Detección de genes de virulencia en cepas de *Enterococcus faecalis* susceptibles y resistentes a aminoglucósidos

Juan Silva, Yara Rodríguez, Jorge Araya, Joselyne Gahona, Nicomedes Valenzuela, Katherine Guerrero, John Báez, Fernando Baquero y Rosa del Campo

Detection of virulence genes in aminoglycoside susceptible and resistant *Enterococcus faecalis*

Background: *Enterococcus* spp. is an important cause of nosocomial infections. A number of virulence factors that may enhance its ability to colonize have been described. *Enterococcus* is capable of acquiring resistance genes, including high-level resistance (HLR) to aminoglycoside antibiotics. **Aim:** to investigate the prevalence of genes encoding virulence factors in aminoglycosides susceptible and resistant *E. faecalis*. **Materials and Methods:** A total of 80 *E. faecalis* isolates from clinical (n: 52) and poultry samples (n: 28) were included in this study. Bacterial identification was performed by biochemical tests and phenotypification was done using the Phene-Plate™ system. Susceptibility to different antimicrobial agents was determined by the agar dilution method. Virulence genes *aceI*, *agg*, *gelE* and *efaA* were detected by multiplex PCR. **Results:** All isolates were susceptible to vancomycin and ampicillin. HLR to gentamicin (13.5%) and streptomycin (9.6%) was detected only in clinical isolates. The phenotyping revealed a great diversity of PhP-types, but only one clone with 7 strains of similar characteristics was found. The *efaA* gene was detected in 100% of the isolates. *aceI* gene was present in 94.2% and 75%, *agg* gene in 73.1%, and 67.9%, and *gelE* gene in 57.5% and 28.6% of the clinical and chicken isolates, respectively. Only 6 strains with HLR to aminoglycosides, belonging to the same phenotype, had the *aceI*, *agg*, *gelE* and *efaA* genes. **Conclusions:** *E. faecalis* with virulence genes and HLR to aminoglycosides were isolated from clinical and chicken samples in Antofagasta. More studies will be necessary to establish an association.

Key words: High levels of resistance, virulence genes, antibiotics, aminoglycosides, *Enterococcus*.

Palabras clave: Resistencia de alto nivel a aminoglucósidos, genes de virulencia, antimicrobianos, *Enterococcus*.

Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile.

Departamento de Tecnología Médica (JSA, YRG, JAR, JGR, NVL, KGO, JBV).

Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

Servicio de Microbiología (FB, RDC).

Los autores declaran no tener conflicto de intereses

Financiado por Proyecto PROIM N° 1357, Dirección de Investigación de la Universidad de Antofagasta y Proyecto N° 4549 Minera Escondida, Antofagasta, Chile.

Recibido: 28 de marzo de 2012

Aceptado: 9 de diciembre de 2012

Correspondencia a:

Juan Silva Avalos
jsilva@uantof.cl

Introducción

El género *Enterococcus* forma parte de la microbiota gastrointestinal del hombre y de los animales. Durante mucho tiempo no fueron considerados como patógenos primarios. Sin embargo, cepas de *Enterococcus* spp resistentes a vancomicina (ERV) han emergido como una causa importante de infecciones nosocomiales en todo el mundo^{1,2}. Este incremento como agente de infecciones nosocomiales se debe, en parte, a su capacidad de adquirir resistencia a los antimicrobianos, lo que hace difícil el tratamiento y también, a su capacidad de adaptarse fácilmente a los cambios del medio. En Estados Unidos de América se aíslan cepas ERV en 25% de las infecciones nosocomiales en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) y están considerados como uno de los tres patógenos más comúnmente aislados en las infecciones nosocomiales³.

Enterococcus spp representan un gran desafío terapéutico debido a su resistencia intrínseca a varios antimicrobianos. Ampicilina y vancomicina son los

antimicrobianos usados normalmente en el tratamiento de las infecciones producidas por este agente⁴. Además de la resistencia intrínseca, poseen capacidad de adquirir genes de resistencia y de virulencia, que son transferidos por plasmidios o transposones conjugativos. Una gran importancia ha sido reconocida para las cepas de *Enterococcus* que adquieren resistencia de alto nivel (RAN) a aminoglucósidos^{5,6}.

A pesar de su patogenicidad relativa, varios factores de virulencia han sido descritos en este género, codificados en genes de virulencia, mayormente en cepas de *Enterococcus faecalis*⁷. Entre ellos, destacan el antígeno A (*efaA*), la sustancia de agregación (*asaI* o *agg*), gelatinasa (*gelE*), proteína enterocócica de superficie (*esp*), citolisina (*cylA*), adhesina del colágeno (*aceI*) y hialuronidasa (*hyl*)⁷⁻¹³.

El gen *asaI* o *agg*, albergado en un plasmidio, codifica para la producción de una sustancia de agregación (feromona inducible) que participa en la conjugación de enterococos⁷. La sustancia de agregación aumenta la adherencia a las células de los túbulos renales, a las células

intestinales y finalmente, se ha asociado a endocarditis en modelos animales⁸.

El gen cromosomal *gelE* codifica para una gelatinasa, que es una metalopeptidasa extracelular que hidroliza colágeno, gelatina, caseína, hemoglobina y pequeños péptidos y se ha visto que produce exacerbación de la endocarditis en modelos animales⁹.

El gen *aceI* codifica para una adhesina que es capaz de interactuar con el colágeno tipo I y IV y la laminina, favoreciendo la unión de enterococos a las células del hospedero¹³.

En estudios anteriores, hemos aislados cepas de *E. faecalis* de origen clínico y ambiental, las cuales presentaban ausencia de resistencia a vancomicina, pero exhibían resistencia de alto nivel a aminoglucósidos^{14,15}. Este trabajo tiene como objetivo estudiar la presencia de genes de virulencia en diferentes fenotipos bioquímicos de *E. faecalis* susceptibles y resistentes a aminoglucósidos.

Material y Métodos

Cepas bacterianas

Se incluyeron 80 cepas de *E. faecalis*, 52 aisladas de muestras clínicas en el Hospital Regional de Antofagasta: orina (n: 29), herida operatoria (n: 8), sangre (n: 1), secreción vaginal (n: 10), otras muestras clínicas (n: 4); y cepas provenientes de pollos expendidos en locales comerciales (n: 28), todas recolectadas en el año 2008. Las cepas fueron identificadas mediante pruebas bioquímicas con diferentes sustratos, de acuerdo a lo descrito por Manero y Blanch¹⁶. También, se identificaron por medio de la comparación de los resultados del Phene-Plate^R con datos de cepas referenciales del patrón de PhP del Programa PhPWIM4¹⁷.

Susceptibilidad in vitro a antimicrobianos

Se evaluó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas de *E. faecalis* por técnica de dilución en placa,

de acuerdo a los criterios establecidos por el CLSI¹⁸. Se incluyeron los siguientes antimicrobianos: amikacina (AMK), ampicilina (AMP), penicilina (P), vancomicina (V), gentamicina (G), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (T), eritromicina (E), estreptomycin (SM) y cloranfenicol (CAF). Los resultados fueron expresados como la CIM₅₀ y CIM₉₀, y se determinaron los porcentajes de resistencia. Además, se determinó la resistencia de alto nivel (RAN) a aminoglucósidos, los que correspondieron a > 500 µg/ml para G y > 2.000 µg/ml para SM. En todos los ensayos, se incluyó la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, como control.

Tipificación de fenotipos bioquímicos

La determinación de los fenotipos bioquímicos (*biochemical fingerprinting*) se realizó por el método de PhP-RF (Phene-Plate Techniques AB, Sweden), de acuerdo a recomendaciones descritas en trabajos anteriores¹⁴. A partir de una colonia de *Enterococcus* sp cultivada en placa de agar sangre se sembró un tubo con 10 ml de proteosa peptona (Difco) 0,1%, conteniendo azul de bromotimol 0,01% y se inocularon alícuotas de 150 µl a los pocillos de microplacas que contenían 8 sets con 11 sustratos deshidratados seleccionados para identificar los fenotipos bioquímicos de *Enterococcus* spp. Las microplacas se incubaron a 37°C hasta un total de 64 h. La cinética de las reacciones fue evaluada midiendo los valores de absorbancia a las 16, 40 y 64 h. El fenotipo bioquímico (*fingerprinting*) se calculó como el valor promedio para cada reactivo de las tres lecturas, mediante el programa computacional PhP-WiM4. Las similitudes entre las cepas ensayadas fueron calculadas como coeficientes de correlación (*r*) y fueron reunidas de acuerdo al método de grupo par no pesados con promedios aritméticos (UPGMA)¹⁷. Los fenotipos bioquímicos que se encontraron en más de una cepa fueron llamados fenotipos comunes (PhP-C), y aquellos que presentaron solamente un aislado fueron llamados fenotipos solos (PhP-S).

Detección de genes de virulencia

La amplificación de los genes de virulencia se realizó por técnica de RPC múltiple de los genes *aceI*, *gelE*, *agg* y *efaA*⁷. Los partidores utilizados fueron descritos previamente^{7,13}. La secuencia de los partidores y tamaño esperado de los amplicones para cada ensayo de RPC se muestran en la Tabla 1. En los ensayos se incluyó, además, una cepa de *E. raffinosus* y una de *E. gallinarum* como controles negativos. Las cepas de *Enterococcus* se sembraron en agar sangre a 37°C por 18-24 h. Se tomaron varias colonias y se hizo una emulsión espesa en microtubos que contenían 200 µl de agua destilada estéril, que se pusieron a ebullición (100 °C) durante 10 min, luego se centrifugó a 12.000 rpm por 5 min. Se tomaron 2 µl del sobrenadante y se agregó a la mezcla de reacción, en un volumen final de 25 µl, conteniendo: 1 µl MgCl₂ 50 mM,

Tabla 1. Oligonucleótidos partidores y productos en la detección de los genes de virulencia en cepas de *E. faecalis* por RPC

Genes de virulencia	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño de los amplicones (pb)	Referencia
<i>ace</i>	GTCGCTCTTTCACTTGTTCT GAGCAAAGTTCAATCGTTGAC	1.003	22
<i>aggA</i>	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1.553	8
<i>efaA</i>	GACAGACCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGTAGTA	705	8
<i>gelE</i>	ACGCATTGCTTTCCATC ACCCGTATCATTGGTTT	419	8

2,5 µl tampón RPC, 1 µl dNTPs 10 mM, 1 ml de cada partidor 100 pmol, 1 U Taq polimerasa (promega) y 13,5 µl agua milliQ ultrapura. El primero de los sets contenía los partidores de los genes *aceI* y *agg* y el segundo set *efaA* y *gelE*. La amplificación de la mezcla se hizo en un equipo de RPC (PTC-100 Programable Thermal Controller, MJ Research, Inc., Watertown, MA), con una denaturación inicial de 95°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 56°C por 1 min y 72°C por 2 min; y una extensión final 72°C por 10 min. Después de la amplificación, una muestra de 6 µL de cada reacción fue analizada mediante electroforesis en un gel de agarosa a 1% con bromuro de etidio (Equipo Power Pac Basic, BioRad, USA). Se usó como marcador de tamaño molecular de ADN un 100-bp *DNA ladder* (Invitrogen, Merelbeke, Belgium).

Análisis estadístico

La comparación de los datos de las cepas de *Enterococcus* recuperadas de muestras clínicas y de pollos se hizo mediante el análisis de las variables cualitativas con el test de Fisher, utilizando el Programa Minitab 15. Un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Los resultados de las pruebas bioquímicas permitieron la identificación de las cepas de *E. faecalis* y los análisis del Ph-plate confirmaron estos resultados. En la Tabla 2 se muestra la gran susceptibilidad que exhibieron las cepas de *Enterococcus* frente a V y AMP, con una CIM₅₀ y CIM₉₀ que fluctuaron entre 0,5 y 4 µg/ml. Se observó resistencia a CAF, 90,9 y 39,3% ($p < 0,05$); T 57,6 y 35,7% ($p > 0,05$); E 32,7 y 14,3% ($p > 0,05$) de las cepas clínicas y de pollo, respectivamente. Un 30% de las cepas clínicas exhibió resistencia a CIP ($p < 0,05$). En general, las cepas clínicas fueron más resistentes a los antimicrobianos, pero en algunos casos esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Las diferencias entre las cepas de *Enterococcus* aisladas de muestras clínicas y de pollos con RAN a G 13,5/3,6% ($p 0,250$), RAN a AMK 11,5/3,6% ($p 0,412$), y RAN a SM 9,6/0% ($p 0,156$), no son estadísticamente significativas.

El sistema Phene-Plate permitió la identificación de 16 fenotipos bioquímicos diferentes que no presentaron correlación alguna con el origen de aislado, solamente el PhP-tipo C3 fue el más frecuentemente aislado en las cepas clínicas (7 cepas) y el PhP-tipo C2 en las de pollo.

Los resultados de la RPC múltiple mostraron que los amplicones obtenidos correspondieron a los tamaños moleculares para cada uno de los genes de virulencia ensayados. En la Figura 1, la electroforesis muestra una banda que corresponde al gen *efaA* (705 pb) presente en todas las cepas de *E. faecalis* y ausente en *E. raffinosus*

y *E. gallinarum*. También se aprecia otra banda de 419 bp correspondiente al *gelE* presente en varias cepas de *E. faecalis*. En la Figura 2, las bandas corresponden a los genes *agg* (1.553 pb) que se encontraba presente en varias cepas de *E. faecalis* y también se aprecia una banda de 1.003 bp, correspondiente al gen *aceI* que se detectó en algunas de las cepas ensayadas.

Tabla 2. Distribución de la CIM₅₀ y CIM₉₀ de cepas de *E. faecalis* a antimicrobianos

Antimicrobianos	Rango CIM µg/ml	Cepas clínicas			Cepas de pollos		
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	% R	CIM ₅₀	CIM ₉₀	% R
Amikacina ¹	4 - 2.024	8	1.024	11,5*	4	8	3,6*
Ampicilina	0,25 - 8	1	4	0	0,5	1	0
Ciprofloxacina ¹	0,25 - 64	0,5	8	30,8	0,5	0,5	0
Cloranfenicol ¹	2 - 256	64	128	90,9	16	32	39,3
Eritromicina ²	0,5 - 16	1	8	32,7	0,5	4	14,3
Estreptomicina ²	4 - 2.048	32	1.024	9,6*	32	64	0
Gentamicina ²	4 - 2.048	8	1.024	13,5*	4	32	3,6*
Penicilina	0,25 - 2	0,5	2	0	0,5	1	0
Tetraciclina ²	2 - 128	16	128	57,6	0,5	64	35,7
Vancomicina	0,25 - 8	0,5	2	0	0,5	1	0

*Cepas con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos. ¹($p < 0,05$); ²($p > 0,05$).

Figura 1. Línea 1 y 28 marcador de tamaño molecular (100 bp). Líneas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 cepas clínicas *E. faecalis* y líneas 24, 25, 26 y 27 cepas de *E. faecalis* de pollos fueron positivas para el gen *efaA*. Línea 10 *E. raffinosus* y línea 13 *E. gallinarum* fueron negativas para el gen *efaA*. Las bandas inferiores corresponden al gen *gelE*, el cual detectó en las líneas 4, 8, 14, 15, 18, 19, 20 y 23 de las cepas clínicas de *E. faecalis* y línea 25 y 26 de las cepas de pollos.

Figura 2. Línea 1 y 28 marcador de tamaño molecular (100 bp). Líneas 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 cepas clínicas *E. faecalis* y líneas 24, 25 y 26 de cepas de *E. faecalis* de pollos fueron positivas para el gen *agg*. Línea 10 *E. raffinosus* y línea 13 *E. gallinarum* fueron negativas para el gen *agg*. Las bandas inferiores corresponden al gen *aceI*, el cual detectó en las líneas 3, 4, 5, 7, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 de las cepas clínicas de *E. faecalis* y línea 24, 25 y 26 de las cepas de pollos.

Figura 3. Porcentajes de los genes de virulencia presentes en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas de muestras clínicas y provenientes de pollos. Antofagasta, Chile.

Tabla 3. Combinaciones de los genes *aceI*, *gelE*, *agg* y *efaA* presentes en cepas de *Enterococcus faecalis* de origen clínico y avícola aisladas en Antofagasta, Chile

Origen	Cepas bacterianas n	%	aceI	Genes de virulencia gelE	agg	efaA
Clínicas (n: 52)	30	57,7*	+	+	+	+
	8	15,4	+	-	+	+
	11	21,1	+	-	-	+
	4	7,7	-	-	-	+
Pollos (n: 28)	5	17,9*	+	+	+	+
	9	32,1	+	-	+	+
	3	10,7	-	+	+	+
	7	25,0	+	-	-	+
	4	14,3	-	-	+	+

*(p < 0,05).

En la Figura 3, se muestran los porcentajes de los genes de virulencia encontrados en las distintas cepas de *Enterococcus*. Estos revelan que el gen *efaA*, que codifica para un antígeno de superficie, estaba presente en 100% de cepas de *E. faecalis*, tanto en las de origen clínico como en las aisladas de pollos. El gen *efaA* no se detectó en las cepas de *E. raffinosus* y *E. gallinarum*. El gen *aceI* (adhesina), estaba presente en 94,2% de las cepas clínicas y en 75% de las provenientes de pollos (p 0,028). El gen que codifica para la sustancia de agregación (*agg*) fue encontrado en 73,1% de las cepas clínicas y 67,9% en las obtenidas de pollos (p 0,616). Finalmente, el gen *gelE* fue encontrado en menor proporción con 57,7% en las cepas clínicas y 28,6% en las aisladas de pollos (p 0,019). En general se aprecia que los genes de virulencia están presentes en mayor proporción en las cepas de *E. faecalis* que fueron aisladas de muestras clínicas, pero esta diferencia es estadísticamente significativa sólo para los genes *aceI* y *gelE*.

En la Tabla 3, se presenta la combinación de los genes *aceI*, *gelE*, *agg* y *efaA* presentes en las cepas de *E. faecalis*. Se encontró que los cuatro genes estaban presentes en 57,7% de las cepas clínicas y en menor proporción en las recuperadas de pollos, alcanzando a 17,9% (p < 0,05). Las otras combinaciones de tres y dos genes de virulencia juntos, se encontraron en porcentajes variables en los aislados clínicos y procedentes de pollos.

En la Tabla 4, se exhiben los resultados de los análisis de RPC que mostraron la presencia de genes de virulencia en la mayoría de las cepas de *E. faecalis*, los que se encontraron en mayor proporción en las cepas resistentes a altos niveles de aminoglucósidos.

Discusión

En los últimos años, *E. faecalis* resistente a antimicrobianos ha emergido como un importante patógeno

Tabla 4. Distribución de los genes de virulencia y PhP-tipo en cepas de *E. faecalis* resistentes a altos niveles (RAN) a aminoglucósidos

n de cepa	aceI	Genes de virulencia gelE	agg	efaA	PhP Tipo	Origen de cepas	AM	V	CIM (µg/ml) AK	G	ES
E-34	-	-	+	+	C2	P	1	0,5	1.024	2.048	64
E-76	+	+	+	+	C3	C	0,5	0,25	1.024	1.024	1.024
E-77	+	+	+	+	C3	C	0,5	0,25	1.024	1.024	1.024
E-91	+	+	+	+	C3	C	1	0,25	1.024	2.048	128
E-99	+	-	+	+	C3	C	0,5	0,25	1.024	1.024	128
E-103	+	+	+	+	C3	C	1	0,25	1.024	1.024	2.048
E-105	+	+	+	+	C3	C	1	0,25	2.048	2.048	2.048
E-117	+	+	+	+	C3	C	1	0,5	1.024	1.024	2.048

P = Pollo; C = Clínico.

nosocomial y también de infecciones adquiridas en la comunidad, cuya evolución y diseminación de resistencia ha sido facilitada por el uso de antimicrobianos a nivel hospitalario y en la comunidad, como así también, por el uso como aditivo de la alimentación en la crianza de animales¹⁹. En Chile, los reservorios y fuentes de *E. faecalis* resistentes a antimicrobianos no han sido completamente definidos e investigados, como así también, los mecanismos que ponen en juego para evadir la acción de los antimicrobianos y de sus capacidades de producir daño.

En relación a la resistencia a antimicrobianos, destaca la ausencia de resistencia a V, hallazgo similar a lo descrito en otros trabajos¹⁵. Esta situación puede deberse al uso restringido de V y por otro lado, su uso en el Hospital Regional de Antofagasta está orientado al tratamiento de los pacientes con condiciones de gravedad. Sin embargo, hoy día el aislamiento de ERV va en aumento en todo el país²⁰⁻²³.

En años recientes, se ha detectado un aumento de la prevalencia de resistencia a T, como así también a CIP²³. En nuestro estudio, más de 58% de las cepas de *E. faecalis* presentaban resistencia a T. Frente a CIP se encontró una resistencia de 30,8%, fenómeno presente sólo en cepas de origen clínico.

La RAN a G se encontró en 13,5%, a AMK 11,5% y a SM en 9,6% de las cepas de origen clínico. Si bien estos resultados no son elevados, ya son una realidad en nuestro medio. Respecto a esto, en una publicación anterior se encontró 10% de cepas de *Enterococcus* spp con RAN a G en los aislados de cinco hospitales del norte de Chile¹⁵. Estos resultados señalan la posible presencia de enzimas modificantes de aminoglucósidos en estas cepas, especialmente la enzima bifuncional que codifica el gen *aac6'-aph2''* y que ha sido descrita en *E. faecalis*^{24,25}. El aislamiento de cepas de *Enterococcus* con RAN a G podría ir en aumento en los hospitales del norte de Chile, lo que constituiría un serio problema, pues disminuye la posibilidad de su asociación con β -lactámicos o V para obtener un efecto sinérgico y tratar en mejor forma las infecciones graves^{4,5}.

Los resultados de la tipificación de las cepas de *Enterococcus* por el sistema Ph-Plate, nos mostraron la existencia una gran diversidad de fenotipos, tanto en las cepas clínicas como en las aisladas de pollo. Sin embargo, se encontraron algunos fenotipos bioquímicos predominantes en ambos tipos de aislados, lo que sugiere que existe una diseminación de estos clones en el medio hospitalario y también en las aves.

En este estudio se determinó la presencia de cuatro genes de virulencia; *aceI*, *gelE*, *agg* y *efaA* en cepas de *E. faecalis*. En ambos tipos de aislados (humanos y pollos) fue demostrada la presencia de estos genes, ya fuese en forma aislada o en combinaciones. El gen *efaA* fue encontrado en la totalidad de las cepas de *E. faecalis*

y no se detectó en otras especies de *Enterococcus*, lo que parece indicar que este gen podría ser un marcador específico de *E. faecalis*.

Los determinantes de virulencia fueron encontrados en mayor proporción en las cepas clínicas que en las aisladas en pollos, lo que concuerda con otros trabajos²⁶. Sin embargo, sólo se observó significancia estadística en la presencia de los genes *aceI* y *gelE*. Los hallazgos de nuestro estudio señalan que 57,7% de las cepas de *E. faecalis* aisladas en hospitales albergaban los genes *aceI-gelE-agg-efaA* juntos y también, que en estas cepas clínicas, incluían algunos fenotipos bioquímicos predominantes, con RAN a aminoglucósidos, lo que ha sido descrito también en trabajos similares²⁷.

Por otro lado, una amplia variedad de genes de virulencia han sido detectados en *E. faecalis* aislados de fecas de pollos y no en otras especies de *Enterococcus*²⁸, lo que concuerda con nuestro trabajo. Es importante señalar que estas cepas de *E. faecalis* aisladas en pollos, que albergan genes de virulencia, pueden también constituirse en una fuente de transmisión al ser humano.

Se concluye que clones de *E. faecalis* con RAN a aminoglucósidos se han aislados de muestras clínicas y de pollos en el norte de Chile y que en algunos de ellos, se encontraron presentes genes de virulencia. Sin embargo, es necesario realizar nuevos estudios con un mayor número de cepas de *Enterococcus* para establecer si este tipo de resistencia está asociado a los factores de virulencia.

Resumen

Antecedentes: *Enterococcus* spp. es una causa importante de infecciones nosocomiales, tanto en Chile como internacional. Se han descrito una serie de factores de virulencia en este microorganismo, que pueden, por ejemplo, aumentar su habilidad para colonizar. *Enterococcus* tiene capacidad de adquirir genes de resistencia, entre ellos la resistencia de alto nivel (RAN) a los antimicrobianos aminoglucósidos. **Objetivo:** Investigar la prevalencia de genes de virulencia en cepas de *E. faecalis* susceptibles y resistentes a aminoglucósidos. **Material y Métodos:** Un total de 80 cepas de *E. faecalis* aisladas de muestras clínicas (n: 52) y pollos (n: 28) se incluyeron en este estudio. La identificación se hizo por pruebas bioquímicas y se tipificaron por el sistema Phene-Plate^{MR}. La susceptibilidad a diferentes antimicrobianos fue realizada por test de dilución en agar. Los genes de virulencia *aceI*, *agg*, *gelE* y *efaA* fueron investigados por RPC múltiple. **Resultados:** Todas las cepas de *E. faecalis* fueron susceptibles a vancomicina y ampicilina. Un 13,5% de las cepas clínicas presentaron resistencia de alto nivel a gentamicina y 9,6% a estreptomicina. La tipificación reveló una gran diversidad de fenotipos, pero se encontró un clon con 7 cepas de características similares. El gen *efaA* estaba presente en

100% de las cepas, gen *aceI* en 94,2 y 75%, gen *agg* 73,1 y 67,9% y gen *gelE* 57,5 y 28,6% de las cepas clínicas y de pollos, respectivamente. Seis cepas con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos, que pertenecían a un mismo fenotipo exhibieron los genes *efaA*, *aceI*, *agg*

y *gelE* juntos. **Conclusiones:** Cepas de *E. faecalis* que albergan genes de virulencia y con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos fueron aisladas de muestras clínicas y de pollos en Antofagasta. Se requieren mayores estudios para establecer una asociación entre estos factores.

Referencias bibliográficas

- 1.- Willems R J, Bonten M J. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20: 384-90.
- 2.- Tendolkar P M, Baghdayan A S, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 2622-36.
- 3.- Rice L B, Hutton-Thomas R, Lakticova V, Helfand M S, Donskey C J. β -lactam antibiotics and gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *J Infect Dis* 2004; 189: 1113-8.
- 4.- Juliet C. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. *Rev Chilena Infectol* 2002; 19: 111-5.
- 5.- Fariñas M C, Torres C. Enterococo un patógeno emergente en nuestros hospitales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 500-2.
- 6.- Fica A, Jemenao M I, Bilbao P, Ruiz G, Sakurada A, Pérez de Arce E, et al. Emergencias de infecciones por *Enterococcus* sp resistentes a vancomicina en un hospital universitario en Chile. *Rev Chilena Infectol* 2007; 24: 462-71.
- 7.- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4473-9.
- 8.- Eaton T J, Gasson M J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628-35.
- 9.- Vergis E N, Nathan S, Joseph W C, Hayden M K, Syndman D R, Zervos, et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, haemolysin and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 570-5.
- 10.- Tendolkar P M, Baghdayan A S, Shankar N. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2006; 188: 2063-72.
- 11.- Heikens E, Bonten M J, Willems R J. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* 2007; 189: 8233-40.
- 12.- Shankar N, Coburn P, Pillar C, Haas W, Gilmore M. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol* 200; 293: 609-18.
- 13.- Nallapareddy S R, Singh K V, Duh R W, Weinstock G M, Murray B E. Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of *ace* during human infections. *Infect Immun* 2000; 68: 5210-7.
- 14.- Silva J, Loyola P, Galleguillos J C, Rodríguez Y, Colque-Navarro N, Möllby R, et al. Prevalencia de *Enterococcus* spp resistentes a antibióticos en aguas servidas en el norte de Chile. *Rev Med Chile* 2005; 133: 1201-10.
- 15.- Silva J, Asserella L, Rodríguez Y. Prevalencia de *Enterococcus* spp. resistentes a los antibióticos en hospitales del norte de Chile. *Rev Chilena Infectol* 2006; 133: 226-31.
- 16.- Manero A, Blanch A R. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4425-30.
- 17.- Saeedi B, Tärnberg M, Gill H, Hällgren A, Jonasson J, Nilsson L E, et al. Phene Plate (PhP) biochemical fingerprinting. A screening method for epidemiological typing of enterococcal isolates. *APMIS* 2005; 113: 603-12.
- 18.- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 16th Informational Supplement. CLSI/NCCLS M100-S16: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006.
- 19.- Torres C, Tenorio C, Portillo A, García M, Martínez C, Del Campo R, et al. Intestinal colonization by vanA- or vanB2-containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain. *Microb Drug Resist* 2003; 9 (Suppl 1): S47-52.
- 20.- Ministerio de Salud de Chile. Circular 4/C28, 9 de Mayo de 2000.
- 21.- Fica A, Jemenao M I, Bilbao P, Ruiz G, Sakurada A, Pérez de Arce E, et al. Emergency of vancomycin-resistant *Enterococcus* infections in a teaching hospital in Chile. *Rev Chilena Infectol* 2007; 24: 462-71.
- 22.- Braun S, Fica A, Andighretti B, Porte L, Triantafilo V. Estudio de factores de riesgo para colonización por enterococos resistentes a vancomicina en el Hospital Militar de Santiago. *Rev Chilena Infectol* 2009; 26: 374-5.
- 23.- López M, Hormazábal J C, Maldonado A, Saavedra G, Baquero F, Silva J, et al. Clonal dissemination of *Enterococcus faecalis* ST201 and *Enterococcus faecium* CC17-ST64 containing Tn5382-vanB2 among 16 hospitals in Chile. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 586-8.
- 24.- Donabedian S M, Thal L A, Hershberger E, Perri M B, Chow J W, Bartlett, et al. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1109-13.
- 25.- Del Campo R, Tenorio C, Rubio C, Castillo J, Torres C, Gómez-Lus R. Aminoglycoside modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant *Enterococcus* spp. in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 15: 221-6.
- 26.- Iversen A, Kühn I, Rahman M, Franklin A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, et al. Evidence for transmission between humans and the environment of a nosocomial strain of *Enterococcus faecium*. *Environ Microbiol*. 2004; 6: 55-9.
- 27.- Klibi N, Ben Slama K, Sáenz Y, Masmoudi A, Zanetti S, Sechi L A, et al. Detection of virulence factors in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from a Tunisian hospital. *Can J Microbiol* 2007; 53: 372-9.
- 28.- Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C. Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. *Avian Dis* 2006; 50: 64-8.