



Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile

Carlos Padilla E., María Núñez A., Andrés Padilla G. y Olga Lobos G.

Virulence genes and bacteriocins in *Enterococcus faecalis* strains isolated from different clinical samples in Maule Region, Chile

The presence of virulence genes (VG) and bacteriocins from different clinical samples was studied in *Enterococcus faecalis* isolated from urinary tract infections (UTI), bacteremia and endodontitis and was correlated with haemolysin and gelatinase activity. We evaluated the presence of VG by PCR in 150 strains of *E. faecalis* including *cylA*, *aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE*, *esp*, *as-48*, *bac31*, *entL50A/B*, *entA*, *entP*, *entB*, *enlA* and *ent1071*. Haemolysin and gelatinase activity was studied. *gelE* and *cylA* genes expressed hemolysin and gelatinase, respectively. This activity was observed in some strains of bacteremia, UTI and endodontitis. The highest number of VG was detected in bacteremic strains, being *aggA* and *entA* genes the most frequent. *efaA*, *esp*, *entA*, *entL50A/B* were associated with their clinical origin ($p < 0.05$). The most common genetic profile was *aggA-eep-enlA-entL50A/B*. *E. faecalis* from UTI, bacteremia and endodontitis presented different gene combinations. Some of the genes studied were related to their clinical origin. The results obtained in this study are similar to those reported in other countries.

Key words: *Enterococcus faecalis*, virulence genes; bacteriocins

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*, genes de virulencia, bacteriocinas.

Universidad de Talca, Talca, Chile.

Departamento de Microbiología (CPE, MNA, OLG).

Universidad Católica del Maule, Talca, Chile.

Escuela de Medicina (APG).

Financiamiento: Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad de Talca a través del Proyecto VAC 600500.

Recibido: 6 de abril de 2011

Aceptado: 11 de noviembre de 2011

Correspondencia a:

Carlos Padilla Espinoza
cpadilla@utalca.cl

Introducción

Las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* son comensales ubicuas con predominancia en el hábitat gastrointestinal de humanos, animales y aves, colonizando ocasionalmente otras zonas anatómicas de los seres humanos¹. En general, los enterococos pueden vivir en condiciones adversas en cuanto a nutrientes y elementos fisicoquímicos². No causan enfermedades en el hábitat intestinal; sin embargo, en algunas ocasiones la relación de comensalismo establecida con el hospedero se rompe y provocan enfermedades³. Estos microorganismos son la tercera causa más común de bacteriemia, los microorganismos más frecuentemente reportados en infecciones quirúrgicas adquiridas en unidades de cuidados intensivos y la segunda causa de infecciones nosocomiales en E.U.A.⁴. En los últimos años los enterococos han sido intensamente estudiados en relación a su reconocida capacidad de resistencia intrínseca a diferentes antimicrobianos, particularmente adquirida mediante transferencia genética horizontal⁵⁻⁷. De todos los aislados con significancia clínica, 80 a 90% corresponde a *E. faecalis* y el resto a *E. faecium*; no obstante, la frecuencia de aislamiento de esta última especie ha aumentado estos últimos años respecto de la primera⁸.

Enterococcus faecalis exhibe una marcada plasticidad genética que le permite habitar diversos nichos mediante la expresión o supresión de diferentes genes⁹. Este microorganismo sintetiza un heterogéneo grupo de péptidos antibacterianos o bacteriocinas, también denominados *enterocinas*, que presentan un singular interés como agentes bio-preservantes de alimentos¹⁰. Por otra parte, la presencia de enterocinas podría otorgar a estas bacterias una herramienta ecológica adicional para persistir en ambientes colonizados por microorganismos competidores por nutrientes, con el propósito de eliminarlos, tal como potencialmente podría ocurrir en un ambiente hospitalario. También se piensa que estos productos antibacterianos podrían constituirse en el elemento inicial de virulencia en el organismo humano al ejercer una acción letal sobre microorganismos que compiten por receptores similares a los que requiere *E. faecalis*¹¹. Los genes de bacteriocinas analizados en este trabajo representan a los más frecuentemente descritos en esta especie bacteriana, los cuales expresan proteínas dirigidas a controlar microorganismos filogenéticamente relacionados¹⁰.

Enterococcus faecalis presenta diferentes elementos de virulencia que, en su conjunto, expresan la capacidad patogénica de esta bacteria. Entre los más recurrentes factores citados en infecciones humanas se encuentran la



proteína de superficie extracelular (Esp), la cual promueve la adhesión, colonización y evasión del sistema inmune, también participa en la generación de biopelícula y aparentemente cumple un rol en la resistencia antimicrobiana; citolisina (Cyl), también denominada hemolisina, que posee propiedades β -hemolíticas en humanos y es bactericida contra bacterias grampositivas; gelatinasa (Gel) que provee de nutrientes a la bacteria degradando el tejido del hospedero y además presenta algún tipo de función en la formación de biopelícula; hialuronidasa que actúa despolimerizando la molécula de mucopolisacárido del tejido conectivo lo que facilita la diseminación de la bacteria; determinantes de feromonas (Eep) son capaces de modular de modo importante la respuesta inflamatoria *in vivo*; antígeno A (EfaA) que se asocia a la adherencia de la bacteria tanto a células bióticas y superficies abióticas, además de participar en ciertas etapas de la formación de biopelícula; proteína de superficie celular (Ace) que exhibe una fuerte similitud con la proteína del mismo nombre producida por *Staphylococcus aureus*, la cual posee la capacidad de unirse al colágeno y presentaría un rol en la patogénesis de la endocarditis¹²; sustancia de agregación (Agg) que actúa mediando la unión específica de la bacteria al epitelio intestinal, células del epitelio renal, neutrófilos humanos y macrófagos además de aumentar la internalización y vida intracelular del microorganismo¹³. La presencia de un pilus de *E. faecalis* es importante en la producción de la biopelícula, la cual se sustenta en la proteína Bps. La aparición de la biopelícula genera una fuerte relación entre endocarditis y producción de infección del tracto urinario (ITU)^{14,15}. La investigación sobre factores de virulencia de *E. faecalis* que colaboren en el entendimiento de su biología patogénica ha permitido detectar variados factores que participan en la virulencia de esta bacteria.

En este trabajo fueron seleccionados los genes que codifican para un grupo de factores de virulencia que han sido ampliamente estudiados y refrendados científicamente como factores de virulencia en diversas partes del mundo y que permitirán establecer comparaciones con las cepas estudiadas en nuestro país^{1,16-19}.

Enterococcus faecalis es frecuentemente aislado de ITUs, cuadros septicémicos, infecciones de heridas y múltiples otros sitios anatómicos, destacándose últimamente la frecuencia de aislamientos desde infecciones endodónticas¹³. En este estudio fueron seleccionadas cepas aisladas desde ITU y bacteriemia, considerando que son dos infecciones en las cuales *E. faecalis* es un reconocido protagonista. Por otra parte, la endodontitis, producida por cepas de esta especie bacteriana, es una afección que se ha descrito con bastante frecuencia en años recientes, permitiendo argüir que estas cepas podrían tener un comportamiento virulento diferente respecto de los dos primeros orígenes de aislamiento.

En diferentes países se ha estudiado la presencia de factores de virulencia de *E. faecalis* con el propósito de conocer su biología y entender su capacidad de infección en diversos tejidos del hospedero^{4,9}. En nuestro país no existe información al respecto, por lo que es de interés conocer el rol patogénico de estas bacterias en sus mecanismos de virulencia. En concordancia con ello, el objetivo de este estudio fue: determinar la presencia de los genes que codifican la expresión de diversos factores de virulencia y bacteriocinas en cepas de *E. faecalis* aisladas desde pacientes con ITU, endodontitis y bacteriemia además de correlacionarlo con la producción de hemolisina y gelatinasa.

Materiales y Métodos

Aislamiento e identificación de *E. faecalis*. Las cepas de *E. faecalis* fueron aisladas desde muestras clínicas tomadas a pacientes de ambos géneros y edades en los hospitales de Talca y Linares, Región del Maule, durante fines del año 2008 y el 2009. Los pacientes fueron informados acerca de los objetivos del estudio al momento de la toma de muestras y firmaron el correspondiente consentimiento informado. Fueron utilizadas 50 cepas de *E. faecalis* aisladas desde casos de ITU, 50 desde casos de bacteriemia y 50 de endodontitis. En los casos de bacteriemia no se dispuso de información que permitiera asociar estas cepas con endocarditis. En cada uno de los grupos estudiados las cepas fueron seleccionadas al azar. La identificación de los 150 aislados se realizó mediante pruebas convencionales²⁰.

Ensayo para actividad hemolítica. Los microorganismos en estudio fueron sembrados en placas de agar Columbia (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) suplementado con sangre de cordero desfibrinada al 5%. Después de incubación a 37°C durante 24 h las placas que presentaban zonas de hemólisis alrededor de las colonias fueron consideradas positivas¹⁷.

Ensayo de actividad para gelatinasa. La producción de gelatinasa fue detectada por inoculación de los microorganismos estudiados sobre agar Brain Heart Infusion (BHI) (Merck, Darmstadt, Alemania) que contenía 10 g/l de peptona y 30 g/l de gelatina. Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche y después mantenidas a 4°C durante 2 h. La presencia de un halo transparente alrededor de las colonias fue considerada un indicador positivo de producción de gelatinasa¹⁷.

Extracción de ADN a partir de cepas de *E. faecalis*. Las cepas de *E. faecalis* fueron cultivadas durante toda la noche a 37°C en agar BHI (Merck). Para la identificación



de los genes de virulencia y bacteriocinas, mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC), el ADN genómico fue extraído directamente de las colonias bacterianas mediante el uso del kit de aislamiento AquaPure Genomic DNA® (BioRad). La concentración del ADN genómico fue determinada espectrofotométricamente.

Amplificación de los genes y condiciones para la RPC. El ADN total de las cepas de *E. faecalis* fue utilizado en las RPCs para detectar la presencia de los genes de virulencia de citolisina (*cylA*), sustancia de agregación (*aggA*), antígeno A (*efaA*), estimulador de la expresión de feromonas (*eep*), gelatinasa (*gelE*) y proteína de superficie (*esp*). Adicionalmente, se amplificaron los genes para enterocinas AS-48 (*as-48*), bacteriocina 31 (*bac31*), enterocinas A, B y P (*entA*, *entB*, *entP*), enterocina L50 A/B (*entL50A/B*), enterolisina A (*enlA*) y enterocina 1071 (*ent1071*). Cada reacción de RPC contenía 10 mM Tris-HCl tampón pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 μM de cada deoxinucleótido (Omega BioTek), 1 μM de partidor (Tabla 1), 2U de *Taq* ADN polimerasa y 1 μl de templado de ADN. Las condiciones de reacción para cada gen fueron las descritas a continuación:

Para la amplificación de los genes de virulencia *cylA*, *aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE* y *esp*, las muestras con el ADN templado fueron desnaturalizadas a 94 °C por 5 m. Posteriormente, se continuó con 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 m a 57 °C y 1 m a 72 °C para el gen *cylA*; 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 m a 52 °C y 1 m a 72 °C para los genes *aggA* y *efaA*; 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 m a 58 °C y 1 m a 72 °C para el gen *eep*; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C y 30 s a 72 °C para el gen *gelE*; 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 m a 62 °C y 1 m a 72 °C para el gen *esp*. La amplificación de todos los genes de virulencia se concluyó con una extensión final de 72 °C por 3 m.

En una etapa inicial de la amplificación de los genes de bacteriocinas *as-48*, *bac31*, *entL50A/B*, *entA*, *entP*, *entB*, *ent1071* y *enlA*, las muestras con el ADN templado fueron desnaturalizadas a 95 °C por 5 m. Posteriormente, se continuó con 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 42 °C y 30 s a 72 °C y extensión final de 72 °C por 10 m para la amplificación del gen *as48*; 30 ciclos de 1 m a 94 °C, 1 m a 54 °C, 1 m a 72 °C y una extensión final de 72 °C por 8 m, para los genes *bac31* y *entL50A/B*; 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C, 30 s a 72 °C y una extensión final de 72 °C por 5 m para la amplificación del gen *entA*; 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 56 °C, 30 s a 72 °C y una extensión final de 72 °C por 5 m, para la amplificación de los genes *entP* y *entB*; 30 ciclos de 1 m a 94 °C, 1 m a 51 °C, 1 m a 72 °C y una extensión final de 72 °C por 8 m, para la amplificación del gen *ent1071* y 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 1 m a 59 °C y 1 m a 72 °C para el gen *enlA*.

Las reacciones fueron realizadas en un termociclador

DNA Engine® (BioRad). Los controles negativos (sin templado de ADN) fueron incluidos en cada set de reacciones y todas fueron realizadas en duplicado. Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. El tamaño de cada producto amplificado fue confirmado mediante comparación con el marcador de tamaño molecular 1Kb-Plus DNA ladder (New England Biolabs).

Análisis estadístico. La correlación entre los distintos orígenes de las cepas, ya fuese ITU, endodontitis o bacteriemia, y la portación de un factor virulento determinado, fue calculada utilizando el test de χ^2 o test Exacto de

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en la amplificación mediante RPC para genes de bacteriocinas y factores de virulencia

	Secuencia oligonucleótidos	Tamaño producto (pb)	Referencias
Genes de virulencia			
<i>cylA</i>	5'-TGGATGATAGTGATAGGAAGT-3'	517	21
	5'-TCTACAGTAAATCTTTCGTC-3'		
<i>aggA</i>	5'-AAGAAAAAGTAGACCAAC-3'	1553	21
	5'-AACGGCAAGACAAGTAAATA-3'		
<i>efaA</i>	5'-GACAGACCCTCAGGAATA-3'	705	21
	5'-AGTTCATCATGCTGCTGTAGTA-3'		
<i>eep</i>	5'-GAGCGGGTATTTAGTTCGT-3'	937	22
	5'-TACTCCAGCATTGGATGCT-3'		
<i>esp</i>	5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3'	933	23
	5'-GCGTCAACACTTGATTGCCGAA-3'		
<i>gelE</i>	5'-AGTTCATGCTATTTTCTTAC-3'	402	24
	5'-CTTCATTATTACACGTTTG-3'		
Genes de bacteriocinas			
<i>as-48</i>	5'-GAGGAGTTCATGTTAAAGA-3'	340	25
	5'-CATATTGTTAAATTACCAAGCAA-3'		
<i>bac31</i>	5'-TATTACGGAAATGTTTATATTGT-3'	202	25
	5'-TCTAGGAGCCCAAGGGCC-3'		
<i>entA</i>	5'-AAATATTATGGAGTGTAT-3'	130	25
	5'-GCACTTCCCTGGAATTGCTC-3'		
<i>entB</i>	5'-GAAAATGATCACAGAATGCCTA-3'	160	25
	5'-GTTGCATTTAGAGTATACATTG-3'		
<i>entP</i>	5'-TATGGTAATGGTGTATTGTAAT-3'	120	25
	5'-ATGTCCCATACCTGCCAAAC-3'		
<i>entL50 A/B</i>	5'-TGGGAGAATCGCAAATAG-3'	96	25
	5'-ATTGCCATCCTTCTCCAAT-3'		
<i>ent1071</i>	5'-ATATTTAGGGGACCGATAA-3'	405	26
	5'-TATACATTCTCCACTTATTTT-3'		
<i>enlA</i>	5'-TTCTTCTTATTCTGTCAACGCAGC-3'	960	22
	5'-GACTGTGAAATACCTATTGCAAGC-3'		

**Tabla 2. Genes de bacteriocinas y de virulencia detectados mediante RPC en cepas de *E. faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas**

Muestras clínicas	Genes de bacteriocinas			Genes de virulencia	
	Total	n	%	n	%
ITU*	50	42	84,0	42	84,0
Bacteriemia	50	46	92,0	45	90,0
Endodontitis	50	35	70,0	41	82,0
Total	150	123	82,0	128	85,0

*ITU: infección del tracto urinario.

Tabla 3. Frecuencia de genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *E. faecalis* aislados desde diferentes muestras clínicas

	<i>E. faecalis</i> aislados desde:					
	ITU* (n: 50)		Endodontitis (n: 50)		Bacteriemias (n: 50)	
	n	%	n	%	n	%
Genes de virulencia						
<i>aggA</i>	39	78	39	78	43	86
<i>cylA</i>	20	40	16	32	26	52
<i>efaA</i>	31	62	0	0	14	28
<i>eep</i>	36	72	32	64	41	82
<i>esp</i>	21	42	0	0	26	52
<i>gelE</i>	14	28	8	16	34	68
Genes de bacteriocinas						
<i>entB</i>	22	44	3	6	4	8
<i>entL50A/B</i>	34	68	11	22	31	62
<i>bac31</i>	0	0	0	0	4	8
<i>entP</i>	0	0	0	0	0	0
<i>as-48</i>	12	24	0	0	2	4
<i>entA</i>	39	78	24	48	32	64
<i>ent1071</i>	5	10	0	0	0	0
<i>enIA</i>	15	30	11	22	21	42

ITU*: infección del tracto urinario.

Fisher (programa estadístico SPSS 15.0, IBM Statistics), según correspondiera. Un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo para indicar la asociación entre ambas variables.

Resultados

Producción de hemolisina y gelatinasa. La actividad hemolítica y de gelatinasa fue evaluada en todas las cepas estudiadas. El mayor número de cepas hemolíticas se obtuvo de aquellas provenientes de bacteriemia ($n = 26$, 52%), seguidas de las cepas de ITU ($n = 20$, 40%), mientras que las cepas de origen endodóntico presentaron el menor porcentaje de hemólisis ($n = 16$, 32%). La actividad de gelatinasa se manifestó en los tres grupos de estudio, presentándose en un mayor porcentaje en las cepas de bacteriemia ($n = 34$, 68%), seguido de las cepas de ITU ($n = 14$, 28%) y posteriormente de las cepas de endodontitis ($n = 8$, 16%).

Genes de virulencia y de bacteriocinas detectadas en *E. faecalis*. El análisis de la amplificación mediante RPC mostró que las cepas aisladas desde bacteriemias presentan el mayor número de genes virulencia y de bacteriocinas, detectándose en 90 y 92%, respectivamente, en comparación a los otros dos grupos estudiados (Tabla 2).

Frecuencia de los genes de virulencia y de bacteriocinas. El más frecuente de los genes de virulencia en los tres grupos de *E. faecalis* estudiados fue *aggA* (Tabla 3). Los genes de virulencia *efaA* y *esp* no fueron detectados en cepas de *E. faecalis* aisladas de endodontitis (Tabla 3). El gen *entA* para bacteriocina fue el más frecuentemente detectado en los tres grupos de cepas y a la inversa el gen *bac31* fue el menos común. El gen *entP* no fue observado en alguna cepa (Tabla 3).

Asociación de genes de factores de virulencia y bacteriocina presentes en las cepas de *E. faecalis*. En 92 cepas de *E. faecalis* se determinó la presencia de tres

Tabla 4. Principales perfiles de genes de virulencia y de bacteriocinas en cepas de *E. faecalis*

Perfiles genéticos		<i>E. faecalis</i> aisladas desde:							
		ITU* (n: 50)		Bacteriemias (n: 50)		Endodontitis (n: 50)		Total (n: 150)	
Virulencia	Bacteriocinas	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>aggA, efaA, eep, gelE, cylA</i>	<i>enIA, entA</i>	6	12,0	7	14,0	0	0	13	8,7
<i>aggA, efaA, eep, esp, cylA</i>	<i>entA, entL50A/B</i>	3	6,0	5	10,0	0	0	8	5,3
<i>aggA, efaA, eep, gelE, cylA</i>	<i>entA</i>	5	10,0	7	14,0	0	0	12	8,0
<i>aggA, eep</i>	<i>enIA, entL50A/B</i>	11	22,0	10	20,0	11	22	32	21,3
<i>aggA, cylA, eep</i>	<i>entA</i>	9	18,0	10	20,0	8	16	27	18,0



genes de virulencia mientras que 58 cepas presentaron uno o dos de estos genes (datos no mostrados). El perfil más frecuente de genes de virulencia y bacteriocinas detectado fue *aggA*, *eep*, con *enlA* y *entL50A/B*. El perfil menos frecuente fue *aggA*, *efaA*, *eep*, *esp*, *cylA* con *entA* y *entL50A/B* (Tabla 4). Todas las cepas analizadas de *E. faecalis* poseen al menos un tipo de factor de virulencia, pero no todas tienen información genética para las bacteriocinas analizadas.

Correlación entre origen clínico de las cepas de *E. faecalis* y presencia de factores de virulencia. La correlación entre origen de las cepas y presencia de factores de virulencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para algunas de las cepas estudiadas. Así, algunos genes de virulencia como *efaA* y *esp* se encuentran relacionados con su origen clínico cuando provienen de ITUs, endodontitis o bacteriemias. Además, la misma correlación se presentó para los genes de bacteriocina *entL50A/B* y *entA*. El resto de los genes se presenta independiente de su origen clínico.

Discusión

Diversos estudios epidemiológicos han reforzado la importancia de *E. faecalis* como agente etiológico de graves infecciones. El conocimiento de cómo ciertos factores virulentos se involucran en la patogénesis de las infecciones producidas por esta bacteria es aún limitado. De aquí se desprende la importancia de conocer la biología de estos microorganismos que cotidianamente aparecen en los aislados clínicos.

En el presente estudio se evaluó fenotípicamente la actividad de hemolisina y gelatinasa. En este aspecto, es interesante destacar la concordancia entre los ensayos biomoleculares para la detección de los genes *cylA* (hemolisina) y *gelE* (gelatinasa) con los resultados fenotípicos. En ambos casos el mismo número de cepas y porcentaje fue determinado, por lo cual no hubo discrepancias entre la presencia del gen y la expresión de su actividad. Lo anterior difiere de los resultados obtenidos en otros estudios en los cuales se ha detectado el gen *gelE* y sin embargo, la actividad gelatinasa no se manifiesta. En esta situación se ha argumentado la presencia de un gen *gelE* silente, lo cual no se correlaciona con nuestros resultados¹⁷.

En la literatura científica se describe que en cepas de *E. faecalis* aisladas desde cuadros clínicos los siguientes genes son los que poseen la mayor frecuencia de detección: 50-90% de genes *aggA*, 5-100% de genes *esp* y 11-70% de genes *cylA*^{1,16}. Estos datos concuerdan con lo detectado en nuestro estudio en los tres grupos de *E. faecalis*. Por otra parte, los resultados obtenidos demuestran que las cepas de *E. faecalis* aisladas desde bacteriemias presentan la

mayor frecuencia de genes de virulencia en comparación a las cepas de los otros dos grupos, con la excepción del gen *efaA*. En otro estudio se evidenció que el gen *efaA* estaba presente en la mayoría de las cepas de *E. faecalis* aisladas desde seres humanos sanos¹⁷. Llama la atención que este factor es un antígeno putativo de endocarditis y además se ha demostrado un potencial rol biológico en modelos murinos de peritonitis¹. Durante los últimos años, *E. faecalis* ha sido frecuentemente aislado desde infecciones endodónticas¹⁸. El hermético hábitat de la raíz dental se hace inaccesible al sistema inmune, también a los antibacterianos por lo cual aparentemente el poder virulento de esta especie bacteriana se hace innecesario. En el presente estudio, es interesante destacar que las cepas aisladas desde casos de endodontitis no presentan el factor de virulencia *esp*, el que sí fue detectado en otro estudio¹⁹. Este factor de virulencia promueve la adhesión, colonización y evasión del sistema inmune y además juega un rol en la resistencia antimicrobiana²⁷. Al respecto, se podría argumentar que las cepas aisladas en nuestro país, carentes del factor de adherencia superficial *esp*, utilizarían otros mecanismos virulentos que eventualmente suplirían las funciones de *esp*. Sin embargo, los fundamentos de la persistente infección del canal de la raíz dental no están claros. Las cepas aisladas desde endodontitis tampoco presentan el gen *efaA* lo que permitiría suponer que estas bacterias dependen de otros mecanismos de adherencia para ejercer la colonización en este hábitat.

Los enterococos pertenecen al grupo de bacterias del ácido láctico (BAL) los cuales juegan un rol importante en la fermentación de alimentos lácteos, pero además producen bacteriocinas que ejercen un rol protector similar a un bio-preservante en estos alimentos²⁷. Las bacteriocinas se pueden asimilar a propiedades virulentas considerando que estos productos antibacterianos pueden eliminar bacterias competidoras por nutrientes. Este efecto supone que las bacteriocinas despejarían el epitelio del hospedero dejando accesible sus receptores a las especies bacteriocinogénicas durante el proceso adherente. De este modo, se hace necesario analizar esta capacidad en cepas de *E. faecalis* productoras de infecciones en humanos, de modo de tener una visión más completa respecto de su capacidad biológica. En este trabajo se evidenció que *E. faecalis* aislados desde ITU son capaces de expresar con mayor frecuencia los genes bacteriocinogénicos *entA* y *entL50 A/B*. No se observó amplificación para los genes *bac31* y *entP*. La menor capacidad bacteriocinogénica se evidenció en el grupo de enterococos aislados desde casos de endodontitis. Esto podría, al igual que con algunos factores de virulencia, deberse a que en ese hábitat es improbable la presencia de otras especies bacterianas, por lo cual estas cepas de *E. faecalis* no necesitan de este recurso antagónico. En este estudio, la mayor presencia



de genes de bacteriocina se detectó en cepas aisladas de bacteriemia que provienen de pacientes hospitalizados, pudiendo argüirse que estas cepas podrían ser de origen nosocomial. Al respecto, se ha determinado que este tipo de bacterias sintetizan bacteriocinas que les permitirían competir con otras cepas y prevalecer en el ambiente intrahospitalario, al igual como sucede con cepas que producen infecciones gastrointestinales²⁸.

De acuerdo a estos resultados, se puede evidenciar que los genes putativos de virulencia y bacteriocinas en *E. faecalis* varían de acuerdo a su procedencia y que además, la presencia de algunos de ellos, se encuentra asociada a su origen clínico, de acuerdo a datos estadísticos. Es así que los genes *efaA* y *esp* que se asocian a diversas actividades virulentas, pero tienen en común la generación de biopelícula. Estos genes fueron detectados solamente en cepas aisladas de ITU y bacteriemia. Al respecto, existen otros genes asociados a la síntesis de biopelícula que no fueron estudiados, como el gen *ebp*^{14,15}. Por otra parte, estadísticamente se comprobó que los genes de enterocina *entL50A/B* y *entA*, presentes en algunas cepas, se encuentran asociados a sus orígenes clínicos.

Los resultados de esta investigación demuestran que las cepas de *E. faecalis* aisladas desde infecciones del tracto urinario, bacteriemias y endodontitis, presentan diferentes genes de virulencia y diversas asociaciones con genes de bacteriocinas. Esto permite demostrar una fracción de la variabilidad biológica de estos microorganismos, lo que sugiere un constante monitoreo de esta especie bacteriana que presenta una gran capacidad para infectar diferentes

tejidos en el ser humano. Además, se puede concluir que las cepas de *E. faecalis* aisladas en Chile presentan similitud en la frecuencia de genes de virulencia y de bacteriocinas a las aisladas en otras latitudes, lo cual permite inferir similares capacidades patogénicas.

Resumen

Desde diferentes muestras clínicas se determinó la presencia de genes codificantes de factores de virulencia (FV) y bacteriocinas en *Enterococcus faecalis* aislados desde infecciones del tracto urinario (ITU), bacteriemias y endodontitis, correlacionándose con la actividad hemolisina y gelatinasa. En 150 cepas de *E. faecalis* fue evaluada mediante RPC la presencia de *cylA*, *aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE*, *esp*, *as-48*, *bac31*, *entL50A/B*, *entA*, *entP*, *entB*, *enlA*, y *ent1071* determinándose actividad hemolisina y gelatinasa. Los genes *cylA* y *gelE* expresaron hemolisina y gelatinasa, respectivamente. Esta actividad fue observada en algunas de las cepas causantes de bacteriemia, ITU y endodontitis. El mayor número de genes estudiados se detectó en cepas bacteriémicas. Los genes *aggA* y *entA*, fueron los más frecuentes. Los genes *efaA*, *esp*, *entL50A/B* y *entA* se asociaron a su origen clínico ($p < 0,05$). El perfil genético más recurrente fue *aggA-eep-enlA-entL50A/B*. *Enterococcus faecalis* de ITU, bacteriemias y endodontitis presentaron distintas combinaciones génicas. Algunos de los genes estudiados se relacionaron con su origen clínico. Los resultados obtenidos son similares a los reportados en otros países.

Referencias

- 1.- Koch S, Hufnagel M, Theilackers C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004; 22: 822-30.
- 2.- Murray B E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med* 2002; 342: 710-21.
- 3.- Jett B D, Huycke M M, Gilmore M S. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 462-78.
- 4.- Poeta P, Igrejas G, Costa D, Sargo R, Rodríguez J, Torres C. Virulence factors and bacteriocin in faecal enterococci of wild boars. *J Basic Microbiol* 2008; 48: 385-92.
- 5.- Johnston L M, Jaykus L A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 3133-7.
- 6.- Quednau S, Ahmé S, Molin G. Genomic relationships between *Enterococcus faecium* strains from different sources and with different antibiotic resistance profiles evaluated by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using Eco RI and Pvu II. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 1777-80.
- 7.- Leavis H L, Bonten M J, Willems R J. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: Global dispersion and antibiotic resistance. *Current Op Microbiol* 2006; 9: 454-60.
- 8.- Murray B E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 46-65.
- 9.- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol* 2009; 155: 1749-57.
- 10.- Franz C M, van Belkum M J, Holzapfel W H, Abriouel H, Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31: 293-10.
- 11.- Padilla C, Lobos O, Brevis P, Abaca P, Hubert E. Plasmid-mediated bacteriocin production by *Shigella flexneri* isolated from dysenteric diarrhea and their transformation into *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol* 2006; 42: 300-03.
- 12.- Lebreton F, Riboulet-Bisson E, Serror P, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, et al. *ace*, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by ERS and is involved in virulence. *Infect Immun* 2009; 77: 2832-9.
- 13.- Khan S A, Nawaz M S, Khan A A, Hopper S L, Jones R A, Cerniglia C E. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms. Detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. *Mol Cell Probe* 2005; 19: 27-34.
- 14.- Nallapareddy S R, Singh K V, Sillanpää J, Garsin D A, Höök M, Erlandsen S L, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest* 2006; 116: 2799-2807.
- 15.- Singh K, Nallapareddy SR, Murray B. Importance of the *ebp* (endocarditis and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *J Infect Dis* 2007; 195: 1671-7.
- 16.- Dupont H, Vae C, Muller-Serieys C, Chosidow D, Mant J, Marmuse J P, et al. Prospective evaluation of virulence factors



- of enterococci isolated from patients with peritonitis. Impact on outcome. *Diagn Micro Infect Dis* 2008; 60: 247-53.
- 17.- Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from diary and human samples in north Italy. *Food Control* 2008; 19: 886-92.
- 18.- Reynaud A, Ellington M, Warner M, Woodford N, Haapasalo M. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 164-8.
- 19.- Sedgley C, Molander A, Flannagan S, Nagel A, Appelbe O, Clewell D, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20: 10-9.
- 20.- Facklam R R, Collins M D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 731-4.
- 21.- Eaton T J, Gasson M J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinant and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628-35.
- 22.- Bittencourt de Marques E, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol* 2004; 53: 1069-73.
- 23.- Shankar V, Baghdayan A S, Huycke M M, Lindahl G, Gilmore M S. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67: 193-200.
- 24.- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I, et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 291-304.
- 25.- Du Toit M, Franz C M, Dicks L M, Holzapfel WH. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 482-94.
- 26.- Sabia C, Niederhäusern S, Guerrieri E, Anacarso I, Manicardi G, Bondi M. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *J Appl Microbiol* 2007; 104: 970-9.
- 27.- Foulquié-Moreno M, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006; 106: 1-24.
- 28.- Padilla C, Brevis P, Lobos O, Hubert E, Zamorano A. Production of antimicrobial substances by hospital bacteria, active against other microorganisms. *J Hosp Infect* 2000; 49: 43-7.