

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Determinación de especies, genes de resistencia a la vancomicina, genes precursores de feromonas sexuales de *Enterococcus* de interés clínico mediante pruebas moleculares.

Proyecto de investigación

Arleth Estefanía Gualle Brito

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 06 de diciembre de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Determinación de especies, genes de resistencia a la vancomicina, genes
precursores de feromonas sexuales de *Enterococcus* de interés clínico
mediante pruebas moleculares.**

Arleth Estefanía Gualle Brito

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Cristina Chávez, MSc.

Firma del profesor

Quito, 06 de diciembre de 2018

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Arleth Estefanía Gualle Brito

Código: 00117485

Cédula de Identidad: 1716841620

Lugar y fecha: Quito, 06 diciembre de 2018

RESUMEN

Los *Enterococcus* (*E.*) son un género bacteriano que han adquirido importancia durante los últimos años en los centros de salud, por sus factores de virulencia que aportan a la patogenicidad, así como por la capacidad de presentar resistencia a múltiples antibióticos incluidos la vancomicina. Los mecanismos para adquirir genes de resistencia son varios, entre ellos feromonas sexuales que son péptidos que potencian y facilitan la conjugación de plásmidos para la transferencia horizontal de genes. El objetivo de este estudio fue determinar las especies de *Enterococcus* y genes de resistencia a la vancomicina, en cepas de importancia clínica aisladas durante un año de dos centros de salud, Sistemas Médicos USFQ (Cumbayá) y Hospital de los Valles mediante PCR multiplex. Se determinó que el 95% de los aislamientos corresponde a *E. faecalis* y el 5% a *E. faecium*. La mayor frecuencia de cepas aisladas corresponde a urocultivos. No se evidenció la presencia de genes de resistencia a la vancomicina mediante PCR convencional en ninguno de los *Enterococcus* recuperados de los dos centros de salud. Adicionalmente se investigó la presencia de genes precursores de feromonas sexuales cCF10 y cAM373 por PCR. Mediante el análisis realizado se observó que el 87% de las muestras amplificaron para el gen precursor de la feromona cCF10 y 90% para la feromona cAM373. Ninguna de las feromonas identificadas se encontró en la especie *E. faecium*.

Palabras clave: Glipéptido, vancomicina, *Van A*, *Van B* *VanC*, feromonas sexuales, cCF10, cAM373.

ABSTRACT

Enterococcus (E.) are a bacterial genus that have become important during the last few years within health centers, due to their virulence factors that contribute to pathogenicity, as well as their ability to exhibit resistance to multiple antibiotics including vancomycin. The mechanisms to acquire resistance genes are several, among them sex pheromones, which are peptides that enhance and facilitate the conjugation of plasmids for horizontal gene transfer. The objective of this study was to determine *Enterococcus* species and vancomycin resistance genes, in strains of clinical importance isolated during one year from two health centers, Sistemas Médicos USFQ (Cumbayá) and Hospital de los Valles, using multiplex PCR. It was determined that 95% of the isolates correspond to *E. faecalis* and 5% to *E. faecium*. The highest frequency of isolated strains corresponds to urine cultures. The presence of vancomycin resistance genes was not evidenced by conventional PCR in any of the *Enterococcus* retrieved from the two health centers. Additionally, the presence of sex pheromone precursor genes cCF10 and cAM373 was investigated by PCR. Through the analysis, it was observed that 87% of the samples amplified for the cCF10 pheromone precursor gene and 90% for the cAM373 pheromone. None of the identified pheromones were found in the species *E. faecium*

Key words: Glycopeptide, vancomycin, resistance genes, *Van A*, *Van B* *VanC*, sex pheromones, cCF10, cAM373.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Características Generales	11
1.2. Patogenicidad	11
1.3. Factores de virulencia.....	12
1.4. Feromonas sexuales en <i>Enterococcus</i>	13
1.4.1. Feromona cCF10	14
1.4.2. Feromona cAM373.....	15
1.5. Genética de la resistencia en <i>Enterococcus</i>	15
1.6. Primeros casos de <i>Enterococcus</i> resistentes a la vancomicina	16
1.7. Mecanismo de resistencia de <i>Enterococcus</i> spp. a vancomicina	17
1.7.1 Fenotipos de resistencia.....	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivos General.....	18
2.2. Objetivos Específicos	19
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. ÁREA DE ESTUDIO	20
5. MATERIALES	21
5.1. Recolección de muestras	21
5.2. Almacenamiento de muestras.....	21
5.3. Extracción de ADN mediante doble ebullición.....	22
5.4. Cuantificación y dilución de ADN.....	22
5.5. Diseño de cebadores para la identificación de genes precursores de feromona sexual de <i>Enterococcus</i> spp.....	22
5.6. PCR: Amplificación de genes de interés.....	23
5.7. Electroforesis en gel de agarosa	23
6. MÉTODOS	24
6.1. Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito	24
6.2. Colección y transporte de muestras.....	24
6.3. Codificación de las muestras	25
6.4. Almacenamiento de muestras.....	25
6.5. Extracción de ADN por ebullición.....	25

6.6.	Cuantificación del ADN obtenido.....	26
6.7.	Diseño de cebadores de las feromonas sexuales de <i>Enterococcus</i> spp.	26
6.8.	Determinación de genes de vancomicina e identificación de especies de <i>Enterococcus</i>	27
6.9.	Amplificación de genes de especies <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> mediante PCR multiplex	27
6.10.	Amplificación de genes de resistencia a la vancomicina <i>VanA</i> , <i>VanB</i> , <i>VanC-1</i> y <i>VanC2-C3</i> mediante PCR multiplex	28
6.11.	Protocolo para la amplificación de genes precursores de las feromonas cCF10 y cCAM373.....	28
6.12.	Procedimiento para el análisis de las secuencias amplificadas mediante PCR	29
7.	RESULTADOS	29
7.1.	Muestras analizadas desde diciembre del 2016 hasta diciembre del 2017 en diferentes centros de salud	29
7.2.	Especies de <i>Enterococcus</i> identificadas a través de PCR multiplex.....	30
7.3.	Comparación de las especies de <i>Enterococcus</i> identificadas en el Hospital de los Valles mediante pruebas bioquímicas (VITEK 2) versus PCR múltiplex del presente estudio.	31
7.4.	Análisis del género <i>Enterococcus</i> según el origen de las muestras	31
7.5.	Análisis del origen de las muestras según las especies de <i>Enterococcus</i>	32
7.6.	Análisis in silico de las especies de <i>Enterococcus</i> que no coincidieron entre la técnica de VITEK 2 y PCR multiplex del presente estudio.	33
7.7.	Genes de resistencia a la vancomicina	33
7.8.	Determinación de la presencia del gen precursor de la feromona cCF10 en los <i>Enterococcus</i> aislados.	34
7.9.	Relación del gen precursor de la feromona cCF10 y las especies de <i>Enterococcus</i> identificadas	34
7.10.	Estudio de la presencia del gen precursor de la feromona cAM373	35
7.11.	Relación del gen precursor de la feromona cAM373 y las especies de <i>Enterococcus</i> identificadas	36
8.	DISCUSIÓN.....	37
8.1.	Análisis de las especies de <i>Enterococcus</i>	37
8.2.	Comparación de las dos metodologías de usadas para la identificación de especies de muestras obtenidas en el Hospital de los Valles	38
8.3.	Relación del origen de la muestra y especies de <i>Enterococcus</i> aisladas.....	40
8.4.	Resistencia a la vancomicina en <i>Enterococcus</i> spp.	41

8.5.	Análisis del gen precursor de la feromona cCF10	44
8.6.	Análisis del gen precursor de la feromona cCAM373	45
9.	CONCLUSIONES	45
10.	RECOMENDACIONES	46
11.	BIBLIOGRAFÍA	48
12.	ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Primers usados para la amplificación de las feromonas sexuales</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 2. Primers utilizados para la detección de genes usados en este estudio.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 3. Identificación molecular de las muestras enviadas a secuenciar.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 4. Datos obtenidos sobre la identificación de genes de resistencia a la vancomicina mediante PCR multiplex.</i>	<i>34</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Porcentaje de muestras de Enterococcus provenientes de los diferentes centros de salud.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2. Porcentaje de especies de Enterococcus identificadas mediante PCR múltiplex en las muestras recolectadas de diferentes centros de salud</i>	<i>31</i>
<i>Figura 3. Comparación de las especies de Enterococcus identificadas en el Hospital de los Valles mediante pruebas bioquímicas (VITEK 2) versus PCR múltiplex del presente estudio.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 4. Datos del origen de las muestras recolectadas de diferentes centros de salud</i>	<i>32</i>
<i>Figura 5. Porcentaje de especies de Enterococcus identificadas en urocultivos y hemocultivos</i>	<i>33</i>
<i>Figura 6. Porcentaje de Enterococcus que presentan el gen precursor de la feromona cCF10 identificadas mediante PCR.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 7. Porcentaje de especies de Enterococcus identificadas que amplificaron para el gen precursor de la feromona cCF10.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 8. Porcentaje de muestras que presentan el gen precursor de la feromona cAM373 identificadas mediante PCR.....</i>	<i>36</i>
<i>Figura 9. Número de especies de Enterococcus identificadas que amplificaron para el gen precursor de la feromona cAM373</i>	<i>37</i>

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características Generales

El género *Enterococcus* son bacterias anaerobias facultativas presentes en el intestino de humanos y otros animales; residentes habituales del tubo digestivo, vías biliares y en menor cantidad en la vagina y uretra masculina. También se pueden encontrar ampliamente distribuidos en el suelo, plantas, agua y algunos alimentos. Se pueden identificar debido a sus características cocos Gram positivos dispuesto típicamente en pares o en cadenas cortas, catalasa negativa (Rodríguez, 2006).

Pueden crecer en un amplio intervalo de temperatura de 10°C a 45°C; presentan una capacidad para sobrevivir a condiciones adversas como altas concentraciones de cloruro de sodio 6,5%, además se caracterizan por hidrolizar la esculina en presencia de sales biliares al 40% y producen pirrolidonil arilamidasa (PIR). Las colonias en el medio agar sangre después de 24 horas de incubación son de gran tamaño y se pueden identificar la hemólisis por la coloración del halo transparente alrededor de la colonia generalmente pueden ser γ -hemolítico, α -hemolítico y rara vez, β -hemolítico (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

Estos organismos anteriormente pertenecían al género *Streptococcus* del grupo D porque presentan el antígeno de la pared celular del grupo D, se los ha reclasificado mediante análisis taxonómicos usando técnicas genéticas en el género *Enterococcus*, se han descrito 40 especies de este género, pero se han asociado solo 26 tipos de estas especies que pueden infectar a humanos (Wardal y Sadowy, 2010). Las especies causantes de enfermedades humanas y clínicamente importantes son: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

1.2. Patogenicidad

Algunas especies de este género se han relacionado con enfermedades humanas y se han establecido como patógenos nosocomiales de importancia clínica en hospitales. La virulencia

de estas bacterias se asocia a diferentes características como: la capacidad de adherirse a los tejidos formando biopelículas, son intrínsecamente resistentes a varios antibióticos usados en tratamientos médicos entre estos la oxacilina, cefalosporina y vancomicina (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2013).

Las especies más prevalentes aisladas en un 90% en casos clínicos son: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Rojas, 2014). Las infecciones asociadas a éstos microorganismo pueden ser por diferentes fuentes endógenas y exógenas, debido a que esta bacteria es un componente de la flora intestinal en seres humanos, a nivel hospitalario es una bacteria nosocomial exitosa debido a su capacidad de adquirir genes de resistencia por el uso excesivo de tratamientos médicos con antibióticos de alto espectro (Chenoweth & Schaberg, 1990).

Las infecciones nosocomiales a las cuales se han asociado al género *Enterococcus* son: bacteriemia, prevalencia de la bacteria en la sangre; bacteriemias secundarias con la presencia de bacterias otras partes del cuerpo; endocarditis infección del endocardio revestimiento interno de las cámaras del corazón y las válvulas; infecciones del tracto urinario (ITUs) y contaminaciones en las heridas postquirúrgicas (Upadhyaya & Ravikumar, 2009).

1.3. Factores de virulencia

Enterococcus spp. son considerados patógenos oportunistas de carácter emergente porque tienen cualidades de transferir genes de resistencia a antibióticos mediante plásmidos (García y Barrantes, 2009). Este factor se ha visto potenciado por el uso de una gran cantidad de antibióticos en la práctica médica; lo cual provoca el surgimiento de esta bacteria con capacidad de resistencia a medicamentos. A pesar de que los *Enterococcus* no son intrínsecamente virulentos pueden adquirir factores de virulencia que les otorgan una ventaja selectiva en diferentes ambientes. (Wardal y Sadowy, 2010). Los factores más estudiados son: producción

de hemolisinas/citolisinas, sustancias de agregación, proteínas de superficie celular que aumentan la patogenicidad en infecciones en seres humanos (Kayaoglu & Orstavik, 2004).

La Hemolisina/citolisina es una proteína citolítica que pueden lisar eritrocitos de humanos, caballos y conejos. Se involucran en el efecto letal de la infección y pueden afectar células como macrófagos y neutrófilos. Las sustancias de agregación son proteínas de unión de superficie que se codifican en plásmidos y promueve que los microorganismos se agrupen con la finalidad del intercambio de plásmidos. Contribuyen en la adherencia de estas bacterias a las células intestinales y epiteliales renales (Procop, Church, Hall, Janda, & Koneman, 2017). La gelatinasa es una metaloproteinasa extracelular que contiene zinc, que presenta capacidad para hidrolizar colágeno, fibrinógeno, caseína, hemoglobina y otros péptidos bioactivos, ésta contribuyen a los *Enterococcus* para complicar cuadros de endocarditis según experimentos realizados en animales. La proteína de superficie celular de *Enterococcus*, se encuentra asociada a la pared celular, permiten que estos microorganismos evadan anticuerpos al alejarse de la superficie celular, además de estar involucradas en la formación de biopelículas (Upadhyaya & Ravikumar, 2009).

Existen una gran cantidad de factores que pueden estar involucrados en la patogenicidad de estas bacterias en relación a colonización del huésped, resistencia contra mecanismos de defensa, resistencia a antibióticos, inducción de la inflamación en el huésped. Los *Enterococcus* pueden acumular, compartir y codificar factores de virulencia y genes de resistencia a través de plásmidos conjugativos que poseen la facultad de diseminarse con facilidad y transferirse con el propósito de permitir la supervivencia del microorganismo bajo condiciones ambientales inusuales (Huycke & Gilmore, 1995).

1.4. Feromonas sexuales en *Enterococcus*

Las feromonas sexuales enterocócicas permiten controlar la señalización intercelular de la bacteria donante y receptora para la transferencia de plásmidos conjugativos. Son péptidos que

son codificados por el cromosoma. Los péptidos más investigados son cCF10, cAD1, cAM373 que permiten la transferencia horizontal de genes que pueden codificar resistencia a antibióticos, producción de hemolisinas o bacteriocinas (Dunny, 2013).

El mecanismo de conjugación inicia cuando la feromona madura luego de ser codificada por el huésped actúa como un receptor para la célula donante. La unión del péptido secretado modula la capacidad del receptor para regular el proceso de conjugación luego se adhiere a la superficie del donante, lo cual permite que sea una guía al proceso para que suceda la transferencia de material genético cuando este haya culminado la feromona se apaga e inactiva (Dunny & Berntsson, 2016).

1.4.1. Feromona cCF10

La feromona cCF10 es un péptido hidrófobo de siete aminoácidos codificados en el cromosoma que induce específicamente a las células que llevan el plásmido pCF10 que se caracteriza por la transferencia de genes de resistencia a la tetraciclina. Hay que destacar que “las feromonas peptídicas (cCF10 [CF]) son esenciales para crear el enlace de transferencia de plásmidos de alta frecuencia in vitro en *Enterococcus faecalis*” (Hirt, y otros, 2013). La transferencia se da por la feromona de un plásmido conjugado. Cada feromona se convierte en el medio para la inducción de transferencia de los plásmidos.

Los *Enterococcus* son conocidos por su capacidad para experimentar la conjugación, transfiriendo horizontalmente genes entre especies a través de plásmidos conjugativos. La conjugación en *Enterococcus* generalmente se controla a través de dos feromonas peptídicas donde un péptido sirve como un inductor para la vía de señalización que conduce a la conjugación, y el otro como un inhibidor que evita el apareamiento innecesario entre las células que ya presentan el plásmido. Los precursores peptídicos inductores están codificados en el cromosoma de *E. faecalis*, mientras que los péptidos inhibidores están codificados en el plásmido.

La expresión del gen peptídico inhibidor del plásmido asegura que no se producirá conjugación entre dos células que albergan el mismo plásmido conjugativo. Las proporciones de la concentración de inductor a inhibidor se inclinan a favor del inductor cuando las células libres de plásmidos, que no pueden generar el inhibidor, están presentes, lo que permite que las células receptoras libres de plásmidos induzcan a las células donantes que contienen plásmidos a conjugarse. En general, los péptidos conjugativos de *E. faecalis* son altamente específicos, solo estimulan la conjugación de su plásmido afín. Análogos de péptidos exógenos que difieren en un solo aminoácido no activa la conjugación del plásmido afín, lo que demuestra la alta especificidad de los péptidos conjugativos (Dunny y otros, 2001).

1.4.2. Feromona cAM373

La feromona cAM373 es un heptapéptido que está presente en diferentes especies como: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus gordonii* es excretado por bacterias que no presentan el plásmido conjugativo (pAM373) que confiere una respuesta de apareamiento a esta feromona (Clewell, An, White, & Gawron-Burke, 1985). El plásmido pAM373 es un vehículo para la adquisición de genes de resistencia. La presencia permite el intercambio intergenérico entre *Enterococcus* y *Staphylococcus* que probablemente puede ocurrir en la naturaleza y se cree que la integración de plásmidos de estas dos especies está involucrada en la transferencia de determinantes de resistencia entre estos dos organismos (Ozawa, Boever, & Clewell, 2005)

Debido a la falta de información de la función del plásmido pAM373 se lo ha relacionado a la eventual adquisición de resistencia a la vancomicina en otros géneros bacterianos. La presencia del gen *camE* se asocia con el mecanismo de producción y formación de la feromona cAM373 en *E. faecalis* y el gen *camS* en *Staphylococcus*; la secuencia de los genes precursor de la feromona se encuentra en ADN genómico (Flannagan & Clewell, 2002).

1.5. Genética de la resistencia en *Enterococcus*

Hace algunas décadas las infecciones por *Enterococcus* se podían tratar con antibióticos como: la penicilina, ampicilina o vancomicina, pero en la actualidad han adquirido resistencia, esto se atribuye a mutaciones o nuevos genes. Los mecanismos por los cuales pueden obtener genes de resistencia en este género bacteriano son: mediante plásmidos sensibles a las feromonas lo que ocasiona la transferencia del plásmido a especies como *E. faecalis* con una mayor frecuencia, otro mecanismo son plásmidos capaces de transferirse a otras especies generalmente con una frecuencia baja, el tercer mecanismo son los transposones de baja frecuencia que pueden ser transmitido a un amplio grupo de bacterias y el último mecanismo es la transferencia de grandes fragmentos de ADN cromosómico de una bacteria a otra mediante conjugación (Arias & Murray, 2017).

1.6. Primeros casos de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina

Los primeros casos de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (VRE) fue en Reino Unido y Francia en el año de 1986, luego se detectaron cepas resistentes *E. faecium* en hospitales ubicados en Estados Unidos. Al analizar las bacterias aisladas en ambos casos se encontraron diferencias epidemiológicas, en Estados Unidos el principal factor que influyó en la diseminación de VRE fue el uso excesivo de antibióticos y glicopéptidos en el ámbito hospitalario por lo contrario en Europa la presencia de esta cepa no ocurrió dentro del área hospitalaria (Corso, Gagetti, Rodríguez, & Melano, 2007).

Actualmente la presencia de VRE está diseminada alrededor del mundo e incluso se han determinado posibles riesgos de transferencia de genes de resistencias a otras especies lo cual los convierte en un potencial riesgo para los sistemas de salud mundial (Cetinkaya, Falk, & Mayhall, 2000). Un ejemplo que se ha identificado son los plásmidos de *Enterococcus* spp. que pueden ceder resistencia a vancomicina a especies como *Staphylococcus aureus* en base a un modelo realizado *in vitro*; lo que sugiere un peligro potencial para pacientes que pueden presentar una infección nosocomial (García y Barrantes, 2009). En 1998 en Japón se registró

el primer caso de *S. aureus* que presentó una resistencia intermedia a la vancomicina no asociado a la transferencia de los genes *Van*. En Michigan en el 2002 se detectó un aislamiento clínico de *Staphylococcus aureus* MRSA (VRSA-1) que exhibía resistencia completa a este glicopéptido debido a la adquisición del operón *vanA* de un *Enterococcus* spp. (Labarca, 2015)

1.7. Mecanismo de resistencia de *Enterococcus* spp. a vancomicina

La vancomicina es un antibiótico perteneciente a la clase de los glicopéptidos que tiene un efecto sobre las bacterias Gram positivas inhibiendo la síntesis de peptidoglicano principal componente de la pared celular bacteriana causando inhibición al unirse a las terminales D-Ala-D-Ala los cuales se ubican en la membrana citoplasmática. El mecanismo de resistencia a la vancomicina en *Enterococcus* spp. está mediada por la expresión de genes que se ubican en los plásmidos o en transposones (Gales & Vignoli, 2018).

Los genes de resistencia a antibióticos generan que los precursores de peptidoglucano muestren terminales diferentes en la estructura D-Ala-D-Lac (D-lactato) o D-Ala-D-Ser (D-Serina) en lugar de D-Ala-D-Ala. Al estar en presencia de la vancomicina actúa sobre los terminales de la pared bacteriana que presentan una configuración diferente lo cual ocasiona una afinidad muy reducida alterando el sitio objetivo de este glicopeptido ocasionado que no afecte el desarrollo de las bacterias. Existen dos tipos de resistencia a la vancomicina una intrínseca que muestra un bajo nivel de resistencia a este antibiótico que se encuentra principalmente en especies como: *Enterococcus gallinarum* y *E. casseliflavus* / *E. flavescens*. La resistencia adquirida mediante la obtención de información genética se encuentra más en especies *E. faecium* y *E. faecalis* pero también se han podido determinar la presencia de estos genes en otras especies (Faron, Ledebor, & Buchan, 2016).

1.7.1 Fenotipos de resistencia

Se han determinado cinco fenotipos que ocasionan la resistencia a la vancomicina en *Enterococcus* *VanA*, *VanB*, *VanC*, *VanD* y *VanE*. Los fenotipos más frecuentes en esta especie

son: *VanA*, *VanB* y *VanC*. El fenotipo *VanA* se encuentran con mayor frecuencia en *E. faecium* y *E. faecalis* confiere resistencia en un alto grado a dos antibióticos teicoplanina y vancomicina. La transferencia de este gen ocurre cuando el operón *vanA* es transportado por el transposón Tn1546 este mecanismo se determinó mediante el uso de plásmidos (Cercenado, 2011). El fenotipo *VanB* es transferido por un operón *vanB* que tiene un mecanismo similar al operón *vanA* pero difieren por que presenta un moderado grado de resistencia a la vancomicina y una sensibilidad a la teicoplanina. El gen *VanC* se relaciona con una resistencia intrínseca moderada o intermedia a la vancomicina y una sensibilidad a la teicoplanina. Se identifican tres genes relacionados a este gen, *VanC1*, *VanC2* y *VanC3* que son específicos para la identificación de especies móviles *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* respectivamente (Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2012).

Los fenotipos de resistencia a vancomicina se pueden verificar a través de pruebas como la concentración mínima inhibitoria (CIM) de vancomicina y teicoplanina que varía según el operón que contenga. Las cepas con *VanA* presentan una CIM de 64-1000 µg/mL para la vancomicina y CIM de 1-512 µg/mL con una resistencia inducible de alto grado que se puede insertar en el cromosoma o en los plásmidos. El fenotipo *VanB* en el caso de la vancomicina presenta CIM de 4-512 µg/mL y sensibilidad a la teicoplanina CIM de 0,5- 1 µg/mL resistencia inducible adquirida a distintas concentraciones de vancomicina. *VanC* presenta concentración mínima inhibitoria de 2-32 µg/mL para la vancomicina y sensible a la teicoplanina CMI de 0,5- 1 µg/mL con resistencia intrínseca constitutiva para la vancomicina de origen cromosómico (Cetinkaya , Falk, & Mayhall, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos General

Determinar especies de *Enterococcus* de interés clínico, genes involucrados en la resistencia a la vancomicina *vanA*, *vanB*, *vanC* y genes precursores de feromonas a partir de muestras obtenidas de centros médicos mediante PCR convencional y PCR multiplex.

- Objetivos Específicos Comparar la especie de *Enterococcus* identificada por pruebas moleculares de acuerdo al origen de la muestra.
- Determinar el tipo de feromona de acuerdo a la especie de *Enterococcus*
- Analizar la especies de *Enterococcus* identificadas en el HDLV y PCR multiplex, realizada en éste estudio.

3. JUSTIFICACIÓN

Los *Enterococcus* se caracterizan por presentar resistencia a la mayor parte de antibióticos disponibles, incluido la vancomicina. Su maquinaria genómica le permite transferir genes de resistencia a otras especies de *Enterococcus* así como a otros géneros bacterianos como el *Staphylococcus* spp., esto podría causar problemas a nivel hospitalario y comunitario debido a que reduce las opciones de tratamiento para infecciones. La colonización e infección ocasionada por *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) en centros médicos cada vez es más común relacionada a una mala higiene dentro de los hospitales y al uso prolongado de éste antibiótico. Los genes de resistencia a la vancomicina son: *VanA* que se asocia a una alta resistencia a este antibiótico, *VanB* moderado grado de resistencia a este glicopéptidos, *VanC* resistencia intrínseca de moderada a baja a la vancomicina que permite la identificación de especies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*. Por ese motivo el identificar la presencia de genes de resistencia permite el desarrollo de medidas para prevenir la propagación de esta bacteria multiresistente (Eliopoulos, 2001).

El proceso de conjugación de *Enterococcus* ocurre por efecto de feromonas sexuales que facilitan la transferencia del plásmido conjugativo, el plásmido pCF10 reconoce la feromona

sexual cCF10 facilita el mecanismo de conjugación de alta frecuencia en especies como *E. faecalis* y modulación de la virulencia además permiten la estabilización y manteamiento del plásmido al ser transferido a otra bacteria otorgando una aptitud competitiva a los *Enterococcus* (Hirt, y otros, 2013). La feromona cAM373 puede estar presente en varios géneros bacterianos como: el *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* facilita la conjugación para el proceso de transferencia del plásmido pAM373, se le atribuido la capacidad de intercambiar genes de resistencia a antibióticos como la vancomicina (Flannagan & Clewell, 2002).

En el Ecuador según datos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) en el año 2015 se registra un porcentaje de resistencia a vancomicina para *Enterococcus faecalis* de 0,7% y *Enterococcus faecium* de 12,7 % muestras analizadas en diferentes centros a nivel nacional (INSPI, 2015). La frecuencia de VRE en una investigación realizada del 2006 al 2008 en países de la región como: Colombia, Perú y Venezuela incluido el Ecuador de un total de 723 cepas de *Enterococcus* spp., solo el 6% presentaban resistencia a este glicopéptido (Panesso, y otros, 2010). Este estudio buscó proporcionar información acerca de la resistencia a vancomicina en *Enterococcus* spp. aislados de diferentes centros médicos y además determinar el gen precursor de la feromona cCF10 y cAM373 que podría incrementar el riesgo para el intercambio de genes de resistencia.

4. ÁREA DE ESTUDIO

El aislamiento de las cepas de *Enterococcus* se realizó durante el periodo de un año desde el mes de diciembre del 2016 hasta diciembre del 2017, las muestras son de origen ambulatorio y hospitalario procedentes de diferentes centros médicos: Hospital de los Valles y Sistemas Médicos Universidad San Francisco de Quito (SIME).

La identificación de *Enterococcus* en el laboratorio clínico del Hospital de los Valles se evalúa mediante el equipo VITEK 2, un sistema microbiológico completamente automatizado

que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos con una suspensión de cultivo puro escala McFarland 0,5., en el módulo de lectura/incubación del equipo se determina el género y la especie de la bacteria, resistencia a antibióticos.

La investigación se realizó con muestras recolectadas del SIME del sector de Cumbayá de pacientes con sospecha de infección bacteriana causa por *Enterococcus*. Las cepas se envían al Instituto de Microbiología USFQ para su análisis en el área clínica las cuales deben presentar los siguientes requerimientos de crecimiento bacteriano con las características fenotípicas y bioquímicas descritas a continuación: cocos Gram positivos, catalasa negativos, bilis esculina positivos y pirrolidónil arilamidasa (PIR) positivo usando medios cromogénicos de la marca Becton Dickinson (BD), para la identificación.

5. MATERIALES

5.1. Recolección de muestras

- Cepas de *Enterococcus* aislados del Hospital de los Valles, Sistemas Médicos USFQ Cumbayá
- Agar nutritivo (Becton Dickinson)
- Recipiente para guardar muestras
- Gel refrigerante
- Tubos de vidrio
- Asas estériles de plástico

5.2. Almacenamiento de muestras

- Medio Brain Heart Infusion (Becton Dickinson-BD)
- Glicerol (PanReac AppliChem)
- Crioviales estériles
- Puntas para micropipeta 100 – 1000 µl

- Micropipeta
- Hisopos estériles
- Ultracongelador -80°C

5.3. Extracción de ADN mediante doble ebullición

- Agua de destilada estéril
- Termobloque (ThermoFisher Scientific)
- Tubos Eppendorf (1,5 ml)
- Congelador a – 20°C (Frigidaire)
- Centrifuga (Eppendorf)
- Puntas para micropipeta 100 – 1000 µl
- Micropipeta

5.4. Cuantificación y dilución de ADN

- Espectrofotómetro (NANOVUE)
- Agua libre de ARNasas y ADNasas
- Congelador a – 20°C
- Puntas para micropipeta 0,5 – 10 µl
- Micropipeta

5.5. Diseño de cebadores para la identificación de genes precursores de feromona sexual de *Enterococcus* spp.

- National Center Biotechnology Information (NCBI) proporcionó la información genómica de los genes precursores de las feromonas cCF10, cAM373
- Programas de libre acceso como:
 - Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) para el diseño de primers

- BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y Tm calculator (<http://tmcalculator.neb.com/>) para la evaluación de las características de los Primers seleccionados

5.6. PCR: Amplificación de genes de interés

- Buffer 5X (Promega)
- Taq Polimerasa (Promega) 5 Unidades/ μ l
- Agua libre de ARNasas yADNasas
- dNTP`s Promega (2 mM)
- Tubos Eppendorf (0,2 ml)
- MgCl₂ marca Promega (25 mM)
- Primers utilizados en esta investigación y las secuencias específicas se muestran en la tabla # 1 y # 2
- Controles de *E. faecium*, *E. faecalis*, *VanA*, *VanB*, *VanC1*, *VanC2-VanC3* se obtuvieron del INSPI
- Termociclador (Bio-Rad)

5.7. Electroforesis en gel de agarosa

- Ladder 100 pb (Invitrogen)
- Bromuro de Etidio
- TBE 1X (Tris-borato EDTA)
- Agarosa
- Balanza analítica (ADAM)
- Cámara de electroforesis (Labnet)

6. MÉTODOS

6.1. Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito

Para realizar el análisis de las muestras, se llenó y se envió la documentación necesaria de la investigación junto con los formularios de aplicación al Comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). La investigación se registró con código 216-186T (Anexo A), adicionalmente para la obtención de las muestras del Hospital de los Valles se adjuntó la investigación a un formulario de aplicación al Comité de Bioética USFQ con el código 2016-026IN (Anexo B). En los dos casos, el permiso del Comité de Bioética se aplicó como “No consentimiento informado” debido a que las muestras de los pacientes de donde se aislaron los *Enterococcus* spp., estaban destinadas a ser desechadas después de su análisis y con el compromiso de que no se usaría ningún dato del paciente, para esto se usó otra codificación de tal manera que se mantenga toda la información del paciente de manera confidencial.

6.2. Colección y transporte de muestras

Las bacterias fueron colectadas por el periodo de un año en diferentes centros médicos: Hospital de los Valles y Sistemas Médicos USFQ (SIME) sector Cumbayá desde el mes de diciembre del 2016 hasta diciembre del 2017. En el laboratorio clínico del Hospital de los Valles, los *Enterococcus* spp. se identificaron a través del equipo automatizado de la marca VITEK 2, después de la confirmación del género y la especie, se seleccionaron con un asa desechable tres colonias aisladas, luego se transportaron las bacterias en tubos de ensayo que contenían 5 ml de agar nutritivo en pico de flauta, en un cooler a una temperatura entre 4 y 8°C, hasta el Instituto de Microbiología USFQ, siguiendo las normas de bioseguridad establecidas en los dos laboratorios. En el caso de las muestras de SIME, las bacterias fueron identificadas en cuanto a género y especie mediante pruebas convencionales en el laboratorio de diagnóstico clínico del Instituto de Microbiología de la USFQ, para el almacenamiento de las bacterias se tomó cepas aisladas con un asa metálica estéril y se colocaron en tubos de

ensayo con 5ml de agar nutritivo en pico de flauta, las muestras provenientes de los dos centros médicos se colocaron en una incubadora en condiciones microaerófilas a 37°C durante 24 horas.

6.3. Codificación de las muestras

Las muestras obtenidas de *Enterococcus* spp. recolectadas por un año se codificaron mediante un orden secuencial siguiendo el formato EN001. Además en el cuaderno de trabajo se registró el centro de salud y el tipo de cultivo de donde se aisló el *Enterococcus* spp.

6.4. Almacenamiento de muestras

Después de la colección y transporte de las muestras, se procedió almacenar las bacterias, hasta posteriores pruebas moleculares, para lo cual se añadió 2 ml de BHI con 20% de glicerol estéril en los tubos de agar nutritivo que permitieron el crecimiento de los *Enterococcus* spp., se desprendió las colonias del tubo con ayuda de un hisopo estéril y se homogenizó la mezcla, se transfirió un 1ml de la mezcla; este proceso se realizó por duplicado. Se rotuló los tubos con los códigos establecidos y se almacenó en un ultracongelador a -80°C, para posteriores pruebas.

6.5. Extracción de ADN por ebullición

Se reactivó la bacteria en agar sangre humana y se incubó a 37°C por 24 horas en atmósfera microaerófila. Se realizó el proceso de extracción por ebullición mediante el protocolo establecido por Coll y colaboradores en el 2005, con las siguientes modificaciones, se agregó 300µL de agua destilada estéril en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se seleccionó de 5 a 8 colonias que crecieron en agar sangre humana, se etiquetó el tubo, se colocó el tubo Eppendorf en el termobloque a 100°C durante 10 minutos, luego se congeló la muestra a -20°C, se esperó 24 horas y se volvió a realizar el proceso de ebullición y congelación de las muestras con las mismas condiciones descritas anteriormente. Se centrifugó el tubo a 13000 rpm por 5 minutos, se transfirió y almaceno el sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1,5 ml, se etiquetó y se guardó a -20°C para posteriores pruebas.

6.6. Cuantificación del ADN obtenido

Para el proceso de cuantificación del ADN se utilizó un espectrofotómetro de la marca NANOVUE General Electric, a través del cual se midió la concentración y calidad de las muestras de ADN, luego se procedió a realizar diluciones de todas muestras de ADN almacenadas -20°C en una relación 50:50, usando agua grado PCR, todas las diluciones se almacenaron a -20°C para posteriores pruebas.

6.7. Diseño de cebadores de las feromonas sexuales de *Enterococcus* spp.

Se crearon cebadores para la identificación de dos tipos de feromonas sexuales cCF10, cAM373 presentes en especies de *Enterococcus* spp. Las secuencias de ADN de cada feromona se tomaron de la base de datos de National Center Biotechnology Information (NCBI). Con ayuda programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) se analizó las secuencias de cada feromona y se diseñó los cebadores por medio de los parámetros especificados se obtuvieron 5 tipos de cebadores (forward y reverse) para cada tipo de feromona.

Se evaluaron los cebadores con el uso de diferentes programas libres como BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), DNA Folding (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>), Tm calculator (<http://tmcalculator.neb.com/>); para garantizar su funcionalidad y eficacia en la detección de estas feromonas en plásmidos de *Enterococcus*. El programa BLAST calcula la sensibilidad del cebador al identificar regiones de similitud entre secuencias de nucleótidos, se seleccionó el cebador con un porcentaje alto de identificación para *Enterococcus* spp. Se compararon temperatura de fusión, contenido de guanina y citosina, longitud del primer se obtuvieron en el programa Primer 3; con este análisis realizado solo se seleccionó un primer para cada feromona especificados a continuación.

Tabla 1. Primers usados para la amplificación de las feromonas sexuales

Amplificación del gen precursor de la feromona	Pares de bases (bp)	Secuencias
cAM373	173	F: ACAGAACCAGCAAGTGACTAC
		R: AAAACGTCGTTAACAGCGCC
cCF10	184	F: ACGCGTGCCTGAGTAAAAG
		R: GATCATCGCTGGCATAACGT

6.8. Determinación de genes de vancomicina e identificación de especies de *Enterococcus*.

Los cebadores que se usaron en esta investigación se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 2. Primers utilizados para la detección de genes usados en este estudio

Amplificación de genes	Pares de bases (bp)	Secuencia (5' a 3')	% CG	Referencia
<i>vanA</i>	732	(+) GGGAAAACGACAATTGC	53	Dutka y otros., 1995
		(-) GTACAATGCGGCCGTTA	53	
<i>vanB</i>	635	(+) ATGGGAAGCCGATAGTC	53	Dutka y otros., 1995
		(-) GATTTCGTTCCCTCGACC	53	
<i>vanC</i>	822	(+) GGTATCAAGGAAACCTC	53	Dutka y otros., 1995
		(-) CTTCGCCATCATAGCT	50	
<i>van C-2 y vanC-3</i>	439	(+) CTCCTACGATTCTCTTG	47	Dutka y otros., 1995
		(-) CGAGCAAGACCTTTAAG	47	
<i>ddl E. faecalis</i>	941	(+) ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG		Reiko y otros., 2000
		(-) ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT		
<i>ddl E. faecium</i>	550	(+) TAGAGACATTGAATATGCC	37	Dutka y otros., 1995
		(-) TCGAATGTGCTACAATC	39	

6.9. Amplificación de genes de especies *E. faecalis* y *E. faecium* mediante PCR multiplex

Para la amplificación de los genes de identificación de especies se siguió el protocolo establecido por Dutka y otros, 1995 realizando las siguientes modificaciones: se trabajó con un volumen final de 10 μ l, con una concentración de 0,3 μ M de cada cebador (*ddl E. faecalis* y *ddl E. faecium*); 2,1 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de dNTPS, 0,15 U de Taq, 1X de buffer. Los ciclos usados fueron 94°C por 2 minutos para una desnaturalización inicial, luego 30 ciclos que consisten en un proceso de desnaturalización a 94°C por 1 minutos, annealing a 56°C durante

1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos; finalmente se realizó un proceso de extensión final a 72°C por 5 minutos. La identificación de productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa de 1,5% al cual se le añadió bromuro de Etidio al 1%.

6.10. Amplificación de genes de resistencia a la vancomicina *VanA*, *VanB*, *VanC-1* y *VanC2-C3* mediante PCR multiplex

Para la amplificación de los genes de resistencia a la vancomicina se siguió el protocolo establecido por Dutka y otros., 1995 con las siguientes modificaciones, se utilizó el cebador *ddl* *E. faecalis* descrito por este autor pero no se obtuvo una amplificación de los controles por ese motivo se usó otro cebador diseñado por Reiko y otros., 2000 para la identificación de *E. faecalis*, la reacción de PCR se realizó a un volumen final de 10 µl, con una concentración de 0,3 µM de cada primer (*VanA*, *VanB*, *VanC-1* y *VanC-2,C-3*); 3 mM de *MgCL₂*; 0,25 mM de dNTPS; 0,25 U de Taq; 1X de buffer. Los ciclos usados consisten en una desnaturalización inicial 94°C por 5 minutos luego se realizaron 30 ciclos que consta de un proceso de desnaturalización a 94°C por 1 minutos, annealing a 56°C durante 1:30 minutos y extensión a 72°C por 2 minutos; el proceso de extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos. La identificación de productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa de 1,5% al cual se le añadió bromuro de Etidio al 1%.

6.11. Protocolo para la amplificación de genes precursores de las feromonas cCF10 y cCAM373

La amplificación de los genes precursores de las feromonas se realizó mediante los estándares establecidos en la investigación de Dutka y otros. en 1995 las dos feromonas fueron realizadas mediante una PCR por separado, pero con las mismas condiciones. El volumen final de cada reacción es de 10 µl, con una concentración de 0,3 µM de cada primer (*VanA*, *VanB*, *VanC-1* y *VanC-2,C-3*); 2 mM de *MgCL₂*; 0,2 mM de dNTPS; 0,2 U de Taq; 1X de buffer. Los ciclos de amplificación se realizaron a las siguientes condiciones, desnaturalización inicial

a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de repetición que consisten en el proceso de desnaturalización a 94°C por 1 minutos, annealing a 56°C durante 1:30 minuto y extensión final a 72°C por 2 minutos; en el último ciclo se realizó la extensión final a 72°C por 10 minutos. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1,5% al cual se le añadió bromuro de Etidio al 1%.

6.12. Procedimiento para el análisis de las secuencias amplificadas mediante PCR

Después de realizada la amplificación de los genes para la identificación de especies se determinó que en dos muestras los resultados no coincidían, por lo tanto, los productos de PCR de las muestras fueron enviadas para realizar el proceso de secuenciamiento a la empresa Fuctional. Las secuencias se analizaron usando el programa MEGA 7 y la identificación se basó en el estudio de homologías con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El mismo procedimiento se llevó a cabo con los productos de PCR de una de las muestras que amplificaron para los genes precursores de las feromonas sexuales.

7. RESULTADOS

7.1. Muestras analizadas desde diciembre del 2016 hasta diciembre del 2017 en diferentes centros de salud

En la investigación se recolectaron un total de 62 muestras de *Enterococcus* a partir del mes de diciembre del 2016 hasta diciembre del 2017. El 92% de las cepas eran provenientes de Hospital de los Valles y el 8% de los Sistemas Médicos de la USFQ sector Cumbayá como se indica en la figura 1.

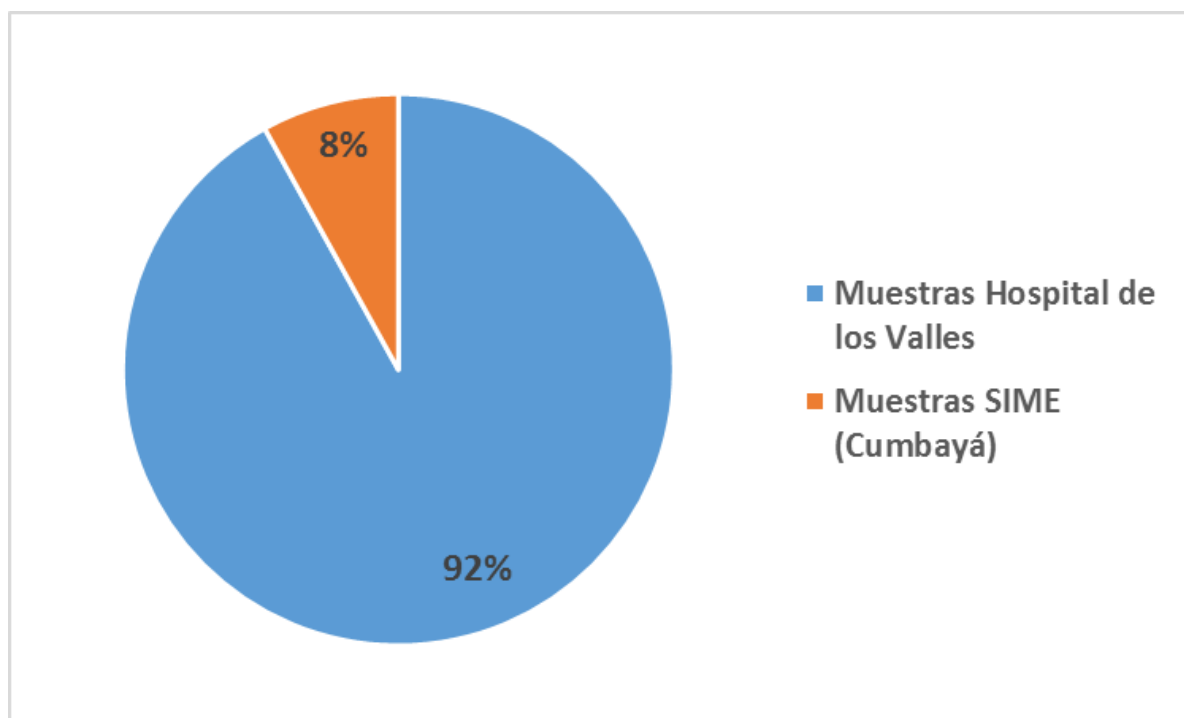


Figura 1. Porcentaje de muestras de *Enterococcus* provenientes de los diferentes centros de salud

7.2. Especies de *Enterococcus* identificadas a través de PCR multiplex

Al analizar los *Enterococcus* recolectados de dos centros de salud, mediante PCR multiplex se determinó que 59 cepas fueron identificadas como *E. faecalis* que representa el 95% y 3 muestras como *E. faecium* que representan el 5% del total, como se indica en el Figura 2.

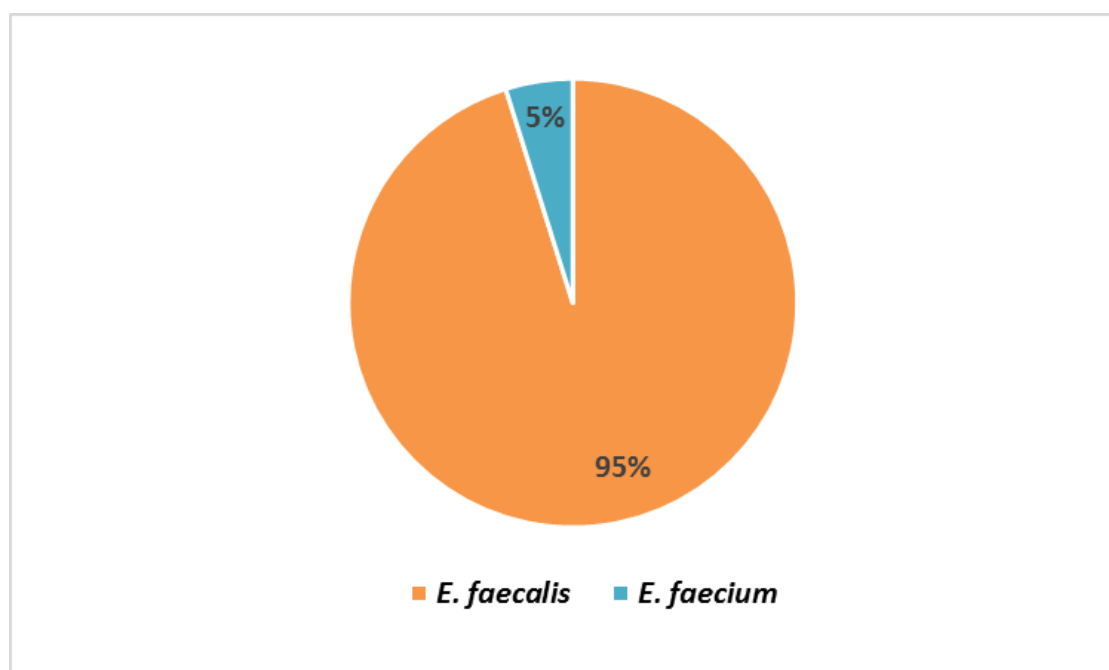


Figura 2. Porcentaje de especies de *Enterococcus* identificadas mediante PCR múltiplex en las muestras recolectadas de diferentes centros de salud

7.3. Comparación de las especies de *Enterococcus* identificadas en el Hospital de los Valles mediante pruebas bioquímicas (VITEK 2) y PCR múltiplex del presente estudio.

En la figura 3 se observa la comparación de las especies identificadas de las muestras recolectadas del Hospital de los Valles (HDLV) pruebas bioquímicas en equipos automatizados (VITEK 2) versus pruebas moleculares del presente estudio. En la parte izquierda de la figura se evidencia que en el HDLV el 91% fueron *E. faecalis*, 7% *E. faecium* y el 2% *E. gallinarum*; en la parte derecha de la figura se observa los porcentajes obtenidos del presente estudio mediante las pruebas moleculares 95% *E. faecalis* y 5% a *E. faecium*, no se evidenció la presencia de *E. gallinarum*.

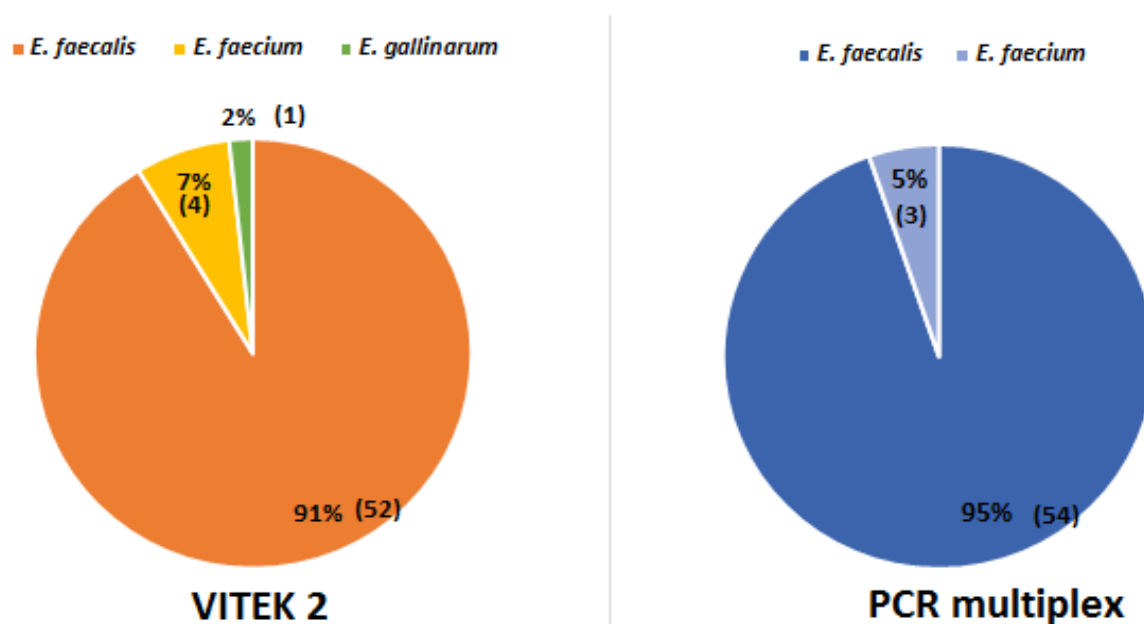


Figura 3. Comparación de las especies de *Enterococcus* identificadas en el Hospital de los Valles mediante pruebas bioquímicas (VITEK 2) versus PCR múltiplex del presente estudio.

7.4. Análisis del género *Enterococcus* según el origen de las muestras

Mediante la información entregada de los centros médicos en relación al origen de las muestras se determinó que de un total de 62 *Enterococcus*; 65,5% de muestras eran provenientes de urocultivos; 6,9% hemocultivos; 3,4% correspondiente a bacterias aisladas en

catéter, lavado bronquial, secreción cardiaca, semen; el 1,7% se identificó en infecciones relacionadas con heridas abdominales, cultivo de secreción traqueal, conducto radicular molar, lavado articular de rodilla, líquido abdominal, líquido cefalorraquídeo, secreción balano prepucial y secreción peneana.

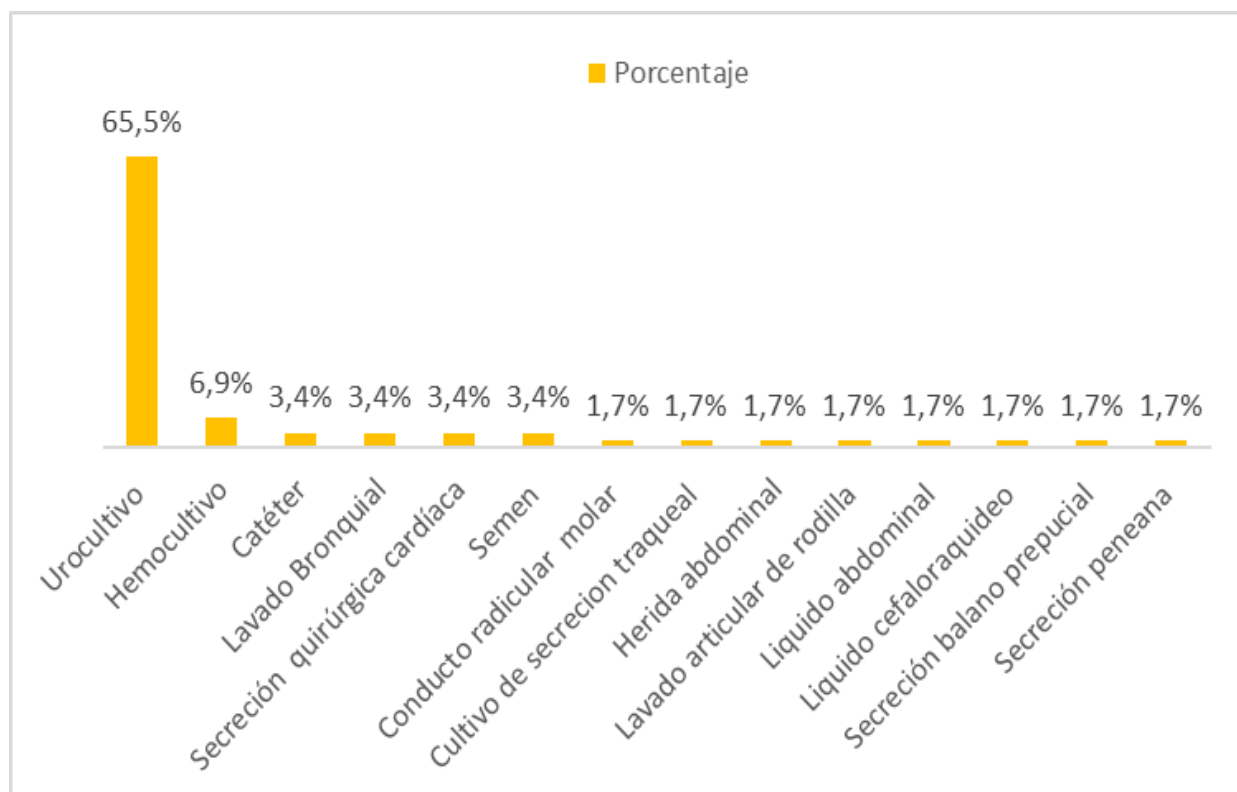


Figura 4. Datos del origen de las muestras recolectadas de diferentes centros de salud

7.5. Análisis del origen de las muestras según las especies de *Enterococcus*

En esta figura se muestra la correlación del origen de las muestras de urocultivos y hemocultivos que representan una mayor frecuencia en esta investigación con las especies identificadas. En el 100% de los urocultivos se aislaron *E. faecalis*, en relación a los hemocultivos el 75% se identificó *E. faecalis* y el 25% *E. faecium*.

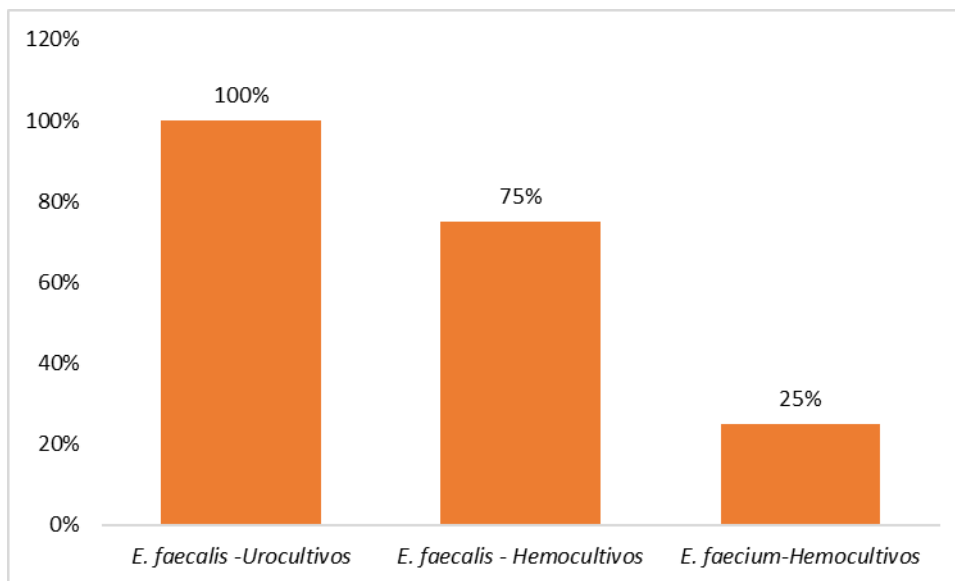


Figura 5. Porcentaje de especies de *Enterococcus* identificadas en urocultivos y hemocultivos

7.6. Análisis *in silico* de las especies de *Enterococcus* que no coincidieron entre la técnica de VITEK 2 y PCR multiplex del presente estudio.

En la tabla 3 se observa la información de análisis molecular obtenida de las muestras después de ser enviadas a secuenciar. Las muestras EN 25 y EN 12 se identificaron mediante un estudio de homología como *E. faecalis* y difieren de los resultados obtenidos del sistema VITEK 2

Tabla 3. Identificación molecular de las muestras enviadas a secuenciar

Muestra	Longitud de la secuencia	Identificación molecular	Max score	Total score	Query Cover	E value	Ident	Accession
EN 25	815	<i>Enterococcus faecalis</i> strain BWATKTN13 D-alanine: D-alanine ligase-related protein (ddl) gene, partial cds	1480	1480	100%	0	99%	KC594682.1
EN 12	870	<i>Enterococcus faecalis</i> D-alanine:D-alanine ligase-related protein (ddl) gene, complete cds	751	751	51%	0	65%	U00457.1

7.7. Genes de resistencia a la vancomicina

Al realizar la PCR multiplex de los genes de resistencia a la vancomicina *VanA*, *VanB*, *VanC1*, *VanC2-VanC3* se evidenció la ausencia de estos genes, por lo tanto, ninguna de las 62 muestras presentan resistencia a este glicopéptidos.

Tabla 4. Datos obtenidos sobre la identificación de genes de resistencia a la vancomicina mediante PCR multiplex.

N° Muestra	Genes de resistencia a la vancomicina			
	<i>VanA</i>	<i>VanB</i>	<i>VanC1</i>	<i>VanC2-VanC3</i>
EN 1 hasta EN 62	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia

7.8. Determinación de la presencia del gen precursor de la feromona cCF10 en los *Enterococcus* aislados.

Según los datos obtenidos mediante PCR convencional para la determinación del gen precursor de la feromona cCF10, se registra que un 95% de las muestras contienen el gen de interés y 5% no presentan gen porque no se identificó ningún tipo de banda.

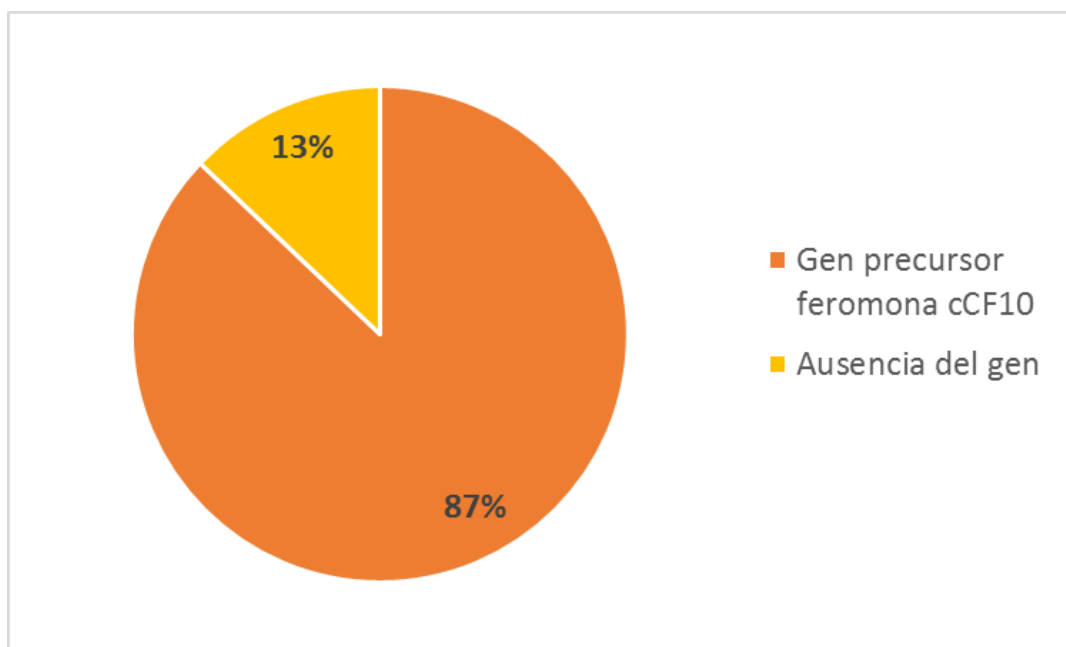


Figura 6. Porcentaje de *Enterococcus* que presentan el gen precursor de la feromona cCF10 identificadas mediante PCR

7.9. Relación del gen precursor de la feromona cCF10 y las especies de *Enterococcus* identificadas

En la siguiente figura se muestra que porcentaje de las especies de *Enterococcus* amplificó exitosamente para el gen precursor de la feromona cCF10 de un total de 59 cepas *E. faecalis*, un 92% amplificaron para el gen de interés, 8% de muestras de *E. faecalis* no se identificó la presencia de bandas en el gel de agarosa. Ninguna de las muestras identificadas como *E. faecium* amplificaron para gen de interés.

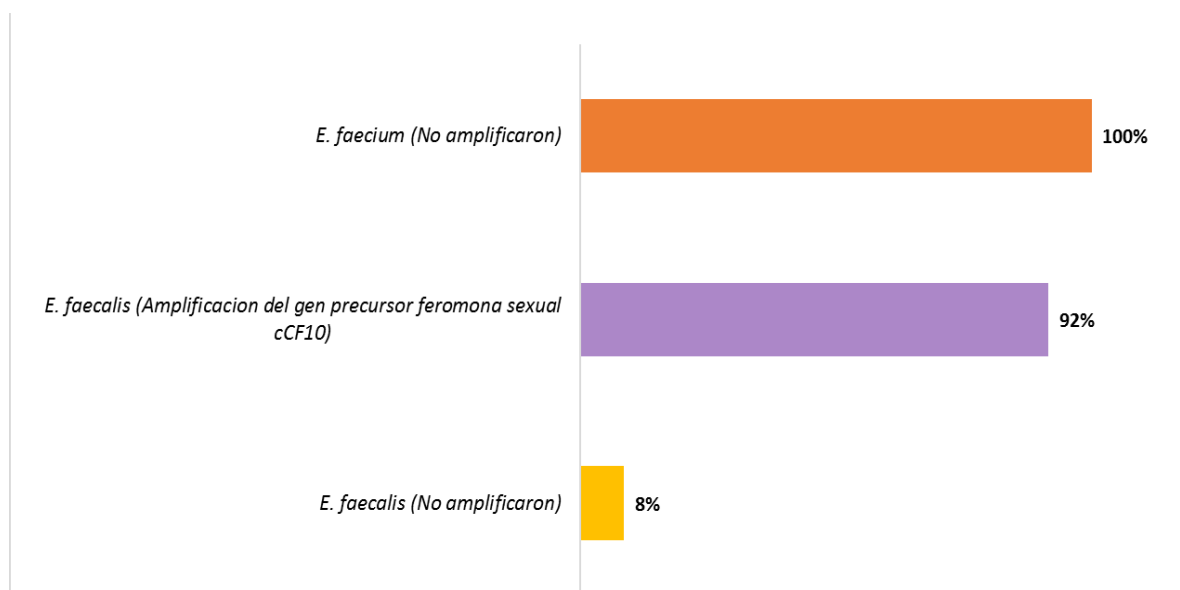


Figura 7. Porcentaje de especies de *Enterococcus* identificadas que amplificaron para el gen precursor de la feromona cCF10

7.10. Estudio de la presencia del gen precursor de la feromona cAM373

Los datos obtenidos mediante PCR convencional para la determinación del gen precursor de la feromona cAM373, se identifica que un 95% de las muestras contienen el gen de interés y 5% no se evidencio la banda de interés.

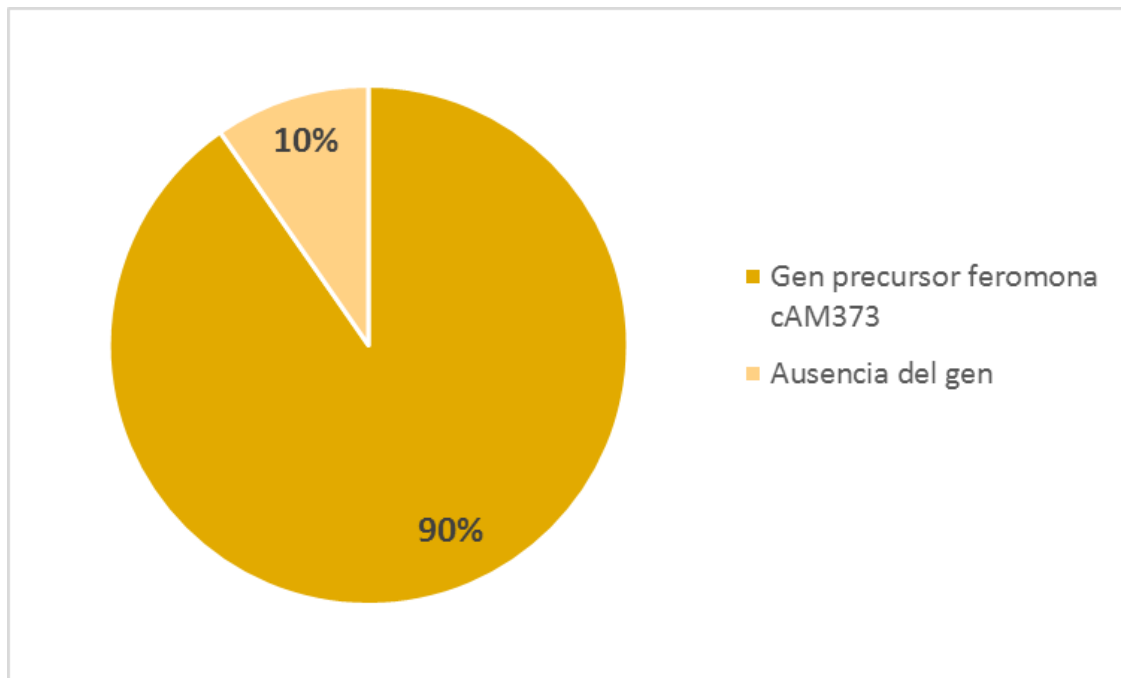


Figura 8. Porcentaje de muestras que presentan el gen precursor de la feromona cAM373 identificadas mediante PCR

7.11. Relación del gen precursor de la feromona cAM373 y las especies de *Enterococcus* identificadas

En la siguiente figura se registra que de un total de 59 muestras identificadas como *E. faecalis* amplificó un 95% para el gen precursor de la feromona cAM373, el 5% de las muestras *E. faecalis* no amplificaron para el gen de interés, el 100% de las especies *E. faecium* no amplificaron para gen precursor de esta feromona.

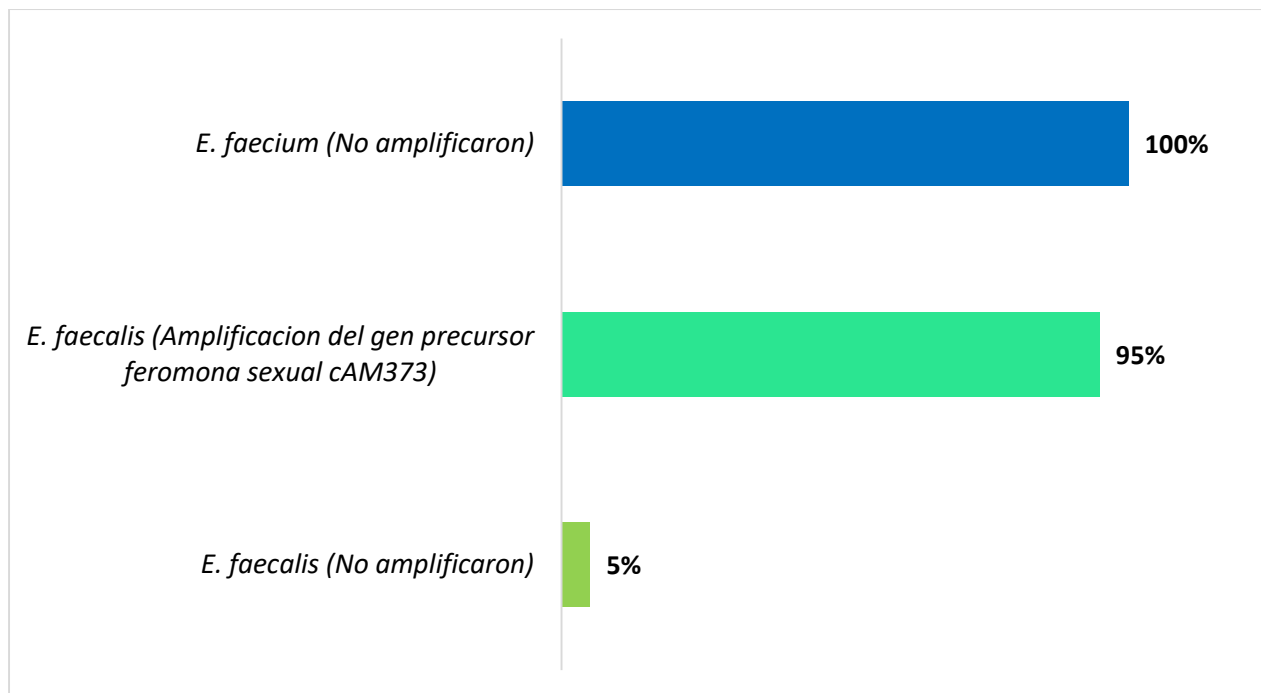


Figura 9. Número de especies de *Enterococcus* identificadas que amplificaron para el gen precursor de la feromona cAM373

8. DISCUSIÓN

8.1. Análisis de las especies de *Enterococcus*

La especie de *Enterococcus* que frecuentemente se aíslan de pacientes con infecciones es *E. faecalis* con un porcentaje alrededor de 60% al 90% seguido de *E. faecium* en un 5% al 16% (Baldisserotto, Carvalho, & Caierão, 2013). Estos datos se correlacionan con este estudio en el que se obtuvo un 95% de *E. faecalis* y un 5% de *E. faecium* aislados en el Hospital de los Valles y Sistemas Médicos de USFQ sector Cumbayá.

La alta prevalencia de *E. faecalis* en las muestras se puede dar por un mayor número de factores de virulencia asociados a infecciones como la presencia de adhesinas, sustancias de agregación, gelatinasas, formación de biopelículas, se considera que la presencia de éstos genes en *E. faecalis* le da la capacidad para adherirse con mayor facilidad a superficies abióticas de los centros de salud. Se ha identificado que esta especie pueden tener más de 4 determinantes de virulencia en comparación con la especie *E. faecium*. (Strateva, Atanasova, & Savov, 2016).

En la investigación realizada también se buscó identificar otras cepas de interés clínico mediante el fenotipo *VanC* que se encuentra en *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* que se caracterizan por presentar una resistencia intrínseca a la vancomicina (Clark, Teixeira, Facklam, & Tenover, 1998). La presencia de gen *VanC-1* se relaciona con *E. gallinarum*, el gen *vanC-2* presente *E. casseliflavus* y el gen *VanC-3* en *E. flavescens*; existen una discrepancia en relación a los genes *VanC-2/C-3*; ya que no se ha podido discriminar entre *E. casseliflavus* y *E. flavescens* de forma exitosa usando PCR y electroforesis de campo pulsado por lo tanto, si ocurre una identificación de gen *VanC-2/C-3* es necesario realizar pruebas adicionales para una correcta identificación del microorganismo (Depardieu, Perichon, & Courvalin, 2004). Como se muestra en la figura 2 ninguno de los *Enterococcus* analizados presentó genes *VanC-1* y *VanC-2/C-3*.

8.2. Comparación de las dos metodologías de usadas para la identificación de especies de muestras obtenidas en el Hospital de los Valles

Al realizar una comparación de las especies identificadas y reportadas en el Hospital de los Valles (figura 3) se observó que de un total de 57 cepas aisladas, las muestras EN025 y EN012 no corresponde a los resultados obtenidos por la PCR multiplex usada en éste estudio. El VITEK 2 es un equipo completamente automatizado que se usa para la identificación de microorganismo, su función se basa en el uso de tarjetas con reactivos colorimétricos que constan de 64 pozos que contienen un sustrato de prueba individual. Con estos sustratos se miden varias actividades metabólicas como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibidoras (Biomériux, 2012).

A pesar de que el sistema VITEK 2 es eficiente en el análisis de especies es posible que ocurran errores en el proceso de identificación que se expresan en intervalos de confianza que no se ajustan a los valores mayores o iguales a 85% que garantiza la identificación correcta del microorganismo. El sistema necesita mejoras adicionales en su precisión de identificación,

interpretación de resultados y base de datos que requieren ser actualizada de forma periódica de especies (Garcia, Cercenado, & Bouza, 2000).

En un estudio realizado sobre la evaluación del sistema VITEK 2 para la identificación y prueba de sensibilidad antimicrobiana de *Enterococcus* realizado en el año 2000, de un total de 150 aislados el 96 % se identificaron correctamente a nivel de especie mediante este método. Datos que se relacionan a los obtenidos mediante este estudio (Garcia, Cercenado, & Bouza, 2000).

Las muestras que presentan incongruencia son EN025 (*E. gallinarum*) que proviene de una secreción quirúrgica cardiaca y EN012 (*E. faecium*) muestra obtenida de una secreción abdominal. Mediante la PCR multiplex, que se usó en éste estudio, las dos muestras amplificaron para la especie *E. faecalis*, por confirmar si los datos obtenidos eran correctos se envió a secuenciar el producto de PCR, en la tabla 3 se indica los resultados obtenidos. En la muestra EN012 se identificó una discrepancia de las secuencias homologas es posible que la concentración del amplicón era alta, lo cual interfirió para la correcta identificación del nucleótido o se cometieron errores al momento de realizar el procedimiento de PCR convencional (Lyons, 2010). Para realizar una correcta identificación de la especie de la muestra EN12 es necesario realizar un secuenciamiento amplificando la región 16S que corresponde ARN ribosomal región muy conservada que es utilizado comúnmente para establecer la filogenia de las bacterias y arqueas (Kolbert & Persing, 1999)

El secuenciamiento del ADN es una técnica bioquímica para determinar el orden de los nucleótidos, es un método que permite conocer con una mayor precisión si los productos de PCR corresponden al gen de interés con la finalidad de analizar, detectar y manipular la información genética. El analizar productos de PCR es fundamental para la adquisición de datos más específicos que pueden ser estudiados directamente y comprobar la especificidad de la amplificación (Bevan, Rapley, & Walker, 2018).

8.3. Relación del origen de la muestra y especies de *Enterococcus* aisladas

Se ha descrito que *E. faecalis* es causante común de endocarditis puede alcanzar valores del 5% al 15% a nivel de la comunidad y a nivel hospitalario hasta un 30% de infecciones de origen nosocomial. Se ha considerado una cepa común de infecciones del tracto urinario que se adquieren dentro de los centros de salud con un porcentaje de 15% al 20% (Murray B. , 2017).

Mediante la información entregada por los centros de salud en relación al origen de las muestras se determinó que hay una mayor recuperación de *Enterococcus* en urocultivos con un porcentaje del 65,5%; en hemocultivos con 6,9% y un menor porcentaje en catéter, herida abdominal, secreción quirúrgica cardiaca y otros zonas, como se puede identificar en la figura 4. Adicionalmente se realizó una correlación entre las especies identificadas y el origen de las muestras como se observa en la figura 5., en cual se evidenció que el microorganismo presente en todos los casos de urocultivos fue *E. faecalis* (Barros, Martinelli, & Rocha, 2009).

En un estudio realizado por Andrade y colaboradores en América Latina mediante el Programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY que es una red de laboratorios asociados a nivel mundial que vigila patrones de resistencia y sensibilidad antimicrobiana, recolectaron 611 muestras provenientes de pacientes comunitarios con infecciones del tracto urinario (ITU); se evidenció que la prevalencia de *Enterococcus* spp es del 5,6% ubicándose como el cuarto uropatógeno más frecuente en la región (Andrade, y otros, 2006). En el año 2001 al 2002 en los centro de salud y hospitales de región de Colombia incluidas las siguientes localidades Bogotá, Cali, Medellín, Bucaramanga y Cartagena se determinó que del total de *Enterococcus* aislados, el 88% era *E. faecalis* provenientes de muestras de orina (Arias, y otros, 2003). La investigación realizada en Colombia demuestra que la información obtenida en este estudio es similar. La alta incidencia de *E. faecalis* en ITUs se debe a una ventaja morfológica exitosa como: las proteínas de superficie (*Esp*) adhesinas que favorece la adherencia a líneas celulares

epiteliales de tracto urinaria, sustancias de agregación (AS) que permiten que se fijen a los tejidos del hospedero (Hussain, Sohail, & Abbas , 2016).

Respecto a los hemocultivo se evidencia que los *Enterococcus* aislados de estudio, corresponden un 66% a *E. faecalis* y el 33% a *E. faecium*. En América Latina, datos del Programa SENTRY de vigilancia de resistencia en el año 2005 ubican a *Enterococcus* en el octavo lugar como causa de bacteriemia y en el cuarto como causa de infección urinaria, pero se espera que en los próximos años los porcentajes de especies identificadas en el torrente sanguíneo y a nivel hospitalario se incrementen (Bazet, Blanco, & Seija, 2004). En Argentina en una investigación realizada en el Hospital de Córdoba desde el año 2000 hasta 2013 se evidenció que *E. faecalis* es el principal responsable de bacteriemias en un 65% de los casos, seguido de *E. faecium* con un 28% y el 7% corresponde a otras especies. La frecuencia de *E. faecium* ha aumentado según datos registrado a nivel mundial probablemente éste incremento ocurre por una diseminación de especies clonales CC17 en este país (Manassero, y otros, 2016).

El aumento de *E. faecium* en bacteriemias se debe a genes de virulencia como: gen *esp* que codifican proteínas de superficie celular para promover la adhesión colonización e invasión del sistema inmune, *gelE* codifica una gelatinasa que degrada el tejido del hospedero y permite la formación de biopelículas, gen *Cyl* para la formación de una hemolisina con propiedades β -hemolíticas en humanos (Ceci, Delpech, Sparo, Mezzina, & Sánchez, 2015).

Se determinó la presencia *E. faecium* en muestras de herida quirúrgica cardíaca y líquido abdominal en el Hospital de los Valles. Según un estudio realizado, las fuentes más comunes para el aislamiento de *E. faecium* en hospitales de Colombia fueron infecciones de herida quirúrgica, abscesos abdominales, en muestras de sangre y en infecciones del endocardio (Arias, y otros, 2003).

8.4. Resistencia a la vancomicina en *Enterococcus* spp.

Alrededor del mundo se ha identificado una mayor incidencia de VRE. En Estados Unidos de acuerdo con información obtenida del National Health-care Safety Network (NHSN), entre

el año 2009 al 2015 se han obtenido un 35,5% de cepas resistentes aisladas de hospitales convirtiéndose en la segunda causa más común de infecciones nosocomiales en este país (Driscoll & Crank, 2015). Se considera que un aumento en la incidencia se debe a la presencia de la cepa (CCF17) de *E. faecium*, la cual es más resistente a la vancomicina y ampicilina, esto se pudo determinar gracias a los registros de aislamientos, en el año de 1980 el porcentaje de *E. faecium* vancomicina resistente era del 0% y en el 2008 este valor cambio drásticamente llegando a un porcentaje mayor al 80% (Top, Willems , & Bonten, 2008).

El escenario es diferente en la región de América Latina en cual la cantidad de VRE es menor. En Brasil el primer VRE fue *E. faecium* que se aisló en 1996 de la sangre de un paciente que presentaba anemia aplásica. En el año 2000 el porcentaje de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina en Brasil fue 9,5%, en el 2002 el 15, 8% se evidencio un aumento en los porcentajes de especies resistentes (Guilherme , Campos, Coutinho, & Moreira, 2005). En Argentina se aisló el primer caso VRE en 1977 fue identificada como *E. faecium* que presentaba el gen *VanA* obtenida de muestra hospitalaria de un hemocultivo en un análisis realizado en enero de 1987 a diciembre de 2000, se han registrado 189 cepas que mediante pruebas moleculares se determinó que la especie predominante era *E. faecium* que presenta genes de resistencia a este glicopéptido (Corso , Gagetti, Rodríguez , & Melano , 2007).

En un estudio realizado en Ecuador, Perú y Venezuela durante el periodo 2006-2008, para investigar la epidemiología de *E. faecium* en relación a la resistencia a la vancomicina, se estudió 32 hospitales con un total de 723 aislamientos de *Enterococcus* spp. se detectó que el 6% de estos presentaban resistencia a vancomicina (Panesso, y otros, 2010). En Colombia la incidencia de VRE en el 2001 al 2002 se registró valores menores al 9,7% mediante concentración mínima inhibitoria usando el método de dilución en agar del antibiótico bajo las normas establecida por CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Arias, y otros, 2003).

La baja incidencia de resistencia a vancomicina en América Latina, podría explicar los resultados del presente estudio, en el cual mediante PCR multiplex se determinó ausencia de genes de resistencia a vancomicina en un universo de 62 cepas recolectadas durante un año. Estos datos también se pueden comparar en otras investigaciones que se realizaron en Ecuador en el cual se recolectaron 148 muestras de *Enterococcus* de 5 hospitales de la región en la cual solo el 7% presentaba resistencia a la vancomicina (Panesso, y otros, 2010). En datos obtenidos del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) se registraron en el año 2015 un porcentaje de VRE para *Enterococcus faecalis* de 0,7% y *Enterococcus faecium* de 12,7 % de cepas recolectadas de centros médicos de todo el país (INSPI, 2015).

Es posible que la ausencia de genes que proporcionan resistencia a la vancomicina en *Enterococcus* obtenida en éste estudio, se deba a que no existe la maquinaria genómica adecuada, la presencia de genes exitosos, plásmidos de resistencia a antibióticos que tengan la capacidad de transferirse de manera eficiente en ambientes como los centros de salud y hospitales. En Estados Unidos las cepas de *E. faecium* CC17 son responsables del aumento de infecciones nosocomiales desde el año 1982 y presenta determinantes de virulencia que se ha adaptado con facilidad a centros de salud, como por ejemplo el gen *acm* que codifica una adhesina de colágeno asociado con la patogénesis de endocarditis, el gen *esp* que codifica una proteína de superficie enterocócica y permite la formación de biopelículas, los genes de codificación de la proteína de superficie que forman las proteínas ancladas a la pared células y subunidades de los pili enterocócicos, el gen *hyl* que codifica una posible glicosil hidrolasa que es transportado por plásmidos que aumentan la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal (Panesso, y otros, 2010).

E. faecium que presentan el grupo clonal CC17 contienen más de cien genes específicos de hospitales como elementos móviles, secuencias de plásmidos, genes reguladores genes de resistencia a antibióticos, una isla de patogenicidad putativa que incluye el gen *esp*, presenta

un elemento genético móvil, Tn 1546 para la resistencia a vancomicina fenotipo *vanA* que puede ser transferido por plásmidos asociado al gen *hyl* que facilita la adaptación para la colonización de intestino y ha contribuido a aumentar la diseminación o infecciones en pacientes (Top, Willems, & Bonten, 2008).

Es probable que la ausencia de la maquinaria genómica y determinantes de virulencia de *E. faecium* CC17 en países de América Latina incluido el Ecuador sea una posible causa de que no exista un aumento generalizado de cepas VRE en los centros de salud. Se ha documentado recientemente cepas *E. faecium* CC17 en Brasil, Chile y Paraguay, pero no se han realizado estudios prospectivos y los datos son limitados con relación a la virulencia (Lopez, y otros, 2009) (Silva, Pereira, & Lima, 2017). Según Panesso y colaboradores en su estudio sobre genotipificación de *E. faecium* CC17 en América Latina se determinó que la estructura genética *E. faecium* se asemeja a la descrita hace 25 años en Estados Unidos lo que sugiere que genes *vanA* en *E. faecium* del genogrupo CC17 puede diseminarse en la región en los próximos años.

8.5. Análisis del gen precursor de la feromona cCF10

Al analizar la figura 6 se determinó que el 87% de las muestras amplificaron para el gen precursor de la feromona cCF10, al realizar una comparación con los datos de la figura 6 se puede analizar que el 87% de los aislados corresponden a la especie *E. faecalis*. La presencia del gen precursor de la feromona sexual cCF10 indica que es posible el proceso de la formación de esta hormona peptídica encargada de la transferencia horizontal de genes mediante el intercambio de plásmidos de alta frecuencia que puede contribuir a la plasticidad del genoma bacteriano (Buttaro, Antiporta, & Dunny, 2000).

Los plásmidos pCF10 sensibles a la feromona cCF10 es la más estudiada y permiten el intercambio de genes de resistencia a la tetraciclina y otros genes que codifican determinantes de virulencia (Hirt, y otros, 2013). El 8% de muestras identificadas como *E. faecalis* no amplificaron para gen precursor de la feromona, en *E. faecium* no hay la presencia de ésta

feromona, lo que se apoya en estudios anteriores (Hirt, y otros, 2013). En un estudio realizado sobre la feromona cCF10 en *E. faecalis*, se asoció que éste péptido está involucrado en la transferencia de plásmidos dentro de esta especie, lo cual podría contribuir en la plasticidad y evolución del genoma (Hirt, y otros, 2013).

8.6. Análisis del gen precursor de la feromona cCAM373

En la figura 8 y 9 se observa que del 90% de las cepas aisladas que amplificaron para el gen precursor de la feromona cAM373 y el 95% corresponde a *E. faecalis* que presentan el gen *cAmE* que permite la codificación de la feromona sexual cAM373 que facilitan la transferencia conjugativa de plásmidos que permite la diseminación de genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia (Flannagan & Clewell, 2002). El plásmido pAM373 es sensible a esta feromona el cual puede transferir resistencia a la vancomicina y se ha relacionado con la posibilidad de contribuir a la adquisición estafilocócica de esta resistencia (Showsh, Boever, & Clewell, 2001).

En el caso de las especies *E. faecium* se evidenció que ninguna amplificó al gen de interés debido a que la feromona cAM373 se ha asociado a especies como *Enterococcus faecalis* pero también se puede producir en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus gordonii* (Ozawa, Boever, & Clewell, 2005). El 5 % de *E. faecalis* no amplificaron para el gen que permite la codificación de la feromona cAM373, es posible que se cometieron errores en el proceso, la cantidad de ADN agregada en las muestras era muy diluida, algún tipo de contaminación; ya que la presencia del gen se asocia a esta especie bacteriana (Potapov & Ong, 2017).

9. CONCLUSIONES

Esta investigación determinó el porcentaje de especies de *Enterococcus* aislados del Hospital de los Valles y SIME Cumbayá, durante el periodo de un año, la especie que en mayor porcentaje se aisló fue *E. faecalis* con un 95% a diferencia de *E. faecium* que se aisló en un

5%. Según el origen de la muestra la mayor cantidad de *Enterococcus* aislados, se recuperó de infecciones de tracto urinario.

La ausencia de genes de resistencia a la vancomicina se pudo determinar mediante PCR multiplex y se correlaciona con la información presentada sobre la prevalencia VRE en América Latina. Es posible que la poca frecuencia VRE se deba a que no existe la maquinaria genómica como se evidencia en otras cepas de *Enterococcus* en los Estados Unidos.

El sistema VITEK 2 es un sistema eficiente de identificación de especies de importancia médica que se basa en intervalos de confianza, para evitar posibles fallos en la identificación se deben realizar continuas actualizaciones del software o pruebas adicionales para no cometer errores en los registros que puede ocasionar un tratamiento erróneo para los pacientes.

La presencia de las feromonas se identificó en un 80% a 90 % de las muestras recolectadas por el periodo de un año en el Hospital de los Valles y SIME evidenciando que existe un gen precursor para formación de las feromonas sexuales, para que pueda darse el proceso de intercambio de plásmidos conjugativos que pueden presentar información como: genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia.

10.RECOMENDACIONES

- Para futuras investigaciones se recomienda realizar un análisis en *Enterococcus* para determinar la presencia de plásmidos pCF10, pAM373 y su relación con las feromonas sexuales descritas en este proyecto
- Realizar un estudio de genes de resistencia a la vancomicina en un universo más grande que incluya hospitales públicos y privados del Ecuador, para que de esta manera se vea el panorama real de lo que está ocurriendo a nivel nacional respecto a la resistencia a la vancomicina en *Enterococcus* spp.

- Determinar la susceptibilidad a la tetraciclina a través de antibiogramas de las 62 muestras colectadas debido a que la feromona cCF10 presenta la capacidad de conjugación con el plásmido pCF10 el cual se ha demostrado que lleva el gen de resistencia a la tetraciclina.
- La presencia de los genes precursores de las feromona cCF10 y cAM373 no pueden afirmar la producción del péptido por lo tanto, es necesario realizar análisis de ARN mensajero o pruebas de cromatografía, para determinar producción de los péptidos.
- Se recomienda volver a realizar una PCR de las muestras de *Enterococcus faecalis* que no amplificación para los genes precursores de las feromonas sexuales para descartar posibles errores en el proceso o una baja cantidad o calidad de ADN.
- En relación a la muestra EN 12 es necesario realizar un análisis de 16S para poder determinar con mayor certeza la especie de *Enterococcus*

11. BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, S., Sader, H., Jones, R., Pereira, A., Pignatari, A., & Gales, A. (2006). *Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines?* Rio de Janeiro: Mem. Inst. Oswaldo Cruz.
- Arias, C., & Murray, C. (2017). *Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci*. Uptodate.
- Arias, C., Reyes, J., Zúñiga, M., Cortés, L., Cruz, C., & Rico, L. (2003). *Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001–2002* (Vol. 51). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Obtenido de <https://academic.oup.com/jac/article/51/1/59/770996>
- Baldisserotto, C., Carvalho, M., & Caierão, J. (2013). *Presence of virulence factors in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium susceptible and resistant to vancomycin*. doi:10.1590/0074-0276108052013009]
- Barros, M., Martinelli, R., & Rocha, H. (2009). *Enterococcal urinary tract infections in a university hospital: clinical studies*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.
- Bazet, C., Blanco, J., & Seija, V. (2004). *Un problema emergente en Uruguay*. *Revista Médica del Uruguay*.
- Bevan, I., Rapley, R., & Walker, M. (2018). *Sequencing of PCR amplified*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Biomérieux. (2012). *Vitek2 Compact*. Obtenido de <http://www.biomerieux.com.ar/microbiologia-industrial/biofarma/vitekr-2-compact>
- Brooks, G., Carroll, G., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2012). *Microbiología médica, 26e*. Estados Unidos : LANGE .
- Buttaro, L., Antiporta, M., & Dunny, G. (2000). *Producción de péptidos de feromonas asociadas a células (cCF10) e inhibición de feromonas en Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology*.
- Ceci, M., Delpech, G., Sparo, M., Mezzina, V., & Sánchez, S. (2015). *Clinical and microbiological features of bacteremia caused by Enterococcus faecalis*. *The Journal of infection in developing countries*. doi:10.3855/jidc.6587
- Cercenado, E. (2011). *Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España*. *Elsevier*, 59-65.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., & Mayhall, C. (2000). *Vancomycin-resistant enterococci*. *Vancomycin-resistant enterococci*.

- Chenoweth , C., & Schaberg, D. (1990). *The epidemiology of enterococci*. Send to.
- Clark, N., Teixeira, L., Facklam, R., & Tenover, F. (1998). *Detection and Differentiation of vanC-1, vanC-2, and vanC-3 Glycopeptide Resistance Genes in Enterococci*. Journal of microbiology. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC105034/>
- Clewell, D., An, F., White, B., & Gawron-Burke, C. (1985). *La feromona sexual de Streptococcus faecalis (cAM373) también es producida por Staphylococcus aureus y la identificación de un transposón conjugativo (Tn918)*. Estados Unidos : PUBMED.
- Coll, P., Coque, T., Domínguez , A., & Vázquez, J. (2005). *Metodos moleculares de tipificación epidemiología en bacteriología*. Sociedad Española de Enfermedades.
- Corso , A., Gagetti, M., Rodríguez , M., & Melano , R. (2007). *Molecular epidemiology of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in Argentina*. Elsevier. doi:10.1016/j.ijid.2006.02.003
- Depardieu, F., Perichon, B., & Courvalin, P. (2004). *Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR*. Journal of Clinical microbiology. doi:10.1128/JCM.42.12.5857-5860
- Driscoll, T., & Crank, C. (2015). *Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management*. Infection and Drug Resistance. doi:10.2147/IDR.S54125
- Dunny, G. (2013). *Enterococcal sex pheromones: signaling, social behavior, and evolution*. Review of Genetics. doi:10.1146/annurev-genet-111212-133449
- Dunny, G., & Berntsson , R. (2016). *Enterococcal Sex Pheromones: Evolutionary Pathways to Complex, Two-Signal Systems*. Journal of bacteriology. doi:10.1128/JB.00128-16
- Dutkan, S., Evers, S., & Courvalin, P. (1995). *Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR*. Journal of clinical microbiology.
- Elipoulos, G. (2001). *Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations*. Clinical Infectious Diseases. IDSA.
- Faron, M., Ledebor, N., & Buchan, B. (2016). *Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting*. American Society for Microbiology. doi:10.1128/JCM.00211-16
- Flannagan , S., & Clewell, D. (2002). *Identification and characterization of genes encoding sex pheromone cAM373 activity in Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus*. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02922.x

- Gales, A., & Vignoli, R. (2018). *Mecanismo de resistencia a los antibióticos*. Interpretación del antibiograma. Evimed. Obtenido de file:///C:/Users/1/Downloads/ATB-01-VignoliGales-Manual-Resistencia-ES-PUB%20(2).pdf
- García, F., & Barrantes, E. (2009). *Prevalencia e identificación genotípica de Enterococcus Vancomicina resistentes en pacientes en un medio hospitalario*. Journal of Bacteriology. .
- García, F., Cercenado, E., & Bouza, E. (2000). *Evaluation of a New System, VITEK 2, for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Enterococci*. Journal of Clinical Microbiology.
- Guilherme, H., Campos, F., Coutinho, A., & Moreira, M. (2005). *Incidence of vancomycin-resistant Enterococcus at a university hospital in Brazil*. São Paulo: Rev. Saúde Pública .
- Hirt, H., Greenwood-Quaintance, K., Karau, M., Till, L., Kashyap, P., Patel, R., & Dunny, G. (2013). *Enterococcus faecalis Sex Pheromone cCF10 Mejora la Transferencia de Plásmidos Conjugativos In Vivo*. Estados Unidos: PUBMED .
- Hussain, A., Sohail, M., & Abbas, Z. (2016). *Prevalence of Enterococcus faecalis mediated UTI and its current antimicrobial susceptibility pattern in Lahore, Pakistan*. J Pak Med Assoc. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27686295>
- Huycke, J., & Gilmore, M. (1995). *Virulence of enterococci*. Washington: American Society for Microbiology Journals. Obtenido de <https://cmr.asm.org/content/7/4/462/article-info>
- INSPI. (2015). *Datos de Vigilancia de resistencia a antibioticos Ecuador*. Obtenido de <https://sites.google.com/site/whonetecuador/home/datos-vigilancia>
- Kayaoglu, G., & Orstavik, D. (2004). *Virulence Factors of Enterococcus faecalis: Relationship to Endodontic Disease*. Sage Publications .
- Kolbert, C., & Persing, J. (1999). *Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens*. Current Opinion in Microbiology.
- Labarca, J. (2015). *Heteroresistance in Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus (VRSA), susceptible or resistant?* Revista chilena de infectología. doi:ISSN 0716-1018
- Lopez, M., Hormazabal, A., Maldonado, G., Saavedra, F., Baquero, J., & Silva, C. (2009). *lonal dissemination of Enterococcus faecalis ST201 and Enterococcus faecium CC17-ST64 containing Tn5382-vanB2 among 16 hospitals in Chile*. Clin. Microbiol. Infect.
- Lyons, R. (2010). *Direct Sequencing of PCR Products*. University of Michigan .

- Manassero, N., Navarro, M., Rocchi, M., Gasparotto, A., Ocaña, V., & Novillo, F. (2016). *Análisis de 117 episodios de bacteriemia por enterococo: estudio de la epidemiología, microbiología y sensibilidad a los antimicrobianos*. Elsevier . doi:10.1016/j.ram.2016.05.002
- Murray, B. (2017). *Microbiology of enterococci*. Uptodate.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2013). *Microbiología médica* . Barcelona : Elsevier.
- Ozawa, Y., Boever, E., & Clewell, D. (2005). *Enterococcus faecalis sex pheromone plasmid pAM373:: Analyses of TraA and evidence for its interaction with RpoB*. doi:10.1016/j.plasmid.2004.12.003
- Panesso, D., Reyes, J., Rincón, S., Díaz, L., Galloway, J., Zurita, J., & Carrillo, C. (2010). *Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium: a Prospective, Multicenter Study in South American Hospitals*. Journal of Clinical Microbiology. doi:10.1128/JCM.02526-09
- Potapov, V., & Ong , J. (2017). *Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing*. PLoS ONE .
- Procop, G., Church, D., Hall, G., Janda, W., & Koneman, E. (2017). *Koneman Diagnostico Microbiológico*. Wolters Kluwer.
- Reiko, K., Ritsuko , M., Joseph , W., & Hiromi , K. (2000). *Simple and Reliable Multiplex PCR Assay for Surveillance Isolates of Vancomycin-Resistant Enterococci*. Journal of Clinical Microbiology. .
- Rojas, F. (2014). *Determinantes de virulencia en Enterococcus asociados a patologías humanas: diferencia fenotípicas y moleculares*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Silva, G., Pereira, F., & Lima, L. (2017). *Clonal dissemination of vancomycin-resistant Enterococcus faecium ST412 in a Brazilian region*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. doi:10.1016/j.bjid.2017.07.001
- Showsh, S., Boever, E., & Clewell, D. (2001). *Vancomycin Resistance Plasmid in Enterococcus faecalis That Encodes Sensitivity to a Sex Pheromone Also Produced by Staphylococcus aureus*. American Society for Microbiology Journals. doi:10.1128/AAC.45.7.2177-2178.2001
- Strateva, T., Atanasova, D., & Savov, E. (2016). *Incidence of virulence determinants in clinical Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolatein Bulgaria*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases.
- Top, J., Willems , R., & Bonten, M. (2008). *Emergence of CC17 Enterococcus faecium : from commensal to*. Department of Medical Microbiology. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00383.

Upadhyaya, G., & Ravikumar, K. (2009). *Review of virulence factors of enterococcus : An emerging nosocomial pathogen*. Indian J Med Microbiol.

Wardal, E., & Sadowy, E. (s.f.). *Complex Nature of Enterococcal Pheromone-Responsive Plasmids*. Polish Journal of Microbiology.

12.ANEXOS

Anexo A: Documentos del comité de bioética USFQ para la colección de muestra del SIME (Cumbayá)

216-186T



Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
Universidad San Francisco de Quito

El Comité de Revisión Institucional de la USFQ
The Institutional Review Board of the USFQ

Aprobación MSP, Oficio No. MSP-VGV5-2016-0244-O, 26 de Abril de 2016

Quito, 31 de agosto de 2017

Señoritas

Arleth Estefanía Gualle Brito
Ana Cristina Chávez Peña

Investigadoras Principales
UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
Ciudad

De mi mejor consideración:

Por medio de la presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito se complace en informarle que su solicitud de revisión y aprobación del estudio de investigación "Determinación mediante de pruebas moleculares de genes de feromonas sexuales: CAD1, CCF10, CAM373 y genes Van A y Van C en *Enterococcus spp.* de muestras obtenidas de centros de salud.", ha sido aprobada el día de hoy como un estudio *exento*, debido a que la investigación va a tomar datos personales pero el investigador asegura que serán codificados para el análisis y presentación de los resultados y una vez concluido el estudio cualquier dato que pudiese identificar al participante será borrado.

El CEISH - USFQ aprueba el estudio ya que cumple con los siguientes parámetros:

- El proyecto de investigación muestra metas y/o objetivos de significancia científica con una justificación y referencias.
- El protocolo cuenta con provisiones para proteger la privacidad y confidencialidad de los participantes del estudio en sus procesos de recolección, manejo y almacenamiento de datos
- El protocolo detalla las responsabilidades del investigador

Además el investigador principal de este estudio ha dado contestación a todas las dudas y realizado todas las modificaciones que este Comité ha solicitado en varias revisiones. Los documentos que se aprueban y que sustentan este estudio es la versión # 1 de julio 26, 2017 que incluyen:

- Solicitud de revisión y aprobación de estudio de investigación, 7 páginas;
- Solicitud de NO aplicación al consentimiento informado por escrito, 1 páginas;
- Hoja de Vida de la Investigadora principal, 1 página;
- Hoja de Vida de la Investigadora principal, 2 páginas;

216-186T

Esta aprobación tiene una duración de **un año (365 días)** transcurrido el cual se deberá solicitar una extensión si fuere necesario. En toda correspondencia con el Comité de Bioética favor referirse al siguiente código de aprobación: **216-186T**. El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder cualquier inquietud que pudiese surgir tanto de los participantes como de los investigadores.

Favor tomar nota de los siguientes puntos relacionados con las responsabilidades del investigador para este Comité:

1. El Comité no se responsabiliza por los efectos de eventos adversos que pudieran ser consecuencia de su estudio, los cuales son de entera responsabilidad del investigador principal. Sin embargo, es requisito informar a este Comité sobre cualquier novedad, especialmente eventos adversos, dentro de las siguientes 24 horas, explicando las medidas se tomaron para enfrentar y/o manejar el mencionado evento adverso.
2. El Comité no se responsabiliza por los datos que hayan sido recolectados antes de la fecha de esta carta; los datos recolectados antes de la fecha de esta carta no podrán ser publicados o incluidos en los resultados.
3. El Comité ha otorgado la presente aprobación en base a la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados.
4. De igual forma, los solicitantes de la aprobación son los responsables por la ejecución correcta y ética de la investigación, respetando los documentos y condiciones aprobadas por el Comité, así como la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.

Deseándole los mejores éxitos en su investigación, se solicita a los investigadores que notifiquen al Comité la fecha de terminación del estudio.

Atentamente,



William F. Waters, PhD

Presidente Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos USFQ
cc. Archivo general, Archivo protocolo

Anexo B: Documento del comité de bioética USFQ para la colección de muestra del Hospital de los Valles



2016-026IN

**Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
Universidad San Francisco de Quito**

**El Comité de Revisión Institucional de la USFQ
The Institutional Review Board of the USFQ**

Aprobación MSP, Oficio No. MSP-SDM-10-2013-1019-O, Mayo 9, 2013

Quito, 15 de febrero de 2017

Ana Cristina Aguilar Jaramillo
Investigadora Principal
UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
Ciudad

De mi mejor consideración:

Por medio de la presente, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Universidad San Francisco de Quito se complace en informarle que su solicitud de *renovación* del estudio de investigación "VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN HOSPITALES TERCARIOS. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA. ESTUDIOS DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE INTERÉS PARA LA SALUD PÚBLICA.", ha sido aprobada el día de hoy.

Antecedentes: El estudio fue aprobado por este Comité el 25 de Febrero de 2016.

La investigadora principal notifica al CEISH-USFQ lo siguiente al estudio en mención:

1. Informe de Avance: Estamos en espera de la aprobación del estudio por parte de la Dirección de Inteligencia de Salud del Ministerio de Salud Pública, para continuar con el estudio, por lo que necesitamos la renovación del estudio.

Los documentos que se aprueban y que sustentan este estudio es:

- Solicitud de renovación para protocolo aprobados, 2 páginas;

En toda correspondencia con el Comité de Bioética favor referirse al siguiente código de aprobación: **2016-026IN**. El Comité estará dispuesto a lo largo de la implementación del estudio a responder cualquier inquietud que pudiere surgir tanto de los participantes como de los investigadores.

Favor tomar nota de los siguientes puntos relacionados con las responsabilidades del investigador para este Comité:

1. El Comité no se responsabiliza por los datos que hayan sido recolectados antes de la fecha de esta carta; los datos recolectados antes de la fecha de esta carta no podrán ser publicados o incluidos en los resultados.
2. El Comité ha otorgado la presente aprobación en base a la información entregada por los solicitantes, quienes al presentarla asumen la veracidad, corrección y autoría de los documentos entregados.

2016-026IN

- De igual forma, los solicitantes de la aprobación son los responsables por la ejecución correcta y ética de la investigación, respetando los documentos y condiciones aprobadas por el Comité, así como la legislación vigente aplicable y los estándares nacionales e internacionales en la materia.

Deseándole los mejores éxitos en su investigación, se solicita a los investigadores que notifiquen al Comité la fecha de terminación del estudio.

Atentamente,



William F. Waters, PhD

Presidente Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos USFQ

cc. Archivo general, Archivo protocolo

Anexo C: Amplificación de genes de identificación de especies *E. faecium* y *E. faecalis*

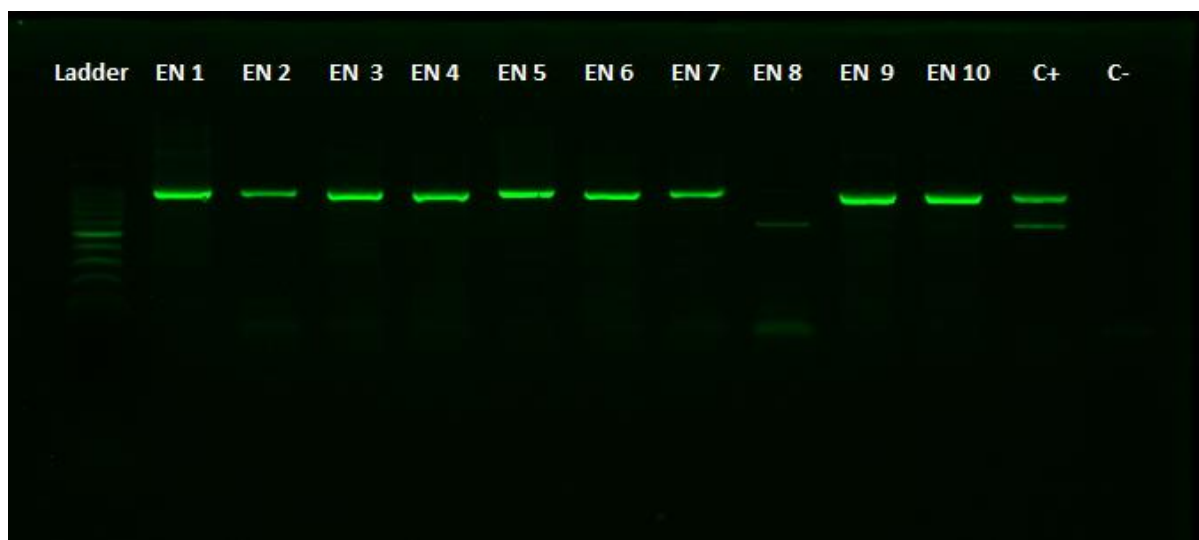


Imagen 1. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen de identificación *E. faecium* y *E. faecalis* muestras EN 1 hasta EN 10

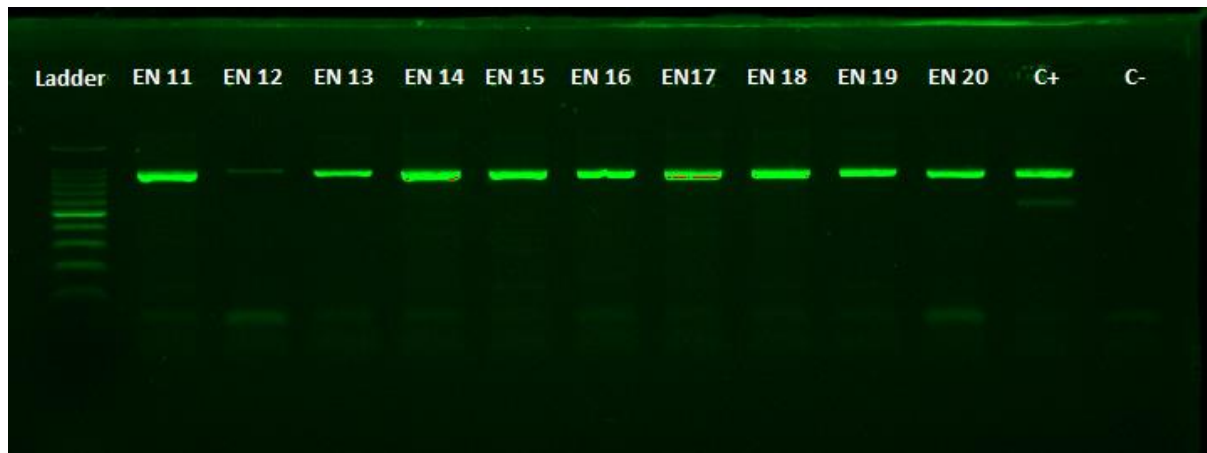


Imagen 2. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen de identificación *E. faecium* y *E. faecalis* muestras EN 11 hasta EN 20

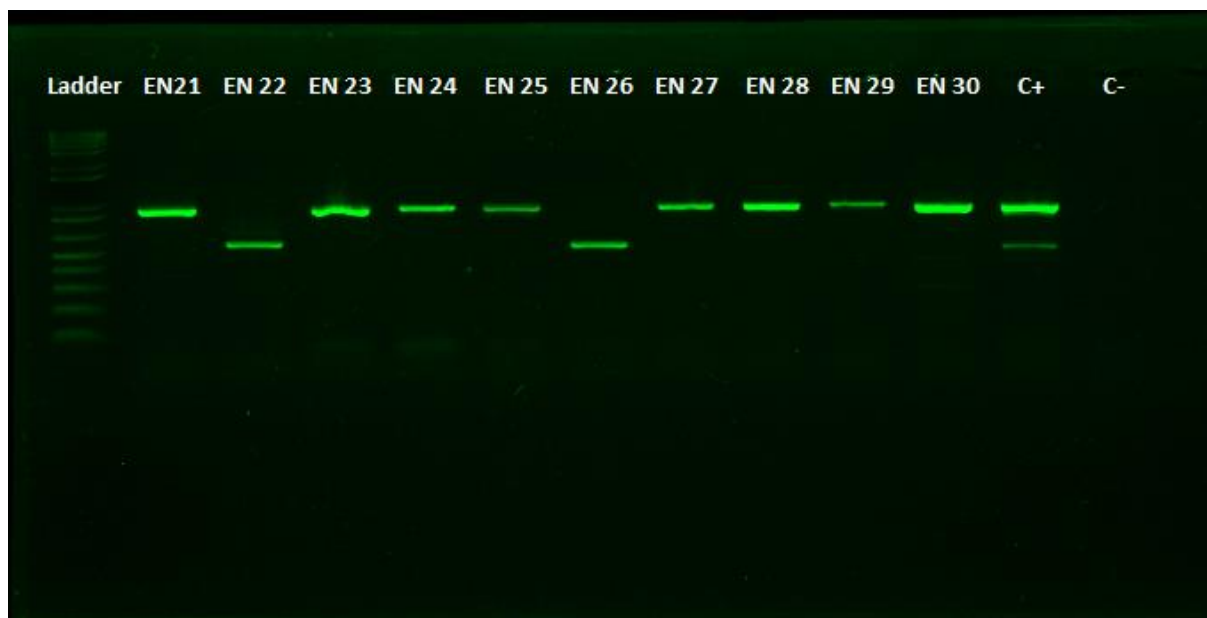


Imagen 3. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen de identificación *E. faecium* y *E. faecalis* muestras EN 21 hasta EN 30

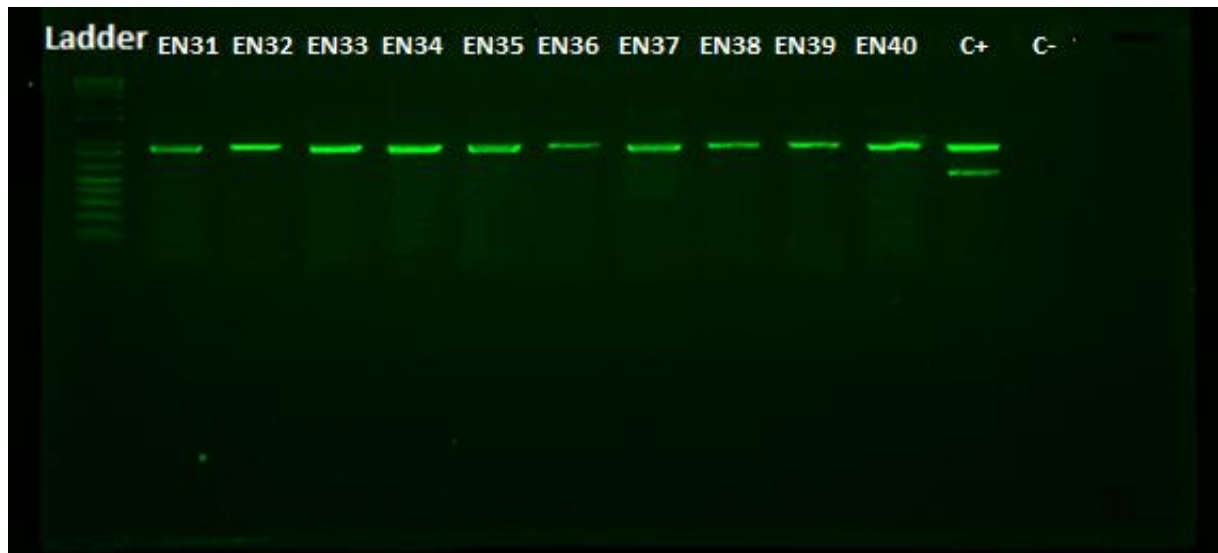


Imagen 4. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen de identificación *E. faecium* y *E. faecalis* muestras EN 31 hasta EN 40



Imagen 5. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen de identificación *E. faecium* y *E. faecalis* muestras EN 41 hasta EN 62

Anexo D: **Amplificación genes de resistencia a la vancomicina**

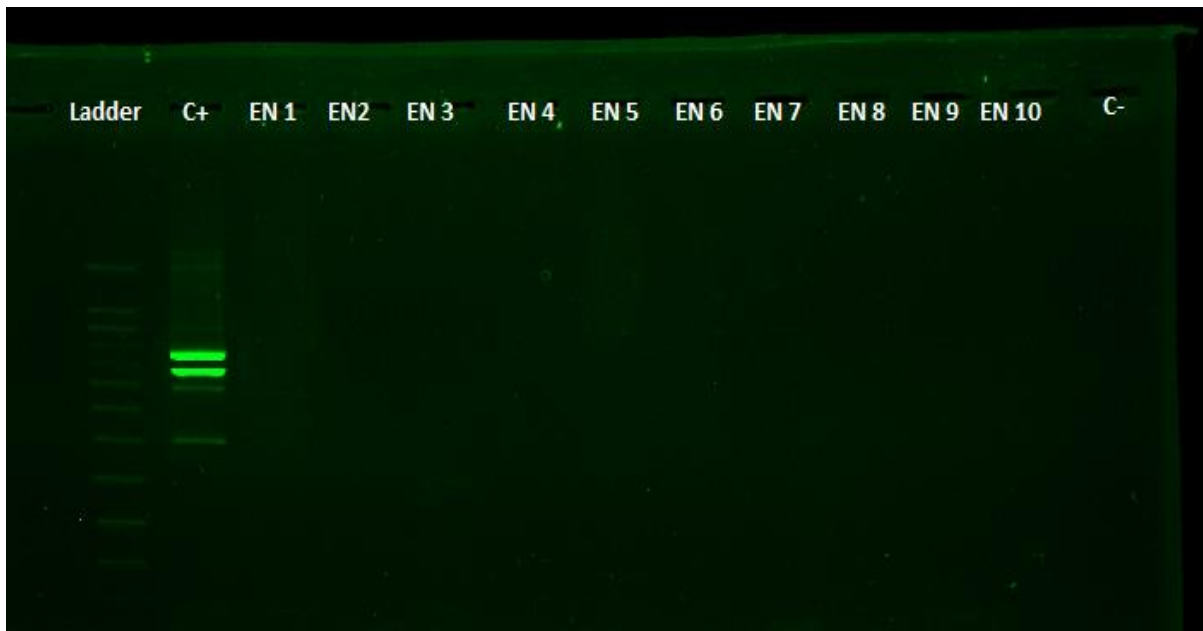


Imagen 6. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación de genes de resistencia a la vancomicina muestras EN 1 hasta EN 10

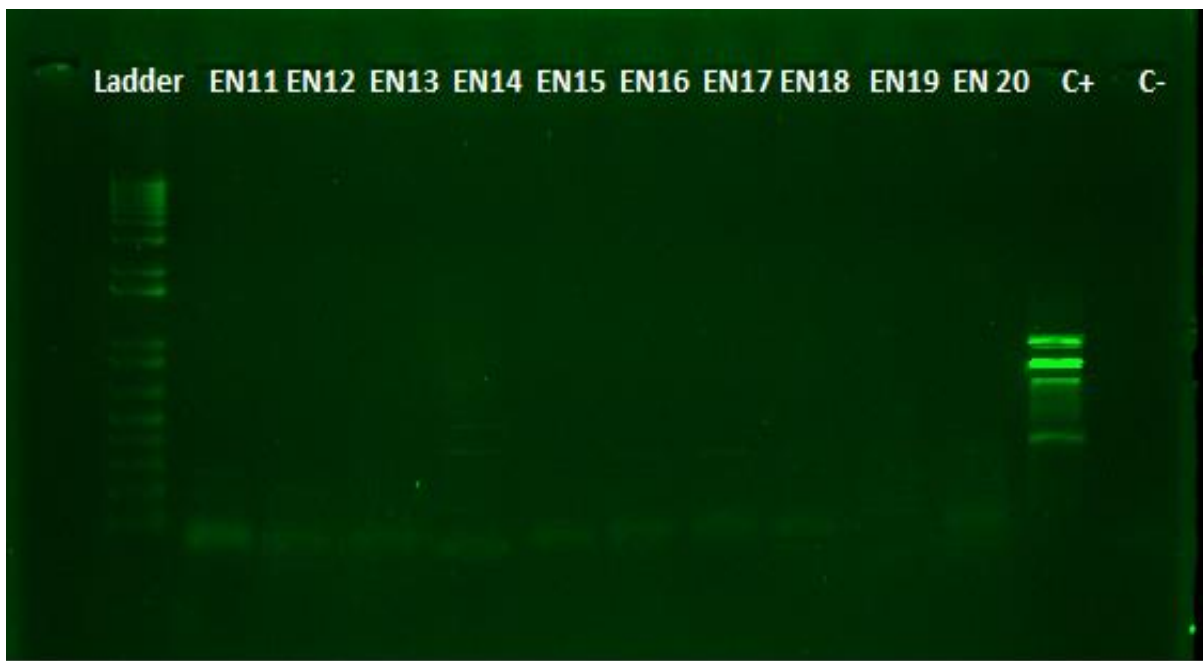


Imagen 7. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación de genes de resistencia a la vancomicina muestras EN 11 hasta EN 20



Imagen 8. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación de genes de resistencia a la vancomicina muestras EN 21 hasta EN 30

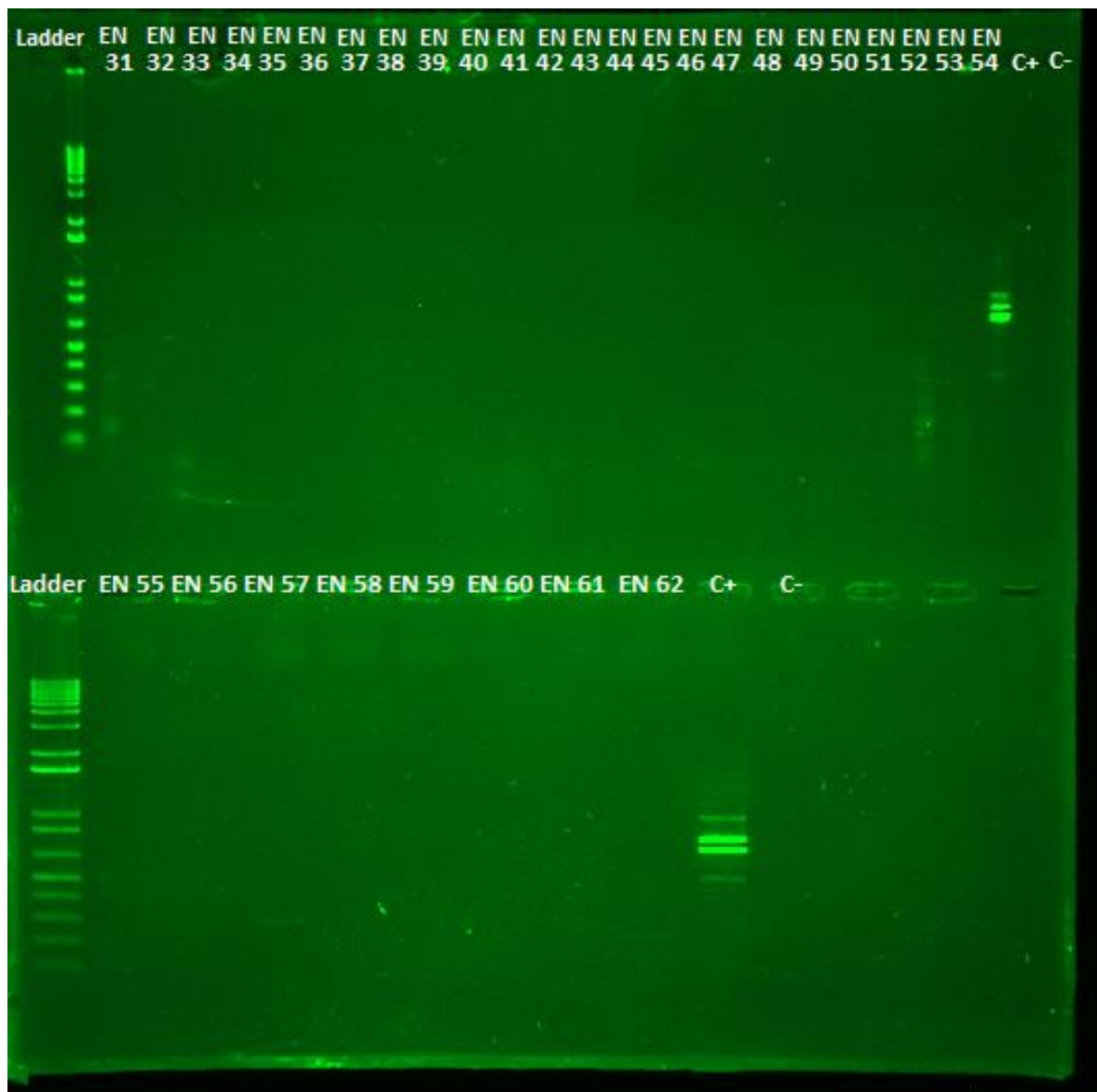


Imagen 9. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación de genes de resistencia a la vancomicina muestras EN 31 hasta EN 62

Anexo E: Amplificación gen precursor de la feromona cCF10

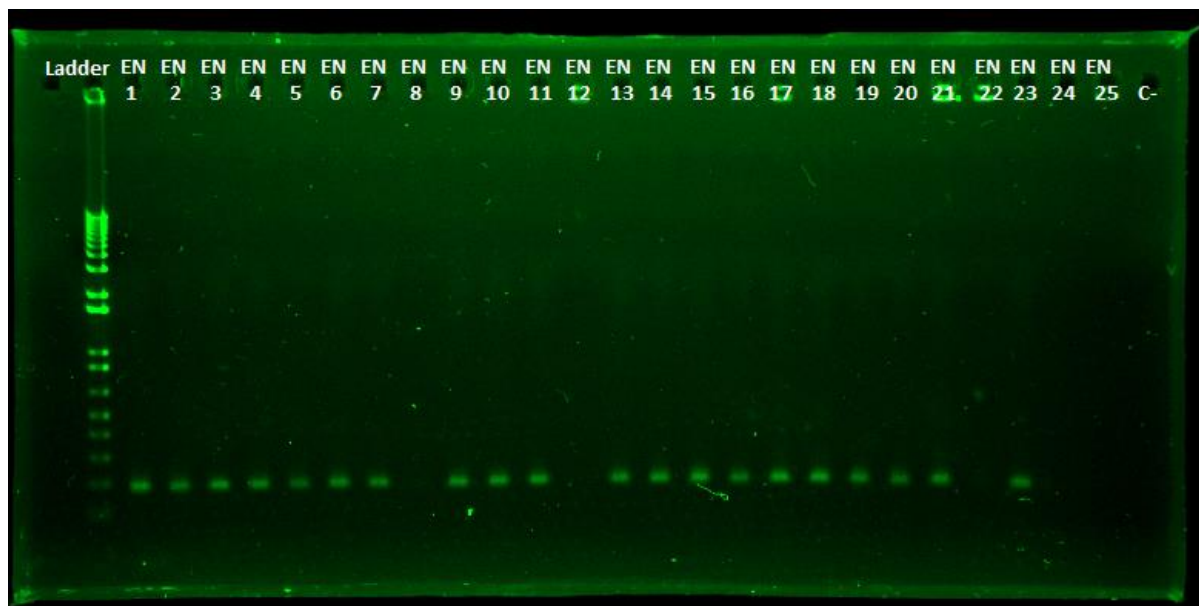


Imagen 10. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen precursor de la feromona sexual cCF10 muestra EN 1 a EN 25.



Imagen 11. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen precursor de la feromona sexual cCF10 muestra EN 26 hasta EN 62.

Anexo F: Amplificación gen precursor de la feromona cAM373

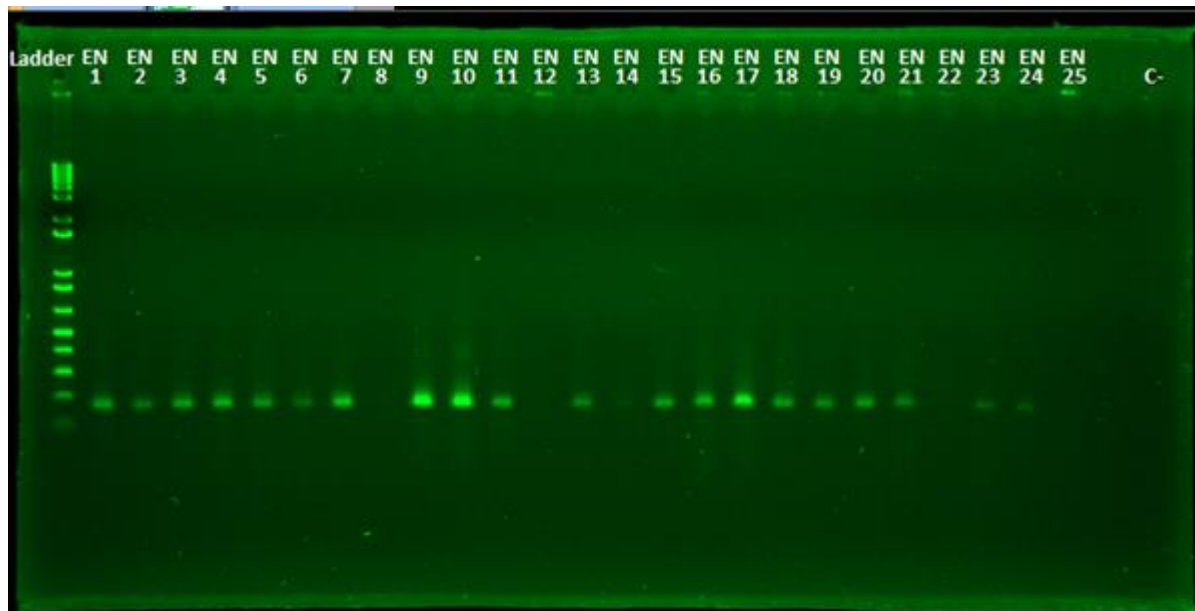


Imagen 12. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen precursor de la feromona sexual cAM373 muestra EN 1 a EN 25.

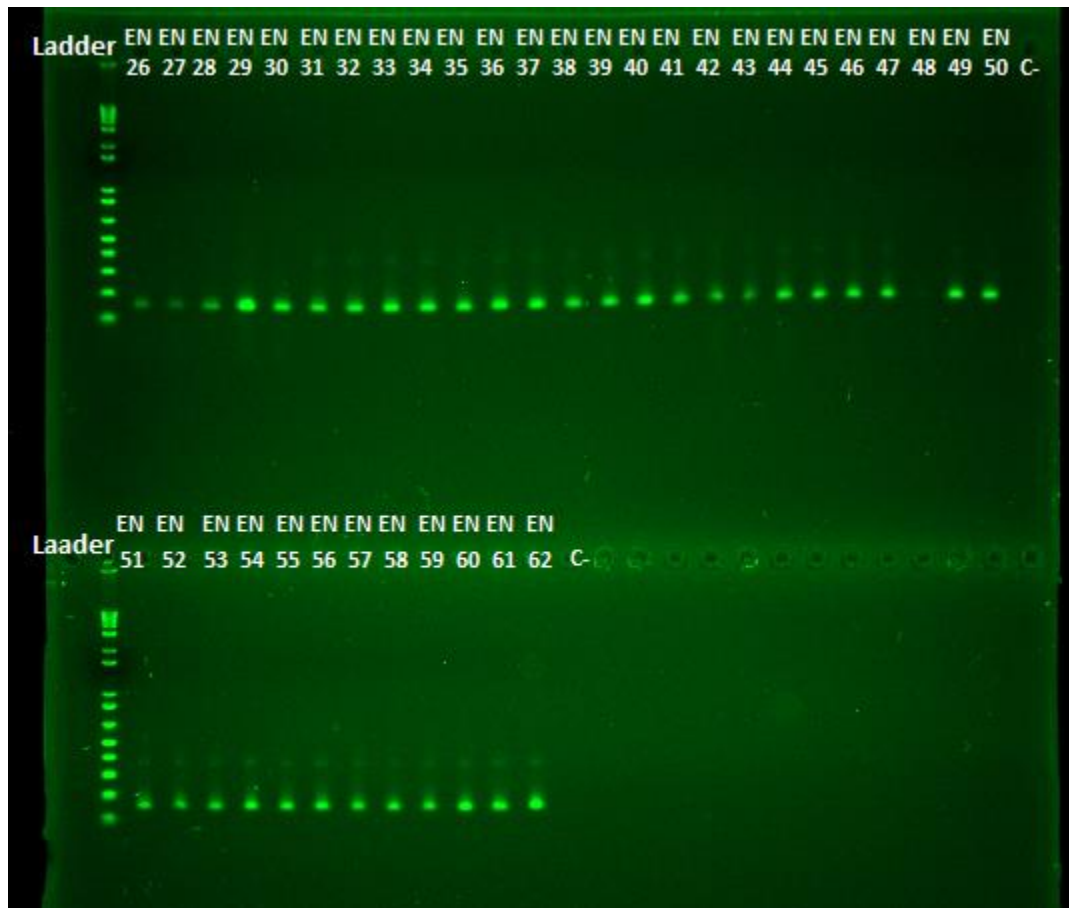


Imagen 13. Gel de agarosa al 1,5% de la amplificación del gen precursor de la feromona sexual cAM373 muestra EN 27 a EN 62.

