proteína Esp a la pared celular (34) (figura 2).

En relación al papel de Esp en la formación de biopelículas, Tendolkar y Cols reportaron un estudio en el cual la formación de biopelículas se redujo cuando se evaluó una mutante isogénica y se comparó con la respectiva cepa productora de la proteína Esp (35). Otros estudios mostraron que el dominio N-terminal de Esp es suficiente para la producción de este fenotipo, lo cual fue comprobado cuando una mutante de Esp que no expresaba el dominio N-terminal presentó menor capacidad de formar biopelículas (36).



Figura 2. Proteína enterococcica de superficie (Esp), de *E. faecalis*.

1.5.6 Proteína de unión a colágeno (Ace)

Ace es ubicua entre cepas de *E. faecalis* comensales y patógenas, por lo cual se ha propuesto que se puede utilizar para identificar las cepas de *E. faecalis* por hibridación (37). Esta adhesina media la unión al colágeno tipo I, colágeno tipo IV.

Ace está formada por un dominio N-terminal altamente conservado denominado A, el cual presenta un péptido señal y dos subdominios N1 y N2. En el C-terminal se encuentra un dominio variable que posee de 2 a 5 repeticiones de 47 aa, precedidas de repeticiones de 20 aa, y un motivo LPxTG que permite el anclaje a la pared celular (38) (figura 3).

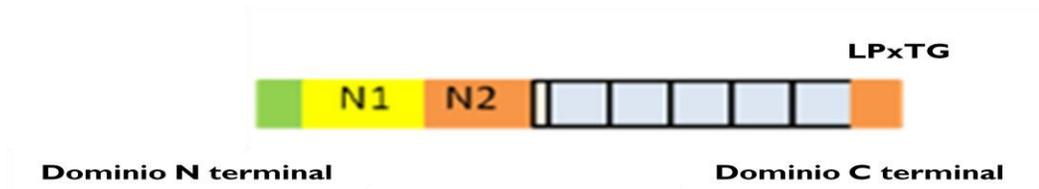


Figura 3. Proteína de unión a colágeno (Ace).

Tabla 1. Comparación de la producción de biopelícula entre las especies de *E. faecalis* y *E. faecium*.

Lugar	% de formación de biopelícula de <i>E. faecalis</i>	% de formación de biopelícula de <i>E. faecium</i>	Referencia
Roma, Italia	80	48	(39)
Cerdeña, Italia	87	16	(40)
Reino Unido	100	42	(41)
India	26	0	(42)

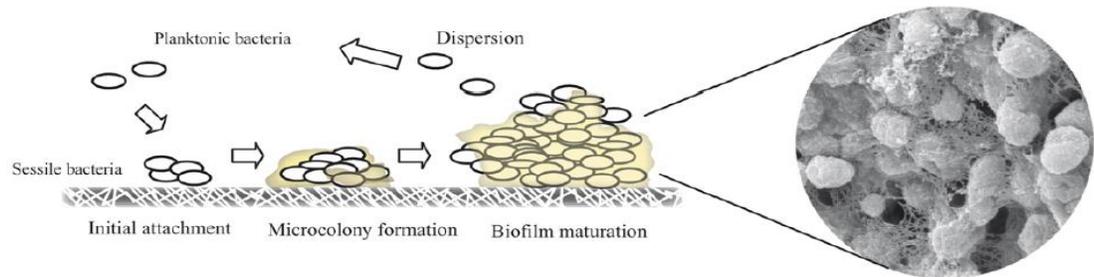


Figura 4. Formación de la biopelícula bacteriana.

1.6 Resistencia a los antibióticos

E. faecalis representa un desafío debido a su resistencia intrínseca a varios antibióticos, tales como la penicilina, ampicilina, tetraciclina, eritromicina y el cloranfenicol. La resistencia a múltiples antibióticos ha resaltado el rápido descenso de las opciones terapéuticas para estos microorganismos (43).

1.7 Resistencia a los gluco péptidos

A principio de la década de los 80's se identificó el primer aislado de *E. faecalis* resistente a la vancomicina. Las cepas VRE se aislaron por vez primera en Europa, durante el lapso 1986-1987, al parecer en Francia y en el Reino Unido, aunque poco tiempo después se les empezó a detectar en EUA, Australia, Argentina, Japón, etc. En 1993, la incidencia de estos microorganismos en los hospitales estadounidenses ascendió hasta el 12% (44, 45).

La resistencia de los enterococos a los gluco péptidos se caracteriza por la síntesis de precursores de peptidoglicano terminados en D-lactato (D-Lac) o D-serina (D-Ser) y la eliminación de los precursores que son sintetizados normalmente por la célula es decir los terminados en D-alanina (D-Ala), (figura) (46).

Hasta el momento, se han descrito siete fenotipos de resistencia a gluco péptidos bien caracterizados, en el cual el peptidoglicano terminal es D-Ala –D-Lac. Representado por los grupos: VanA, VanB y VanD (47) y los grupos en los cuales el peptidoglicano termina en D-Ala-D-Ser: VanC-1, VanC-2/3 VanE, VanG, VanL, (48).

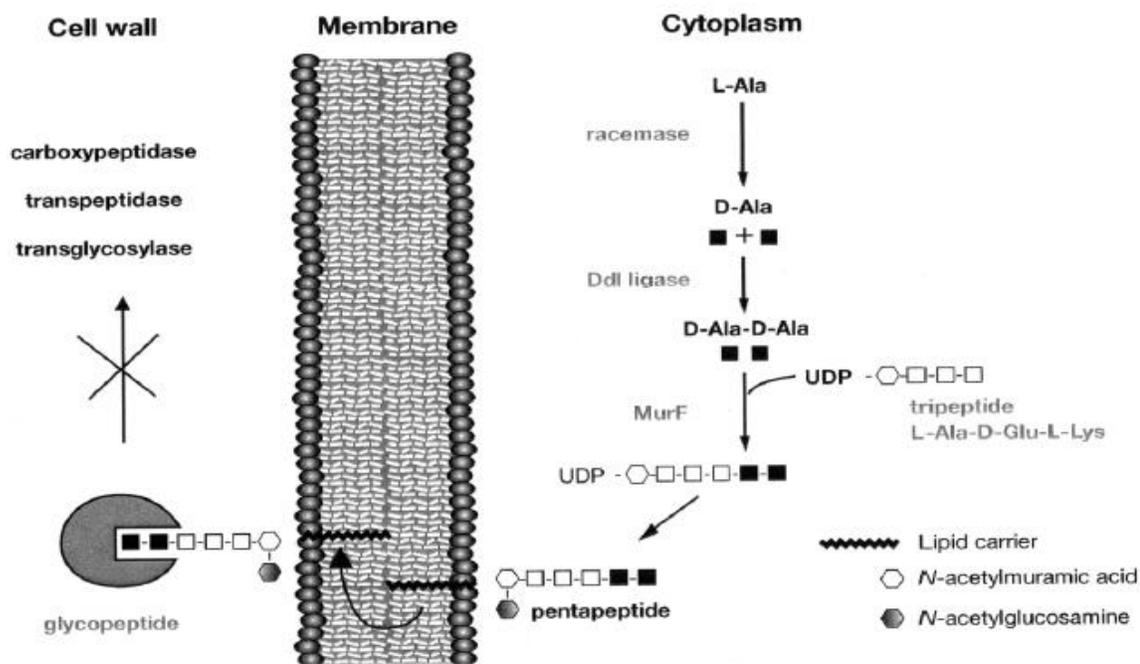


Figura 5. Biosíntesis del peptidoglicano y mecanismo de acción de la vancomicina.

Sin embargo, el tipo *vanA* es el de mayor distribución y frecuencia, por lo que ha concentrado una mayor cantidad de estudios, e inclusive, constituye el paradigma de acción de los genes *van*: éstos aportan a las clonas implicadas la capacidad para sintetizar y ensamblar terminaciones D-alanil-D-lactato (D-Ala-D-Lac) en el peptidoglicano de su pared celular, en vez de producir las clásicas moléculas D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala), las cuales funcionan como el “blanco” de los Glucopéptidos (49).

En otras palabras, las cepas que poseen el gen *vanA* crean una vía alterna de biosíntesis de la pared celular, a fin de seguir produciendo esta importante estructura, aunque sin receptores para vancomicina y teicoplanina.

A tal respecto, la maquinaria biosintética requerida para efectuar dicha adaptación depende del transposón Tn1546 y, particularmente, de cinco genes ubicados en este último: *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA* y *vanX*, cuyos productos realizan las siguientes funciones: la proteína VanA (derivada del gen *vanA*), corresponde a la enzima que sintetiza a la molécula D-Ala-D-Lac, la VanH actúa como una alfa-cetoácido reductasa que provee de sustrato a VanA (convirtiendo al piruvato en D-lactato) y, por último, VanX es una dipeptidasa que hidroliza específicamente al dímero D-Ala-D-Ala, pero incapaz de reconocer al sustituto D-Ala-D-Lac (3).

De esta manera, los enterococos sintetizan su peptidoglicano con base en residuos D-Ala-D-Lac y en total ausencia de la molécula D-Ala-D-Ala, requerida como “blanco” por los glucopéptidos, (50) (figura 6)

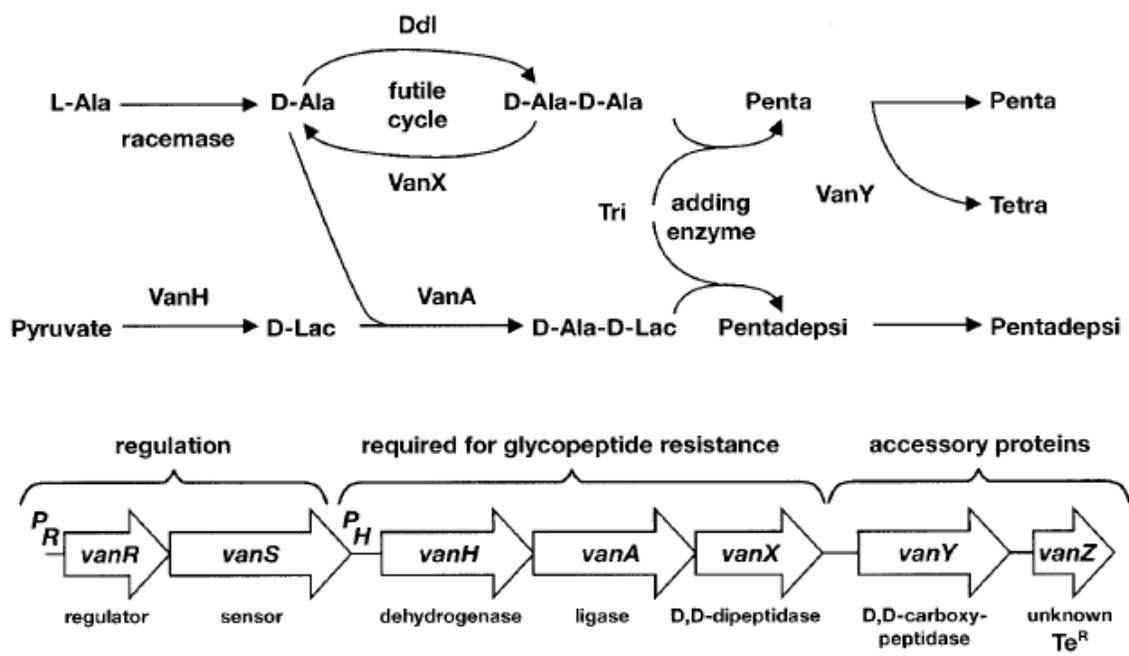


Figura 6. Resistencia a glucopéptido tipo *vanA*.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, *E. faecalis* es uno de los principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias. Las infecciones causadas por esta bacteria están asociadas a una alta mortalidad, debido principalmente al incremento en la resistencia a los antibióticos en los últimos años. En México no hay reportes de la susceptibilidad a los antibióticos y de los factores de virulencia en aislamientos clínicos de *E. faecalis*.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar aislamientos clínicos de *E. faecalis* recuperados de tres hospitales de tercer nivel del país.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar aislamientos clínicos de *E. faecalis* mediante pruebas bioquímicas.
2. Detectar la presencia de clonas por electroforesis de campos pulsados.
3. Caracterizar el fenotipo de resistencia a antibióticos y los genes asociados a la farmacorresistencia. *(En caso de encontrar aislamientos resistentes a la vancomicina se determinará el gen asociado a la misma)
4. Determinar la formación de biopelícula y los genes asociados a su producción.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Estrategia general

Para llevar a cabo los objetivos específicos se siguió la siguiente estrategia general, (figura 7). A partir de un cultivo joven de 24h de *E. faecalis* sembrado en agar sangre, se procedió a realizar diferentes pruebas bioquímicas, para llegar a la identificación de los aislamientos del estudio. Una vez identificados los aislamientos se procedió a realizar la técnica de Electroforesis en gel de campos pulsados, con la cual se llevó a cabo la selección de las diferentes clonas, seguido de esto, se procedió a realizar pruebas de susceptibilidad a los antibióticos; aquellos aislamientos que presentaron resistencia a glucopéptidos como la vancomicina, se les procedió a realizar la identificación de los genes asociados a la resistencia a la vancomicina, en nuestro caso los genes *vanA* y *vanB*. Por último se evaluó la producción de biopelícula de los aislamientos en estudio, así mismo se llevo a cabo la identificación de los genes asociados a la producción de biopelícula (*esp*, *ace*, *agg*).

Estrategia general

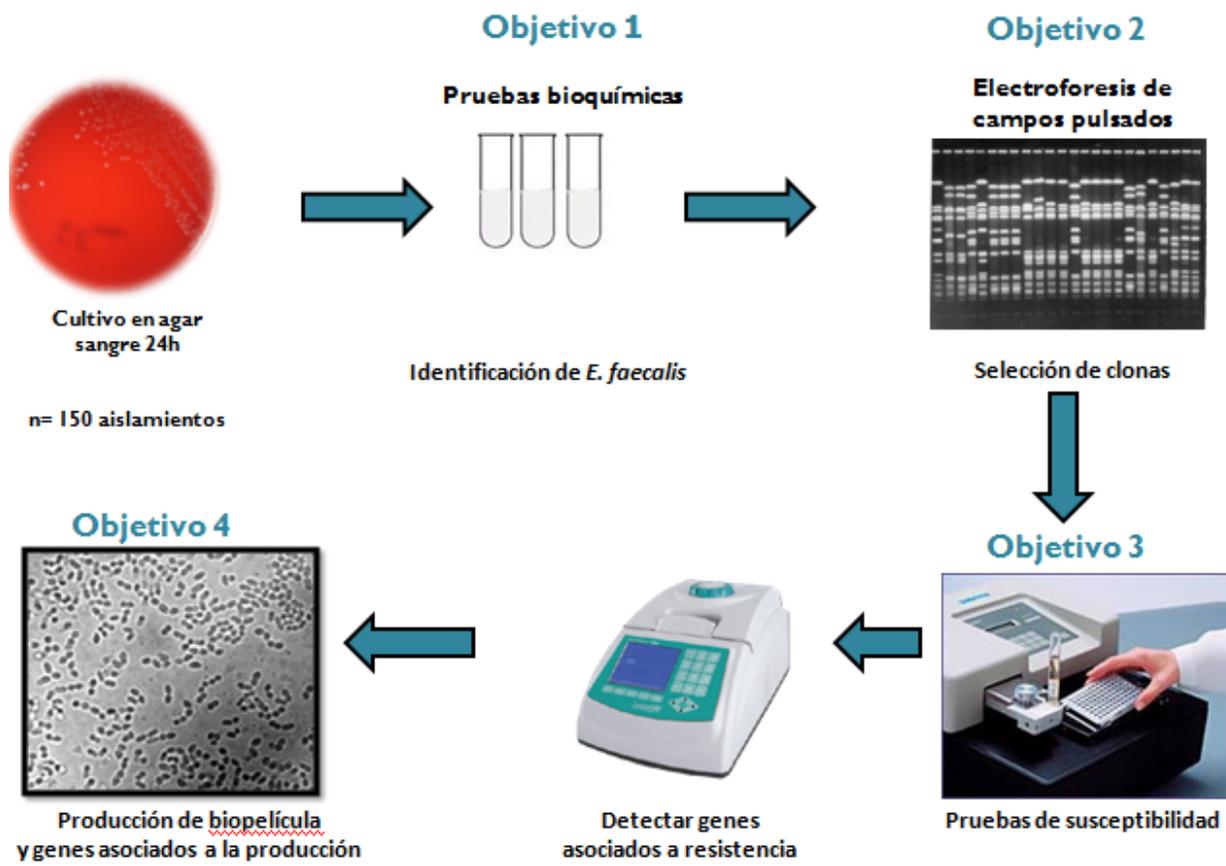


Figura 7. Esquema que muestra la estrategia general.

4.2 Aislamientos

Se analizaron un total de 109 aislamientos identificados como *E. faecalis*, recolectados desde Mayo de 2006 a Diciembre de 2011, a partir de tres hospitales de tercer nivel de México, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González (n=47), Hospital Civil de Guadalajara, Fray Antonio Alcalde (n=26) y el Hospital General de Durango (n=37). Dentro de los criterios de inclusión se seleccionaron enterococos invasivos a partir de muestras de sangre, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y hueso, así mismo se incluyeron un total de 15 aislamientos provenientes de muestras de orina, los cuales correspondieron a una muestra única del paciente. Se excluyeron del estudio microorganismos que provenían de esputo, heridas quirúrgicas, abscesos abdominales, aspirados bronco-alveolares, catéteres y de piel.

4.3 Identificación de aislamientos

Para llevar a cabo la identificación en el laboratorio se realizaron 6 pruebas bioquímicas, las primeras 3 se utilizaron para llegar a la identificación a nivel de género, las pruebas que se realizaron fueron: prueba de la catalasa, hidrólisis de esulina, tolerancia a la sal. Las siguientes tres pruebas se realizaron para llegar a la identificación a nivel de especie, reducción de telurito de potasio, fermentación de piruvato y sorbitol. De esta manera se diferenció a *E. faecalis* de *E. faecium*.

4.3.1 Prueba de catalasa

Procedimiento

Se colocó una gota de H₂O₂ al 3% sobre un portaobjetos y luego se transfirió una porción de colonia sobre el H₂O₂ con el fin de realizar una emulsión. Se realizó la toma de la colonia a partir de un medio sin sangre ya que los eritrocitos tienen actividad de catalasa y pueden falsear los resultados.

Interpretación de resultados: el desprendimiento de burbujas se consideró como una prueba positiva. Los aislamientos catalasa negativa, se seleccionaron para continuar con las siguientes pruebas de identificación.

4.3.2 Hidrólisis de esculina

Procedimiento

La prueba de hidrólisis de esculina se realizó tomando una colonia y se sembró en agar esculina en tubo inclinado, por un periodo de tiempo de 24 h a una temperatura de 37°C.

Interpretación de resultados: Una reacción positiva se evidenció como ennegrecimiento del medio. (Viraje de verde-negro). Se seleccionaron como posibles candidatos aquellos aislamientos que hidrolizaron la esculina.

4.3.3 Tolerancia a la sal

Procedimiento

Se tomó una de una colonia y se inoculó en caldo nutritivo el cual contenía NaCl al 6.5%, y se incubó por un periodo de tiempo de 24 h a una temperatura de 37°C.

Interpretación de resultados: Se consideró la prueba positiva cuando se observó turbidez en el medio. La ausencia de turbidez indicó una prueba negativa.

4.3.4 Reducción de telurito de potasio

Procedimiento

Se resembró una colonia en una placa de agar soya tripticasa con 0.14% de telurito de potasio, la cual se incubó por un periodo de tiempo de 24 h a una temperatura de 37°C.

Interpretación de resultados: se consideró un resultado positivo cuando las colonias presentaron un precipitado negro, producto de la reducción del telurito de potasio.

4.3.4 Fermentación de piruvato

Procedimiento

Se inoculó una colonia en un tubo con caldo glucosado, y se incubó por un periodo de 48 h a una temperatura de 37°C, pasado ese tiempo se añadieron de 2-3 gotas de rojo de metilo.

Interpretación de resultados: se consideró un resultado positivo cuando hubo un viraje de amarillo a rosa.

4.3.5 Fermentación de sorbitol

Procedimiento

Se inoculó una colonia en un tubo con agar sorbitol y se incubó por un periodo de 24 h a una temperatura de 37°C.

Interpretación de resultados: se interpretó como positivo, cuando hubo un cambio de viraje de verde a amarillo.

4.4 Selección de clonas (Electroforesis en gel de campos pulsados)

Para llevar a cabo la identificación de las clonas se utilizó la metodología de electroforesis en gel de campos pulsados, la cual se siguió de la siguiente manera:

El primer día se sembraron los aislamientos en agar soya tripticaseína (TSA) en placa, durante un periodo de 24 h a una temperatura de 37°C. A partir del cultivo anterior se inoculó una sola colonia en 5mL de caldo triptona soya (TSB). Se incubó hasta fase exponencial, por un periodo de tiempo de (16-18 h) a una temperatura de 37°C, posterior a este tiempo se pasó 1 mL del cultivo en fase exponencial a un tubo Eppendorf y se centrifugó durante 5 min a 14000 rpm, se eliminó todo el sobrenadante sin remover la pastilla que se formó, se le añadió a la pastilla 1 mL de PIV frío, se agitó en vórtex hasta que se disolvió y se centrifugó a 14000 rpm. durante 5 min (Cntrífuga Labnet, modelo Hermle Z 233 MK-2), a continuación se eliminó el PIV de cada tubo y nuevamente se añadió 410 µL de PIV a cada muestra se agitó en vórtex para disolver la pastilla.

Se preparó agarosa al 1.5% (Agarosa Certificada para Campos Pulsados *BIO-RAD*, Inc., CA, E.U.A.), se mezcló con buffer TBE 0.5X. Se añadieron 150 μ L de agarosa fundida a cada tubo uno por uno (esto para evitar que se solidifique la agarosa), se mezcló y se tomaron 35 μ L de la mezcla de la bacteria y la agarosa los cuales se colocaron en un porta-objetos aproximadamente entre 5 y 6 discos, seguido se les colocó un porta objetos para que se formaran los discos bacterianos, se dejaron a temperatura ambiente durante 15 min, pasado este tiempo se preparó el buffer de EC-Lisis el cual contenía lo siguiente:

Lisozima y RNAsa a concentraciones de **10mg/mL**)

Reactivo	Volumen necesario	Cantidad a añadir
Lisozima	10 μ L / muestra	0.1 mg / muestra
RNAsa	5 μ L / muestra	10 μ L / muestra

Los discos se colocaron en un tubo Falcon estéril de 15 mL a los cuáles se les añadió 1 mL del buffer EC-Lisis, se incubó durante toda la noche a una temperatura de 37°C (Baño de agua LAB-LINE, modelo Imperial IV). Después de la incubación se decantó el sobrenadante de EC-Lisis con una gasa estéril, y se preparó la solución de lisis ESP, 1 mL por muestra: se añadió 1 mg de proteinasa K a 1 mL de ES, se incubó toda la noche (mínimo 17 horas) a una temperatura de 37°C. Posterior a este tiempo se decantó el sobrenadante con una gasa estéril, y se añadió 13 mL de TE 1X. Se agitó por inversión (en un agitador Labnet Orbit LS) durante 1 hora, este procedimiento se repitió 5 veces.

Terminado el proceso se pasaron los discos bacterianos a un tubo Eppendorf con 1 mL de TE 1X, los cuales se almacenaron a una temperatura de 4°C.

Sé tomó un disco por aislamiento, los cuales se tomaron con pinzas estériles y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL, y se añadió 40 µL buffer de restricción sin enzima, el cual se dejó por un periodo de 30 min a temperatura ambiente (esto se llevó a cabo para atemperar y eliminar el exceso de buffer TE 1X). Pasado el tiempo se eliminó el buffer sin enzima, y se preparó buffer con la enzima *Sma I* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón).

Buffer de restricción sin enzima:

Reactivo	1 reacción
BSA	4 µL
Buffer	4 µL
Agua	32 µL

Buffer con la enzima *Sma I*:

Reactivo	1 reacción
BSA	4 µL
Buffer	4 µL
Agua	31 µL
Enzima	1 µL

Se añadieron 40 μ L del buffer de restricción con enzima. Se incubó toda la noche a una temperatura de 30°C. Después del periodo de incubación se preparó un gel de agarosa al 1%, y se agregaron los discos bacterianos con una pinza estéril y el marcador de PM al principio y al final del gel, se colocó el gel en el equipo (CHEF-DR® III System *BIO-RAD*) bajo las siguientes condiciones: T inicial 1 segundo, T final 30s, volts 6. Tiempo de corrida 23 h, velocidad de la bomba 70, 180 mA. Pasado este tiempo sacó el gel del equipo y se tiñó con bromuro de etidio 1 μ g / mL por 5 min y se enjuagó con agua, se observó en luz UV.

El análisis del patrón de bandas se realizó de manera visual, se construyó una base de datos en Excel 2007 para la realización de un dendograma mediante el software SPSS versión 18, los resultados se analizaron en base a los criterios establecidos por Tenover *et al.* Para llevar a cabo la identificación de la diversidad de clonas (51).

4.5 Obtención del DNA

Todos los aislamientos se sembraron en agar sangre y se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 h. En un tubo eppendorf se colocaron 100 µL de Tris-HCL 100 mM, 150 µg de lisozima y se tomaron de 2 a 3 colonias con las cuales se realizaron una suspensión bacteriana. El tubo Eppendorf se colocó en un baño a una temperatura de 37°C por 2 h, posteriormente se añadió 200 µL de TE 1X con SDS al 1% y 6 µL de proteinasa K (10mg/mL) y se incubó a una temperatura de 55°C por 2 h a baño María. Posterior a esto se procedió a añadir 250 µL de fenol saturado y se mezcló por inversión, se añadieron 250 µL de SEVAG y 100 µL de TE 1X, se mezclaron y se agitaron por inversión 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 8 minutos y se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf, se realizó el mismo procedimiento anterior y se añadió 2.33 volúmenes de etanol absoluto, hasta que se observó la formación de la hebra de DNA, se dejó precipitar a -20°C por 1 h, pasado este tiempo se centrifugó 5 min a 14000 rpm y se lavó 2 veces con etanol al 70%, se decantó el contenido y se dejó secando el exceso de etanol, posteriormente se resuspendió en 100 µL de TE 1X y se incubó en baño de agua a una temperatura de 65°C por un tiempo de 15 min, se cuantificó por espectrofotometría para verificar la calidad del DNA.

4.6 Pruebas de susceptibilidad (CMI)

Para llevar a cabo las pruebas de susceptibilidad, se efectuaron utilizando el método de microdilución en caldo, de acuerdo con los lineamientos estipulados en el documento M02-M07 del CLSI (64).

4.6.1 Preparación del inóculo

Cada aislamiento se sembró en agar sangre y se incubó por un periodo de 24 h a una temperatura de 37°C, posteriormente, se realizó una resiembra en agar Mueller-Hinton, se incubó por un periodo de 24 h a una temperatura de 37°C. Se procedió a realizar el inóculo, el cual se preparó a partir del 0.5 de la escala de MacFarland, empleando suspensión directa. La suspensión inicial se diluyó en caldo Muller-Hinton. Se realizó una dilución 1:10. El inóculo final fue de 5×10^5 UFC/mL UFC/ pocillo. El inóculo ya diluido se usó antes de 15 minutos tras su preparación.

4.6.2 Antibióticos y rangos utilizados

Tabla 2. Rangos de concentraciones de los antibióticos.

Antibiótico	Rango de Concentración ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
Fosfomicina	16 – 512
Nitrofurantoina	8 – 256
Cloranfenicol	2 – 64
Vancomicina	1 – 64
Ampicilina	2 – 32
Penicilina	2 – 32
Tetraciclina	1 – 32
Tigeciclina	1 – 32
Gentamicina	1 – 32
Eritromicina	0.125 – 16
Linezolid	0.5 – 16
Amoxicilina	1 – 16
Rifampicina	0.25 – 8
Ciprofloxacino	0.0625 – 8
Daptomicina	4 – 8

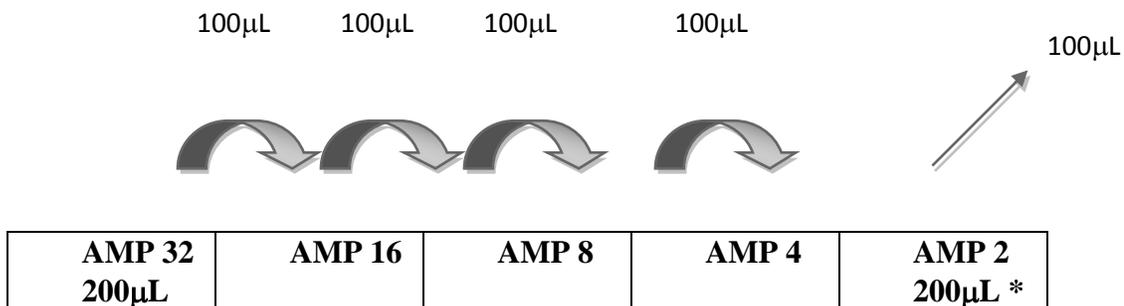
Todos los antibióticos empleados en este estudio fueron obtenidos de Sigma Aldrich® (Toluca, Estado de México).

Se efectuó una serie de diluciones de los antibióticos utilizando agua destilada estéril, buffer de fosfatos de pH 6, 7.2 y 8, utilizando los rangos de concentración mostrados en la tabla 2. Se prepararon las soluciones de antimicrobiano a dos veces la dilución más alta a usar, en caldo Muller-Hinton.

4.6.3 Preparación de las placas

Se utilizaron placas de 96 pocillos (12 x 8) y se empleó una placa por aislamiento. Se empleó un pocillo como control positivo al cual solo se agregó la bacteria, un control negativo (solo el caldo de Muller-Hinton). Para el ensayo, las placas se llenaron utilizando una pipeta multicanal con 200 μ L de la concentración más alta de antimicrobiano en la primera celda de cada antibiótico. Posteriormente se añadió un volumen de 100 μ L de caldo Muller-Hinton sin antimicrobiano en los pocillos de la columna 2 hasta el pocillo correspondiente a la dilución final y la dilución se realizó haciendo pases consecutivos de 100 μ L (2 a la 3, 3 a la 4, 4 a la 5 etc) de una celda a la otra empleando una micropipeta, dejando los pocillos de la última columna como controles. Se eliminó los últimos 100 μ L para que todas las celdas quedaran con un volumen total de 200 μ L.

Ejemplo



*Como en la última dilución queda un volumen de 200µL, se desecharon 100µL.

Las placas se incubaron a 37°C durante 16-20 h. Para evitar diferencias de temperatura en la incubación de bloques de placas de microtitulación, no se apilaron más de cuatro a cinco placas dentro de la incubadora. Después del periodo de incubación se procedió a realizar la lectura de los resultados. La CMI se definió como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhiba completamente el crecimiento del microorganismo en estudio. La interpretación de los resultados se realizó tomando como referencia el crecimiento observado en los pocillos usados como control positivo. Los controles positivos presentaron una clara turbidez o un botón de al menos 2 mm de diámetro. Para la lectura se utilizó un lector con espejo en el que se reflejó la parte inferior de la placa de microtitulación. Para el control de calidad se empleó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 (cepa susceptible para vancomicina) y la ATCC 51299 (resistente a vancomicina).

4.7 Producción de biopelícula

Para llevar a cabo la producción de biopelícula, se siguió la metodología empleada por Mohamed y colaboradores (52)(65), la cual consistió de lo siguiente:

El primer día los aislamientos se cultivaron en agar soya tripticaseína por un periodo de tiempo de 24 h a una temperatura de 37°C, posterior a este tiempo se transfirió una colonia bacteriana y se inoculó en caldo soya tripticasa con glucosa al 1% y se incubaron por un periodo de tiempo de 24 h a una temperatura de 37°C. Después de la incubación durante toda la noche, se realizó una dilución 1:40 en caldo de soya tripticasa suplementado con glucosa al 1%. Se añadieron 100 µL de cada cultivo diluido en cada una de 2 celdas de la placa, se cubrió e incubó 48 h a 37°C.

Posterior a esto se eliminaron las células planctónicas de cada celda y se lavaron las placas con PBS. Se añadieron 125 µL de cristal violeta al 1% a cada celda, se dejó teñir por un periodo de tiempo de 15 min a temperatura ambiente y se eliminó la solución de cristal violeta. Posteriormente se lavó 2 veces más y se eliminó todo el líquido posible contra papel absorbente y se añadieron 200 µL de una mezcla de etanol-acetona (80:20). Se incubó por un tiempo de 10-15 min a temperatura ambiente, para permitir que el colorante se disuelva, se mezcló el contenido de cada celda y se transfirieron 125 µL de la solución cristal violeta-solvente en una celda en la cual se midió la DO a 570 nm. La prueba se llevó a cabo por duplicado y el promedio de las dos se tomaron para poder obtener la densidad óptica.

Se utilizó medio de cultivo sin microorganismo como blanco. Se formaron cuatro grupos una absorbancia mayor de 2 se denominaron fuertes productores, entre 1-2 moderados productores, mayores de 0.5 bajos productores y menores de 0.5 no productores de biopelícula.

4.7.1 Identificación de genes asociados a la producción de biopelícula

A los 109 aislamientos se les detectó los 3 genes asociados a la formación de biopelícula, *esp*, *ace* y *agg* mediante la técnica de PCR, para lo cual se emplearon los iniciadores específicos descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Primers utilizados en el estudio, para la identificación de los genes asociados a la producción de biopelícula.

Primers	Secuencia	Producto (pb)
<i>esp11</i> <i>esp12</i>	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCAA	950
<i>ace1</i> <i>ace2</i>	AAAGTAGAATTAGATCCACAC TCTATCACATTCGCTTGCG	320
<i>agg1</i> <i>agg2</i>	CCAGTAATCAGTCCAGAAACC TAGCTTTTTTCATTCTTGTGTT	406

Para estas PCRs, se prepararon mezclas de reacción de PCR de 23 μ L con 50 mM de KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 50 pM/mL

de los primers descritos en la tabla 2 en la cual a partir del stock se efectuaron diluciones 1:10 con agua estéril biología molecular y 1 U de Taq DNA polimerasa.

Para el gen *esp* se siguieron las siguientes condiciones: la amplificación se realizó con un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 1 min seguido de 30 ciclos de 94°C durante 45 s, 58°C durante 45 s y 72°C durante 45 s, terminando con un paso extensión final a 72°C durante 1 min.

Gen *ace* se siguieron los siguientes condiciones: la amplificación se realizó con un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 1 min seguido de 30 ciclos de 94°C durante 45 s, 56°C durante 45 s y 72°C durante 45 s, terminando con un paso extensión final a 72°C durante 1 min.

Gen *agg* se siguieron las siguientes condiciones: la amplificación se realizó con un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante 1 min seguido de 30 ciclos de 94°C durante 45 s, 54°C durante 45 s y 72°C durante 45 s, terminando con un paso extensión final a 72°C durante 1 min.

Los productos de PCR fueron visualizados en luz UV después de la electroforesis en gel de agarosa al 2% el cual contenía 0,5 mg/ mL de bromuro de etidio.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Identificación de aislamientos

De un total de 165 aislamientos estudiados, 109 fueron identificados como *E. faecalis*, 15 como *Enterococcus spp.*, y 41 aislamientos como otras especies. De los 109 aislamientos recolectados 77 eran provenientes de líquidos estériles: como sangre y LCR, 17 aislamientos de muestras de hueso y 15 de muestras de orina. 47 aislamientos fueron recolectados de la ciudad de Monterrey, 37 del estado de Durango y 26 de la ciudad de Guadalajara (figura8).

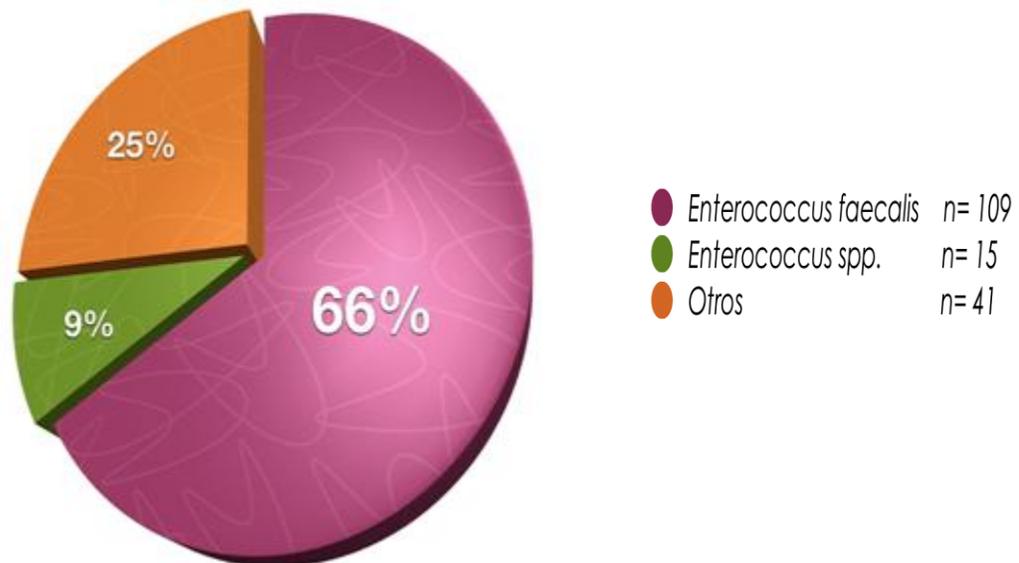


Figura 8. Identificación de aislamientos de *E. faecalis*.

5.2 Caracterización por PFGE

Se obtuvo un patrón de restricción entre 5 y 43 bandas. Con un porcentaje de similitud que fluctuó desde el 0% hasta el 95%. Hubo ausencia de clonas entre los 109 aislamientos estudiados de los tres hospitales de México.

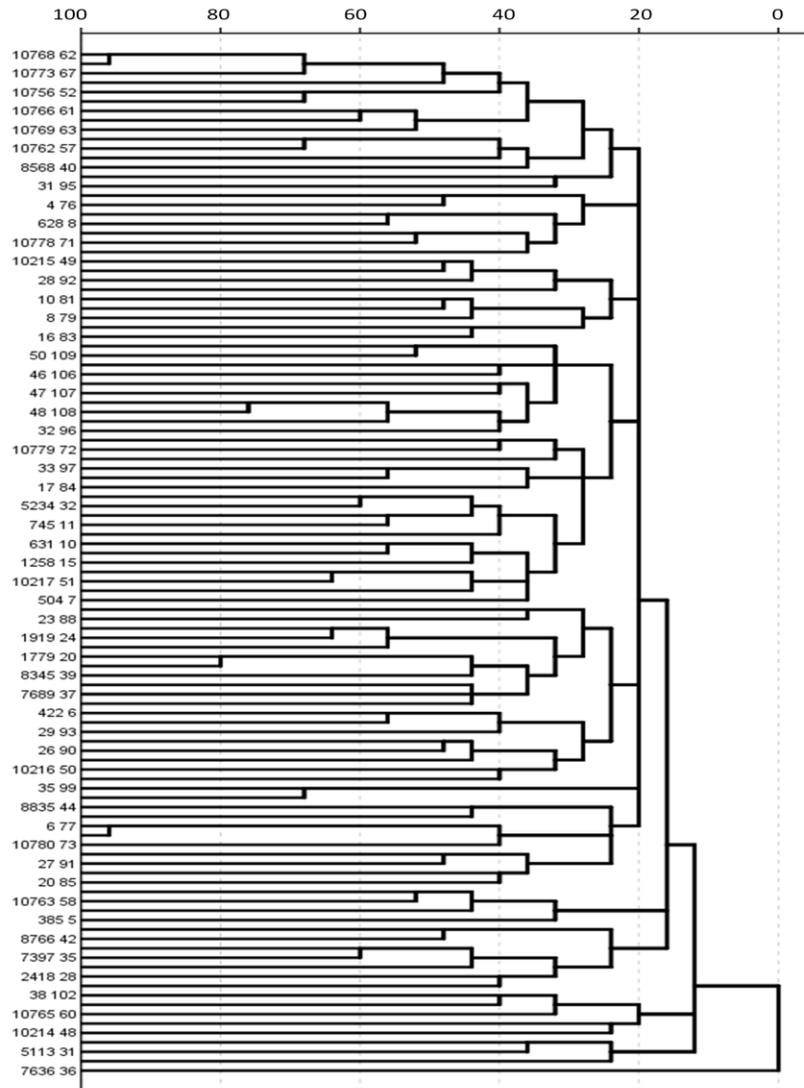


Figura 9. Eelectroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), se muestran los 109 patrones de restricción. Con un porcentaje de similitud que fue desde el 0% al 95%.

5.3 Susceptibilidad antimicrobiana

En la tabla 4 se muestran los resultados de las pruebas de susceptibilidad de los 109 aislamientos de *E. faecalis*, analizados por el método de microdilución en caldo. Los datos se presentan como rango máximo y mínimo, CMI ($\mu\text{g/mL}$) necesaria para inhibir el 50% y 90% de los aislamientos analizados.

De los antibióticos del estudio, se mostró una alta resistencia a los siguientes fármacos, 77% de resistencia a eritromicina, 60% a tetraciclina y 50% a gentamicina.

Cabe mencionar que de los 109 aislamientos del estudio no se presentó resistencia al glucopéptido vancomicina por lo que no se llevó a cabo la detección de los genes asociados a la resistencia.

Tabla 4. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *E. faecalis*.

ANTIBIÓTICO	CMI₅₀	CMI₉₀	Rango	RESISTENCIA
	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	n (%)
Eritromicina	>16	>16	<0.125 - >16	84 (77)
Tetraciclina	16	>32	<1 - >32	68 (62)
Gentamicina	16	>32	<1 - >32	55 (50)
Ciprofloxacino	1	>8	<0.0625 - >8	45 (41)
Cloranfenicol	8	64	<2 - >64	42 (39)
Rifampicina	2	>8	<0.25 - >8	35(32)
Fosfomicina	128	256	<16 - >512	23(21)
Penicilina	2	8	<2 - >32	12(11)
Ampicilina	<2	16	<2 - >32	9 (8)
Amoxicilina	<1	2	<1 - >16	7 (6)
Linezolid	2	2	<0.5 - >16	6 (6)
Vancomicina	1	16	<1 – 16	0 (0)
Nitrofurantoina	<8	16	<8 – 64	0 (0)
Tigeciclina	<1	<1	<1 - <1	0 (0)

5.4 Producción de biopelícula

El 89% de los aislamientos de *E. faecalis* fueron productores de biopelícula, dentro de los cuales 4.6% fueron altos productores, 48% moderados, 36% bajos y tan solo 11% de los aislamientos, no fueron productores de biopelícula (Tabla 5).

En cuanto a la presencia de genes asociados a la producción de biopelícula, el gen detectado con mayor frecuencia, fue el gen que codifica para la sustancia de agregación (Agg) con un 48%, seguido del gen que codifica para la proteína de unión a colágeno (Ace) con un 43% de incidencia y el gen que codifica para la proteína enterocócica de superficie (Esp) con 36% de frecuencia.

Dentro del grupo de los altos productores de biopelícula un aislamiento no presentó ninguno de los tres genes asociados a la producción, este hecho también se observó en el grupo de los moderados productores.

De lo contrario se observó en el grupo de los no productores de biopelícula, un aislamiento que presentó los tres genes asociados con la producción.

Se llevó a cabo una correlación de cada uno de los genes asociados a la producción de biopelícula, mediante la prueba de correlación Chi Cuadrada, sin embargo el gen *esp*, fue el único gen que contribuyó significativamente a la producción de biopelícula (tabla 6).

De los 109 aislamientos, 15 provenían de muestras no invasivas como orina, de las cuales solo 9 fueron bajos productores y 6 no productores de biopelícula, 94 de los aislamientos provenían de muestras invasivas como sangre, LCR y hueso, se observó en general moderada producción de biopelícula (tabla 7).

Tabla 5. Aislamientos productores de biopelícula, clasificados en altos, moderados, bajos y no productores.

Producción de Biopelícula		Presencia de genes		
		<i>esp</i>	<i>Ace</i>	<i>agg</i>
Alto	4.5 % (5/109)			
	40% (2/5)	-	-	+
	20% (1/5)	+	-	+
	20% (1/5)	-	+	+
	20% (1/5)	-	-	-
Moderado	46.7% (51/109)			
	31.3% (16/51)	-	-	-
	17.6% (9/51)	-	+	-
	15.6% (8/51)	-	-	+
	11.7% (6/51)	-	+	+
	11.7% (6/51)	+	+	-
	7.8% (4/51)	+	-	+
	13.9% (2/51)	+	-	-
	1.9% (1/51)	+	+	+
Bajo	36.6% (40/109)			
	25% (10/40)	+	-	-
	15% (6/40)	+	-	+
	15% (6/40)	-	+	+
	12.5% (15/40)	+	-	-
	12.5% (15/40)	+	+	-
	10% (4/40)	-	+	-
	7.5% (3/40)	-	-	+
	2.5% (1/40)	+	+	+
Negativo	11% (12/109)			
	25% (3/12)	+	-	+
	25% (3/12)	-	+	+
	16.6% (2/12)	-	-	+
	16.6% (2/12)	-	-	-
	8.3% (1/12)	+	+	+
	8.3% (1/12)	+	-	-

Tabla 6. Asociación del gen *esp*, en aislamientos productores y no productores de biopelícula

Producción de biopelícula	<i>esp</i>
Productor	0.001
No productor	0.564

Tabla 7. Producción de biopelícula en los diferentes tipos de muestra, y la frecuencia de los genes asociados a la producción.

Producción de biopelícula y presencia de los genes asociados a la producción en los aislamientos de <i>E. faecalis</i>							
Tipo de muestra	N (%)				N		
	Altos	Moderados	Bajos	No productores	<i>esp</i>	<i>ace</i>	<i>agg</i>
Sangre (53)	4 (7)	34 (64)	13 (24)	2 (3)	14	21	18
LCR (24)	1 (4)	12 (50)	8 (33)	3 (12)	7	8	10
Hueso (17)	0 (0)	6 (35)	10 (58)	1 (5)	7	4	5
Orina (15)	0 (0)	0 (0)	9 (60)	6 (40)	3	5	7

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

E. faecalis, se ha reconocido como una causa importante de infecciones intrahospitalarias por más de tres décadas (4, 53) y está frecuentemente implicado en las infecciones del sistema genitourinario, bacteremias, heridas quirúrgicas, e infecciones relacionadas con catéteres y endocarditis (4).

En el presente estudio se investigaron 109 aislamientos colectados en un periodo de cinco años (2006 - 2011), identificados como *E. faecalis* mediante pruebas bioquímicas, y se logró diferenciar *E. faecalis* del resto de las especies que conforman el género de *Enterococcus*.

Para llevar a cabo la detección de clonas en los aislamientos de *E. faecalis*, se utilizó la técnica de EGCP y se obtuvieron 109 patrones diferentes, con un número de bandas que varió entre 5 y 43 bandas, con un porcentaje de similitud entre el 0% - 95% en los aislamientos estudiados. Los resultados de la EGPC sugieren que la infección por *E. faecalis* se originó de manera endógena, y no una diseminación dentro del hospital, en contraste a lo reportado por Garbajosa y Cols en el año 2006, ya que ellos encontraron una alta clonalidad entre los aislamientos provenientes de catéter, sonda y sangre (54).

En nuestro estudio se obtuvo un 89% (97/109) de los aislamientos de *E. faecalis* fueron productores de biopelícula, este resultado es similar al reportado por Mohamed y Cols ya que ellos encontraron que el 92% (151/163) de los aislamientos fueron productores de biopelícula. En cuanto a los grupos productores de biopelícula, en nuestro

estudio se obtuvo un bajo porcentaje de aislamientos productores altos de biopelícula 4.5% (5/109), a diferencia del reporte de Mohamed en el año 2004, en el cual detectaron que el 22% (36/109) de los aislamientos fueron altos productores (52). Cabe señalar que, en nuestro estudio se clasificó la producción de biopelícula de la misma manera que la realizada en este estudio. Por otro lado, en otro estudio, en el que se siguió una metodología diferente para la determinación de la producción de biopelícula, se encontró que solamente un 32% (65/200) de los aislamientos de *E. faecalis* fueron productores de biopelícula, (9, 10, 55).

Dentro del grupo de los aislamientos productores de biopelícula, el 27% (27/97) de los aislamientos no presentaron ninguno de los tres genes estudiados como asociados a la producción de biopelícula, este resultado se obtuvo entre la clasificación de los altos, moderados y bajos productores de biopelícula. Este hecho fue reportado en otro estudio sin embargo sólo se determinó la presencia del gen *esp* (52, 55).

Hasta hoy en día, no se cuenta con algún estudio en el que se reporte la ausencia de los tres genes asociados a la producción de biopelícula, y se tenga un alto porcentaje de aislamientos productores de biopelícula.

En nuestra investigación, dos de los aislamientos fueron productores de biopelícula, sin embargo no presentaron los genes estudiados en este trabajo, esto sugiere que existen otros factores relacionados con la formación de biopelícula, entre los cuales se ha citado la presencia del gen que codifica para la gelatinasa *gelE*, debido a que la gelatinasa

hidroliza el colágeno, llevando a cabo la adherencia en células cardíacas (Singh et al., 1998, 2005).

En cuanto a la presencia de los genes asociados a la producción de biopelícula, en nuestro estudio se encontró que el gen que codifica para la sustancia de agregación (*agg*) se encontró en una mayor proporción, con un 48% de frecuencia, seguido por el gen que codifica para la proteína de unión a colágeno (*ace*) con 43% y 36% de frecuencia para el gen que codifica para la proteína enterocócica de superficie (*esp*). Diversos estudios han reportado resultados similares a los nuestros, Giridhara y Cols reportaron en el año 2011, que el 30% (n=60/200) de los aislamientos presentaron el gen *esp*, mientras que Hällgren y Cols reportaron que el 75% (n=69/92) de los aislamientos presentaron el gen *esp* y el 80% (n=74/92) de los aislamientos presentaron el gen que codifica para la sustancia de agregación. Por otro lado Dupre y Cols, reportaron lo contrario, ya que el 33% (n=5/15) de los aislamientos presentaron el gen que codifica para la sustancia de agregación, y el 60% (n=9/15) de los aislamientos presentaron los genes *ace* y *esp*. Esto se puede deber a que se trabajó con diferentes especímenes como orina, pus, semen y secreciones vaginales (9, 52, 55-57).

En cuanto a la correlación de los genes asociados a la producción de biopelícula, el gen *esp*, fue el único que contribuyó significativamente a la producción de biopelícula, esto se reportó en diversos estudios, en los que se ha observado que la eliminación del extremo N-terminal de la proteína, disminuye la producción de biopelícula hasta en un 80%, como lo reportado en el año 2011 por Giridhara y Cols, de 65 aislamientos

productores de biopelícula 60 presentaron el gen *esp*, Mohamed y Cols, reportaron que el 45% de los aislamientos presentaron el gen *esp* (9, 52, 55-57).

Con respecto a los resultados sobre la susceptibilidad a los antibióticos, en nuestro estudio se obtuvieron altos porcentajes de resistencia a eritromicina (77%), tetraciclina (62%), gentamicina (50%), ciprofloxacina (41%) y cloranfenicol (39%). Otros estudios han reportado valores de resistencia para *E. faecalis* menores que los obtenidos en nuestro estudio, Panesso y Cols reportaron en el año 2010, un 29% de resistencia para ciprofloxacina, un 16% de resistencia para cloranfenicol y un 28% de resistencia para gentamicina. Por otro lado, Garbajosa y Cols en el año 2006 reportaron un 65% de resistencia a eritromicina, 66% a tetraciclina, 39% a cloranfenicol, 33% a gentamicina, resaltando que los 96 aislamientos fueron susceptibles a linezolid, mientras que en nuestro estudio se obtuvo un 6% de resistencia para este antibiótico. (54, 58).

Cabe resaltar que en nuestra investigación los 109 aislamientos de *E. faecalis* presentaron susceptibilidad a vancomicina, por lo que nuestros resultados indican que la prevalencia de la resistencia a este antibiótico es relativamente baja en los hospitales de México, en comparación a la de los Estados Unidos, o bien a la de diversos países Europeos (44, 59). La resistencia hacia este glucopéptido se ha presentado en mayor en *E. faecium* en nuestro País (60).

Debido a que *E. faecalis* se considera como parte de la flora del tracto digestivo, la mayoría de los investigadores enfocan hoy en día sus estudios hacia las bacterias Gram negativas, bacterias patógenas, dejando a un lado a microorganismos como *E. faecalis*, el cual ha emergido como patógeno intrahospitalario durante las últimas tres

décadas actuando como reservorio hacia la resistencia a múltiples antibióticos. En México se cuenta con poca información con respecto a la resistencia a los antibióticos y aún no se tienen bien identificados los factores de virulencia de este microorganismo.

Este trabajo representa el primer estudio que se ha realizado sobre la epidemiología de *E. faecalis* en México, enfocándose a los factores de virulencia y el perfil de susceptibilidad de este microorganismo, principalmente en la producción de biopelícula y sus genes asociados. Es de especial interés llevar a cabo estudios posteriores para analizar otros genes que pudieran estar asociados a la producción de biopelícula para ampliar la información de los factores de virulencia en esta bacteria. Además, es importante realizar estudios para determinar el perfil de susceptibilidad de *E. faecalis* en otros estados de México no estudiados, principalmente su potencial de resistencia a vancomicina, y de esta manera entender mejor las infecciones ocasionadas por este microorganismo en el entorno clínico.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

De los 109 aislamientos del estudio no se obtuvieron clonas, se presentó un porcentaje de similitud que abarcó desde 0 a 95%, con un patrón de restricción que fluctuó entre 5 y 43 bandas.

Se presentó una alta resistencia a los antibióticos eritromicina, tetraciclina, gentamicina, ciprofloxacino y cloranfenicol, la cual varió entre un 70 y 40% de resistencia.

No se obtuvieron aislamientos resistentes al glucopéptido vancomicina, por lo que no se llevó a cabo la identificación de los genes asociados a la misma.

Al igual que otros microorganismos Gram positivos, los enterococos son capaces de producir biopelícula en superficies abióticas, aumentando su resistencia innata hacia los antibióticos.

Además de los genes estudiados en este trabajo hay otros factores que se ven involucrados en la producción de biopelícula tales como el sistema de dos componentes FSR (FSRA, FSRB Y FSRC), el gen *gelE*, el gen *atn*, la producción de hemolisina entre otros.

Se observó una alta frecuencia en la producción de biopelícula en los aislamientos invasivos provenientes de muestras como sangre, LCR y hueso en comparación con los aislamientos provenientes de muestras de orina.

El gen *esp*, fue uno de los genes con mayor contribución hacia la formación de biopelícula en la especie de *E. faecalis*.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

Debido a la creciente incidencia de infecciones ocasionadas por *E. faecalis*, y a la gran cantidad de reportes asociados la producción de biopelícula, aún no se conoce de forma completa los diferentes factores que intervienen en la formación de este fenómeno.

Los resultados obtenidos en este trabajo, nos permitirán realizar estudios con respecto a la expresión de proteínas asociadas a la producción de biopelícula.

Además de ser factible llevar a cabo un estudio comparativo del comportamiento de los aislamientos pertenecientes de pacientes con diabetes y de aislamientos de personas sanas, ya que la glucosa es un factor importante para llevar a cabo la producción de biopelícula. Así como realizar estudios de otros genes asociados a la producción de este fenómeno.

Por último es factible también estudiar las dos especies más importantes del género *Enterococcus*: *E. faecium* y *E. faecalis*, comparando la resistencia a los antibióticos y la producción de biopelícula.

1. Tannock, G.W., et al., *Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing Lactobacillus rhamnosus DR20*. Appl Environ Microbiol, 2000. 66(6): p. 2578-88.
2. Klein, G., *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract*. Int J Food Microbiol, 2003. 88(2-3): p. 123-31.
3. Boyd, D.A., et al., *Molecular characterization of Enterococcus faecalis N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. 52(7): p. 2667-72.
4. Murray, B.E., *The life and times of the Enterococcus*. Clin Microbiol Rev, 1990. 3(1): p. 46-65.
5. Matsuda, K., et al., *Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules*. Appl Environ Microbiol, 2009. 75(7): p. 1961-9.
6. Hayashi, H., et al., *Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism*. J Med Microbiol, 2005. 54(Pt 11): p. 1093-101.
7. Franz, C.M., W.H. Holzappel, and M.E. Stiles, *Enterococci at the crossroads of food safety?* Int J Food Microbiol, 1999. 47(1-2): p. 1-24.
8. Noble, C.J., *Carriage of group D streptococci in the human bowel*. J Clin Pathol, 1978. 31(12): p. 1182-6.
9. Toledo-Arana, A., et al., *The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation*. Appl Environ Microbiol, 2001. 67(10): p. 4538-45.
10. Baldassarri, L., et al., *Enterococcus spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages*. Med Microbiol Immunol, 2001. 190(3): p. 113-20.
11. Elsner, H.A., et al., *Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000. 19(1): p. 39-42.
12. Gray, J.W. and S.J. Pedler, *Antibiotic-resistant enterococci*. J Hosp Infect, 1992. 21(1): p. 1-14.
13. Morrison, A.J., Jr. and R.P. Wenzel, *Nosocomial urinary tract infections due to enterococcus. Ten years' experience at a university hospital*. Arch Intern Med, 1986. 146(8): p. 1549-51.
14. Hidron, A.I., et al., *NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. 29(11): p. 996-1011.
15. *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999*. Am J Infect Control, 1999. 27(6): p. 520-32.
16. Ghanem, G., et al., *Outcomes for and risk factors associated with vancomycin-resistant Enterococcus faecalis and vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteremia in cancer patients*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2007. 28(9): p. 1054-9.
17. Malani, P.N., et al., *Nosocomial infections in left ventricular assist device recipients*. Clin Infect Dis, 2002. 34(10): p. 1295-300.
18. Rice, L.B., et al., *Enterococcal endocarditis: a comparison of prosthetic and native valve disease*. Rev Infect Dis, 1991. 13(1): p. 1-7.
19. Harbarth, S. and I. Uckay, *Are there patients with peritonitis who require empiric therapy for enterococcus?* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. 23(2): p. 73-7.

20. Eigler, J.O., et al., *Bacterial meningitis. I. General review (294 cases)*. Proc Staff Meet Mayo Clin, 1961. 36: p. 357-65.
21. Kuhn, I., et al., *Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment--a European study*. Int J Food Microbiol, 2003. 88(2-3): p. 133-45.
22. Brown, D.F., et al., *National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health - August 2004*. J Hosp Infect, 2006. 62 Suppl 1: p. S1-27.
23. Mundy, L.M., D.F. Sahm, and M. Gilmore, *Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance*. Clin Microbiol Rev, 2000. 13(4): p. 513-22.
24. Sava, I.G., E. Heikens, and J. Huebner, *Pathogenesis and immunity in enterococcal infections*. Clin Microbiol Infect, 2010. 16(6): p. 533-40.
25. Koch, S., et al., *Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities*. Vaccine, 2004. 22(7): p. 822-30.
26. Mohamed, J.A. and D.B. Huang, *Biofilm formation by enterococci*. J Med Microbiol, 2007. 56(Pt 12): p. 1581-8.
27. Stewart, P.S. and J.W. Costerton, *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. Lancet, 2001. 358(9276): p. 135-8.
28. Davey, M.E. and A. O'Toole G, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. 64(4): p. 847-67.
29. Lewis, K., *Riddle of biofilm resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. 45(4): p. 999-1007.
30. Hendrickx, A.P., et al., *LPxTG surface proteins of enterococci*. Trends Microbiol, 2009. 17(9): p. 423-30.
31. Shankar, N., A.S. Baghdayan, and M.S. Gilmore, *Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*. Nature, 2002. 417(6890): p. 746-50.
32. Kayser, F.H., *Safety aspects of enterococci from the medical point of view*. Int J Food Microbiol, 2003. 88(2-3): p. 255-62.
33. Willems, R.J., et al., *Variant esp gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant Enterococcus faecium spreading in hospitals*. Lancet, 2001. 357(9259): p. 853-5.
34. Mazmanian, S.K., et al., *Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall*. Science, 1999. 285(5428): p. 760-3.
35. Tendolkar, P.M., et al., *Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by Enterococcus faecalis*. Infect Immun, 2004. 72(10): p. 6032-9.
36. Tendolkar, P.M., A.S. Baghdayan, and N. Shankar, *The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in Enterococcus faecalis*. J Bacteriol, 2005. 187(17): p. 6213-22.
37. Duh, R.W., et al., *In vitro activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from Enterococcus faecalis for species identification*. Microb Drug Resist, 2001. 7(1): p. 39-46.
38. Nallapareddy, S.R., et al., *Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I*. Infect Immun, 2000. 68(9): p. 5218-24.

39. Creti, R., et al., *Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides*. BMC Microbiol, 2006. 6: p. 60.
40. Mannu, L., et al., *Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between Enterococcus faecium strains of dairy, animal and clinical origin*. Int J Food Microbiol, 2003. 88(2-3): p. 291-304.
41. Sandoe, J.A., et al., *Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo*. J Med Microbiol, 2003. 52(Pt 7): p. 547-50.
42. Prakash, V.P., *Clinical prevalence, identification and molecular characterization of enterococci*, 2005, Pondicherry India.
43. Harbarth, S., S. Cosgrove, and Y. Carmeli, *Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant enterococci*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. 46(6): p. 1619-28.
44. Werner, G., et al., *Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe*. Euro Surveill, 2008. 13(47).
45. Hegstad, K., et al., *Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect, 2010. 16(6): p. 541-54.
46. Arthur, M., P. Reynolds, and P. Courvalin, *Glycopeptide resistance in enterococci*. Trends Microbiol, 1996. 4(10): p. 401-7.
47. Arthur, M. and P. Courvalin, *Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. 37(8): p. 1563-71.
48. Fines, M., et al., *VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in Enterococcus faecalis BM4405*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. 43(9): p. 2161-4.
49. Arias, C.A., et al., *Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant Enterococcus gallinarum BM4174*. Mol Microbiol, 1999. 31(6): p. 1653-64.
50. Depardieu, F., P.E. Reynolds, and P. Courvalin, *VanD-type vancomycin-resistant Enterococcus faecium 10/96A*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. 47(1): p. 7-18.
51. Tenover, F.C., et al., *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. J Clin Microbiol, 1995. 33(9): p. 2233-9.
52. Mohamed, J.A., et al., *Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by Enterococcus faecalis*. Infect Immun, 2004. 72(6): p. 3658-63.
53. Moellering, R.C., Jr., *Emergence of Enterococcus as a significant pathogen*. Clin Infect Dis, 1992. 14(6): p. 1173-6.
54. Ruiz-Garbajosa, P., et al., *Genetic and phenotypic differences among Enterococcus faecalis clones from intestinal colonisation and invasive disease*. Clin Microbiol Infect, 2006. 12(12): p. 1193-8.
55. Upadhyaya, G.P., U.B. Lingadevaru, and R.K. Lingegowda, *Comparative study among clinical and commensal isolates of Enterococcus faecalis for presence of esp gene and biofilm production*. J Infect Dev Ctries, 2011. 5(5): p. 365-9.

56. Mohamed, J.A. and B.E. Murray, *Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of Enterococcus faecalis isolates*. J Clin Microbiol, 2005. 43(10): p. 5405-7.
57. Hallgren, A., et al., *Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolyisin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of Enterococcus faecalis and E. faecium of clinical origin*. Int J Med Microbiol, 2009. 299(5): p. 323-32.
58. Panesso, D., et al., *Molecular epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecium: a prospective, multicenter study in South American hospitals*. J Clin Microbiol, 2010. 48(5): p. 1562-9.
59. Zilberberg, M.D., A.F. Shorr, and M.H. Kollef, *Growth and geographic variation in hospitalizations with resistant infections, United States, 2000-2005*. Emerg Infect Dis, 2008. 14(11): p. 1756-8.
60. Cuellar-Rodriguez, J., et al., *Vancomycin-resistant enterococci, Mexico City*. Emerg Infect Dis, 2007. 13(5): p. 798-9.

APÉNDICE

Preparación de reactivos

Acetato de amonio 10 M

Disolver 770 g de acetato de amonio en 800 mL de agua destilada. Ajustar el volumen a 1 L.

Acetato de sodio 3 M

Pesar 20.415 g de acetato de sodio y aforar a 50 mL con agua DEPC.

Acetato de potasio 1 M

Disolver 9.82 g de acetato de potasio en 90 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con ácido acético 2 M. Aforar a 100 mL.

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (Stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura y aforar a 50 mL, almacenar a 4°C protegido de la luz en recipiente de vidrio ambar.

Bromuro de etidio 2 µg/mL

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock más 249 mL de agua ultrapura). Almacenarse en un frasco oscuro o en aluminio.

EC

Disolver 29.2 g de NaCl, 1 g de deoxicolato de sodio, 2.5 g de laurilsarcosina de sodio, 2.5 g de brij 58, 5 mL de Tris-base 1 M pH 8.0 y 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0. Aforar con agua destilada a 500 mL y esterilizar.

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 500 mM pH 8.0

Disolver 9.306 g de Na₂EDTA·2H₂O en 40 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL. Esterilizar en autoclave.

Gel de agarosa 1.5 %

Disolver 1.5 g de agarosa grado biología molecular en 100 mL de TBE 0.5x, calentar hasta disolución total. Una vez que hayan cesado los vapores añadir 10 µL de bromuro de etidio 2 µg/mL, mezclar y vaciar en la cámara de electroforesis.

ES

Pesar 93.1 g de EDTA y disolver en 400 mL de agua destilada, ajustar a pH 9 con ≈ 20 g de NaOH, añadir 0.5 g de sarcosyl. Aforar con agua destilada a 500 mL y esterilizar.

Etanol al 70 %

Mezclar 70 mL de etanol al 100% mas 30 mL de H₂O₂ destilada estéril.

Jugo azul 6 x (Buffer de carga para electroforesis)

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 mL de glicerol en TE 1x pH 8.0 y aforar a 10 mL. No esterilizar.

PIV

Disolver 29.22 g de NaCl en 5 mL de Tris-base 1M pH 8. Aforar a 500 mL y esterilizar.

Proteinasa K

Disolver 100 mg de proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM pH 7.5 y filtrar. Almacenar a -20°C.

RNA´sa 10 mg/mL

Disolver 10 mg de RNA´sa en 1 mL de solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 15 mM. Almacenar a -20°C.

RNA´sa 1 mg/mL

Mezclar 5 µL de RNA´sa mg/mL con 45 µL de agua destilada estéril (dilución 1:10). Almacenar a -20°C.

SDS al 1 % (Dodecil sulfato de sodio)

Mezclar 5 mL de una solución de SDS en 50 mL de agua destilada.

TBE 10X (*Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 20 mM pH 8*).

Disolver 27 g de Tris-base, 13.7g de ácido bórico, 10 mL de EDTA 0.5 M pH 8 en agua ultrapura y aforar a 500 mL. Esterilizar en autoclave.

TBE 0.5X

Medir 50 mL de TBE 10X y aforar a 1000 mL con agua destilada.

TE 1X (*Tris-HCl mM pH 8, EDTA 1 mM*).

Mezclar 500 µL de Tris-HCl 500mM pH=8 y 50 µL de EDTA 500mM en agua destilada, ajustar el pH a 8 y aforar a 25mL. Esterilizar en autoclave.