



Caracterización molecular de la virulencia transferible de *Enterococcus faecium*
de origen nosocomial

Tesis de grado para obtener el título de PhD.

Diana Panesso Botero

Director de tesis

Cesar A. Arias MD, MSc, PhD.

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias Básicas

División de Postgrado

Bogotá

2010

ADVERTENCIA

Artículo 23, resolución No 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajo de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien sea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Caracterización molecular de la virulencia transferible de *Enterococcus faecium*
de origen nosocomial

Diana Panesso Botero

APROBADO

Cesar A. Arias H. MD, MSc, PhD.

Director de Tesis

Fredy O. Gamboa, PhD.

Jurado

Teresa Coque, PhD.

Jurado

Hugo Díez, PhD.

Jurado

Marilyn Hidalgo, PhD.

Jurado

Raul Poutou, PhD.

Jurado

Caracterización molecular de la virulencia transferible de *Enterococcus faecium*
de origen nosocomial

Diana Panesso Botero

APROBADO

Ingrid Shuler PhD.

Decana Académica

Manuel A. Franco. MD, PhD.

Director Postgrado

DEDICATORIA

A mis padres, mi familia, Ralf Nehring, mis amigos y a Dios

PREFACIO

El trabajo presentado en esta tesis fue desarrollado en la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana, (UGRA) de la Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia y en el Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana (University of Texas Health Science Center at Houston) Texas, USA, durante el período de Julio del 2005 a Diciembre del 2009 con el apoyo del programa de doctorados nacionales, COLCIENCIAS, 2005.

La secuenciación del DNA se realizó en el laboratorio central del departamento de microbiología y genética molecular de la Universidad de Texas por Agnes Puskas y la construcción de la mutante *E. faecium* D344SRF Δ *hyl*_{Efm} fue desarrollada por el laboratorio de Investigación del Dr Louis Rice in Cleveland. Con estas excepciones yo, certifico que esta tesis describe el trabajo en 5 años de doctorado y confirmo además que este trabajo no ha sido presentado para evaluación ni obtención de título de PhD. en ninguna otra universidad.

1. Resúmenes presentados como parte de este trabajo y presentados en congresos internacionales:

- **Panesso, D.**, Singh, KV., Murray, BE and Arias, CA. Role of a *Enterococcus faecium* (Efm) *hyl*_{Efm}-Containing Plasmid in Pathogenesis of Murine Urinary Tract Infection. *ICAAC 49th annual meeting*, September 11-15. San Francisco. 2009. Presentación oral B1089.

- **Panesso, D.**, Bourgone A., Singh, KV., Murray BE and Arias CA. Directed Mutagenesis in *Enterococcus faecium* (Efm) Using the PheS* Vector System. 48th annual ICAAC/IDSA 46th annual meeting, October 25-28, 2008. Washington, Poster, B-074.
- **Panesso, D.**, Reyes, J., Zurita, J., Carrillo, C., Guzman, M., Rincón, S., Diaz, L., Adachi JA., Murray, BE and Arias CA. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) from Latin-American Hospitals: A prospective Study, 2006-2008. 48th annual ICAAC/IDSA 46th annual meeting, October 25-28, 2008. Washington, Poster, C2-1998.
- Arias, CA., **Panesso, D.**, Singh, KV., Rudin, S., Rice, LB and Murray BE. A Hyaluronidase-like Gene Deletion Mutant of *Enterococcus faecium* is Attenuated *in vivo*. ICAAC 47th annual meeting, September 17-20. Chicago. 2007. Poster B56

2. Las publicaciones relacionadas directamente con este proyecto de investigación:

- Arias, CA., **Panesso, D.**, Singh, KV., Rice, LB and Murray BE. Co-transfer of antibiotic resistance genes and *hyl_{Efm}* containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009. 10:4240-46.
- Kim, D., Singh, KV., Nallapareddy, S., **Panesso, D.**, Arias, CA and Murray, BE. The *fms* 21 (*pilA*)-*fms*20 Locus Encoding one of four Distinct Pili of *Enterococcus faecium* is Harbored on a Large Transferable Plasmid Associated with Gut Colonization and Virulence. *Journal Medical Microbiology*. 2010. 4: 505-07.

- **Panesso, D.**, Reyes, Rincón, S., Diaz, L., Gallowey-Pena, J., Zurita, J., Carrillo, C., Merentes, A., Guzman, SA., Adachi JA., Murray, BE and Arias CA. Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: A Prospective, Multicenter Study in South American Hospitals. *Journal Clinical Microbiology*. 2010. 5:1562-9.

- **Panesso, D.**, Sigh, KV., Rudin, S., Rice, LB., Murray, BE and Arias, CA. Evaluation of the role of *hyl_{Efm}* in *Enterococcus faecium* Pathogenesis. Enviado a: *Infection and Immunity*

3. Publicaciones no relacionadas directamente con este trabajo pero que han hecho parte del entrenamiento doctoral:

- Reyes, J., Rincón, S., Díaz, L., **Panesso, D.**, Contreras, GA., Zurita, J., Carrillo, C., Rizzi, A., Guzmán, M., Adachi, J., Chowdhury, S., Murray, BE and Arias, CA. Dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 sequence type 8 lineage in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*. 2009. 49:1861-67.

- Arias, CA., Vallejo, M., Reyes, J., **Panesso, D.**, Moren, J., Castañeda, E., Villegas, MV., Murray, BE and Quinn, JP. Clinical and microbiological aspects of linezolid resistance mediated by the *cfr* gene encoding a 23S rRNA methyltransferase. *Journal Clinical Microbiology*. 2008. 46:892-96.

- Arias, CA., Torres, HA., Singh, KV., **Panesso, D.**, Moore, J., Wanger, A and Murray BE. Failure of daptomycin monotherapy for endocarditis caused by an

Enterococcus faecium strain with vancomycin-resistant and vancomycin susceptible subpopulations and evidence of *in vivo* loss of the *vanA* gene cluster. *Clinical Infectious Diseases*. 2007. 45:1343-36.

- Arias, CA., Singh, KV., **Panesso, D** and Murray BE. Evaluation of ceftobiprole medocaril against *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 2007. 60:594-98.
- Arias, CA., Singh, KV., **Panesso, D** and Murray BE. Time-kill and synergism studies of ceftobiprole against *Enterococcus faecalis*, including β -lactamase-producing and vancomycin-resistant isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007. 5:2043-47.
- Arias, CA., Robredo, B., Singh, KV., Torres, C., **Panesso, D** and Murray BE. Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae mur-2* gene in *E. durans*. *Journal Clinical Microbiology*. 2006. 44:1567-70.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido desarrollado gracias a la financiación recibida del Instituto de Salud de los Estados Unidos (NIH) bajo la beca “NIH Pathway to Independence Award K99/R00 AI72961, The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)” a cargo del Dr Cesar A. Arias como investigador principal y adicionalmente con el soporte del “NIH grant” R01 AI067861 otorgado a la Dra Barbara E. Murray como investigadora principal. Así mismo, parte de este trabajo se realizó con el apoyo de Pfizer, SA Colombia bajo el proyecto titulado “Vigilancia de resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* y Enterococos de hospitales en Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela” dirigido por el Dr Cesar A. Arias.

Quiero agradecer al programa de Doctorados Nacionales 2005 de COLCIENCIAS (Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología), a la Universidad El Bosque y a la Universidad de Texas por el apoyo económico e institucional obtenido para la realización del doctorado en ciencias biológicas en la Pontificia Universidad Javeriana. Así mismo, a la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) por las becas otorgadas para la presentación de parte de este trabajo en el evento anual ICAAC, 2007 e ICAAC, 2009. Igualmente a la Pontificia Universidad Javeriana por el apoyo logístico y académico obtenido para la ejecución de este programa doctoral.

A mi director el Dr Cesar Arias, el cual ha sido la base fundamental de mi crecimiento académico, por su soporte científico, su orientación, apoyo en todo el proceso de investigación que he llevado a cabo, bajo su supervisión he logrado la finalización exitosa

de la maestría y el desarrollo del doctorado. Así mismo, quisiera agradecer a mi grupo de investigación, la Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA) de la Universidad El Bosque, por la enorme colaboración, ánimo, trabajo en equipo y motivación que he recibido de todos sus integrantes: Jinnethe Reyes, Sandra Rincón, Lorena Díaz, German Contreras y Maritza Berrío. Así mismo a María Camila Montealegre y María Fernanda Mojica pertenecientes al Centro Internacional de Entrenamiento en Investigaciones Médicas (CIDEIM) y al Dr Carlos Corredor de la Pontificia Universidad Javeriana. Por otro lado, quiero agradecer sinceramente a la Dra Barbara Murray directora del Laboratorio de Investigación en Enterococos de la Universidad de Texas por el apoyo y asesoría brindada durante el tiempo que se ha desarrollado este proyecto. Igualmente, a todos los miembros de su grupo Dr Kavindra Singh, Dr Sreedhar Nallapareddy, Dra Agathe Bourgogne, Dr Jouko Sillanpaa, Dr Jung Roh, Dra Ana Cohen, Dra Tina Choudhury, Shahreen Chowdhury, Charlene Thompson, Jessica Galloway-Peña, Karen Jacquez-Palaz, Melinee Harris e Isabel Reyes quienes no solo me brindaron apoyo académico sino una grandísima ayuda personal durante las pasantías de investigación que desarrolle en este laboratorio. Adicionalmente, quisiera agradecer al Dr Jesus Eraso del departamento de microbiología y genética molecular y a Lily Carlin de la división de enfermedades infecciosas de la Universidad de Texas.

A Houston esta calurosa ciudad que no solo por su clima sino por su gente, la cual ha hecho mi estancia inolvidable. A María Grissom, Karina Garzón, Lucia Piccotti y a todo mi grupo de amigos de Bogotá y de Houston con los cuales he compartido momentos muy

felices. Quisiera agradecer especialmente a Ralf Nehring que con su apoyo, estímulo y amor ha sabido acompañarme en la parte final de este proceso académico. A toda mi familia, representada por mi abuela materna la cual me ha animado incansablemente en todas las etapas de mi formación personal y profesional. Finalmente, no tengo palabras para expresar mi enorme gratitud hacia a mis padres Ruby Botero y Bernardo Panesso que siempre han estimulado con gran cariño y con infinita paciencia todos mis procesos académicos y a Dios quien me ha dado la fuerza para no darme por vencida en cada momento difícil que he pasado.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag
Prefacio	6
Agradecimientos	10
1. Índice de figuras	22
2. Índice de tablas	27
3. Resumen	28
4. Abreviaciones	30
5. Alcance y definición del problema de investigación	33
6. Marco teórico	38
6.1 Aspectos microbiológicos de los enterococos	38
6.2 Nicho biológico, fuentes de infección y colonización	41
6.3 Aspectos clínicos	43
6.3.1 Bacteriemias	44
6.3.2 Endocarditis	44
6.3.3 Infecciones urinarias	45
6.3.4 Infecciones intra-abdominales-pélvicas y de tejidos blandos	46
6.3.5 Infecciones del sistema nervioso central	46

6.4 Epidemiología de las infecciones por enterococos	47
6.4.1 Enterococos resistentes a vancomicina	48
6.4.2 Enterococos resistentes a ampicilina	50
6.4.3 Epidemiología molecular de las infecciones por <i>E. faecium</i>	52
6.5 Patogénesis de la infecciones por enterococos	59
6.5.1 Determinantes de patogenicidad en <i>E. faecalis</i>	60
6.5.1.1 Sustancia de agregación (AS)	61
6.5.1.2 Proteína de superficie (Esp)	63
6.5.1.3 Proteína de unión al colágeno (Ace)	65
6.5.1.4 Proteínas productoras de pili	67
6.5.1.5 Citolisina (Cyl)	68
6.5.1.6 Gelatinasa (GeE) y proteasa (SprE)	69
6.5.1.7 Carbohidratos de la pared celular y polisacáridos capsulares	71
6.5.2 Determinantes de patogenicidad en <i>E. faecium</i>	72
6.5.2.1 Proteína de superficie (Esp _{Efm})	73
6.5.2.2 Proteína de unión a colágeno (Acm)	76
6.5.2.3 Proteínas de superficie en <i>E. faecium</i> (Fms)	79

6.5.2.4. Adhesina de unión al nidógeno (SgrA) y adhesina de unión a colágeno (EcbA)	83
6.5.3 Modelos animales para la evaluación de la virulencia en enterococos	85
7. Objetivos	89
7.1 Objetivo general	89
7.2. Objetivos específicos	89
8. Metodología	90
8.1 Microorganismos de estudio	90
8.1.1 Cepas bacterianas de laboratorio	90
8.1.2 Aislamientos nosocomiales de <i>E. faecium</i> obtenidos a partir de un estudio clínico de vigilancia en la región Andina	96
8.2 Técnicas de manipulación de DNA	97
8.2.1 Extracción de DNA	97
8.2.2 Construcciones de mutantes en la región <i>hyl_{Efm}</i>	97
8.2.2.1 Construcción de una mutante del gen <i>hyl_{Efm}</i> utilizando el sistema de reemplazo alélico con el vector sensible a la temperatura pTEX5501-TS-Mob+	97

8.2.2.2 Construcción de una mutante de 6 genes en la región <i>hyl_{Efm}</i> utilizando el sistema PheS*	99
8.2.2.2.1 Construcción de vectores derivativos de pCJK47 para delección de genes en <i>E. faecium</i>	99
8.2.2.2.2 Construcción del vector portador de regiones homólogas para la obtención de la mutante de 6 genes de la región <i>hyl_{Efm}</i>	108
8.2.2.2.3 Transferencia del vector portador de regiones homólogas (pCJK47Gen/Chl:: <i>AB</i>) a <i>E. faecium</i>	110
8.2.2.2.4 Producción del doble evento de recombinación	113
8.2.3 Construcciones de plásmidos para ensayos de complementación	114
8.2.3.1 Evaluación de la estabilidad de los derivados de pAT392 <i>in vitro-in vivo</i>	115
8.2.3.2. Experimentos de PCR con transcripción reversa (RT-PCR)	117
8.2.4 Técnicas de genotipificación molecular	120
8.2.4.1 Electroforesis de campo pulsado (PFGE)	120
8.2.4.2 Tipificación de secuencia de múltiples locus (MLST)	121

8.2.5 Estudio de plásmidos	122
8.2.5.1 Digestión con nucleasa S1 y digestión con I-CeuI	122
8.2.5.2 Aislamiento de plásmidos usando gradiente de densidad con cloruro de cesio	125
8.2.6 Hibridizaciones	127
8.2.6. 1 Southern blotting	127
8.2.6.2 Hibridización por lisis de colonias	129
8.3. Curvas de crecimiento y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	130
8.4 Modelos animales	131
8.4.1 Modelo de peritonitis en ratón	131
8.4.2 Modelo de infección urinaria en ratón	133
9. Resultados capítulo I	135
9.1. Transferencia de un plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> proveniente la cepa clínica A <i>E. faecium</i> (TX0016)	135
9.1.1. Resultados de la conjugación <i>in vitro</i> entre la cepa clínica A <i>E. faecium</i> (TX0016) y la cepa de <i>E. faecium</i> receptora TX1330RF	135
9.1.2 Estudio del plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> en <i>E. faecium</i> cepa A y TX1330RF A-1 empleando la enzima nucleasa S1	140

9.1.3 Confirmación de la presencia extra-cromosomal del gen <i>hyl_{Efm}</i> empleando la digestión con la enzima I- Ceu-I y PFGE	141
9.1.4 Transferencia de los genes de resistencia a eritromicina y HLR-STR partir de la cepa donadora A (TX0016)	143
9.2. Un plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> también fue transferido de la cepa clínica donadora B (ERV99) aislada de un paciente Colombiano	144
9.2.1 Resultados de la conjugación <i>in vitro</i> entre la cepa clínica B <i>E. faecium</i> (ERV99) y la cepa de <i>E. faecium</i> receptora TX1330RF	144
9.2.2 Estudio del plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> en <i>E. faecium</i> cepa B (ERV99) y en las transconjugantes TX1330RF B-1, B-2 empleando la enzima nucleasa S1	147
9.2.3 Confirmación de la presencia extracromosomal del gen <i>hyl_{Efm}</i> empleando la digestión con la enzima I-Ceu-I y PFGE	148
9.2.4 Transferencia de los genes de resistencia a eritromicina HLR-STR, HLR-GEN y vancomicina a partir de la cepa donadora B (ERV99)	149
9.3. El plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> también fue transferido de la cepa donadora C <i>E. faecium</i> (C68)	152
9.3.1 Transferencia del plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> de la cepa	152

C <i>E. faecium</i> (C68) a la cepa de <i>E. faecium</i> receptora D344SRF	
9.3.2 Aislamiento del plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> por extracción utilizando un gradiente de densidad con cloruro de cesio	154
9.3.3 Estudio del plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> en la cepa donadora C (C68) y la transconjugante D344SRF C-6 empleando PFGE- S1 y confirmación con PFGE y I-Ceu-I	156
10. Discusión capítulo I	159
11. Conclusiones capítulo I	166
13. Resultados capítulo II	168
13.1. Análisis computacionales de la región <i>hyl_{Efm}</i>	168
13.2 El plásmido portador de <i>hyl_{Efm}</i> incrementa la virulencia en el modelo experimental de peritonitis en ratón.	172
13.2.1 Incremento de la virulencia experimental en el modelo de peritonitis en las cepas derivadas de <i>E. faecium</i> D344SRF	175
13.2.2. Incremento de la virulencia experimental en el modelo de peritonitis en las cepas derivadas de <i>E. faecium</i> TX1330RF	177
13.3 Adquisición del plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> también incrementa la colonización de <i>E. faecium</i> en el tracto genitourinario (riñones y vejigas) del ratón.	180

13.3.1 Modelo de infección mixta	182
13.3.2 Modelo de mono-infección	185
14. Discusión capítulo II	187
15. Conclusiones capítulo II	194
16. Resultados capítulo III	195
16.1 Efecto <i>in vivo</i> de la delección de genes en la región <i>hyl_{Efm}</i> en <i>E. faecium</i>	195
16.1.1 Construcción de una mutante de 6 genes en la región <i>hyl_{Efm}</i> en <i>E. faecium</i> utilizando el sistema PheS*	195
16.1.2 Evaluación de la mutante obtenida por el método PheS* empleando el modelo de peritonitis en ratón	200
16.1.3 Evaluación <i>in vivo</i> de las mutantes del gen <i>hyl_{Efm}</i> empleando el modelo de infección urinaria en ratón.	206
16.1.4 La interrupción del gen <i>hyl_{Efm}</i> produce atenuación de la virulencia en la cepa de laboratorio D334SRF que presenta el plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> .	209
16.1.5. Complementación de las mutantes con el gen <i>hyl_{Efm}</i> y el gen localizado corriente abajo de <i>hyl_{Efm}</i> (<i>hip</i>).	213
17. Discusión capítulo III	223

18. Conclusiones capítulo III	229
19. Resultados capítulo IV	230
19.1 Características fenotípicas de los aislamientos de <i>E. faecium</i> de origen nosocomial provenientes de los países de la región Andina	230
19.2 <i>E. faecium</i> perteneciente al CC17 se encuentra como genogrupo predominante en la región Andina	233
19.3 Los genes <i>fms</i> , <i>esp_{Efm}</i> y <i>hyl_{Efm}</i> se encuentran frecuentemente en los aislamientos de <i>E. faecium</i> resistentes a vancomicina y pertenecientes al CC17 los cuales provienen de diferentes orígenes geográficos en la región Andina	235
19.4 Los genes <i>fms 20</i> y <i>fms 21(pilA)</i> se encuentran localizados en el plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> y su presencia se observa en cepas de <i>E. faecium</i> provenientes de hospitales en la región Andina.	236
20. Discusión capítulo IV	246
21. Conclusiones capítulo IV	251
22. Perspectivas y aplicaciones	253
23. Anexos	256
23.1. Anexo A: Tabla de iniciadores	259
24. Bibliografía	262

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa físico de la región <i>hyl_{Efm}</i> en <i>E. faecium</i>	38
Figura 2. Proteínas de superficie que presentan el motivo LPxTG en enterococo	63
Figura 3. Organización de los Fms en <i>E. faecium</i>	81
Figura 4. Construcción del vector portador de las regiones homólogas del gen <i>hyl_{Efm}</i> para la creación de una mutante por reemplazo alélico utilizando el vector pTEX5501-TS-Mob+.	101
Figura 5. Sistema de construcción de mutantes utilizando el sistema de selección sin marcación PheS*.	103
Figura 6. Construcción del vector pCJK47Gen	107
Figura 7. Construcción del vector pCJK47Gen/Chl	109
Figura 8. Construcción del vector portador de regiones homólogas para la creación de una mutante de 6 genes en la región <i>hyl_{Efm}</i>	111
Figura 9. Metodología de selección sin marcación empleando el sistema PheS* para la deleción en la región <i>hyl_{Efm}</i>	116
Figura 10. Construcción de plásmidos para complementación utilizando el vector de expresión pAT392.	118
Figura 11. Resultados de PFGE e hibridización empleando la sonda <i>hyl_{Efm}</i> .	139
Figura 12. PFGE empleando la digestión enzimática con la nucleasa S1 y I-Ceu-I y los respectivos “Southern blot”.	141
Figura 13. Resultados de PFGE de la cepa A (TX0016) y sus derivadas empleando	144

la enzima SmaI y Southern blot con sondas dirigidas a los genes (A) *hyl_{Efm}*, (B) *erm(B)* y (C) *ant(6)-I*

Figura 14. PFGE empleando la digestión enzimática con SmaI, la nucleasa S1 y I-Ceu-I y los respectivos “Southern blot”. 146

Figura 15. Resultados provenientes de PFGE de la cepa B (ERV99) y sus derivadas empleando la enzima SmaI e hibridaciones con sondas dirigidas a los genes (A) *hyl_{Efm}*, (B) *vanA*, (C) *acc(6’)-aph(2’)*, (D) *erm(B)* y (E) *ant(6)-I*. 152

Figura 16. Resultados de PFGE-SmaI de las cepas *E. faecium* C68, D344SRF y D344SRF C-6. 154

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* digerido con la enzima EcoRI e hibridación con la sonda correspondiente al gen *hyl_{Efm}*. 156

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* digerido con la enzima S1 e hibridación con la sonda correspondiente al gen *hyl_{Efm}*. 158

Figura 19. Alineamiento del dominio hialuronidasa de *hyl_{Efm}* proveniente de *E. faecium* cepa A (TX0016) con otras glicosil hidrolasas de la familia 84 (GH84). 173

Figura 20. Curva de sobrevivencia del *E. faecium* D344SRF en presencia y ausencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*. 176

Figura 21. Curvas de sobrevivencia en el modelo de peritonitis en ratón por inoculación vía intra-peritoneal con cepas de *E. faecium*. 179

Figura 22. Resultados de PFGE-Smal de las cepas TX1330RFy TX1330RF A-1 provenientes de colonias recuperadas del bazo de los ratones infectados vía intra-peritoneal en el modelo de peritonitis en ratón	180
Figura 23. Modelo de infección urinaria mixta (ensayo competitivo)	184
Figura 24. Resultados del modelo de infección urinaria (mono-infección)	186
Figura 25. Grupo de genes en <i>E. faecium</i> y en <i>S. pyogenes</i>	188
Figura 26. Mapa físico de la región <i>hyl_{Efm}</i> en diferentes cepas de <i>E. faecium</i> y las respectivas mutantes.	198
Figura 27. Curva de crecimiento de las cepas A (TX0016) y TX0016/ Δ -región <i>hyl_{Efm}</i>	199
Figura 28. Perfil electroforético realizado por PFGE de las cepas de <i>E. faecium</i> y sus respectivas mutantes digeridas con la enzima Smal e hibridizadas con el gen <i>hyl_{Efm}</i> y el gen <i>cat</i>	200
Figura 29. Curvas de sobrevivencia en el modelo experimental de peritonitis en ratón de la cepa A (TX0016) y la mutante isogénica TX0016/ Δ región <i>hyl_{Efm}</i> .	202
Figura 30. Caracterización de la cepa TX1330RF A-1/ Δ región <i>hyl_{Efm}</i> por PFGE–Smal e hibridizaciones con las sondas <i>hyl_{Efm}</i> y <i>cat</i> .	203
Figura 31. Curva de crecimiento de las cepas TX1330RF A-1 y TX1330RF A-1/ Δ -región <i>hyl_{Efm}</i> .	204
Figura 32. Curvas de sobrevivencia en el modelo experimental de peritonitis de ratón de las cepas derivadas de TX1330RF	205

Figura 33. Infección mixta de la cepa salvaje de <i>E. faecium</i> TX1330RF A-1 (portadora del plásmido) comparada con la mutante TX1330RF A-1/ Δ región <i>hyl</i> _{Efm} .	208
Figura 34. Resultados de PFGE–Apal e hibridización con la sonda <i>hyl</i> _{Efm} de las cepas <i>E. faecium</i> D344SRF C-6 y la mutante D344SRF/ Δ <i>hyl</i> _{Efm} .	210
Figura 35. Curva de crecimiento de las cepas <i>E. faecium</i> D344SRF C-6 y la mutante D344SRF/ Δ <i>hyl</i> _{Efm} .	212
Figura 36. Curvas de sobrevivencia en el modelo de peritonitis en ratón empleando las cepas derivadas de <i>E. faecium</i> D344SRF.	213
Figura 37. Resultados de PFGE-SmaI de las cepas de <i>E. faecium</i> TX1330RF y sus derivadas transformadas con los plásmidos pAT392.	217
Figura 38. Curva de crecimiento de las cepas derivadas de <i>E. faecium</i> TX1330RF/pAT392	219
Figura 39. Curvas de sobrevivencia de las cepas derivadas de <i>E. faecium</i> TX1330RF portadoras del plásmido pAT392 y pAT392:: <i>hyl</i> _{Efm} y evaluadas en el modelo de peritonitis en ratón	220
Figura 40. Curvas de sobrevivencia de las cepas derivadas de <i>E. faecium</i> TX1330RF portadoras del plásmido pAT392 y pAT392:: <i>hyl</i> _{Efm} - <i>hip</i> y evaluadas en el modelo de peritonitis en ratón	221
Figura 41. Curvas de sobrevivencia de la cepa mutante <i>E. faecium</i> TX1330RF A-1/ Δ región <i>hyl</i> _{Efm} complementadas con plásmido pAT392 (<i>hyl</i> _{Efm}) y pAT392 (<i>hyl</i> _{Efm} - <i>hip</i>) en el modelo de peritonitis en ratón	222

Figura 42. Perfiles de resistencia antibiótica de los 111 aislamientos de <i>E. faecium</i> provenientes de diferentes hospitales en la región Andina (Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela).	231
Figura 43. Perfiles de resistencia antibiótica de los aislamientos de <i>E. faecium</i> provenientes de diferentes hospitales en la región Andina (Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela).	232
Figura 44. Tipificación molecular de <i>E. faecium</i> resistente a vancomicina provenientes de la región Andina empleando PFGE.	234
Figura 45. Frecuencia de los genes putativos de virulencia en los aislamientos de <i>E. faecium</i> resistentes a vancomicina provenientes de hospitales de la región Andina en Sur America	236
Figura 46. Detección de los genes <i>fms 20</i> y <i>fms21 (pilA)</i> en el plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> y en la cepa A (TX0016), TX1330RF A-1 y TX1330RF	238
Figura 47. Resultados de PFGE-S1 de los plásmidos portadores de los genes <i>fms20</i> y <i>fms21 (pilA)</i> en aislamientos representativos de <i>E. faecium</i> provenientes de hospitales de la Región Andina en Sur America	244
Figura 48. Resultados de PFGE-S1 de los plásmidos portadores de los genes <i>fms20</i> y <i>fms21 (pilA)</i> en aislamientos representativos de <i>E. faecium</i> provenientes de hospitales de la región Andina	245

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipos de resistencia a vancomicina en enterococos	51
Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo	91
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo	95
Tabla 4. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para <i>E. faecium</i>	138
Tabla 5. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para <i>E. faecium</i>	148
Tabla 6. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para <i>E. faecium</i>	155
Tabla 7. Recuentos de colonias de la cepa TX1330RF/pAT392 proveniente de bazo de ratones infectados por vía intra-peritoneal	215
Tabla 8. Evaluación de la estabilidad de los plásmidos derivados del pAT392 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	218
Tabla 9. Localización plasmídica o cromosomal de los genes <i>fms20-fms21 (pilA)</i> <i>hyl_{Efm}</i> y <i>vanA</i> en las cepas de <i>E. faecium</i> resistente a vancomicina provenientes de hospitales de la región Andina	240

3. RESUMEN

El gen *hyl_{Efm}* codifica para una hialuronidasa-glicosil hidrolasa y se encuentra en plásmidos (*pHyl_{Efm}*) en aislamientos clínicos de *E. faecium*. Este trabajo evaluó la co-transferencia del *pHyl_{Efm}* con genes de resistencia a antibióticos (GRAs) en *E. faecium* y caracterizó el papel de *pHyl_{Efm}* en la virulencia *in vivo*. La transferencia de *pHyl_{Efm}* y de GRAs se realizó por conjugación *in vitro* y el estudio de los plásmidos por digestión con S1 y I-Ceu-I. El efecto de la adquisición del *pHyl_{Efm}* por una cepa de *E. faecium* comensal (TX1330RF) fue evaluado utilizando los modelos murinos de peritonitis e infección urinaria; una mutante de *pHyl_{Efm}* fue obtenida empleando el sistema PheS* y su efecto también fue estudiado en los mismos modelos. Se realizó genotipificación de *E. faecium* resistentes a vancomicina (VRE_{fm}) de los países de la región Andina. Resultados: a) El *pHyl_{Efm}* se encontraba en megaplásmidos y se transfería entre cepas de *E. faecium*; b) co-transferencia *hyl_{Efm}* con genes de resistencia a gentamicina y vancomicina que se co-localizan en *pHyl_{Efm}*; c) La adquisición de *pHyl_{Efm}* por TX1330RF incrementó la virulencia en el modelo de peritonitis y la colonización del uroepitelio murino; d) La delección de seis genes en *pHyl_{Efm}* atenuó la virulencia *in vivo* de TX1330RF, pero la complementación en *trans* con *hyl_{Efm}* o *hip* no restauró la virulencia; e) Aislamientos del complejo clonal (CC17) fueron encontrados y los genes *fms20-21* (codifican para pili) se detectaron en plásmidos co-existiendo con *hyl_{Efm}* y *vanA*. Conclusiones: a) *pHyl_{Efm}* media colonización, virulencia y resistencia a antibióticos, su diseminación podría explicar parcialmente el éxito de *E. faecium* como patógeno nosocomial; b) La región *hyl_{Efm}* podría estar comprometida en el incremento de la virulencia, pero *hyl_{Efm}* no explica las propiedades patogénicas del *pHyl_{Efm}*; c) El método PheS* facilita la manipulación genética en *E. faecium* y en otros microorganismos.

ABSTRACT

The *hyl_{Efm}* gene encodes a hyaluronidase like-glycosyl hidrolase and it has been found in nosocomial strains of *E. faecium* (Efm) harboring the plasmid containing *hyl_{Efm}* (pHyl_{Efm}). The aim of this work was to evaluate the co-transfer of pHyl_{Efm} and antibiotic resistance genes (ARG) from clinical strains and characterize the role of the pHyl_{Efm} in the virulence of *E. faecium*. The transferability of the pHyl_{Efm} and ARG was analyzed using filter mating and the study of the plasmids was evaluated by S1 nuclease and I-Ceu-I digestions. The effect of acquisition of the pHyl_{Efm} from a Efm commensal strain (TX1330RF) was studied by mouse peritonitis and urinary tract infection model and a mutant was obtained by using a counter-selection system (PheS*); this mutant was also evaluated with the same animals models. Genotyping of of vancomycin resistant Efm (VREfm) isolates recovered from the Andes region was performed. Results: a) pHyl_{Efm} is carried in megaplasmids and it transfers from clinical strains to *E. faecium*; b) Co-transfer of ARG and the vancomycin resistance genes and gentamicin resistance determinants were genetically linked to *hyl_{Efm}*; c) The acquisition of pHyl_{Efm} by TX1330RF resulted in an increase of virulence in the peritonitis model and improved the colonization of the uroepithelium of the mice in UTI model; d) The deletion of the six genes including *hyl_{Efm}* caused attenuation in the virulence of TX1330RF in the peritonitis model however the complementation with *hyl_{Efm}* and *hip* genes did not restored the virulence; e) Isolates from clonal cluster 17 (CC17) were studied and *fms 20-21* (putative pilus genes) were found on plasmids from almost all VREfm sometimes co-existing with *hyl_{Efm}* and the *vanA* gene. The findings indicate that the acquisition of pHyl_{Efm} could increase *in vivo* virulence and may explain the recent success of *E. faecium* in the nosocomial settings. The *hyl_{Efm}* region might play a rol in the virulence of pHyl_{Efm} however the *hyl_{Efm}* gene by itself appears not to be sufficient to explain the increased virulence properties of the pHyl_{Efm}. A new counter selection system for mutagenesis of *E. faecium* was developed which can be applied to clinical strains that are difficult to manipulate.

4. ABREVIACIONES

Aa:	Aminoácidos
AH:	Acido hialurónico
AFLP:	Análisis de polimorfismos de fragmentos de diferente longitud
ABC:	Casete de unión al ATP
BHI:	Infusión cerebro corazón
<i>cat</i> :	Gen que codifica para cloranfenicol acetil transferasa
CDC:	Centro para el control de las enfermedades infecciosas
CC17:	Complejo clonal 17
CIM:	Concentración inhibitoria mínima
CI:	Colágeno tipo I
CV:	Colágeno tipo V
CS:	Condroitin sulfato
DTT:	Ditritoteitol
ERY:	Eritromicina
ERV:	Enterococo resistente a vancomicina

EFRV:	<i>E. faecium</i> resistente a vancomicina
EFSV:	<i>E. faecium</i> susceptible a vancomicina
FUS:	Acido fusídico
GEN:	Gentamicina
GH84:	Glicosil hidrolasas de la familia 84
GMP:	Guanina mono fosfato
<i>hyl_{Efm}</i>	Gen inicialmente descrito como hialuronidasa, perteneciente a la familia glicosil hidrolasa 84
HLR-GEN:	Altos niveles de resistencia a gentamicina
HLR-STR:	Altos niveles de resistencia a estreptomina
Ig:	Inmunoglobulina
LB:	Luria-Bertani
MLST:	Tipo de secuencia de múltiples locus
MSCRAMM:	Moléculas de adhesión a la matriz celular que reconocen componentes de superficie microbianas
NHSN:	National Health Safety Network
OD:	Densidad óptica
ORF:	Marco de lectura abierto

PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE:	Electroforesis de campo pulsado
RIF:	Rifampicina
SPE:	Espectinomicina
ST:	Tipo de secuencia
STR:	Estreptomicina
SSC:	Cloruro de sodio-citrato de sodio
RBS:	Sitio de unión al ribosoma
RT-PCR:	PCR con transcripción reversa
SRFE:	Extracto fecal de rata estéril
THG:	Transferencia horizontal de genes
TBE:	Tris-ácido bórico-EDTA
TU:	Tracto urinario
UFC/ml:	Unidades formadoras de colonia por ml
UTI:	Infección del tracto urinario
VAN:	Vancomicina
x-gal:	5- bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

5. ALCANCE Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Los enterococos son habitantes naturales del tracto gastrointestinal (TGI) de humanos y animales (1), que también se encuentran en diferentes ambientes como tierra, agua y alimentos (2). Las especies más comúnmente identificadas a nivel clínico son *E. faecalis* y *E. faecium* sin embargo, especies como *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum* y *E. caseliflavus* también han sido reportadas a nivel hospitalario pero con menor frecuencia (1, 3, 4). Hasta los años noventa la proporción de aislamientos nosocomiales de *E. faecalis* y *E. faecium* era 9:1 respectivamente (5-7). No obstante, en los últimos años estas cifras han cambiado incrementando la proporción de las infecciones producidas por *E. faecium* (8). Es así como un estudio realizado en una institución hospitalaria en los Estados Unidos, determinó un incremento en la prevalencia de *E. faecium* de 12.7% a 22.2 % y adicionalmente reportó un aumento de 28.9 % a 72.4 % de los aislamientos resistentes a vancomicina en un período de 10 años (8).

Las cepas de *E. faecium* se caracterizan por presentar resistencia intrínseca a diferentes antimicrobianos y desinfectantes (9-11) tienen la habilidad para sobrevivir por largos períodos de tiempo en superficies inertes y de esta manera se pueden diseminar fácilmente en ambientes hospitalarios (12, 13). Adicionalmente, son capaces de adquirir o donar DNA (especialmente genes de virulencia o de resistencia a antibióticos), proceso que realizan por transferencia de elementos móviles, por transferencia horizontal de plásmidos o por transposones conjugativos (14-18). De esta manera, *E. faecium* se ha

posicionado como un patógeno nosocomial importante en los últimos años gracias a la resistencia que ha adquirido a diferentes antibióticos y a la presencia de otros factores implicados en colonización y virulencia, los cuales también se han propuesto como determinantes importantes que podrían explicar el incremento de la frecuencia de aislamientos de esta especie (19-21).

Es así, como se ha reportado la presencia en *E. faecium* de un gen de virulencia putativo *hyl_{Efm}*, el cual se ha detectado en una región denominada *hyl_{Efm}* que presenta un tamaño aproximado de ~20 kb, la cual se encuentra localizada en plásmidos (22, 23). En esta región se identifican tres grupos de genes; los que presentan homología con genes implicados en regulación, los genes relacionados con transporte de carbohidratos y los genes implicados en la degradación de azúcares como glicosil hidrolasas (GH). Adicionalmente, se ha detectado un gen hipotético (*hip*) y un gen que codifica para una sintetasa GMP.

Finalmente, esta región se encuentra delimitada en sus extremos 5' y 3' por copias invertidas de la secuencia de inserción IS1476 (22). Dentro del grupo de genes de GH se localiza el gen *hyl_{Efm}*, el cual inicialmente fue propuesto que codificaba para una hialuronidasa pero la actividad bioquímica de esta proteína aún no se ha determinado (22). Sin embargo, después análisis de secuencia y tras haber detectado homología en ciertas regiones conservadas y nivel del sitio activo, se ha propuesto que este gen podría pertenecer a la familia 84 de las glicosil hidrolasas (GH84) (Figura 1).

La presencia del gen hyl_{Efm} se ha reportado en un 34 % de un total de 264 aislamientos clínicos evaluados, provenientes de diversos orígenes geográficos de Estados Unidos, los cuales en su mayoría pertenecían a *E. faecium* de origen nosocomial (22). Adicionalmente, en los aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina (EFRV) estudiados, el gen hyl_{Efm} se encontró en un 37.7 % por el contrario, en los aislamientos de origen fecal (recuperados a partir de voluntarios sanos, animales, aguas de desechos y pro-bióticos) este gen no fue detectado (22). Reportes adicionales en Europa, señalan la presencia de el gen hyl_{Efm} en 17 % de un total de 271 aislamientos nosocomiales evaluados mientras que en cepas EFRV de origen clínico este gen fue encontrado en un 27 % (24). Un estudio reciente en una cepa de laboratorio de *E. faecium* portadora del plásmido hyl_{Efm} ($pHyl_{Efm}$) demostró que la presencia de este plásmido incrementa la habilidad del *E. faecium* para colonizar el TGI en ratones y el mismo efecto se determinó cuando se transfirió $pHyl_{Efm}$ a una cepa de EFRV. Por lo tanto, estos resultados sugirieron que la capacidad de colonización del TGI por *E. faecium* podría estar relacionada con la presencia de factores adicionales (determinantes de virulencia) a los genes de resistencia a los antibióticos, que puedan contribuir a una adecuada invasión del TGI por estos microorganismos (23).

Adicionalmente, los datos epidemiológicos y moleculares generados en *E. faecium* en estas dos últimas décadas señalan que este microorganismo ha alcanzado un grado de relevancia clínica que previamente no se había documentado (25). La caracterización molecular de *E. faecium* se ha realizado agrupando inicialmente a los aislamientos

provenientes de los hospitales en un linaje denominado complejo clonal 17 (CC17) el cual congrega diferentes tipos de secuencias (ST) siendo el ST17 el fundador de este grupo, para ello se ha empleado tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST) y el algoritmo eBURST (“enhanced based upon related sequences types”) (25-28). Se ha demostrado que el CC17 está ampliamente diseminado en hospitales y que posee la capacidad de adaptarse a ambientes nosocomiales por adquisición secuencial de mecanismos que le proveen una ventaja selectiva para colonizar el TGI de humanos y producir infección (26, 29). Es así como los aislamientos de *E. faecium* pertenecientes a este genogrupo CC17 se caracterizan por la resistencia a ampicilina, altos niveles de resistencia a quinolonas, frecuente resistencia a vancomicina, presencia del gen *hyl_{Efm}*, de los genes *fms* (*E. faecium* surface proteins) y generalmente presentan una isla de patogenicidad la cual posee el gen *esp_{Efm}* (22, 26, 29-34). Sin embargo, estudios posteriores empleando diferentes algoritmos han propuesto que los hallazgos obtenidos con eBURST acerca del CC17 no son totalmente confiables debido a que la predicción de agrupamiento no es la más adecuada en cepas como *E. faecium* en donde la tasa de recombinación es muy alta (35).

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el papel del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en la virulencia de *E. faecium*. Para ello, se crearon mutantes del gen *hyl_{Efm}* y de la región perteneciente a los genes con funciones putativas metabólicas de degradación de azúcares (GH) y se realizaron construcciones plasmídicas en las cuales el gen *hyl_{Efm}* y el gen hipotético (*hip*) (localizado corriente abajo de *hyl_{Efm}*) se expresaban en *trans* en el

vector pAT392. Se estudió la capacidad de transferencia del plásmido *hyl_{Efm}* junto con genes que codifican para resistencia a glicopéptidos y aminoglicósidos empleando diferentes cepas donadoras del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*. Posteriormente, las cepas portadoras del plásmido *hyl_{Efm}*, las mutantes construidas y las cepas de *E. faecium* con las construcciones derivadas de pAT392 fueron evaluadas en el modelo de peritonitis en ratón. Adicionalmente, la cepa de *E. faecium* portadora del plásmido *hyl_{Efm}* y su respectiva mutante fueron también evaluadas en el modelo infección urinaria en ratón. Finalmente, se realizó una caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de enterococos (concentrándose en plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*), provenientes de un estudio de vigilancia epidemiológica en la región Andina que incluyó un total de 32 hospitales en Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela.

Figura 1.

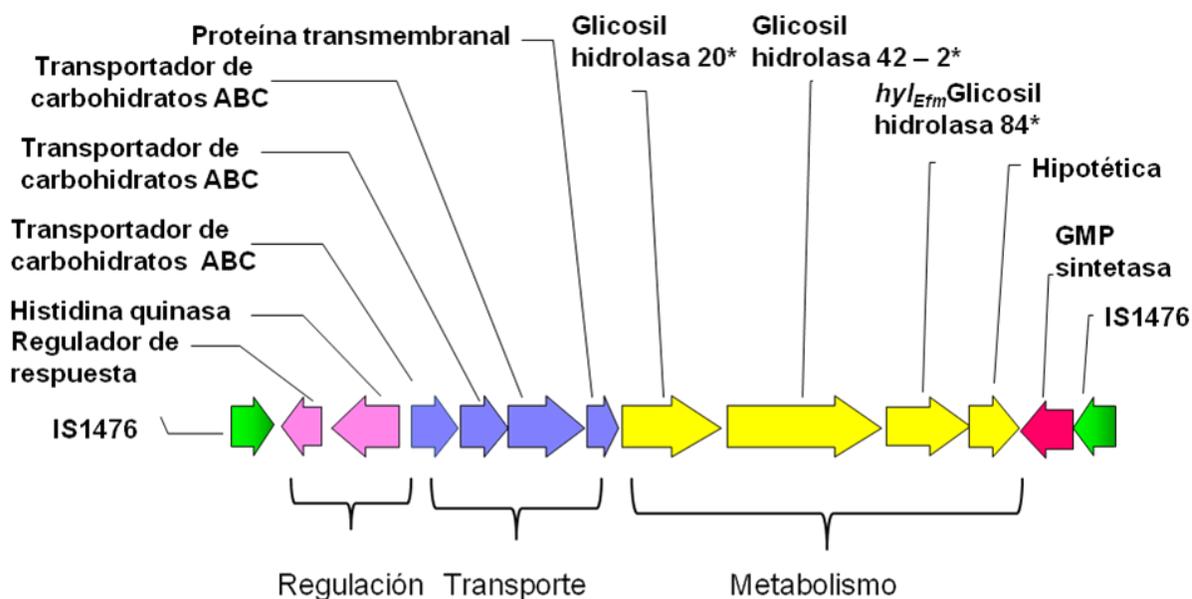


Figura 1. Mapa físico de la región *hylEfm* en *E. faecium*. La función putativa de los genes se observa en la parte superior. Los genes se dividen en tres grupos, implicados en regulación, transporte y metabolismo. Estas funciones putativas fueron obtenidas empleando el análisis por alineamiento de las secuencias de las proteínas de este grupo de genes, utilizando "The Basic Local Alignment Search Tool, (BLAST) por medio de la página electrónica NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Nomenclatura: * familia de Glicosil hidrolasa, ABC: cassette de unión de ATP, IS: secuencia de inserción.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 Aspectos microbiológicos de los enterococos

Los enterococos fueron clasificados inicialmente como cocos Gram-positivos entéricos, del género *Streptococcus* (1). En los inicios de los años treinta fueron incluidos como *Streptococcus* del grupo D, sin embargo en la década del ochenta, estos microorganismos fueron excluidos de esta clasificación y con base en estudios genéticos se creó el género *Enterococcus* (36). El primer reporte de un estreptococo de origen fecal (Enterococo) se originó en 1899 (37) y posteriormente en el mismo año se detectó una bacteria causante

de endocarditis designada como "*Micrococcus zymogenes*" (38) la cual probablemente correspondía a un *Streptococcus faecalis* subespecie *zymogenes* (1). En 1906, Andrewes y Holder aislaron un microorganismo proveniente de un paciente con endocarditis y como consideraron que esta bacteria era bastante característica de la flora proveniente del intestino la denominaron *S. faecalis* (39). En 1919, Orla-Jensen describió el segundo miembro del género enterococo, denominado *Streptococcus faecium*, el cual no presentaba capacidad de producir ácido a partir de azúcares como D-tagatosa, sorbitol y glicerol (1, 40).

Hasta la fecha el género *Enterococcus* spp. está formado por 40 especies (<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>), las cuales pertenecen al reino bacteria, filum firmicutes, clase *bacilli*, orden *lactobacillales* y familia *enterococcaceae*. Los *Enterococcus* spp. son cocos que se presentan en parejas o en cadenas, son anaerobios facultativos, con crecimiento óptimo a 35°C pero lo pueden hacer en un rango de temperatura de 10 a 46°C, son capaces de crecer en medios con altas concentraciones de sal al 6.5% en un caldo con pH ajustado a 9.6 y además sobreviven a 60°C por 30 minutos (41, 42)

Estos microorganismos son capaces de hidrolizar la esculina en presencia de 40 % de bilis, no producen esporas, la mayoría de especies no producen hemólisis en agar tripticasa de soya con 5% de sangre de cordero, algunas especies son móviles como *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* (2) y producen leucina amino peptidasa y pirrolidonil-arilamidasa (sin embargo, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens* y *E. saccharolyticus* no la producen) (2, 43).

Adicionalmente, pueden sobrevivir en desinfectantes químicos como cloro, glutaraldehído y alcohol, lo cual podría contribuir a su sobrevivencia y dispersión en ambientes hospitalarios (44-47).

Los enterococos no contienen citocromo oxidasa pero ocasionalmente producen una pseudocatalasa (36, 48) generando una efervescencia leve en la prueba de catalasa que podría considerarse como positiva. Adicionalmente, casi todas las cepas son homofermentativas produciendo ácido láctico como producto final de la fermentación de glucosa (2). Dentro de las pruebas que permiten la diferenciación de cepas de *E. faecium* se encuentran la producción de ácido a partir de arabinosa y manitol, sin embargo, la mayoría estas cepas no fermentan glicerol, rafinosa y sorbitol. Por otro lado, las cepas de *E. faecalis* se reconocen fácilmente por la producción de ácido a partir de glicerol, manitol y sorbitol pero no arabinosa (41).

De las especies de enterococos descritas hasta la fecha, dos de ellas se destacan principalmente a nivel hospitalario como agentes causales de infecciones en humanos, *E. faecalis* y *E. faecium* (1). Sin embargo, existen otras especies capaces de causar infecciones como: *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* y *E. mundtii* entre otros (1, 3, 4, 49).

6.2 Nicho biológico, fuentes comunes de infección y colonización

Los enterococos se localizan en una gran variedad de ambientes debido a la capacidad de crecer y sobrevivir en condiciones adversas. Es así como se pueden encontrar en una amplia variedad de animales y en humanos, junto con un amplio grupo de microorganismos aerobios y anaerobios haciendo parte de la flora normal intestinal (1). En la mayoría de individuos se encuentran en la materia fecal en una proporción baja (10^4 - 10^6 gr/heces), si se compara con bacterias que se encuentran en mayor número en el TGI como clostridia, bifidobacteria y bacteroides (50-52). Se ha determinado que estos microorganismos se localizan esencialmente en el intestino delgado, especialmente estudios de identificación de especies empleando cultivo y análisis por el RNA 16S han mostrado que se presentan de forma abundante en el yeyuno y el íleon (53, 54). Adicionalmente, los enterococos se observan en menor cantidad en secreciones oro-faríngeas, vaginales, en la piel o en el área perianal (55-57).

El papel que los enterococos juegan en TGI de individuos sanos no está claramente dilucidado sin embargo, estudios en cerdos han demostrado que *E. faecium* puede modular el sistema inmune (58). Adicionalmente, se ha probado que la administración de *E. faecium* permite disminuir la cantidad de *E. coli* recuperada de las heces de los animales (59) y permite disminuir la tasa de infección por *Chlamydia* en el intestino o en la vagina (60). Sin embargo, aún está por determinar si el efecto que presentan los enterococos endógenos en el sistema inmune humano y si la colonización por

enterococos en individuos sanos contribuye a la protección del TGI de la infecciones por microorganismos patógenos.

Por otro lado, la presencia de enterococo en ganado bovino y en mascotas también ha sido documentada, con el fin de determinar si cepas de enterococos en estos animales pueden servir de reservorios para genes de resistencia (61, 62). En gatos, perros, terneros y cerdos aproximadamente del 30 al 50 % de los enterococos encontrados fueron *E. faecalis* mientras que *E. faecium* fue menos abundante (5-15 %). A nivel avícola, la situación es muy diferente: *E. faecium* se encuentra casi en un 60 % de las especies identificadas mientras *E. faecalis* menos del 5 % (63). Otras especies que también han sido aisladas en pollos son *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. mundtii* (64, 65).

En el pasado se consideraba que la fuente de infección por enterococos para los pacientes era la flora endógena, sin embargo muchos estudios han demostrado la transmisión entre pacientes provenientes de las unidades de cuidado intensivo (UCI) (66). Se ha sugerido la transmisión paciente a paciente a partir de las manos el personal de salud y además de otras formas de transmisión que involucran la inoculación directa en catéteres intravenosos o urinarios durante procedimientos rutinarios (67, 68).

Los factores que contribuyen a la colonización o infección con enterococos de pacientes incluyen aquellos que brindan una ventaja selectiva a estos organismos al incrementar la probabilidad de diseminarse en un ambiente determinado, dentro de ellos se encuentran: *i)* presencia de una enfermedad de base previa, *ii)* hospitalización prolongada especialmente en una UCI, *iii)* insuficiencia renal, *iv)* neutropenia y trasplante

(generalmente de hígado y de medula ósea) *v*) catéteres urinarios o vasculares, *vi*) contacto con pacientes colonizados con ERV *vii*) contacto con elementos hospitalarios contaminados, *viii*) la administración de glicopéptidos orales (vancomicina o teicoplanina), cefalosporinas o aquellos que presentan acción contra bacterias anaerobias (metronidazol, clindamicina, imipenem) y *ix*) la proximidad de un paciente colonizado con ERV. Una vez colonizado el paciente con ERV, puede permanecer con el microorganismo por largos períodos de tiempo creando un reservorio de estas bacterias e incrementando la probabilidad de transmisión nosocomial y posterior infección en pacientes susceptibles (57, 69-77).

Las cepas de enterococos también se encuentran en una gran variedad de productos fermentados como quesos, salchichas y vegetales (42, 78-80). En particular son bastante utilizados en la industria de lácteos por sus capacidades proteolíticas y lipolíticas debido a que contribuyen en el proceso de maduración y producción de aroma en los quesos (42, 81). Adicionalmente, también ha sido empleados como pro-bióticos puesto que pueden sobrevivir en el TGI (82).

6.3 Aspectos clínicos

Durante las últimas dos décadas los enterococos han emergido como importantes patógenos nosocomiales generando infecciones como endocarditis (1), bacteriemias (83, 84) por herida quirúrgica (intra-abdominales y pélvicas) (85), infecciones del tracto

urinario (cistitis, pielonefritis, prostatitis y absceso perinefrítico) (83, 86), infecciones de tejidos blandos (piel y catéteres) y en algunos casos meningitis (87).

6.3.1 Bacteriemias

Los enterococos son catalogados como los terceros agentes causantes de bacteriemias nosocomiales en Estados Unidos y en pocos años los enterococos resistentes a vancomicina (ERV) han producido 25 % de las infecciones en las unidades de cuidado intensivo (UCI) (7). El origen de estas bacteriemias proviene principalmente de infecciones del tracto urinario y del TGI, pero también se han reportado provenientes de la vía biliar, de catéteres intravenosos o urinarios infectados, heridas de pacientes quemados o de infecciones de tejidos blandos. Las bacteriemias por enterococos ocurren generalmente en pacientes que se encuentran en condiciones críticas, los cuales han recibido gran cantidad de antibióticos. Algunos estudios sugieren que las infecciones producidas por *E. faecium* tienen mal pronóstico comparadas con las ocasionadas con *E. faecalis*, debido a que *E. faecium* presenta un grado de resistencia a los antibióticos mucho mayor que *E. faecalis*, haciendo que el tratamiento de estas infecciones sea difícil de implementar (88).

6.3.2 Endocarditis

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

afectada que la aortica (73). La infección se puede generar tanto en las válvulas nativas como en las prostéticas, siendo *E. faecalis* la especie más comúnmente aislada en estos procesos (89). También se han reportado casos de endocarditis infecciosa por *E. faecium*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. raffinosus* (41, 90). Esta infección es generalmente observada en hombres de edad avanzada, aunque en mujeres embarazadas también se han documentado casos, siendo el principal origen de infección el tracto genitourinario y TGI (91).

6.3.3 Infecciones Urinarias

Las infecciones del tracto urinario bajo (ITU) son comúnmente causadas por los enterococos (86) y en algunos casos, se ha observado la producción de infecciones urinarias complicadas que generan pielonefritis y abscesos perinefríticos los cuales pueden conducir a bacteriemias (1). Un reporte reciente de la red de hospitales en los Estados Unidos, indicó que los enterococos son los terceros microorganismos más comúnmente aislados a partir de catéteres asociados a ITU, con una frecuencia para *E. faecium* de 40 % y de 20 % para *E. faecalis* (92). Las infecciones del tracto urinario bajo (cistitis) son las más comunes en hombres en edad avanzada; por el contrario, son poco frecuentes en mujeres jóvenes sin ninguna historia de infecciones urinarias o anomalías anatómicas (93).

Las infecciones urinarias son generalmente adquiridas en hospitales o en unidades de cuidado intensivo, donde los pacientes son sometidos a diferentes procesos de

instrumentación, se encuentran generalmente bajo terapia antimicrobiana (lo cual selecciona para resistencia) y presentan un sistema inmunológico debilitado (1).

6.3.4 Infecciones intra-abdominales-pélvicas y de tejidos blandos

Los enterococos son comúnmente aislados a partir de infecciones intra-abdominales y pélvicas junto con otros microorganismos Gram-negativos y anaerobios, pero su papel en estas infecciones es bastante controversial (94). Experimentos en animales han mostrado que los enterococos *per se* no causan sepsis en infecciones intra-abdominales, solo la generan cuando se inyectan con otras sustancias o microorganismos que promueven la formación de abscesos (95). A pesar del amplio debate acerca del papel de los enterococos en las infecciones pélvicas e intra-abdominales se ha demostrado que pueden contribuir a la producción de abscesos y sepsis (1). Adicionalmente, se ha reportado que los enterococos son capaces de producir peritonitis espontánea y empiema en pacientes cirróticos o en falla renal (96, 97).

Se ha determinado también la asociación entre infecciones de la piel y tejidos blandos, pero este es un tópico debatible debido a que la gran mayoría de veces las muestras de origen clínico están acompañadas por otros microorganismos. Las úlceras de decúbito y de pie en pacientes diabéticos son en algunos casos infectadas por enterococos e incluso se han detectado estos microorganismos causando osteomielitis (98).

6.3.5 Infecciones del sistema nervioso central

Los enterococos causan meningitis neonatal, pero también se han visto relacionados con infecciones del sistema nervioso central en niños y adultos (1). Generalmente en estos

casos se han visto asociados a enfermedades previas, pacientes que han sufrido de procedimientos invasivos del sistema nervioso central como cirugías, individuos con malformaciones y todos ellos habían sido tratados con antibióticos (99).

6.4 Epidemiología de la infecciones por enterococos

Los enterococos han emergido en el ámbito mundial como importantes patógenos nosocomiales con un impacto clínico enorme en áreas como UCI, servicios de hematología, unidades de trasplante de médula ósea y unidades de hemodiálisis (70, 100, 101). En Estados Unidos, la aparición de *E. faecium* como un patógeno hospitalario importante se determinó en los años noventa, hecho que se asoció al aumento de resistencia a vancomicina (25). Es así como un informe reciente de la red nacional de hospitales de Estados Unidos (The National Health Care Safety Network, NHSN) reportó una prevalencia de infecciones asociadas a hospitales de 5.6 % y 3.5 % para *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. De igual manera, este reporte ubica a los enterococos en el tercer puesto como agentes causales de infecciones hospitalarias después de *Staphylococcus coagulasa negativo* y *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, el mismo informe indicó que más del 80 % de *E. faecium* aislados de los hospitales eran resistentes a vancomicina y más del 90% eran resistentes a ampicilina (92, 102).

Las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* son las principales causas de infecciones por enterococos en pacientes hospitalizados, en los años noventa el 80 al 90 % de los aislamientos recuperados eran *E. faecalis* y tan solo 5 al 10 % eran *E. faecium* (6, 8). Sin

embargo, en los últimos años el 40 % de las infecciones nosocomiales en Estados Unidos y Europa son causadas por *E. faecium* (6, 8). Este incremento en las infecciones hospitalarias, no solo ocurrió con aumento de las infecciones asociadas a enterococos a nivel clínico, sino que se observó un reemplazo parcial de *E. faecalis* por *E. faecium* (6, 8, 103) (www.earss.rivm.nl, 2006).

6.4.1 Enterococos resistentes a vancomicina

En la mayoría de países europeos la resistencia a vancomicina en los hospitales no se ha extendido de la misma forma que en Estados Unidos sin embargo, en ciertos países la prevalencia del ERV ha aumentado más del 10 % (25). El sistema de vigilancia europeo de resistencia antimicrobiana (EARSS, 2008) reportó tres países que presentaron resistencia a vancomicina en *E. faecium* mayor al 25 %; estos países correspondieron al Reino Unido (28 %, n=88), Irlanda (35 %, n= 390) y Grecia (28 %, n= 368); por el contrario países como Bulgaria, Dinamarca, Malta y Holanda, entre otros, no se detectó la presencia de EFRV. Es relevante anotar que Holanda desarrolla un estricto control en el uso de antibióticos y aplica medidas de control de infecciones cuando se detecta un paciente colonizado o infectado con ERV (www.earss.rivm.nl, 2006).

Las cepas de ERV fueron inicialmente descritas a finales de los años ochenta en Francia y el Reino unido (104, 105), Estados unidos en 1987 (106) y posteriormente, se han documentado diversos reportes alrededor del mundo (14). En Europa, se ha detectado la presencia de un importante reservorio de estos microorganismos en individuos sanos de la comunidad y en animales, hecho que ha sido asociado al uso de promotores de

crecimiento análogos de glicopéptidos en animales destinados para consumo humano y la posible transmisión de dicha resistencia en la cadena alimenticia (107). En contraste, en Estados Unidos las prevalencias de colonización y de infección permanecen altas en pacientes hospitalizados debido al uso indiscriminado de vancomicina y cefalosporinas a nivel clínico (55, 108-112). Este hecho podría contribuir a explicar la diferencia en la prevalencia de ERV entre Estados Unidos y en la mayoría de países de Europa (107, 113, 114).

De la misma manera, también se han descrito brotes nosocomiales de ERV en Asia y Australia (115-118). En Suramérica, el primer reporte de *E. faecium* resistente a vancomicina se documentó en 1996 en Argentina (119), luego en Brasil (120) y posteriormente en un hospital en Colombia (121). Así mismo, los resultados de la red SENTRY obtenidos de un programa de vigilancia epidemiológica indicaron, que la tasa de resistencia a vancomicina en aislamientos provenientes de bacteriemias en los enterococos en Latinoamérica se incrementó de 0 % a 5 % (122). Por otra parte, en un estudio de vigilancia epidemiológica desarrollada en 15 hospitales Colombianos (en cinco ciudades) en el período 2001-2002 reportó una frecuencia de resistencia a glicopéptidos de 9.7 % junto con evidencia de diseminación clonal de estos aislamientos (123).

La resistencia de los enterococos a los glicopéptidos se caracteriza por la síntesis de precursores de peptidoglicano terminados en D-lactato (D-Lac) o D-serina (D-Ser) y la eliminación de los precursores que son sintetizados normalmente por la célula es decir los terminados en D-alanina (D-Ala) (124-129). Hasta el momento, se han descrito siete

fenotipos de resistencia a glicopéptidos bien caracterizados, en el cual el peptidoglicano terminal es D-Ala –D-Lac representado por los grupos: VanA, VanB y VanD (130-134) y los grupos en los cuales el peptidoglicano termina en D-Ala-D-Ser: VanC-1, VanC-2/3 VanE, VanG, VanL, (132, 135-140) (Tabla 1).

6.4.2 Enterococos resistentes a ampicilina

La presencia de ERV fue precedida por la aparición de cepas de *E. faecium* resistentes a ampicilina (ERA), en los inicios de los años ochenta en Estados Unidos, seguido de una rápida emergencia de aislamientos susceptibles a vancomicina y resistentes a ampicilina en Europa en la siguiente década (141-144). En Holanda por ejemplo, la prevalencia de ERV es baja en hospitales sin embargo, un importante incremento de infecciones ocasionadas por ERA también fue demostrado (142, 145). Es así como un estudio reciente realizado en hospitales Holandeses reveló tasas de colonización intestinal con ERA de más del 40% en los pacientes que fueron evaluados (142). Es así como una rápida y simultánea epidemia de *E. faecium* resistentes a múltiples antibióticos, apareció en las dos últimas décadas en todo el mundo generando un cambio dramático en la prevalencia de las especies que producen infección a nivel nosocomial (25). Adicionalmente, un estudio reciente de 53 aislamientos de origen clínico de *E. faecium* obtenidos desde 1971 a 1994 en Estados Unidos, determinó la presencia de 16 ST distintos asociados en su mayoría al CC17, identificados en 9 regiones diferentes de Estados Unidos.

Tabla 1. Fenotipos de resistencia a vancomicina en enterococos

	Resistencia adquirida						Resistencia intrínseca
	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanC
Fenotipo	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanC
Gene de ligasa	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>	<i>vanL</i>	<i>vanC</i>
CIM vancomicina (µg/ml)	16-1000	4-32	64-128	8-32	16	8	2-32
CIM teicoplanina (µg/ml)	16-512	0.5-1	4-64	0.5	0.5	S	0.5-1
Peptidoglicano	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser
Expresión	Inducible	Inducible	Constitutivo	inducible	inducible	inducible	constitutivo/ inducible
Localización	Plásmido o Tn/ Cromosoma	Plásmido o Tn/ Cromosoma	Cromosoma	Cromosoma	Cromosoma	Cromosoma?	Cromosoma
Transferencia por conjugación	+/-	+/-	-	-	+	-	-
Distribución entre especies de enterococos	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. raffinosus</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. mundii</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i> ,	<i>E. faecalis</i> ,	<i>E. faecalis</i> ,	<i>E. gallinarum</i> : <i>vanC-1</i> , <i>E. casseliflavus</i> : <i>vanC2/3</i>

Los resultados de este estudio mostraron que los primeros aislamientos de *E. faecium* pertenecientes al CC17 hicieron parte de un brote en 1982 en Richmond, presentaron resistencia a ampicilina, la mayoría altos niveles de resistencia a estreptomicina y todos estos aislamientos eran portadores de los genes de virulencia potenciales como *fms* (*E. faecium* surface proteins); sin embargo, una gran parte de ellos carecían de los genes *esp_{Efm}* y *hyl_{Efm}* (146). Estos hallazgos concordaban con la hipótesis que la resistencia a ampicilina pudo haber sido uno de los primeros pasos para la adaptación de este genogrupo CC17 de *E. faecium* asociado a hospitales (26, 146). Adicionalmente, este trabajo determinó que el nivel de resistencia a ampicilina (representado por un incremento en las CIM de este antibiótico) incrementó con el tiempo, resultado que es consistente con el hecho que mutaciones o sobreexpresión del gen *pbp5* podrían haber evolucionado y de esta forma generar una disminución de la afinidad por ampicilina. Este estudio también señaló, que la resistencia a vancomicina emergió posteriormente (primeros aislamientos en 1990 portadores de *vanA*), a la resistencia a ampicilina, resultados que están totalmente relacionados con los reportes Europeos (27, 30).

6.4.3 Epidemiología molecular de las infecciones por *E. faecium*

Los métodos de tipificación molecular son esenciales para determinar la epidemiología de los microorganismos y caracterizar brotes a nivel hospitalario. Los primeros métodos moleculares de tipificación en enterococo se basaron en el análisis del perfil de plásmidos, los cuales incluían análisis de los mismos utilizando enzimas de restricción

(147, 148). Posteriormente, en los años ochenta se desarrollaron técnicas adicionales como el método de tipificación genética denominado electroforesis de campo pulsado (PFGE), el cual se fundamenta en la separación de DNA cromosomal digerido con endonucleasas en una matriz de agarosa sometida campos eléctricos que se alternan en dos direcciones (149).

La PFGE fue adaptada para su uso en enterococos (150, 151) y es considerada por muchos laboratorios como la técnica estándar de oro para la tipificación molecular. Permite la evaluación de cepas que se encuentran asociadas en tiempo y ubicación pero no es muy útil para hacer seguimiento de las mismas en estudios ancestrales evolutivos. Por otra parte, presenta como inconvenientes la dificultad de intercambio de información entre laboratorios, debido a la presencia de múltiples protocolos que hacen difícil la interpretación de los patrones electroforéticos (14, 152-154).

Adicionalmente, la metodología de análisis de polimorfismos de diferente longitud ("amplified fragment length polymorphism, AFLP) se desarrolló con el fin de estudiar relaciones genéticas entre cepas, la cual permite análisis de polimorfismos entre fragmentos pequeños que han sido previamente amplificados y posteriormente digeridos con enzimas de restricción (155). Esta técnica a pesar de ser rápida y reproducible, no es suficientemente adecuada para análisis moleculares a nivel mundial, debido a que se generan variaciones en la intensidad de las bandas, lo cual puede producir resultados ambiguos para la interpretación de grupos clonales; por lo mismo presenta problemas para el intercambio de información entre laboratorios (14, 156).

Por lo tanto, se requería de la implementación de una metodología que permitiera comparación de cepas a nivel mundial y que pudiera manejar un sistema estandarizado para su interpretación. Es así como, en los años noventa se desarrolló la técnica de tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST), que identifica la variación alélica de múltiples genes, para lo cual se tipifican alelos a partir de secuencias de DNA de 400 a 500 bp de 6 a 7 genes “housekeeping” (genes de expresión constante y que son esenciales para la bacteria). A cada alelo se le asigna un número siendo el resultado un perfil numérico de alelos, el cual se denomina secuencia tipo (ST). Su valor radica en el concepto que las poblaciones bacterianas han evolucionado dado a pequeños cambios en los genes “housekeeping” (156). Esta metodología ha permitido la creación de una base de datos mundial formada por secuencias de estos genes (www.mlst.net de acceso libre), que permite la comparación entre microorganismos de una manera más precisa y objetiva. El MLST surge como una técnica que ha probado ser una herramienta muy poderosa para el estudio global de la epidemiología, para el reconocimiento y el seguimiento de la diseminación de clones bacterianos virulentos, epidémicos y multi-resistentes (157). Esta metodología cuenta con esquemas de tipificación para diferentes especies bacterianas, incluyendo *E. faecium* (158).

Es así como, empleando estas metodologías moleculares se ha logrado una caracterización de la epidemiología molecular de aislamientos de EFRV. En los años noventa, diversas publicaciones reportaron la aparición de cepas de ERV en los hospitales de Estados Unidos, las cuales se caracterizaban por la diseminación de un número

limitado de clones asociados a los hospitales, según resultados que fueron obtenidos empleando PFGE. Los primeros estudios mostraron que los brotes hospitalarios de *E. faecium* fueron inicialmente generados por uno o dos clones circulantes de ERV, pero gradualmente las epidemias se produjeron por la presencia de múltiples clones en diferentes hospitales de Estados Unidos (159). La presencia de policlonalidad pudo generarse como resultado de la introducción de nuevos clones en los hospitales, o por transferencia horizontal de genes de resistencia a vancomicina a múltiples cepas, característica que ha sido descrita ampliamente en hospitales de Estados Unidos, Europa y Asia (32, 160-164). De esta manera, en la década de los noventa se logró evaluar la relación genética de aislamientos de *E. faecium* empleando PFGE sin embargo, con esta metodología no era posible determinar micro-variaciones (debido a su alto poder discriminatorio) característica necesaria para identificar relaciones entre cepas circulantes en una área geográfica específica como lo es un hospital, pero no para generar conclusiones acerca de relaciones evolutivas (25).

Posteriormente, la técnica de AFLP (“amplified fragment length polymorphism”) permitió por primera vez mostrar que los clones de EFRV provenientes de los hospitales eran genotípicamente diferentes a la flora normal (155). AFLP logró agrupar 255 cepas de EFRV en genogrupos asociados a un huésped específico y detectó la presencia de un grupo asociado a cepas provenientes de animales como terneros y pollos, diferente a las de origen nosocomial (155).

Las cepas provenientes de cerdos y humanos sanos formaron un grupo único, sugiriendo una relación epidemiológica entre estos dos nichos ecológicos. Por el contrario, la presencia de cepas hospitalarias pertenecientes a otro linaje indicaba que estas eran genéticamente diferentes de las cepas provenientes de flora fecal de individuos sanos (155). Una posible explicación para estos resultados, se debe a que las cepas de EFRV provenientes de ambientes nosocomiales han sido adquiridas por los pacientes en el hospital y en parte o en su totalidad, han reemplazado la flora endógena de los mismos, posiblemente por selección debido al uso de antibióticos de amplio espectro y la adquisición de diversos determinantes de virulencia (25).

Homan y colaboradores desarrollaron un esquema de MLST para *E. faecium*, el cual generaba una base de secuencias genómicas que permitía estudiar la variación genética de las cepas empleando múltiples loci (158). Este principio es ideal debido a que la variación de uno o dos alelos (generada por recombinación que altera algún alelo) no limita que la cepa pueda ser reconocida en el mismo complejo clonal empleando técnicas de agrupamiento genético (158). Este primer análisis de 123 aislamientos de *E. faecium* resistente y susceptible a vancomicina mostró alta similitud con los resultados obtenidos empleando AFLP y reveló la presencia de un linaje denominado “clonal cluster 1” (CC1), el cual estaba formado por cepas de origen nosocomial (158).

Posteriormente, un estudio que evaluaba un número mayor de aislamientos de (EFRV) y de *E. faecium* susceptible a vancomicina (EFSV) (n=411), de diversos orígenes geográficos y diferentes fuentes (humano y animal) (27), confirmó la presencia de un grupo de cepas

de origen nosocomial, que se agrupaban en un CC el cual fue obtenido empleando el algoritmo eBURST (27). En este estudio, los autores identificaron la presencia de un linaje genético de *E. faecium* denominado “clonal cluster 17” (CC17), el cual agrupaba la mayoría de los aislamientos evaluados y provenía de un linaje único previamente conocido como C1 (158). Este CC17, (denominado así debido a que el fundador presuntivo de este grupo pertenece al tipo de secuencia 17 (ST17) probablemente se adaptó al ambiente hospitalario por medio de variación genética, utilizando para ello mutaciones y recombinaciones homólogas convirtiéndose así en un genotipo de amplia distribución en hospitales de todo el mundo (27). Es así como, la presencia del CC17 se ha reportado en países como Holanda (145, 165, 166), Italia (167-169), Alemania (32), Suecia (170), Korea (116), Singapur (171), España (172), USA (146) Brasil (173) Paraguay (174) y Chile (175), entre otros.

Estudios recientes empleando un algoritmo adicional denominado “global optimized” (goeBURST) (35) señalan que el ST17 y sus variantes de uno y de dos alelos no se agrupan en un complejo separado previamente denominado CC17 (25). Por el contrario, empleando esta metodología de agrupamiento, se obtiene una división del CC17 en pequeños grupos dentro de los cuales encuentran casi el 60 % de los aislamientos contenidos en la base de datos de MLST los cuales son de origen humano, comunitario y animal. Estos trabajos indican que empleando algoritmos como eBURST un 40% de las relaciones genéticas obtenidas no son adecuadas, debido a que poblaciones como *E. faecium* presentan un grado de recombinación y mutación muy alta (35). Adicionalmente,

sugieren que *E. faecium* no comparte un ancestro común reciente y que debiera dividirse en diferentes complejos clonales en los cuales se destacan el ST5, ST9, ST17, ST18, ST22, ST26, ST78, ST192 y ST236. Este trabajo también señala que los aislamientos agrupados en el CC17 probablemente no han evolucionado a partir del fundador inicial el ST17, por el contrario, los aislamientos de *E. faecium* de origen hospitalario han evolucionado independientemente a partir de diferentes clones ancestrales (ST17, ST 18, ST78, ST192)(35).

Los resultados de este estudio fueron posteriormente confirmados, empleando un algoritmo diferente (Clonal Frame), sugiriendo la presencia de subgrupos fundadores del CC17 (25). Sin embargo, es de anotar que a pesar de que estos hallazgos señalan la carencia de un ancestro común perteneciente al CC17, la mayoría de los aislamientos de origen nosocomial son genéticamente diferentes de los aislamientos de origen comunitario y animal (25). También, se observa que estas cepas nosocomiales presentan varios determinantes comunes como la resistencia a ampicilina, a ciprofloxacina, genes de virulencia putativos y secuencias de inserción (28). Estos determinantes de virulencia encontrados en esta subpoblación son esencialmente islas de patogenicidad que presentan el gen *esp_{Efm}* (176) así como también el gen *hyl_{Efm}*, (22) y los genes *fms*(33, 177) entre otros.

6.5 Patogénesis de las infecciones por enterococos

El género enterococo habita en el TGI como comensal en armonía con el huésped y con otros microorganismos pertenecientes a la flora gástrica. Es así como, la flora comensal juega un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal. (178-181). A nivel del huésped las condiciones que alteran esta armonía son el tratamiento antibiótico, un sistema inmune comprometido, presencia de catéteres urinarios o vasculares en los pacientes y permanencia de largo tiempo en UCI. Por parte del microorganismo, los factores que influyen generalmente son la adquisición de nuevos determinante genéticos como factores de virulencia y genes de resistencia entre otros, que le permitan a la bacteria evadir las defensas del huésped y colonizar nuevos nichos biológicos (182).

Es así como uno de los primeros eventos que permite que se genere una infección, consiste en la colonización de las mucosas humanas por parte de las bacterias (183). En el caso específico del enterococo, estos microorganismos cuentan con proteínas de superficie que actúan como adhesinas, que son generalmente de naturaleza protéica, glicoprotéica, lipoprotéica o glicosídica. Una vez iniciado el proceso de adherencia, el microorganismo puede invadir otros órganos cercanos e ingresar al sistema linfático o a la circulación sanguínea, lo cual genera diversas alteraciones patológicas y respuestas inflamatorias (184). Inicialmente, los enterococos invaden las células entéricas de los seres humanos generando un estado de colonizador asintomático del TGI, el cual se produce después que los pacientes ingresan al hospital (185). Posteriormente, los

enterococos han sido internalizados por las células del íleon, colon o por macrófagos intestinales, se translocan desde el lumen del intestino delgado hasta los nódulos linfáticos, el hígado y el bazo, lo que favorece que atraviesen la pared intestinal y alcancen las vías linfáticas y diferentes sitios anatómicos generando infección (186-188). Adicionalmente, los enterococos también pueden ser transportados desde el intestino hasta el sistema circulatorio por colonización previa del tracto urinario y de esta manera también producir infección.

6.5.1 Determinantes de patogenicidad en *E. faecalis*

La virulencia en los enterococos ha evolucionado muy probablemente de una forma similar a linajes patogénicos de otras especies bacterianas (189) como por ejemplo *Escherichia coli* O157 (190) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (191), entre otros. Es así como, *S. aureus* ha adquirido determinantes de virulencia por medio de intercambio genético, característica que le permite obtener plásmidos, transposones o elementos cromosomales como el SCCmec (192). De la misma manera, *E. coli* posee islas de patogenicidad que codifican para numerosas toxinas, adhesinas y diversos genes de virulencia (193). Una vez estos elementos se integran en los huéspedes bacterianos se generan nuevos linajes patogénicos capaces de adaptarse, sobrevivir y diseminarse en su nuevo nicho biológico (194).

En enterococos, los determinantes genéticos que han adquirido algunas especies han incrementado la capacidad de este género para generar infección, por medio de la

producción de toxinas citolíticas, gelatinasa, sustancia de agregación, producción extracelular de peróxido y proteínas de superficie entre otros (194). Así estas proteínas de tipo adhesina le permiten al enterococo adherirse a un amplio rango de proteínas de la matriz extracelular (ECM) como colágeno, fibrinógeno, trombospondina, lactoferrina y así mismo al epitelio renal y oral de humanos y animales (195).

6.5.1.1 Sustancia de agregación (AS)

Dentro de los factores de virulencia más importantes en *E. faecalis* se encuentra la sustancia de agregación (AS), proteína que ha sido bien caracterizada en términos de función y de contribución a nivel de virulencia siendo la primera proteína descrita en enterococo que presenta el motivo LPxTG. Este motivo se localiza en el C-terminal de las proteínas, es el sitio de acción de las enzimas sortasas y está formado por una región de aminoácidos conservados como leucina (L), prolina, (P) cualquier aminoácido (X), treonina (T) y glicina (G) (15, 196). Adicionalmente, la AS presenta dos motivos RGD (arginina, lisina y aspartato) (Figura 2) que también son encontrados en fibronectina, comúnmente asociados con proteínas de unión a integrinas (197, 198) lo cual indica que esta adhesina tiene un papel importante en la unión a células eucariotas (182). Esta proteína esta codificada por los genes *asp1*, *asc10* y *asa1* los cuales se localizan en plásmidos inducibles a feromonas denominados pPD1, pCF10, pAD1, respectivamente (199).

La expresión de los genes que codifican para AS es inducida por feromonas (los cuales son oligopéptidos de 7 a 8 aminoácidos (aa) generalmente de tipo hidrofóbico) que son

secretados por enterococos libres de plásmidos (16). Estos péptidos promueven la expresión de la proteína AS en la superficie celular estimulando el contacto físico entre una cepa donadora portadora del plásmido y una cepa receptora (16). La AS *in vitro* potencia la conjugación de plásmidos (16) permite la adhesión a células tubulares renales y promueve la internalización y la supervivencia en los fagocitos (186, 197, 200).

La AS *in vivo* contribuye en la patogénesis de las infecciones por una variedad de mecanismos (194) como formación de grandes agregados celulares, incrementa la hidrofobicidad en la superficie celular y adhesión a las proteínas de la ECM (194, 201, 202); en el modelo de endocarditis estimula el incremento en el tamaño de las vegetaciones en las válvulas cardíacas del conejo (188, 197, 203). Experimentos empleando la mutagénesis por transposones han indicado que los dominios de la AS tienen un papel *in vivo* importante, demostrando que en el dominio N-terminal variable de la proteína y el C-terminal desempeñan un papel importante en la agregación entre las células donadoras del plásmido y las células receptoras (204) (Figura 2).

Figura 2.

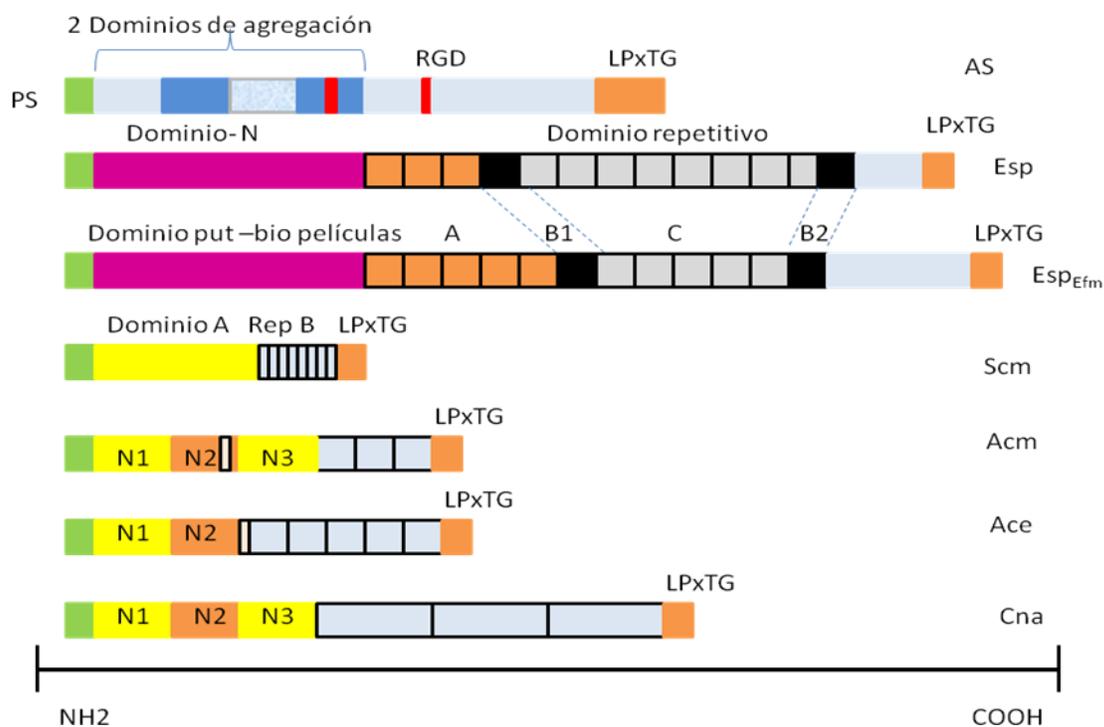


Figura 2. Proteínas de superficie que presentan el motivo LPxTG en enterococo. Se muestra la organización estructural de las proteínas en *E. faecalis*: sustancia de agregación, AS, proteína de superficie, Esp y proteína de unión a colágeno, Ace. Proteínas en *E. faecium*: proteína de superficie (Esp_{Efm}), segunda proteína de unión a colágeno (Scm), proteína de unión a colágeno, (Acm), proteína de unión a colágeno en *S. aureus* (Cna). Nomenclatura: PS, péptido señal; N1, N2, N3, subdominios con estructura de IgG; RGD, motivo arginina, glicina y aspartato (196).

6.5.1.2 Proteína de superficie (Esp)

El gen *esp* fue inicialmente detectado en un *E. faecalis* resistente a gentamicina (MMH594) aislamiento que fue causante de una epidemia hospitalaria a mediados de los años ochenta (205, 206). Pocos años después se determinó que este gen existía en un elemento genómico de gran tamaño (153 kb), que presentaba características de una isla de patogenicidad (PAI) con un bajo contenido de GC (32.2 %) comparado con el resto del

genoma de *E. faecalis* (promedio 37.5 %) y presentaba determinantes de virulencia, reguladores transcripcionales y transposasas (207).

El gen *esp* codifica para la proteína de superficie denominada Esp (“enterococal surface protein”), polipéptido de gran tamaño que es altamente conservado en sus dominios repetitivos y es detectado frecuentemente en aislamientos de origen clínico (29, 182). Es así como Willems y colaboradores reportaron que 41 % de los aislamientos provenientes de pacientes con endocarditis presentaban este gen mientras que solo el 3% de los aislamientos provenientes de heces eran portadores de dicho gen (29). Estos resultados sugirieron que la presencia de *esp* en aislamientos de *E. faecium* podría tener un papel relevante a nivel de virulencia (29, 206). Esta proteína tiene en su N-terminal un péptido señal, un dominio putativo que podría estar implicado en la formación de bio-películas y en el C-terminal un dominio de anclaje al peptidoglicano con un motivo (Y/F PXTG) el cual es reconocido por sortasas, las cuales permiten anclar covalentemente la proteína Esp a la pared celular (208) (Figura 2).

Se han presentado resultados conflictivos acerca del papel de Esp en la formación de bio-películas, Tendolkar y colaboradores reportaron un estudio en el cual la formación de bio-películas fue reducida cuando se evaluó una mutante isogénica comparada con la respectiva cepa productora de la proteína Esp (209). Aún más, estudios adicionales han mostrado que el dominio N-terminal de Esp parece ser suficiente para la producción de este fenotipo, hecho que fue comprobado cuando una mutante de Esp que no expresaba el dominio N-terminal presentó menor capacidad de formar bio-películas (210); sin

embargo, otros reportes indican que Esp no es necesaria para la producción de biopelículas (211, 212).

Por otro lado, ensayos *in vivo* mostraron el papel de Esp en la colonización y la persistencia en el tracto urinario (TU) empleando para ello un modelo animal de infección urinaria, en el cual se comparaba una cepa Esp positiva y una cepa Esp negativa (mutante isogénica). Los resultados mostraron que la cepa Esp positiva fue más prevalente en la vejiga y la orina de los ratones, mientras que en los animales que fueron infectados con la respectiva mutante se obtuvo una menor colonización al TU con esta cepa. Estos hallazgos, sugirieron que Esp puede promover la adhesión bacteriana al uro-epitelio a través de componentes específicos como mucina o uroplakina (proteínas integrales que se encuentran en el uro-epitelio) (213). Adicionalmente, los estudios de colonización intestinal murina han mostrado que esta proteína no está involucrada en la colonización o en la adhesión a células de endocarcinoma colorectal (214).

6.5.1.3 Proteína de unión al colágeno (Ace)

La proteína de superficie denominada “adhesion of collagen from E. faecalis” (Ace), fue la primera proteína descrita perteneciente a la familia de las adhesinas conocidas como “microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules”, (MSCRAMMs) en enterococos (215). Ace es ubicua entre cepas de *E. faecalis* comensales y patógenas, por lo cual se ha propuesto que se puede utilizar para identificar las cepas de *E. faecalis* por hibridación (216, 217). Esta adhesina media la unión al colágeno tipo I, colágeno tipo IV,

laminina y dentina (215, 218, 219) y fue identificada con base en homología de secuencia con el factor de virulencia *cna* del *S. aureus* el cual se encuentra bien caracterizado (215, 219).

La proteína Ace está formada por un dominio N-terminal altamente conservado denominado A, el cual presenta un péptido señal y dos subdominios N1 y N2. En el C-terminal se encuentra un dominio variable que posee de 2 a 5 repeticiones de 47 aa, precedidas de repeticiones de 20 aa (el papel que presentan estas repeticiones no está claro aún) y un motivo LPxTG que permite el anclaje a la pared celular (219) (Figura 2). Adicionalmente, se ha demostrado que Ace es inducida a altas temperatura (46°C) y se ha determinado su expresión *in vivo* cuando se ha expuesto en presencia de suero o componentes de la ECM como el colágeno a temperatura fisiológica (37°C) (219).

Estudios estructurales del ligando con una región de Ace han indicado que el subdominio A está formado por N1 y N2 (estructura de Ig), los cuales han sugerido por análisis que se unen al colágeno por el mecanismo denominado “collagen hug”. Por este mecanismo la proteína Ace adopta una conformación abierta (empleando los dominios N1 y N2), dentro de la cual el colágeno es atrapado, posteriormente se genera un cambio molecular produciendo una estructura denominada de conformación cerrada (el colágeno es firmemente anclado) y finalmente el dominio C-terminal asegura la unión del sustrato para formar un complejo adhesina ligando muy estable (220). Este mecanismo es una variante del mecanismo denominado “dock, lock, latch”, descrito en la adhesina de fibrinógeno SdrG de *S. epidermidis* (220). Adicionalmente, se ha demostrado la

producción de anticuerpos contra la proteína Ace sugiriendo la importancia de la expresión *in vivo* de esta proteína; también se ha visto su expresión en presencia de colágeno tipo I, tipo IV y laminina a una temperatura de 46°C (217).

Recientes estudios han mostrado el efecto de este gen a nivel del modelo de endocarditis en rata con infección mixta, en el cual se observó atenuación por parte de la mutante del gen *ace* comparada con la cepa salvaje; sin embargo, en el modelo de peritonitis en ratón no se detectaron diferencias entre estas dos cepas. Adicionalmente, se encontró un aumento en la colonización de las válvulas cardiacas (a las 4h) de la cepa mutante complementada con un plásmido de expresión portador del gen *ace* (pAT392::*ace*), comparada con la cepa portadora del plásmido pAT392 (sin la presencia de *ace*); estos resultados sugieren que la proteína Ace es importante para *E. faecalis* en el proceso inicial de adherencia a las válvulas cardiacas. Además, se identificó la expresión *in vivo* de vegetaciones recuperadas de los animales infectados con la cepa *E. faecalis* OG1RF portadora de este gen. Más aún, se encontró que los animales inmunizados con inmunoglobulinas anti-Ace fueron menos susceptibles a la infección por la cepa de *E. faecalis* OG1RF que los que no fueron inmunizados, sugiriendo de esta manera la importancia de Ace en la patogénesis de este microorganismo en el modelo experimental de endocarditis (221).

6.5.1.4 Proteínas productoras de pili

La habilidad de los enterococos de producir bio-películas es un elemento que contribuye en enfermedades endodónticas, infecciones urinarias y endocarditis (195). Las bacterias Gram-positivas producen estructuras que se exponen en la superficie celular, denominadas pili las cuales están formadas por fibras multiméricas (pilinas) que presentan motivos LPxTG, las cuales son ancladas covalentemente a la pared celular por la acción de una enzima sortasa (196, 222).

Estudios *in silico* han revelado que *E. faecalis* presenta por lo menos dos grupos de genes implicados en la producción de pili y bio-películas. El operón *ebp* (“endocarditis and biofilm associated pili”) el cual está formado por tres genes encargados de la producción de subunidades del pili (*ebpA*, *ebpB*, *ebpC*), una sortasa C (*srtC*) (223) y una proteína con función de regulación (*ebpR*) (224); este operón está relacionado con la producción de bio-películas y una mutante no piliada presentó atenuación en el modelo de endocarditis en rata (223). Por otro lado, el operón *bee* (“biofilm enhancer in enterococo”) está formado por tres genes denominados *bee-1*, *bee-2*, *bee-3* y por dos sortasas *str-1* y *str-2* el cual está localizado en un plásmido que se transfiere con alta eficiencia en el proceso de conjugación y se encuentra esporádicamente en un 5 % de *E. faecalis* estudiados (225).

6.5.1.5 Citolisina (Cyl)

La citolisina es una proteína hemolítica encontrada hasta en el 60% de los aislamientos de *E. faecalis* (226, 227). Los genes que codifican esta proteinasa localizan en plásmidos

(ocasionalmente se ha reportado en el cromosoma) y dentro de ellos el más comúnmente estudiado es el denominado pAD1 (228). Esta citolisina esta codificada por el operón *cyLLLSMBAI*, el cual produce una reacción β -hemolítica que promueve la lisis los eritrocitos, así como también es bactericida para otras bacterias Gram-positivas (226, 229). Los genes *cyLI* y *cyLs* codifican para las subunidades estructurales de la citolisina requeridas para la actividad hemolítica y bactericida de la proteína (226) y los genes adicionales *cyIM*, *CyIB*, *cyIA*, *cyII* están involucrados en las modificaciones post transcripcionales de la citolisina (230). En el modelo de endoftalmitis se ha podido demostrar que la citolisina produce una disminución de la función retinal en los conejos (231, 232). Así mismo, en el modelo de endocarditis observaciones similares han detectado la producción de vegetaciones debido a la presencia de la citolisina, las cuales incrementan significativamente la mortalidad de los animales estudiados (233).

6.5.1.6 Gelatinasa (GelE) y proteasa (SprE)

El gen *gelE* codifica para una proteína secretada de tipo extracelular metaloproteasa dependiente de zinc (117) denominada gelatinasa, la cual al hidrolizar gelatina, colágeno y caseína, suministra nutrientes a la bacteria por degradación del tejido del huésped. Adicionalmente, esta proteína se encuentra relacionada con la producción de bio-películas (234) y también se ha demostrado que la gelatinasa presenta un papel importante en virulencia *in vivo* cuando se ha evaluado en los modelos animales de

peritonitis y endocarditis (235, 236) en el de endoftalmitis (237) y en modelo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (238).

El gen *gelE* se encuentra en el cromosoma regulado por medio del “quórum sensing” (239) y corriente abajo de este se encuentra un gen adicional denominado *sprE*, que codifica para una proteasa de serina y es co-transcrito con *gelE* (240). La transcripción de estos genes es regulada de una forma dependiente por medio del sistema *fsr* (fecal streptococci regulator) (238, 239), el cual está formado por los genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, que se encuentran corriente arriba de los genes *gelE* y *sprE* y presentan homología con el sistema al *agrBCA* de *Staphylococcus aureus* (239). Este sistema inicialmente se postulaba como regulador solamente de los genes *gelE* y *sprE* sin embargo, estudios recientes han demostrado su actividad como regulador general en *E. faecalis* (224). El gen *fsrA*, se transcribe de forma monocistrónica como un regulador de respuesta, el gen *fsrB* produce un oligopéptido señal, feromona conformada por 11 residuos peptídicos denominado “gelatinase bio synthesis activating pheromone (GBAP) y el gen *fsrC* codifica para una proteína quinasa, capaz de sensar la presencia del GBAP. Por lo tanto, cuando el GBAP se acumula en la transición de fase exponencial a fase estacionaria los genes *gelE* y *sprE* son inducidos (241).

Diferentes estudios del sistema *fsrABC* y de la gelatinasa en *E. faecalis* OG1RF han señalado que estos genes son importantes en la producción de bio-películas (242) así como también, en virulencia en diferentes modelos animales. Por ejemplo mutantes de *fsr* y del gen *gelE* han mostrado atenuación en el modelo de peritonitis de ratón (239) en

C. elegans (238), en el modelo de endoftalmitis en conejo (243) y en el modelo de endocarditis (236).

6.5.1.7 Carbohidratos de la pared celular y polisacáridos capsulares:

Debido a la complejidad y la habilidad de conferir resistencia a la fagocitosis, los componentes capsulares juegan un papel importante en el proceso de patogénesis, puesto que pueden de esta forma ayudar al microorganismo a invadir la respuesta inmune (182). Se ha descrito un operón que codifica para la síntesis de polisacárido capsular el cual es expresado por aislamientos clínicos de *E. faecalis* (244). Los estudios de la composición de fracciones de carbohidratos de la pared celular mostraron que estaba compuesta por glicerol fosfato, glucosa y galactosa y además los análisis de secuencia indicaron la presencia de un operón que está organizado en un grupo de once genes designados *cpsA-K*. Los estudios de mutagenesis de este operón por medio de una inserción en el gen *cpsI* mostraron que la mutante presentaba un aumento en la susceptibilidad a la fagocitosis *in vitro* y presentaba mejor habilidad para persistir en los nódulos linfáticos de los ratones (244).

Un operón adicional también ha sido descrito, el cual se denomina “*enterococcal polysaccharide antigen*” (*epa*) que codifica para polisacáridos productores de ramnosa y está formado por diez y ocho genes. Estos genes se han encontrado ampliamente distribuidos en cepas de *E. faecalis* y se ha demostrado que son necesarios para la resistencia a la fagocitosis por parte de este microorganismo. Interrupciones de dos

genes, han mostrado una reducción significativa en la mortalidad en el modelo de peritonitis en ratón, además han perdido la habilidad para translocarse a través de los enterocitos y presentan una marcada disminución en la producción de bio-películas sugiriendo por lo tanto su papel en virulencia (245).

Recientes estudios de polisacáridos purificados del operón *Epa* proveniente de *E. faecalis* OG1RF versus mutantes de los genes *epaA*, *epaM* y *epaN*, produjeron alteración en el contenido del polisacárido, la presencia de células con forma redondeada comparada con la forma ovalada del *E. faecalis* OG1RF, así como también disminución en la formación de bio-películas, atenuación en el modelo de peritonitis y resistencia a la lisis por el fago NPV-1. Adicionalmente, se detectó la ausencia de la ramnosa en la mutante *epaB*, sugiriendo que una o más glicosil transferasas codificadas por este operón son necesarias para la transferencia de este azúcar en estas cepas (246).

6.5.2 Determinantes de patogenicidad en *E. faecium*

A nivel de virulencia *E. faecium* carece de ciertos determinantes genéticos los cuales se han mostrado presentan un papel relevante en infecciones por *E. faecalis* como por ejemplo la gelatinasa, la citolisina y el locus *fsr* entre otros. La sustancia de agregación codificada por plásmidos en *E. faecalis* ha sido encontrada con menos frecuencia en *E. faecium* (84, 247-249). También, se ha demostrado que cepas clínicas de *E. faecium* son resistentes a la fagocitosis en presencia de suero humano normal, mientras que *E. faecalis* no presenta esta característica (250, 251). Probablemente, la patogénesis del *E.*

faecium se da por la combinación de determinantes genéticos que incrementan las condiciones adecuadas de crecimiento para la bacteria y aumentan la capacidad de sobrevivencia en el TGI o en la piel de pacientes hospitalizados, así como también estos factores adicionales pueden estimular a que la bacteria sea capaz de adherirse, sobrevivir y formar bio-películas en objetos inertes (252).

6.5.2.1. Proteína de superficie Esp_{Efm}:

El gen *esp_{Efm}* (variante del gen *esp* encontrado en *E. faecalis*) fue inicialmente detectado haciendo parte de una isla de patogenicidad (PAI) en un aislamiento de *E. faecium* resistente a vancomicina originado en un brote hospitalario (29, 253). Sin embargo, este PAI proveniente de *E. faecium* presentó características genéticas diferentes al PAI encontrado en *E. faecalis* (29, 31). El gen *esp_{Efm}* codifica para la proteína Esp_{fm}, la cual posee un peso molecular de 202 kDa, es expresada en la superficie de la bacteria (29) y comparte un 90 % de identidad con la Esp de *E. faecalis*; esta característica sugiere que la proteína presenta funciones muy similares en ambos microorganismos (196). Esp y Esp_{Efm}, hacen parte de la familia de proteínas de superficie de bacterias Gram positivas a la cual también pertenecen la proteína Rib y la proteína alfa C de *Streptococcus agalactiae*, la proteína R28 de *Streptococcus pyogenes* y la proteína asociada a bio-películas Bap de *S. aureus* (254-257); todas estas proteínas están involucradas en virulencia y confieren inmunidad protectora (258). La proteína Esp_{Efm} presenta un dominio N-terminal formado por aproximadamente 700 aa que se presume está relacionado con la producción de bio-

películas, posee además tres dominios repetidos denominados A, B y C y en el C-terminal se encuentra el motivo (Y/F)PXTG [(tirosina/fenilalanina, prolina, cualquier aminoácido, treonina y glicina)] que es probablemente reconocido por la sortasa (222) (Figura 2).

Es interesante anotar que a diferencia del gen *esp* de *E. faecalis* que está distribuido ampliamente en cepas de diversos origen, el gen *esp_{Efm}* se ha visto en una gran proporción de aislamientos de *E. faecium* provenientes de hospitales pertenecientes al CC17, lo cual sugiere la importancia de este gen en la patogénesis de *E. faecium* (29, 107, 141, 176, 248, 259, 260). También se ha demostrado que la expresión de *Esp_{Efm}* se ve afectada por cambios en condiciones ambientales, siendo las situaciones que más simulan el microambiente del intestino delgado la temperatura (37°C) y la anaerobiosis (261). Adicionalmente, aislamientos de *E. faecium* obtenidos de bacteriemias presentan un incremento en la adherencia a células humanas epiteliales de adenocarcinoma colorectal (Caco-2), resultados que podrían sugerir que este gen juega un papel importante en colonización intestinal, condición que es el primer paso que antecede a la infección clínica (262).

Para la caracterización funcional de la proteína *Esp_{Efm}* se han realizando estudios empleando una cepa salvaje de *E. faecium* (produce la proteína en la superficie celular) y una mutante por inactivación insercional del gen *esp_{Efm}* (no produce la proteína *Esp_{Efm}* en la superficie celular), las cuales ha sido evaluadas mediante el ensayo *in vitro* de formación de bio-películas. Los resultados han indicado, que esta mutante presenta menor capacidad de adherencia al poliestireno comparada con la cepa salvaje (gen *esp_{Efm}*

intacto) y por lo tanto, menos formación de bio-películas en superficies abióticas. Así mismo, experimentos adicionales señalaron que cuando esta mutante fue complementada en *trans* por medio de un plásmido que expresaba el dominio N-terminal del gen *esp_{Efm}*, se restauraba la capacidad de adherencia y producción de bio-películas (176).

Por otro lado, estudios *in vivo* de este gen en un modelo animal empleando la cepa salvaje portadora del gen *esp* y una mutante isogénica del mismo, indicaron que este determinante genético no está relacionado en la colonización gastrointestinal. Sin embargo, los estudios *in vitro* utilizando las cepas previamente descritas determinaron que el gen *esp_{Efm}* no fue esencial en la adhesión celular cuando se evaluó frente al cultivo celular CaCo2 (263). Hallazgos recientes sugieren que *esp_{Efm}* podría jugar un papel de tipo transitorio en la patogénesis de la infección urinaria en el modelo murino (264). Los resultados de este modelo experimental indicaron que la cepa salvaje (que contenía el gen *esp_{Efm}*) presentó mejor infección en los riñones y en la vejiga comparada con la mutante y además, se detectó la producción de bacteriemia acompañada con niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias en los riñones. También se determinó que la presencia de *Esp_{Efm}* influyó solamente el proceso de la infección urinaria en su fase inicial sugiriendo de esta forma, que el efecto de esta proteína es de tipo temporal (transitorio) en este modelo murino (264). Adicionalmente, al comparar el efecto de la cepa portadora del gen *esp_{Efm}* y la mutante en el modelo de peritonitis en ratón, no se evidenció ninguna diferencia entre las dos cepas evaluadas. Por lo tanto, se sugiere que el

gen *esp_{Efm}* tiene un nicho especial en la patogénesis de la infección urinaria causada por *E. faecium* pero no en la infección peritoneal (264).

6.5.2.2 Proteína de unión a colágeno (Acm)

El gen *acm* (“adhesin of collagen from *E. faecium*”) posee un tamaño de 2,166 bp y se ha detectado en aislamientos nosocomiales de *E. faecium* (>99 %) especialmente los resistentes a múltiples antibióticos pertenecientes al CC17 y provenientes de pacientes con endocarditis. También se ha identificado como pseudogen en aislamientos de origen animal y fecal por la presencia de un codón de terminación o de una inserción (265). El gen intacto codifica para una proteína denominada Acm (721 aa), la cual se ha propuesto como una adhesina primaria de unión a colágeno que presenta características típicas de la familia de moléculas de adhesión microbianas que reconocen componentes la matriz celular (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMM) .

Estas proteínas pertenecientes a la familia MSCRAMMs han sido identificadas en diversos microorganismos Gram-positivos (por ejemplo *S. aureus*) y tienen la capacidad de adherirse al colágeno, fibronectina, fibrinógeno y laminina (266); en algunos casos el sitio de unión primario de estas MSCRAMMs se ha localizado en dominios específicos en las respectivas adhesinas (215, 267-270). Es así como, en un estudio de Nallapareddy y colaboradores se ha mostrado que el 62 % de los aislamientos de origen clínico presentan un fenotipo de adherencia al colágeno mientras que solo el 6% de los aislamientos no

clínicos presentan la capacidad de unirse a esta proteína. Adicionalmente, la producción *in vitro* de Acm en los aislamientos que presentaron en fenotipo de adherencia soporta el concepto que esta proteína es una adhesina primaria de colágeno (271).

La proteína Acm presenta características típicas de una proteína de anclaje a la pared bacteriana, en donde los dominios importantes son: *i*) un péptido señal involucrado en el transporte del polipéptido a través de la membrana citoplasmática, *ii*) una región denominada A localizada en el dominio N-terminal, la cual presenta la actividad de unión a colágeno tipo I (CI) y presenta tres subdominios (N1, N2, N3), *iii*) una región B la cual presenta dos repeticiones, *iv*) un dominio C-terminal que posee un motivo LPKTS, el cual es un blanco donde actúan las sortasas, *v*) una región hidrofóbica la cual se extiende a la membrana celular y, *vi*) una región pequeña citoplasmática (265) (Figura 2). Es interesante anotar que la proteína Acm presenta una similaridad de 47 % en el dominio A con la proteína Ace del *E. faecalis* y mayor similitud con proteína Cna del *S. aureus* (60 % y 75 % con el dominio A y el B respectivamente) (265). Adicionalmente, Acm también presenta homología con adhesinas de patógenos Gram-positivos como *Streptococcus equi* (272), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (273) y *Streptococcus mutans* (274).

Análisis genéticos confirman que Acm es necesaria para mediar la adhesión del *E. faecium* al colágeno pero no a fibronectina ni a fibrinógeno (275). Adicionalmente, los estudios bioquímicos de Acm han mostrado la gran afinidad de unión que determinados subdominios (los cuales presentan una estructura similar a las inmunoglobulinas, basados en predicciones estructurales) presentan al colágeno tipo I, características bastantes

similares a las descritas en las proteínas Cna y Ace (220, 276). Estos hallazgos suportan la hipótesis que la adhesión de Acm se da por el modelo denominado “collagen hug” en el cual ha sido descrito previamente para otras adhesinas (220, 276).

Recientes estudios han demostrado que Acm juega un papel importante en la patogénesis de *E. faecium* en el modelo animal (21). Lo anterior se concluyó al evaluar una mutante (por delección del gen *acm* con reemplazo alélico) con su respectiva cepa salvaje (isogénica portadora del gen *acm*), en el modelo de endocarditis en rata por infección mixta (se infecta el mismo animal con los dos microorganismos de estudio al mismo tiempo). Los resultados de este modelo mostraron que la cepa mutante estaba atenuada cuando se comparaba con la cepa salvaje y que esta última era capaz de establecerse y colonizar 1 a 3 horas después de la infección, indicando de esta manera que Acm es el primer factor de virulencia que tiene una función implicada en la patogénesis de endocarditis en *E. faecium* (21). En contraste, la evaluación de las mismas cepas en el modelo de peritonitis en ratón indicó que la mutante no presentó atenuación en comparación con la cepa salvaje (21). Estos resultados permiten concluir la importancia de Acm para la mediación de adherencia del *E. faecium* a las válvulas cardiacas y por consiguiente el daño que genera a las mismas las cuales son estructuras ricas en colágeno, efecto que genera la producción de endocarditis; sin embargo este gen no parece jugar un papel en la peritonitis murina (21).

6.5.2.3 Proteínas de superficie en *E. faecium* (Fms)

Hasta la fecha se han descrito veintidós genes denominados *fms* (*E. faecium* surface protein-encoding) que codifican para proteínas de superficie en *E. faecium*, identificados a partir de análisis bio-informáticos de la secuencia del genoma de *E. faecium* TX0016. Estos genes se encuentran en gran proporción en aislamientos clínicos pertenecientes al CC17 (33) y presentan similitud a nivel de secuencia con proteínas de superficie de anclaje a la pared celular (CWPA) (33, 177). De estos veintidos genes, quince presentaron características de adhesinas pertenecientes a la familia MSCRAMMs o de proteínas involucradas en la formación del pili (operón *ebp*), *Acm* (223, 265), *Scm* (second collagen adhesin of *E. faecium*) y la proteína *SagA*, la cual se ha determinado como una adhesina la cual une fibrinógeno, colágeno tipo I (CI), colágeno (CIV), fibronectina y laminina; no obstante, a pesar de tener características de adhesina la proteína *SagA* carece del dominio CWPA (177, 277).

Las quince proteínas *Fms* se caracterizan por presentar uno o más dominios tipo inmunoglobulina, amplia variedad de estructuras secundarias tipo hoja β plegada y solo una pequeña cantidad de hélices alfa, estructura similar a la encontrada en las regiones A que corresponden a los ligandos de las proteínas MSCRAMM (278). Estas proteínas también presentan multi-dominios similares a los observados en las proteínas de adhesión *Cna* en *S. aureus* y *Ace* en *E. faecalis* (278-280) (Figura 2).

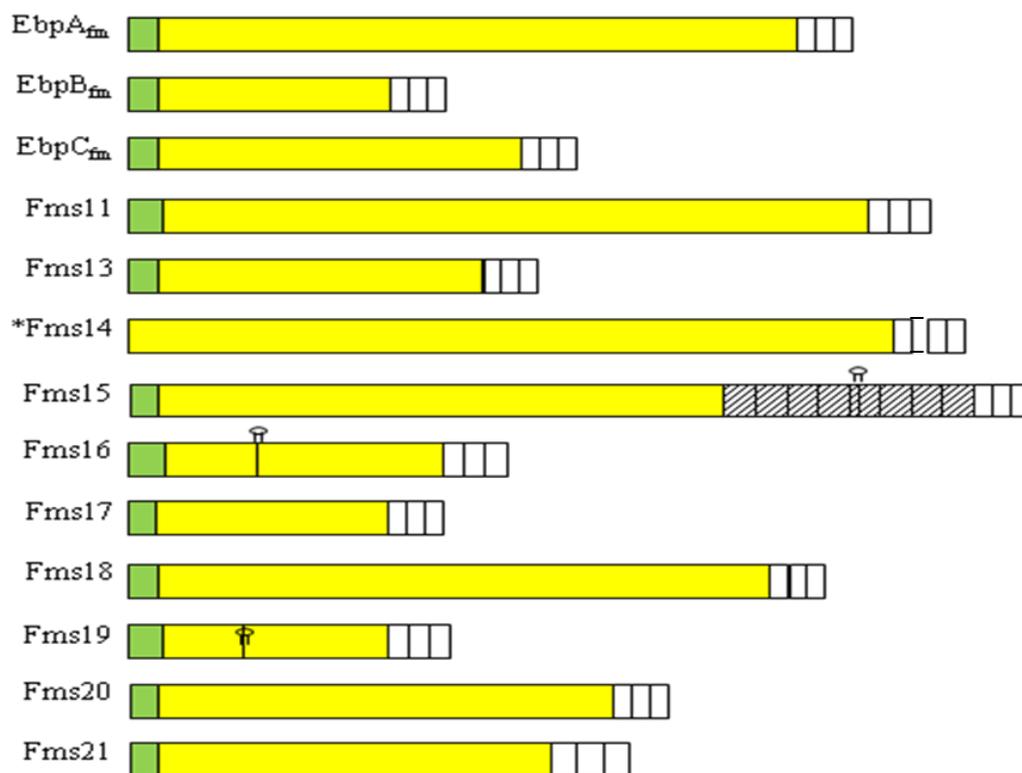
Dentro de los genes pertenecientes a esta familia de *fms*, se ha identificado el gen *scm* (second collagen adhesin of *E. faecium*) el cual codifica para una proteína denominada

Scm que presenta un péptido señal, una región denominada A, una región repetitiva B (con trece repeticiones de fragmentos cortos de aa) y un dominio de anclaje a la membrana (Figura 3). Esta proteína es capaz de unirse eficientemente al colágeno tipo V (CV) de forma dependiente de la concentración de sustrato, pero es ineficiente uniendo CI y fibrinógeno. Ensayos de expresión de Scm en la superficie celular indicaron que esta proteína se produce activamente y se localiza en la superficie de las células de *E. faecium* durante su crecimiento *in vitro* (34).

Por lo tanto, considerando los diferentes tipos de colágeno presente en el ser humano y no es extraño encontrar dos proteínas en *E. faecium* que sean capaces de actuar sobre distintos colágenos proporcionándole de esta manera la capacidad de adherirse de acuerdo a la ubicación anatómica en que se localice (177). Como el colágeno tipo V se encuentra en la submucosa intestinal es posible que la proteína Scm pueda estar involucrada en la colonización y la persistencia en el TGI, el cual es el mayor reservorio de *E. faecium* comensal y asociado a infecciones en humanos, facilitando de esta manera la translocación de este microorganismo al epitelio intestinal (177).

Figura 3.

A



B

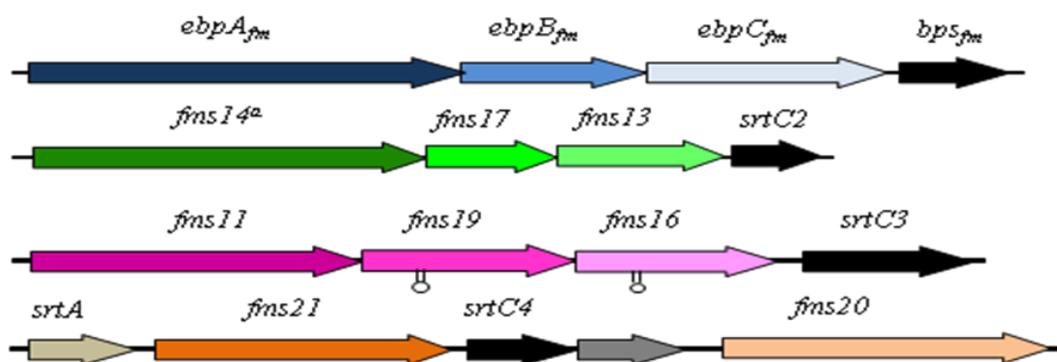


Figura 3. Organización de los Fms en *E. faecium*. A. Diagrama esquemático de las proteínas Fms. En color verde se indica el péptido señal, en amarillo se encuentra la región A, en la cual en el Fms 16 y Fms 19 se encuentra un codón de parada mientras que en el Fms15 el codón de parada se encuentra en la región repetitiva B; el dominio C-terminal está representado en color blanco. B Grupo de genes organizados en estructura de operón, cada uno se caracteriza por tener una sortasa de tipo C y adicionalmente el operón Fms 21 y Fms20 presenta una sortasa A adicional. Figura suministrada generosamente por Jouko Sillanpaa (177).

Dentro de estas adhesinas de superficie Fms se han identificado estructuras de tipo pili en bacterias Gram-positivas (281-283), las cuales son proteínas no flagelares formadas por múltiples componentes que se encuentran adheridas a la pared celular (284). En bacterias Gram-positivas, estas estructuras se han visto implicadas en la formación de bio-películas y endocarditis en *E. faecalis* (223), resistencia a macrófagos (285), adhesión y adherencia a células endoteliales del cerebro (*Streptococcus agalactiae*) (285), adhesión a epitelio y a piel (*S. pyogenes*) (286). Estos heterodímeros están compuestos por una subunidad mayor la cual forma el esqueleto del pili y una subunidad menor localizada al final de la estructura (287).

El análisis de la secuencia de nucleótidos de *E. faecium* mostró que presenta cuatro grupo de genes putativos que podrían codificar para pili, los cuales cuentan con una sortasa y probablemente funcionan como un operón. Estos genes se organizan de la siguiente manera: *i*) grupo 1, en el cual se encuentra los genes los *ebpA_{fm}* (*fms1*), *ebpB_{fm}* (*fms5* o también denominado *pilB*, (33), *ebpC_{fm}* (*fms9*), *ii*) grupo 2, formado por el *fms11*, *fms19* y *fms16* (estos dos genes presentan una substitución en un nucleótido o una deleción generando un pseudogen), *iii*) grupo 3, formado por *fms14* (no presentaba péptido señal), *fms17* y *fms13*, *iv*) grupo 4, *fms20* y *fms21* los cuales se localizan separados por dos ORFs, uno de ellos codifica para una proteína putativa sortasa C (*srtC4*) y el otro ORFs está localizado entre *srtC4* y *fms20* presenta similaridad del 27 % con el gen *ebpB*. Adicionalmente, se encuentra un gen de sortasa A (*strA*) corriente arriba del gen *fms21* (también denominado *pilA*) (33, 177) (Figura 3).

El estudio de aislamientos de *E. faecium* provenientes de muestras humanas y animales ha indicado que los genes que codifican para MSCRAMM y los genes que codifican para el pili (*ebpA_{fm}*, *ebpB_{fm}*, *ebpC_{fm}*, *scm*, *fms13*, *fms15*, *fms17* y *fms 21*) se encontraron ampliamente distribuidos en un 82 % a un 94 % de los aislamientos. El resto de genes se han detectado entre el 26 y el 56 % de los aislamientos, mientras que la proteína Acm se encuentra en más del 99 % de los aislamientos (21, 177). Adicionalmente, el análisis de la presencia de los 14 genes pertenecientes a la familia de los MSCRAMM, señaló que por lo menos el 91 % de los aislamientos de origen clínico portaban todos los genes, mientras que los provenientes de comunidad y de animales un 61 % y 65 % respectivamente, indicando así una acumulación o conservación de estos genes en los aislamientos originados de infecciones hospitalarias (34). De la misma manera, análisis independientes de la distribución de cada grupo de genes, mostraron una fuerte correlación de los aislamientos de origen clínico con los genes *scm*, *fms15*, y *fms18* y con dos grupos de genes que codificaban para el cluster *ebpABC_{fm}* y para el *fms11-19-16*) (34); sugiriendo nuevamente la relevancia que pueden tener estos genes para los aislamientos clínicos de *E. faecium*.

6.5.2.4 Adhesina de unión al nidógeno (SgrA) y adhesina de unión a colágeno (EcbA)

El gen *sgrA* (serine-glutamate repeat containing protein A) presenta un tamaño de 975 bp y codifica para una proteína de 355 aa y el gen *ecbA* (E. *faecium* collagen binding protein A), posee un tamaño de 3,228 bp y codifica para una proteína de 1,076 aa; estas dos

proteínas presentan un motivo LPxTG y se encuentran en gran proporción en aislamientos de *E. faecium* de origen hospitalario (288). El análisis *in silico* de los genes del *E. faecium* TX0016 muestra la ausencia de una sortasa tipo C en cercanías de estos dos genes (*sgrA* y *ecbA*) sugiriendo que estas proteínas pueden ser ancladas a la pared celular por el gen putativo que pertenece a la familia de las sortasas clase A.

La proteína SgrA contiene un péptido señal, seguido de una región no repetitiva denominada A (podría ser el sitio de unión al ligando), la cual no presenta dominios de tipo inmonoglobulina, lo que sugiere que esta proteína no puede ser clasificada en la familia de las MSCRAMM. La región B está formada por ocho dominios repetitivos y en el C-terminal, un motivo LPETG (leucina, prolina, ácido glutámico, treonina y glicina). Esta proteína SgrA es capaz de unirse a fibrinógeno de una forma dependiente de la concentración pero no a fibronectina, vitronectina o albumina de suero bovino (BSA). Adicionalmente, se ha detectado que es capaz de unirse a las glicoproteínas designadas como nidógeno 1 (conocida también como entactina) y nidógeno 2, las cuales están estrechamente asociadas con la cadena γ de la laminina que generalmente se aísla a partir de extractos de la membrana basal de la matriz extracelular (289, 290). Ensayos *in vitro* que evaluaban la formación de bio-películas indicaron que la cepa salvaje portadora del gen *sgrA* media la adherencia de *E. faecium* a superficies abióticas de superficies de poliestireno, mientras que una mutante isogénica de *sgrA* produce menos bio-películas. Estos resultados indicaron que la proteína SgrA podría jugar un papel doble en un proceso infeccioso, puesto que puede adherirse a superficies de polímeros con un crecimiento

posterior en catéteres y adicionalmente se puede unir a proteínas de la matriz extracelular (288).

Por otro lado, la proteína EcbA contiene un péptido señal, seguido de tres regiones no repetitivas (A, B y C) y en el C-terminal presenta un dominio FPQTG (fenilalanina, prolina, glutamina, treonina y glicina). Esta proteína pertenece a la familia de las MSCRAMM, contiene características similares a las encontradas en las proteínas de unión a fibrinógeno en *S. aureus* (288) y posee 4 dominios putativos similares a CnaB los cuales adoptan estructuras de inmunoglobulinas (278, 291). Por otro lado, la proteína EcbA se une al colágeno tipo V y a la subunidad γ del fibrinógeno de una forma dependiente de la concentración y gracias a su actividad de adhesina podría tener un papel en la patogénesis de infecciones relacionadas a catéteres (288).

6.5.3 Modelos animales para evaluación de virulencia en enterococos

El primer modelo animal de infección con enterococo fue desarrollado por MacCallum y Hastings (38), empleando infección intra-peritoneal o por vía intra-venosa en ratones y en conejos, los cuales eran inoculados con altas dosis de bacteria. Este estudio mostró las limitaciones que el modelo animal presenta, por las variaciones que se pueden obtener debido a la susceptibilidad de cada especie animal. La forma más común para estudiar virulencia en enterococos son los modelos experimentales de peritonitis murina (235, 292), de endocarditis en conejo o en rata (293-295), el modelo murino oro-gástrico (249, 296, 297), endoftalmitis en conejos (298, 299), infección urinaria (300) y los modelos en

nematodos como *C. elegans* (301) y en la oruga *Galleria mellonella* (302). La evaluación de la virulencia en enterococo también ha sido complementada con diferentes estudios *in vitro* empleando cultivos de enterocitos, macrófagos o células epiteliales con el fin de investigar la adherencia a los tejidos, invasión, translocación y sobrevivencia intracelular de los enterococos (188, 202).

El modelo de peritonitis, ha demostrado ser útil para comparar la letalidad de las mutantes isogénicas, sin embargo genera menor información relacionada con la patogénesis de la infección o el mecanismo exacto que produce la muerte del animal (182). El modelo de endocarditis utiliza la cateterización con el fin de ocasionar daño valvular y a diferencia del de peritonitis, permite evaluar morfológica e histológicamente las vegetaciones así como también, estudiar la bacteriemia generada por el microorganismo (182). El modelo oro-gástrico es el de elección cuando se desea evaluar la colonización intestinal, empleando niveles máximos de colonización de 10^{10} UFC/gr en el ciego cuando la bacteria se administra oralmente seguida por una terapia con antimicrobianos. Este modelo permite estudiar la translocación del microorganismo a través del epitelio intestinal, permitiendo de esta manera la detección de la bacteria en la sangre, riñón, bazo, hígado y nódulos linfáticos (297).

El modelo de endoftalmitis en conejo fue desarrollado para estudiar la infección por enterococos y tiene grandes ventajas sobre otros modelos. Por ejemplo, solo se requiere de una concentración muy baja de inóculo bacteriano (10 UFC/ml) para generar infección en el ojo y la monitorización de la infección se puede realizar por 3 a 5 días, utilizando

técnicas no invasivas usadas en oftalmología clínica. Este modelo permite eliminar las dificultades de usar animales inmuno-comprometidos puesto que en tiempo real permite determinar las condiciones fisiológicas como inflamación y pérdida de la función de la retina (298, 299).

El modelo de infección intravenosa ha sido desarrollado para simular las bacteriemias humanas, sin embargo la mortalidad en este modelo solo ocurre entre 7 y 10 días posteriores a la infección, pero puede ser útil para evaluar cepas que presentan diferencias muy pequeñas a nivel de virulencia (303). El modelo de infección urinaria presenta una gran ventaja pues permite determinar el tropismo de algunos genes por componentes el epitelio urinario, así como también la posibilidad de infectar un solo animal con la cepa salvaje y la cepa mutante controlando de esta manera posibles diferencias que se pueden generar cuando se hacen ensayos de infección independiente por cada cepa (304).

Por otro lado, también se han desarrollado modelos empleando nematodos como *C. elegans*, para evaluar virulencia en enterococos; se ha visto que en este animal no vertebrado *E. faecalis* y *E. faecium* pueden persistir en el tracto intestinal, siendo solo *E. faecalis* letal para este nematodo (301). Este modelo ha sido útil para evaluar el factor de virulencia potencial ScrB (hidrolasa de sucrosa) y también se han confirmado hallazgos previos de factores de virulencia como la citolisina y el sistema de regulación FsrB. Sin embargo, la sustancia de agregación, determinante ampliamente descrito por sus importancia a nivel de *E. faecalis* no parece ser relevante en el modelo de *C. elegans*,

resaltando una vez más la importancia para determinar el modelo animal adecuado al microorganismo y al gen que se está evaluando. Adicionalmente, se ha implementado el modelo de *G. mellonella*, el cual presenta ventajas como: *i)* la temperatura a que se mantienen las orugas es 37°C, lo cual es adecuada para estudios de patógenos en humanos, *ii)* la infección con el inóculo es fácilmente administrada por inyección en el cuerpo del animal y *iii)* la presencia de un sistema inmune celular y humoral mediado por péptidos antimicrobianos y células fagocíticas (hemocitos), que permiten la respuesta por parte del huésped al microorganismo (305).

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Caracterizar el papel del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en la virulencia de *E. faecium* de origen nosocomial.

7.2 Objetivos específicos

- Confirmar que el gen *hyl_{Efm}* se encuentra localizado en plásmidos de gran tamaño.
- Evaluar si el gen *hyl_{Efm}* se co-transfiere junto con los genes de resistencia a antibióticos.
- Caracterizar el papel del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* *in vivo* utilizando modelos animales.
- Desarrollar un sistema de mutagénesis para *E. faecium* empleando el sistema de contra-selección sin marcación PheS*.
- Determinar el papel de *hyl_{Efm}* y la región donde está localizado este gen por medio de la construcción de mutantes empleando el sistema PheS*.
- Estudiar la epidemiología molecular y la presencia de genes de virulencia en los aislamientos de *E. faecium* en cuatro países de la región Andina.

8. METODOLOGÍA

8.1 Microorganismos de estudio

8.1.1 Cepas bacterianas de laboratorio

Las cepas utilizadas en el estudio se describen en la Tabla 2. Las cepas de *E. faecium* se cultivaron en agar Infusión Cerebro Corazón, (BHI) (Beckton-Dickinson). Las cepas derivadas de *E. faecium* TX1330RF se sembraron en agar BHI suplementado con rifampicina (RIF) 100 µg/ml y ácido fusídico (FUS) 25 µg/ml, al igual que las cepas derivadas de *E. faecium* D344SRF.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas para clonaciones fueron: DH5α y TG1, las cuales se sembraron en agar Luria Bertani (LB). Las cepas *E. coli* TG1 portadoras de plásmidos derivados de pAT392 se cultivaron en agar LB con gentamicina 25 µg/ml, así como también cepas de *E. coli* EC1000 que presentaban plásmidos derivados de pCJK47Gen (sección construcción de mutantes) (Tabla 3).

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo

Nombre de la cepas	Denominación de las cepas utilizadas en este trabajo	Características relevantes	Referencias
<i>E. faecium</i>			
TX0016 (DO)	A	Aislamiento clínico. Presenta el plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> . Proveniente de USA. ERY ^R , STR ^R ; ST-16	(250) (265)
TX2160	TX0016/ Δ - región <i>hyl_{Efm}</i>	Mutante de 6 genes de la región <i>hyl_{Efm}</i> en la cepa TX0016	Este trabajo
TX1330	TX1330	Aislamiento de origen fecal proveniente de un voluntario sano	(265)
TX1330RF	TX1330RF	Cepa derivada de TX1330. FUS ^R , RIF ^R	Este trabajo
TX2158	TX1330RF A-1	Cepa transconjugante, la cual presenta el plásmido <i>hyl_{Efm}</i> transferido por conjugación <i>in vitro</i> utilizando como donador el TX0016 y como receptor el TX1330RF.	Este trabajo
TX2161	TX1330RF A-1/ Δ - región <i>hyl_{Efm}</i>	Cepa transconjugante obtenida por conjugación <i>in vitro</i> a partir del donante TX0016/ Δ -región <i>hyl_{Efm}</i> y el receptor TX1330RF	Este trabajo
ERV99	B	Aislamiento clínico. Presenta el plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> . Proveniente de Colombia. VAN ^R , STR ^R , GEN ^R . ST -18	Este trabajo.

TX6068	TX1330RF B-1	Cepa transconjugante. Proviene de la conjugación <i>in vitro</i> entre B (donador) y TX1330RF (receptor). Presenta un plásmido portador para el gen <i>hyl_{Efm}</i> VAN ^R , ERY ^R , GEN ^R , STR ^R .	Este trabajo
TX6069	TX1330RF B-2	Cepa transconjugante. Proviene de la conjugación <i>in vitro</i> entre B (donador) y TX1330RF (receptor). Presenta un plásmido portador para el gen <i>hyl_{Efm}</i> VAN ^R , GEN ^R .	Este trabajo
C68	C	Aislamiento clínico. Presenta un plásmido portador del gen <i>hyl_{Efm}</i> . Proveniente de USA. VAN ^R ; ST-16	(23)
D344SRF	D344SRF	Cepa de laboratorio con pérdida espontánea del gen <i>pbp5</i> . FUS ^R , RIF ^R	(23)
TC6	D344SRF C-6	Cepa transconjugante proveniente de la conjugación <i>in vitro</i> entre el donador C68 y el receptor D344SRF. Presenta un plásmido portador para el gen <i>hyl_{Efm}</i> .	(23)
CV518	D344SRF C-6/ Δ <i>hyl_{Efm}</i>	Cepa mutante derivada del D344SRF-C6, la cual presenta una delección de 296 bp en el gen <i>hyl_{Efm}</i> y un reemplazo alélico con el gen <i>cat</i> .	
	TX1330RF/pAT392	Cepa derivada de TX1330RF con presencia del plásmido pAT392. Obtenida por electrotransformación	Este trabajo
	TX1330RF/pAT392:: <i>hyl_{Efm}</i>	Cepa derivada de TX1330RF con presencia del plásmido pAT392:: <i>hyl_{Efm}</i> . Obtenida por electrotransformación.	Este trabajo

TX1330RF/pAT392:: <i>hip</i>	Cepa derivada de TX1330RF con presencia del plásmido pAT392:: <i>hip</i> . Obtenida por electrotransformación.	Este trabajo
TX1330RF/pAT392:: <i>hyl_{Efm}-hip</i>	Cepa derivada de TX1330RF con presencia del plásmido pAT392:: <i>hyl_{Efm}-hip</i> . Obtenida por electrotransformación.	Este trabajo
TX1330RF A1-Δ región <i>hyl_{Efm}- / pAT392</i>	Cepa derivada de TX1330RF-A1- <i>Δhyl_{Efm}-</i> con presencia del plásmido pAT392. Obtenida por electrotransformación.	Este trabajo
TX1330RF-A1-Δ región <i>hyl_{Efm}- / pAT392::<i>hyl_{Efm}</i></i>	Cepa derivada de TX1330RF-A1- <i>Δhyl_{Efm}-</i> región con presencia del plásmido pAT392:: <i>hyl_{Efm}</i> . Obtenida por electrotransformación.	Este trabajo
TX1330RF-A1-Δ región <i>hyl_{Efm} / pAT392::<i>hyl_{Efm}-hip</i></i>	Cepa derivada de TX1330RF-A1- <i>Δhyl_{Efm}-</i> región con presencia del plásmido pAT392:: <i>hyl_{Efm}-hip</i> . Obtenida por electrotransformación.	Este trabajo

E. faecalis

ATCC29212	Cepa control para determinación de la susceptibilidad microbiana.	ATCC
CK111	Cepa OG1 Sp <i>upp4::P23repA4</i> . Donador para ensayos de conjugación. SPE ^R	(306)

E. coli

DH5α	pTEX5501-TS-Mob+; CHL ^R , GEN ^R	(275)
TG1	Cepa huésped para clonaciones <i>F' traD36-lacI^q(lacZ)M15</i> <i>proA⁺B⁺/supe⁻(hsdM-mcrB)5</i> <i>(r_km_k⁺McrB⁻) thi (lac-proAB)</i>	(307)
EC1000	Cepa huésped para clonación, presenta <i>repA</i> en <i>trans</i> .	(308)
	EC1000/pCJK47; ERY ^R	(306)
TX5502	EC1000/pCJK47Gen; GEN ^R	Este trabajo
TX5503	EC1000/pCJK47GenChl; GEN ^R ,	Este trabajo
	EC1000/ pCJK47GenChl::A-B.	Este trabajo
TX11007	TG1/pAT392:: <i>hyl_{Efm}</i> . SPE ^R , GEN ^R	Este trabajo
TX11006	TG1/pAT392:: <i>hip</i> . SPE ^R , GEN ^R	Este trabajo
TX11005	TG1/pAT392:: <i>hyl_{Efm}-hip</i> . SPE ^R , GEN ^R	Este trabajo
	TG1/pAT392. SPE ^R , GEN ^R	Este trabajo

CHL^R resistencia a cloranfenicol, ERY^R, resistencia a eritromicina, FUS^R resistencia a ácido fusídico, GEN^R resistencia a gentamicina, RIF^R resistencia a rifampicina, SPE^R, resistencia a espectinomicina, STR^R resistencia a estreptomina VAN^R resistencia a vancomicina, ST tipo de secuencia.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmidos	Nombre utilizado en este trabajo	Características relevantes	Referencias
pCJK47	pCJK47	Plásmido conjugativo utilizado para mutagénesis; <i>oriTpCF10</i> y <i>pheS*</i> ; pOR1280. ERY ^R .	(306)
pTEX5502	pCJK47Gen	Plásmido derivado de pCJK47. Reemplazo del gen <i>ermC</i> por <i>aph-2'</i> .	Este trabajo
pTEX5503	pCJK47Gen/Chl	Plásmido derivado de pCJK47Gen, el cual presenta el gen <i>cat</i> y dos MCS.	Este trabajo
	pCJK47Gen/Chl::A-B	Plásmido donador para construcción de la delección de la región <i>hyl_{Efm}</i> . Presenta las regiones corriente arriba, (977bp) sitios de restricción BamHI y XhoI respectivamente. Corriente abajo, (999bp) con sitios de restricción ApaI y EcoRI respectivamente. GEN ^R	Este trabajo
pAT392	pAT392	Ori _{R_{pAMβ1}} , ori _{R_{pUC}} ori _{TRK2} , <i>spc</i> , <i>lacZαP2 aac(6')-aph (2'')</i> . GEN ^R , SPE ^R	(126)
pTEX11007	pAT392:: <i>hyl_{Efm}</i>	Plásmido derivado de pAT392. El gen <i>hyl_{Efm}</i> se clonó (sitios de restricción SacI y SmaI) bajo el control del promotor P2. GEN ^R SPE ^R	Este trabajo
pTEX11006	pAT392:: <i>hip</i>	Plásmido derivado de pAT392. El gen <i>hip</i> se clonó (sitios de restricción SacI y SmaI) bajo el control del promotor P2. GEN ^R , SPE ^R	Este trabajo
pTEX11005	pAT392:: <i>hyl_{Efm}-hip</i>	Plásmido derivado de pAT392. Los genes <i>hyl_{Efm}-hip</i> se clonaron (sitios de restricción SacI y smaI) bajo el control del promotor P2. GEN ^R ,SPE ^R	Este trabajo

ERY^R, resistencia a eritromicina, GEN^R, resistencia a gentamicina, SPE^R, resistencia a espectinomina,

8.1.2 Aislamientos nosocomiales de *E. faecium* obtenidos a partir de un estudio clínico de vigilancia en la región Andina

A partir de un estudio prospectivo realizado en la región Andina se analizaron 111 aislamientos clínicos de *E. faecium* desde febrero 2006 a febrero 2008 a partir de un programa de vigilancia epidemiológica en la región Andina, en el cual participaron un total de 32 hospitales, pertenecientes a Colombia (n=22), Ecuador (n=5), Perú (n=3) y Venezuela (n=2). Dentro de los criterios de inclusión se seleccionaron enterococos invasivos provenientes de sangre, herida quirúrgica, orina, líquido peritoneal, absceso abdominal, aspirado articular, osteomielitis, aspirado bronco-alveolar, líquido pleural, colección pericárdica, absceso cerebral y líquido céfalo-raquídeo y los cuales correspondían a una muestra única del paciente. Se excluyeron del estudio organismos duplicados del mismo paciente así como también aquellos que provenían de esputo, catéteres y de piel. Todos los aislamientos fueron identificados en cada hospital utilizando metodologías automatizadas como Vitek (Biomérieux) y Microscan, además de métodos manuales. Posteriormente, las cepas incluidas en el estudio se enviaron al laboratorio de referencia Unidad de Genética y Resistencia Bacteriana (UGRA) de la Universidad El Bosque, en Bogotá utilizando para ello el medio de transporte AMIES (BBL, Franklin Lakes, NJ, USA). Finalmente, los microorganismos se recuperaron por cultivo en agar BHI a 37°C durante 24 horas y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex para la confirmación de la especie de los enterococos. Para ello, se utilizó la detección del gen de D-Ala-D-Ala ligasa siguiendo un protocolo previamente descrito (309, 310)

8.2 Técnicas de manipulación de DNA

8.2.1 Extracción de DNA

La extracción del DNA de los enterococos se realizó utilizando el protocolo comercial DNeasy Blood & Tissue Kit, (Qiagen Inc, Valencia, CA). Este método permite la degradación de la pared bacteriana por medio de una solución de lisis, el DNA es precipitado y posteriormente es unido selectivamente a una membrana. Finalmente, los componentes celulares son removidos por medio de procesos de centrifugación y el DNA es eluído en agua.

Una colonia bacteriana se inoculó en 5 ml de caldo BHI a 37 °C toda la noche, al día siguiente se centrifugó por 10 minutos a 5.000 rpm, el precipitado celular obtenido se resuspendió en 1 ml de solución de lisis (tris pH 8.0 20 mM, EDTA 2 mM, tritón X-100 1.2 %, lisozima 20 mg/ml, mutanolisina 5 U/μl), se incubó a 37°C por 30 minutos y posteriormente se siguieron las condiciones descritas en el protocolo comercial DNeasy Blood & Tissue. Finalmente, el DNA se eluyó en 100 μl de agua y la cuantificación se realizó utilizando un espectrofotómetro a una densidad óptica (OD) de 260 nm. Adicionalmente, el DNA obtenido se corrió en un gel de agarosa al 0.8 %.

8.2.2 Construcciones de mutantes en la región *hyl_{Efm}*

8.2.2.1 Construcción de una mutante del gen *hyl_{Efm}* utilizando el sistema de reemplazo alélico con el vector sensible a la temperatura pTEX5501-TS-Mob+

Con el fin de determinar si el gen *hyl_{Efm}* estaba implicado en la patogénesis de *E. faecium*, se construyó una mutante utilizando el vector sensible a la temperatura denominado pTEX5501-TS-Mob+, el cual se replica en *E. coli* a 37°C (temperatura permisiva) y es suicida en enterococos a temperatura no permisiva, 42°C (275). En este vector se clonan fragmentos adyacentes corriente arriba y corriente abajo del gen a deletar y posteriormente se realiza un reemplazo alélico del gen utilizando la estrategia de integración-segregación de dos pasos. El plásmido, se integra en el cromosoma por recombinación homóloga de tipo Campbell bajo presión selectiva por medio de antibióticos. Posteriormente, las recombinantes mero-diploides se cultivan en caldo BHI por pases sucesivos en ausencia de antibiótico por 7 días a 42°C para estimular un segundo evento de recombinación entre los segmentos duplicados, generando así un alelo mutado o reconstitución del alelo original dependiendo del sitio de recombinación (275).

En la Figura 4 se observa el esquema de obtención de la mutante (obtenida por el grupo del Dr LB Rice), para lo cual un fragmento de la región *hyl_{Efm}* de 2,370 bp (incluyendo el gen *hyl_{Efm}* completo) se amplificó por PCR (utilizando como templado el DNA del *E. faecium* C68) y se clonó en el vector TA-topo (Invitrogen, CA) (Figura 4). Posteriormente, este plásmido fue digerido con la enzima XmnI la cual removió 296 bp del gen *hyl_{Efm}*, y en esta región se insertó un fragmento que contenía el gen de cloranfenicol acetil transferasa (*cat*), (incluyendo promotor y terminador) el cual fue obtenido por amplificación por PCR empleando como templado el vector pWM401 (311). El fragmento

obtenido fue liberado del vector TA-topo y clonado en el vector pTEX5001-TS-Mob+ (275) al cual previamente se le había removido el gen *cat*, obteniéndose así un plásmido portador de regiones corriente arriba y corriente abajo del gen *hyl*_{Efm} y con presencia del gen *cat* (Figura 4). Este vector se introdujo por conjugación al *E. faecium* D344SRF C-6 (Tabla 2) obteniéndose una mutante por reemplazo alélico con el gen *cat* denominada D344SRF C-6/ Δ *hyl*_{Efm}; esta cepa fue caracterizada (en nuestro laboratorio y los resultados se muestran en este trabajo) por secuenciación, PFGE e hibridización con sondas dirigidas al gen *hyl*_{Efm} y al gen *cat*.

8.2.2.2 Construcción de una mutante de 6 genes en la región *hyl*_{Efm} utilizando el sistema PheS*

8.2.2.2.1 Construcción de vectores derivativos de pCJK47 para delección de genes en *E. faecium*

Con el objetivo de construir una mutante en la región *hyl*_{Efm}-se utilizó el sistema de intercambio genético denominado PheS* desarrollado previamente para *E. faecalis* el cual permite crear delecciones de un gen o de varios genes utilizando el vector pCJK47 (306). Esta metodología presenta varias características importantes: *i*) posee una alta eficiencia de introducción del DNA debido a que utiliza el sistema de conjugación, *ii*) utiliza el sistema de intercambio genético sin marcación el cual se basa en la selección positiva por medio del gen *ermC* (que confiere resistencia a eritromicina) y la selección negativa por la inhibición del crecimiento de las bacterias que poseen el marcador de contra-selección, el gen *pheS**. Este gen codifica para una RNA_t sintetasa la cual presenta

una mutación (A312G) que le permite a la RNAt sintetasa incorporar el para-cloro-fenil alanina (p-cl-Phe) (compuesto que es un análogo de la fenil alanina) a la cadena polipeptídica naciente, interfiriendo de esta manera con la elongación del péptido y por lo tanto con la síntesis de proteínas y *iii*) este sistema posee el gen *lacZ* que codifica para una β -galactosidasa lo cual permite la selección de las colonias azules en *E. faecalis* las cuales son portadoras del plásmido PheS* recombinante (Figura 5).

Figura 4.

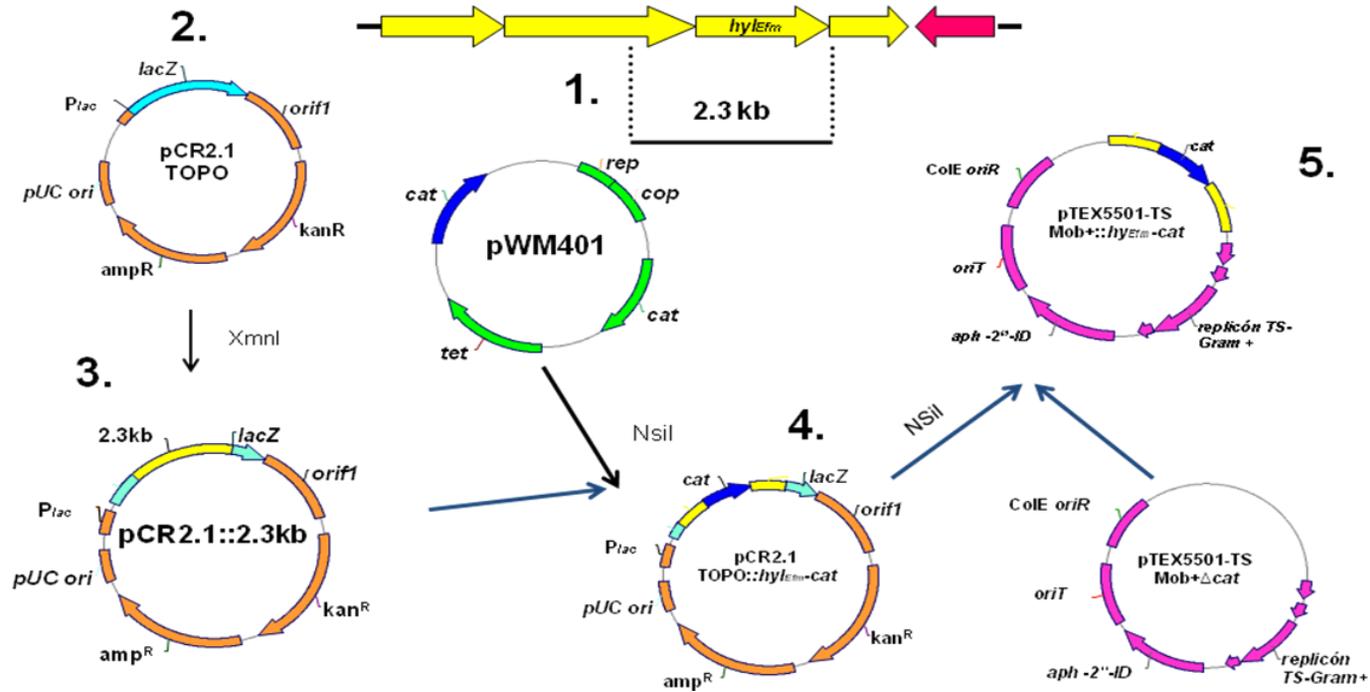


Figura 4. Construcción del vector portador de las regiones homólogas del gen *hylEfm* para la creación de una mutante por reemplazo alélico utilizando el vector pTEX5501-TS-Mob+. 1. Una región de 2.3 kb (en la cual se encontraba el gen *hylEfm*) se amplificó por PCR; 2. En el vector pCR2.1 se clonó la región de 2.3 Kb; 3. El plásmido recombinante pCR2.1::2.3kb fue digerido con la enzima XmnI (la cual removía 296bp del gen *hylEfm*) y posteriormente el gen *cat* (proveniente del plásmido pWM401) se clonó en esta región; 4. El fragmento obtenido fue digerido con la enzima NsiI y se clonó en el vector pTEX5501-TS-Mob+; 5. El plásmido resultante pTEX5501-TS-Mob+::*hylEfm*-*cat* se utilizó para la producción de una mutante del gen *hylEfm*. Nomenclatura: *lacZ*:β-galactosidasa; *P_{lac}*: promotor del gen *lacZ*; *pUC*: origen de replicación del pUC; *amp^R*: resistencia a ampicilina; *kan^R*: resistencia a kanamicina; *tet*: gen de resistencia a tetraciclina; *cat*: gen de resistencia a cloranfenicol; *rep*: región de replicación; *cop*: región de control de número de copias; *aph-2''-ID*: gen de resistencia a gentamicina; Mob+, movilización; replicón TS-Gram+: replicón de Gram-positivos sensible a la temperatura; Col *oriT*: origen de replicación de *E. coli*; *oriT*: origen de transferencia proveniente de Tn916.

Para la construcción de mutantes con este sistema se clonan regiones corriente arriba y corriente abajo del gen o genes a deleccionar en pCJK47 y se utiliza la cepa *E. coli* EC1000 portadora del gen *repA* en el cromosoma para la replicación del plásmido recombinante PheS* (plásmidos derivados de pCJK47). Posteriormente, este vector es transferido por electrotransformación a la cepa *E. faecalis* CK111 (portadora adicionalmente del plásmido pCF10) que actúa como donadora y permite la transferencia por conjugación del plásmido recombinante PheS* a la bacteria en la cual se desea realizar la mutación. El plásmido, es integrado en el cromosoma vía recombinación homóloga utilizando presión selectiva con antibióticos. Posteriormente, las recombinantes merodiploides obtenidas se cultivan en un medio suplementado con p-cloro-fenil alanina, (p-cl-phe) y de esta manera se estimula la producción de un segundo evento de recombinación entre los segmentos duplicados (en ausencia del antibiótico), generando un alelo mutado o reconstitución del alelo original dependiendo del sitio de recombinación. La pérdida del plásmido se evalúa por la sensibilidad al antibiótico correspondiente (presente en pCJK47) (Figura 5).

Figura 5.

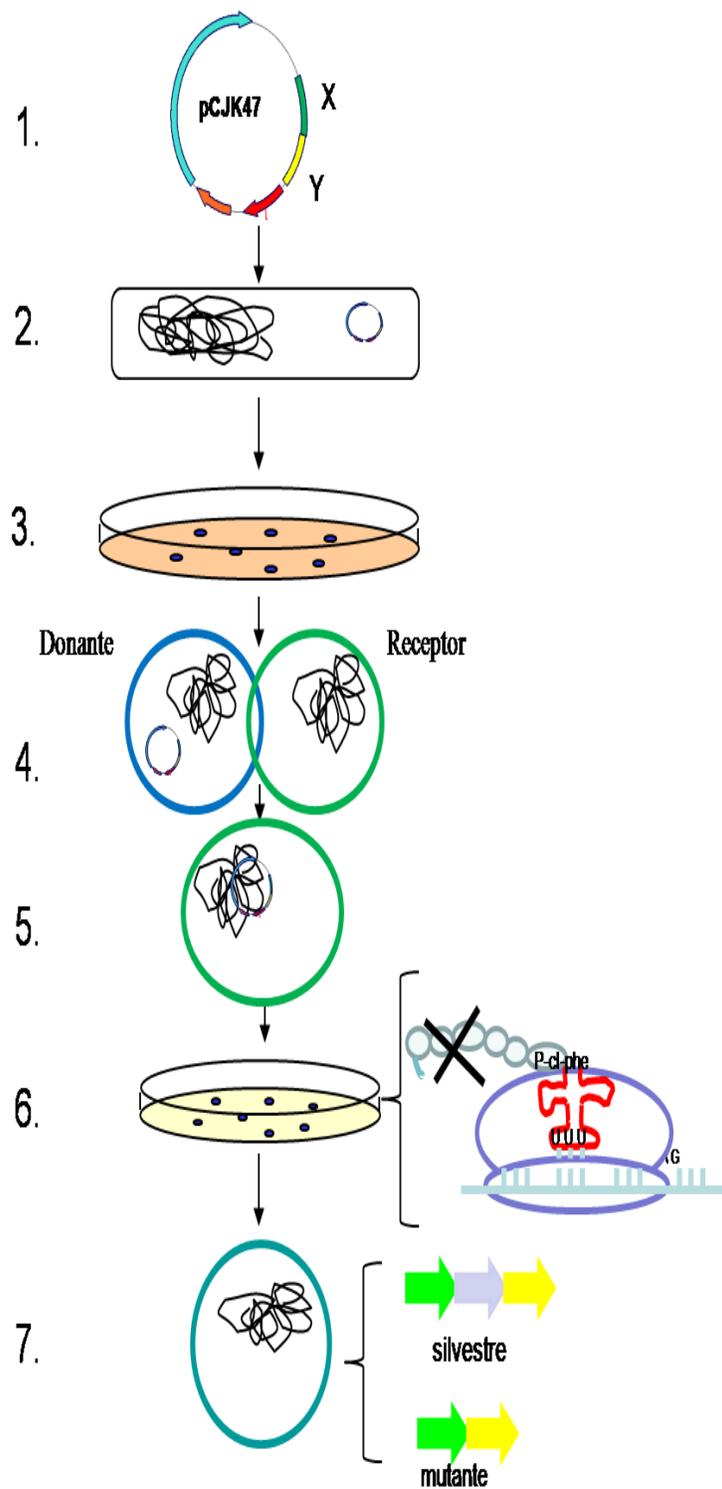


Figura 5. Sistema de construcción de mutantes utilizando el sistema de selección sin marcación PheS*

Para la implementación del sistema PheS* en *E. faecium* fue necesario la creación de un plásmido derivativo del pCJK47 (posee el gen *ermC* que confiere resistencia a eritromicina), debido a que la mayoría de *E. faecium* son resistentes a este antibiótico y por lo tanto un vector portador del gen *ermC* no era útil para realizar mutagénesis en *E. faecium*. Por ello, se removió el gen *ermC* y se reemplazó por el gen *aph (2'')-ID* (incluyendo el promotor y las regiones terminadoras) que confiere resistencia a gentamicina, el cual fue obtenido por amplificación por PCR usando como templado el plásmido pTEX5501-TS-Mob+ (número de acceso DQ208937) y los iniciadores A y B (Anexo A). El fragmento amplificado (1,089 bp) fue digerido con las enzimas de restricción NsiI y BglII utilizando una concentración 1 X del buffer D (tris HCl 6 mM, MgCl 6 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM) (Promega Corporation, Madison, Wis), albumina de suero bovino (BSA) y agua desionizada estéril por 6 horas a 37°C. Una vez digerido el inserto se ligó al vector pCJK47 (previamente tratado con las mismas enzimas las cuales removían el gen *ermC*) utilizando la enzima T4 ligasa (Promega, Corporation) por incubación a 16°C toda la noche siguiendo los protocolos de clonación y ligación de Sambrook y colaboradores (307).

El producto de la ligación se transformó en *E. coli* EC1000 utilizando la metodología de choque térmico (307) y se sembró en agar LB suplementado con gentamicina 25 µg/ml y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-gal 200 µg/ml). Las bacterias se incubaron a 37°C por 24 horas y las colonias recombinantes de color azul obtenidas fueron evaluadas por PCR para la detección del gen *aph (2'')-ID* utilizando los iniciadores

A y B (Anexo A). Se seleccionó una cepa positiva por PCR para este gen y se aisló el plásmido correspondiente utilizando el protocolo comercial Wizard Plus SV minipreps DNA purification system (Promega Corporation, Madison, Wis). El nuevo plásmido recombinante pCJK47Gen fue confirmado por restricción enzimática utilizando las enzimas NsiI y BglII (para liberación del fragmento clonado) y además por secuenciación. El nuevo vector pCJK47Gen (6,931 bp), confiere resistencia a gentamicina y mantiene las características del sistema PheS* de contra-selección (Figura 6).

Posteriormente, con el objetivo de construir una mutante que pudiera ser diferenciada fácilmente de la cepa salvaje, se desarrolló un plásmido derivativo de pCJK47Gen que presenta el gen *cat* (cloranfenicol acetil transferasa) el cual permite hacer interrupción por reemplazo alélico. Para su construcción se realizó una digestión de un fragmento de 992 bp (portador del gel *cat*), proveniente del plásmido pTEX5501-TS-Mob+ utilizando las enzimas BamHI y PstI (Promega) el cual posteriormente fue clonado en el plásmido pCJK47Gen (Figura 7). La digestión se realizó con la enzima BamHI empleando el buffer E (tris HCl 6 mM, MgCl 6 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM) y con la enzima PstI con el buffer H (tris HCl 90 mM, MgCl 10 mM, NaCl 50 mM) por 6 horas a 37°C. La purificación del plásmido y el fragmento se realizó por medio de la metodología de extracción en gel (Qiagen); la ligación con T4 ligasa y transformación en *E. coli* EC1000 se realizó empleando las mismas condiciones previamente descritas para la construcción del vector pCJK47Gen. Las bacterias recombinantes se cultivaron en agar LB suplementado con gentamicina 25 µg/ml-X-gal 200 µg/ml y las colonias obtenidas se confirmaron por PCR detectando la

presencia del gen *cat* con los iniciadores *catF*–*catR* (Anexo A). Las colonias positivas por PCR fueron confirmadas por medio del aislamiento del plásmido recombinante, digestión enzimática y por secuenciación en las dos cadenas de DNA. El nuevo vector se denominó pCJK47Gen/ChI (7,906 bp presenta dos sitios de clonaje (MCS) múltiple y el gen *cat* se localiza entre el MCSI y el MCSII.

Estos MCS permiten la clonación de fragmentos corriente arriba y corriente abajo del gen o de los genes a deletar y la presencia del gen *cat* permite reconocer fácilmente el reemplazo alélico por PCR. Adicionalmente, este vector también mantiene las características del sistema PheS* de contra-selección (Figura 5).

Figura 6.

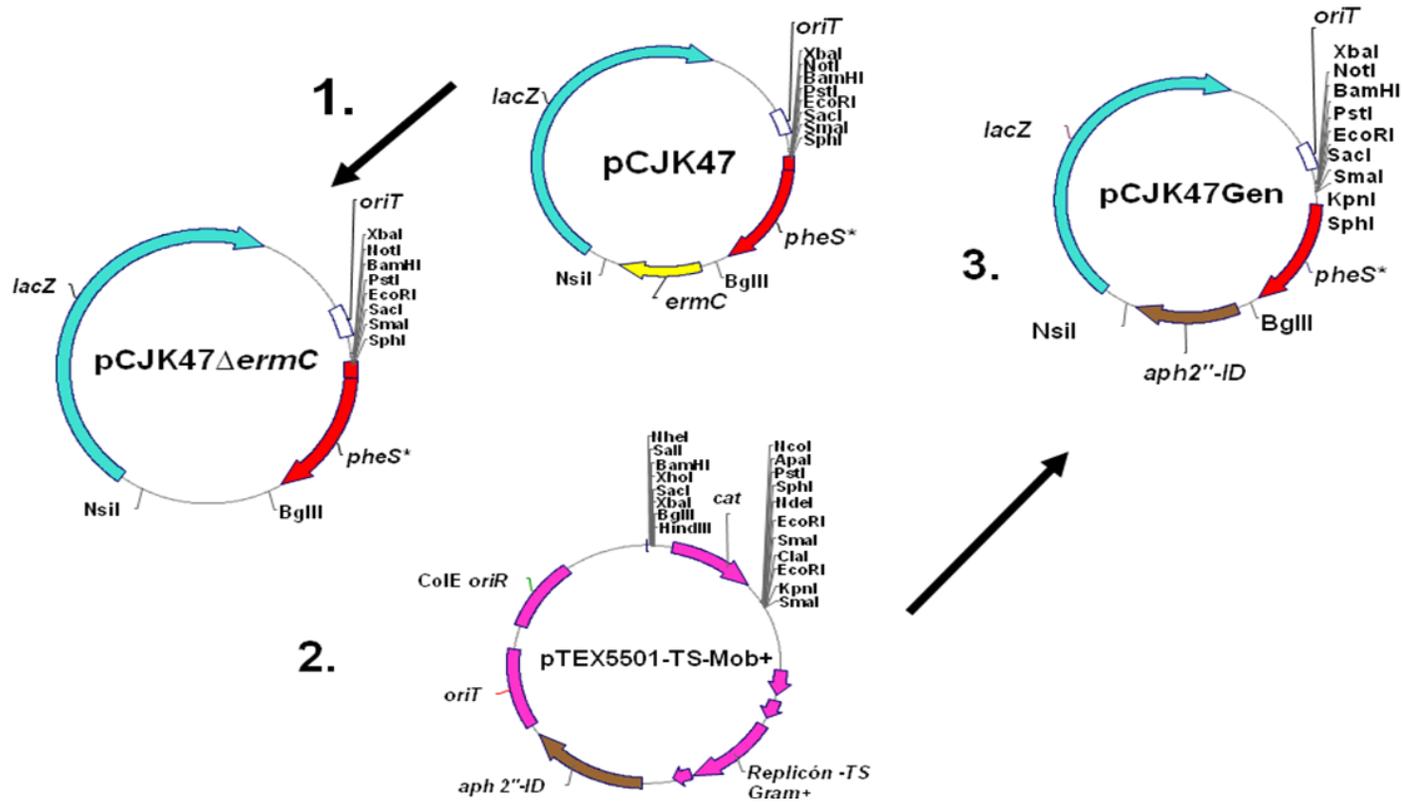


Figura 6. Construcción del vector pCJK47Gen. 1. El gen *ermC* del vector pCJK47 se removió utilizando las enzimas de restricción NsiI y BglII; 2. El gen *aph2''-ID* se amplificó por PCR usando como templado el pTEX5501-TS-Mob+ se digirió con las enzimas NsiI y Bgl II y posteriormente se ligó en el vector pCJK47 Δ *ermC*; 3. El vector obtenido mantiene las características de contra selección pCJK47 pero posee resistencia a gentamicina.

Nomenclatura: *lacZ*: β -galactosidasa; *pheS**: fenilalanina RNAt sintetasa (mutación G181D); *ermC*: gen de resistencia a eritromicina; *aph2''-ID*: gen de resistencia a gentamicina; *cat*: gen de resistencia a cloranfenicol; *oriT*: origen de transferencia proveniente de pCF10; Replicón TS-Gram positivos: replicón de Gram-positivos sensible a la temperatura; ColE *oriR*: origen de replicación de *E. coli*.

8.2.2.2.2 Construcción del vector portador de regiones homólogas para la obtención de la mutante de 6 genes de la región *hyl_{Efm}*.

Con el fin de construir una mutante por reemplazo alélico con delección los genes asociados al metabolismo en la región *hyl_{Efm}* (Figura 1), se utilizó el plásmido pCJK47Gen/Chl previamente obtenido. Un fragmento denominado A ubicado corriente arriba de *hyl_{Efm}* se clonó en el MCS I; para ello, un producto de 977 bp se amplificó por PCR (utilizando como templado el DNA del *E. faecium* TX0016 y los iniciadores C-D (Anexo A) y se digirió utilizando las enzimas BamHI y XhoI. La presencia del inserto en el vector se confirmó por PCR, restricción enzimática y secuenciación en las dos cadenas de DNA; este nuevo plásmido recombinante se denominó pCJK47Gen/Chl::A.

Posteriormente, un fragmento denominado B corriente abajo de *hyl_{Efm}* se clonó en el MCS II; para ello, se amplificó un producto de PCR de 999 bp empleando como templado el *E. faecium* TX0016 y los iniciadores E-F (Anexo A). El producto obtenido se clonó en el MCS II del vector pCJK47Gen/Chl::A usando las enzimas de restricción ApaI y EcoRI. La presencia del inserto B en el plásmido pCJK47Gen/Chl::A fue evaluada por PCR, restricción enzimática y secuenciación del fragmento clonado en las dos cadenas de DNA. El plásmido obtenido se denominó vector portador de regiones homólogas pCJK47Gen/Chl::A-B (Figura 8).

Figura 7.

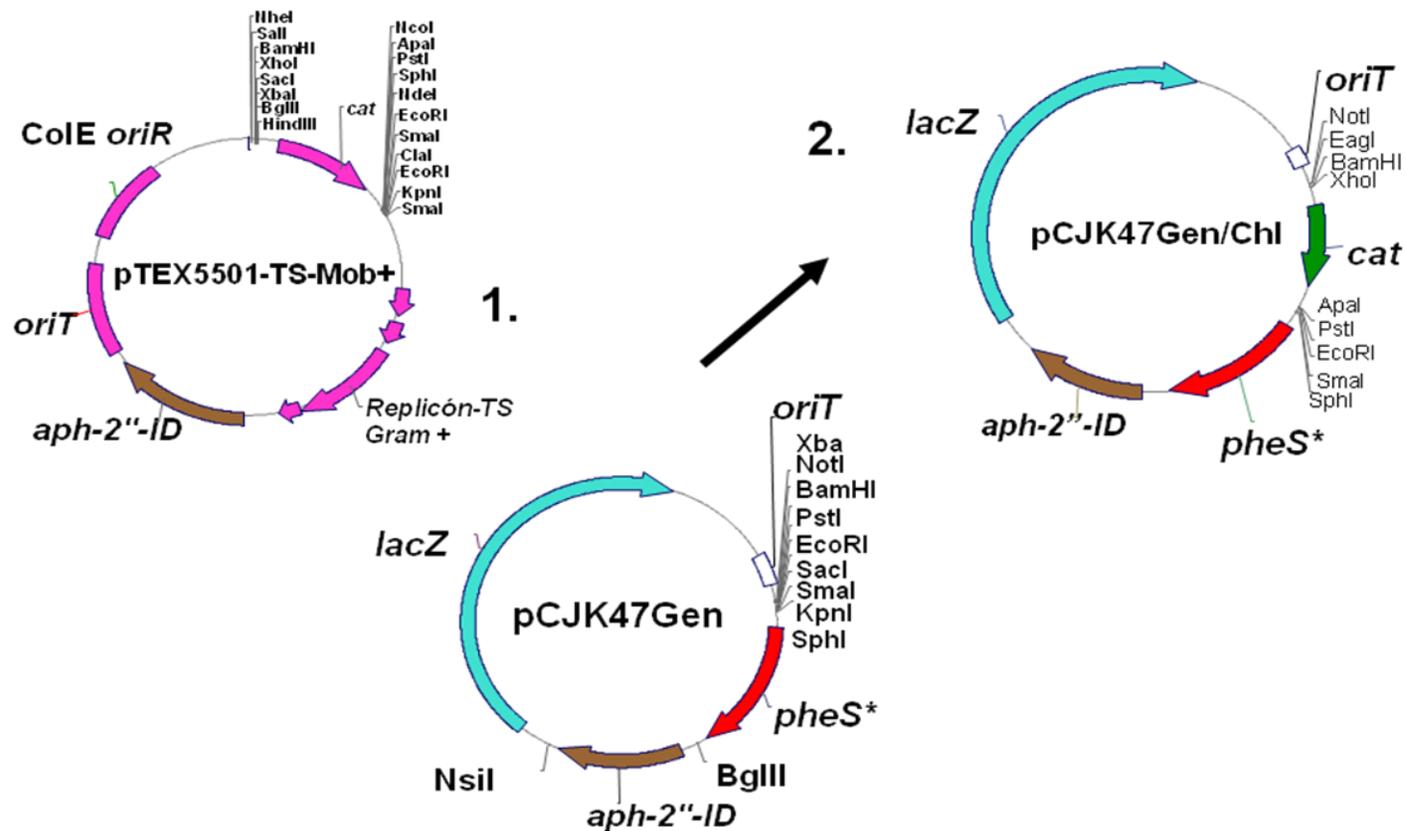


Figura 7. Construcción del vector pCJK47Gen/Chl. 1. Un fragmento de 922bp (proveniente del pTEX5501-TS-Mob+ el cual contenía el gen *cat*) fue digerido utilizando las enzimas BamHI-PstI y ligado en el pCJK47Gen. 2. El plásmido obtenido mantiene las características del pCJK47Gen y permite la identificación de mutantes por presencia del gen *cat*.

Nomenclatura: ColE *oriR*: origen de replicación de *E. coli*; *oriT*: origen de transferencia proveniente de pCF10; replicón TS-Gram-positivo: replicón de Gram-positivo sensible a la temperatura; *lacZ*: β-galactosidasa; *pheS**: fenilalanina RNAt sintetasa (mutación G181D); *ermC*: gen de resistencia a eritromicina; *aph-2''-ID*: gen de resistencia a gentamicina; *cat*: gen de resistencia a cloranfenicol.

8.2.2.2.3 Transferencia del vector portador de regiones homólogas (pCJK47Gen/Chl::AB) de *E. faecium*

El plásmido pCJK47Gen/Chl::AB fue transferido por electrotransformación a la cepa *E. faecalis* CK111 siguiendo el protocolo descrito por Bae y colaboradores (312). Se realizó conjugación *in vitro* utilizando como receptor *E. faecium* cepa A (TX0016). Las células competentes de *E. faecalis* CK111 se prepararon inoculando una colonia en 10 ml de caldo BHI con espectinomicina (SPE) (1.000 µg/ml) a 37°C con agitación moderada toda la noche. Al día siguiente 1 ml de este cultivo se inoculó en 50 ml de caldo BHI y las bacterias se cultivaron hasta alcanzar una OD de 0.8. Posteriormente, las células se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C por 10 min y se resuspendieron en un buffer con lisozya (tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, NaCl 50 mM con lisozya 25 µg/ml) incubándolas a 37°C por 30 minutos. Las células se lavaron 3 veces en buffer de electrotransformación (sucrosa 0.5 M y glicerol al 10 %) se resuspendieron en 500 µl del buffer con lisozya y se congelaron a -80°C. La electrotransformación se realizó utilizando el electroporador Bio-Rad gene pulser, utilizando los siguientes parámetros: 50 µl de las células competentes, 500 ng del pCJK47Gen/Chl::AB, 1.25 K, 200 Ω, 25 µF, en una cubeta de 0.1 cm.

Figura 8.

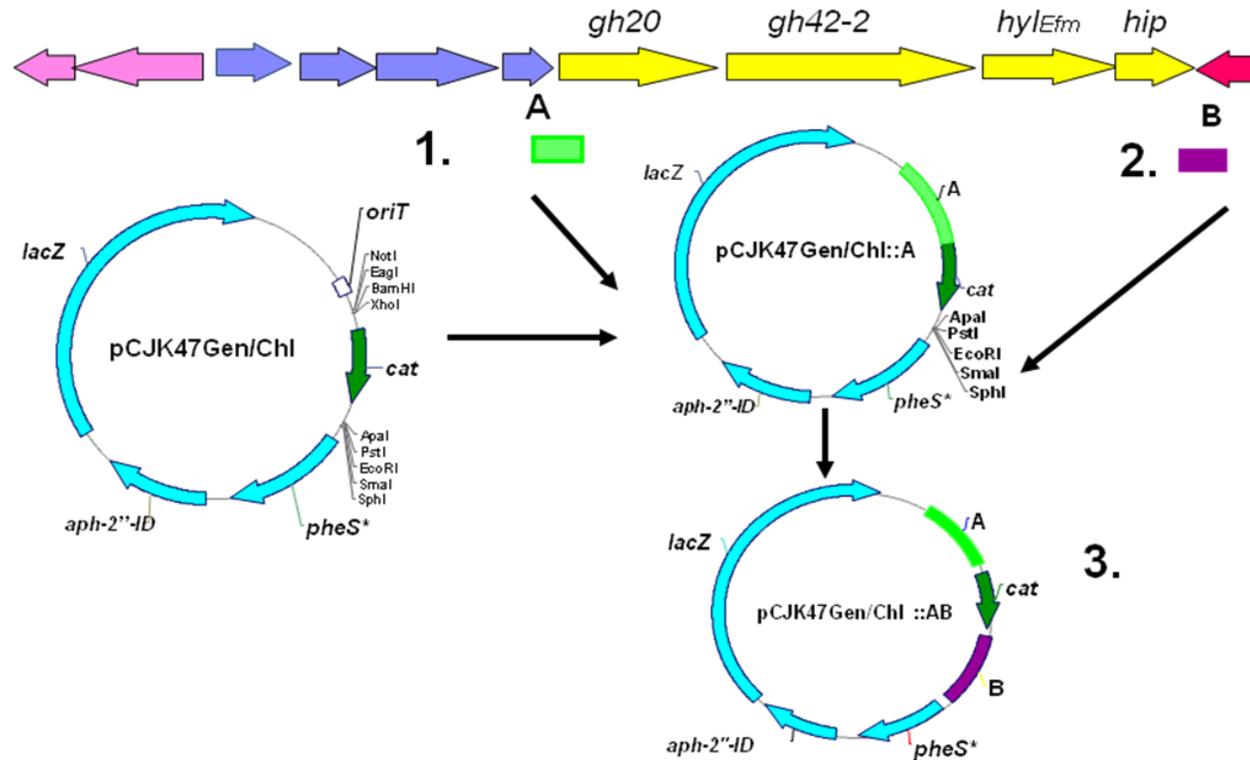


Figura 8. Construcción del vector portador de regiones homólogas para la creación de una mutante de 6 genes en la región *hylEfm*. 1. Una región A de 977bp se clonó utilizando las enzimas BamHI y XhoI en el MCS del pCJK47Gen/Chl; 2. Una región B de 999bp se clonó en el plásmido pCJK47Gen/Chl::A utilizando las enzimas ApaI y EcoRI 3. Se obtuvo el vector recombinante pCJK47Gen/Chl::AB el cual se utilizó para crear la delección de 6 genes en la región *hylEfm* de *E. faecium*. Nomenclatura: *lacZ*: β-galactosidasa; *pheS**: fenilalanina RNAt sintetasa (mutación G181D); *ermC*: gen de resistencia a eritromicina; *aph2''-ID*: gen de resistencia a gentamicina; *cat*: resistencia a cloranfenicol; *oriT*: origen de transferencia proveniente de pCF10; MCS: sitio múltiple de clonaje.

Posteriormente, las células transformadas se incubaron en caldo BHI con agitación moderada a 37°C por 2 horas y se sembraron en agar BHI suplementado con gentamicina 125 µg/ml y X-gal 200 µg/ml por 24 horas. Finalmente, las colonias azules obtenidas fueron evaluadas por PCR para confirmar la incorporación del plásmido a *E. faecalis* CK111.

Con el fin de generar el primer evento de recombinación entre el pCJK47Gen/Chl::AB y la región *hyl_{Efm}* presente en *E. faecium* TX0016 (Figura 9), se realizó la transferencia de este plásmido desde el donante *E. faecalis* CK111 al receptor *E. faecium* TX0016, empleando la metodología de conjugación *in vitro* (313). El donador se incubó en caldo BHI suplementado con gentamicina 125 µg/ml y el receptor en caldo BHI sin antibiótico. Posteriormente, se realizaron cultivos frescos con caldo BHI de cada una de las cepas por separado sin antibiótico hasta alcanzar una OD de 0.8 y a partir de estos cultivos se realizó una mezcla con caldo BHI en una relación donante : receptor 1:10.

El donante (*E. faecalis* CK111), el receptor (*E. faecium* TX0016) y el cultivo mixto (donante-receptor) se inocularon por separado en caldo BHI conservando la misma proporción en la mezcla mencionada previamente (1:10). Las bacterias en solución se transfirieron a una jeringa de 5 ml adaptada a un dispositivo que contenía una membrana estéril de 0.45 µm (Millipore, Bedford, Mass). Las membranas se transfirieron a un agar BHI (el cual se incubó a 37°C durante 24 horas para permitir el crecimiento de la bacterias) y luego se resuspendieron en 1 ml de solución salina (0.9 %) usando vortex. La solución de bacterias se sembró por dispersión en agar BHI suplementado con

eritromicina 200 µg/ml-gentamicina 170 µg/ml) y se incubó a 37°C hasta por 48 horas. A las colonias transconjugantes obtenidas (recombinantes merodiploides) se les realizó PCR con diferentes pares de iniciadores (M-N y O-P) (Anexo A), permitiendo confirmar que el plásmido se había integrado en una de las regiones homólogas que se encontraban en *E. faecium* TX0016 generando el primer evento de recombinación. Por otra parte, las soluciones bacterianas del donante y del receptor (sembradas por separado) se cultivaron en los respectivos agares y se realizó recuento de colonias; la eficiencia de la conjugación fue evaluada calculando el número de transconjugantes por donante empleando la fórmula:

$$\text{Eficiencia de la conjugación} = \frac{\text{UFC/ml de la cepa donadora}}{\text{UFC/ml de las cepas transconjugantes}}$$

8.2.2.2.4. Producción de doble evento de recombinación

Una vez obtenidas las recombinantes merodiploides, estas se sembraron en un medio selectivo sin antibiótico MM9YEG (medio M9 10X, extracto de levadura 0.25 %, glucosa 0.5 %, X-gal 200 µg/ml) suplementado con p-cloro-fenilalanina con el fin de estimular el segundo evento de recombinación; las colonias que crecen han perdido el plásmido generando de esta manera dos posibles tipos: cepas que han reconstituido el genotipo o las cepas que han producido la delección esperada (Figura 9) (306).

Para este último paso, se tomó una colonia proveniente del primer evento de recombinación, se resuspendió en 50 µl de solución salina (0.9 %) y se sembró en el

medio de cultivo MM9YEG por agotamiento. Este cultivo se incubó a 37°C hasta por 48 horas, las colonias obtenidas se sembraron nuevamente en agar BHI y BHI suplementado con gentamicina 125 µg/ml. Las colonias que crecieron en BHI pero no en BHI con gentamicina 125 µg/ml se evaluaron por PCR, electroforesis de campo pulsado (PFGE), hibridación (con sondas para los genes *cat* y *hyl_{Efm}*) y adicionalmente la región mutada fue secuenciada para confirmar la delección de los genes correspondientes.

8.2.3. Construcciones de plásmidos para ensayos de complementación

Con el fin de evaluar si los efectos *in vivo* eran debido a las mutaciones y no a otros efectos se desarrollo un sistema de complementación utilizando un vector de expresión denominado pAT392 (126). Este plásmido es un derivado del pAT79, que se caracteriza por presentar un origen de replicación para Gram-negativos, proveniente del pUC19 y un origen de replicación para Gram-positivos, proveniente del plásmido de enterococos pAMβ1. Adicionalmente, el pAT392 contiene un gen de resistencia a espectinomicina (*spc*), un gen de resistencia a gentamicina (*aac-6'-aph2''*), un MCS y un promotor de enterococos de expresión constitutivo, P2 (proviene del gen *aphA-3* del plásmido de enterococos pJH1 y se encuentra localizado corriente arriba del MCS). El gen de interés se clona en el MCS que se encuentra corriente arriba del gen *aac-6'-aph2''* por lo tanto, el promotor P2 controla la expresión de los dos genes y de esta manera cuando se expresa el gen de resistencia a gentamicina (*aac-6'-aph2''*) también lo hace el gen de interés que ha sido clonado en el MCS (126) (Figura 10). Para ello, se realizaron tres construcciones independientes en las cuales clonaron el gen *hyl_{Efm}*, el gen hipotético (*hip*) y ambos genes

en el pAT392 utilizando las enzimas SacI y SmaI; en las tres clonaciones se empleó el DNA del *E. faecium* TX0016 como templado, los iniciadores G-H (*hyl_{Efm}*), I-J (*hip*), G-J (*hyl_{Efm}-hip*) (Anexo A) y los insertos clonados fueron confirmados por PCR, digestión enzimática y secuenciación (Figura 10). Los plásmidos derivados de pAT392 fueron transferidos por electrotransformación a cepas de *E. faecium*. Para ello se prepararon células competentes inoculando una colonia en 10 ml de caldo BHI e incubando toda la noche a 37°C. Al día siguiente se adicionó 2 ml de esta suspensión bacteriana a 40 ml de caldo BHI suplementado (2 g de glicina y sucrosa 1 M) y se cultivó a 37°C con agitación moderada por 24 horas. Posteriormente, las bacterias se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C por 10 minutos y se resuspendieron 3 veces en buffer PSM (fosfato de potasio 7 mM pH 7.4, sucrosa 300 mM y cloruro de magnesio 1 mM). Finalmente, las células se disolvieron en un ml de buffer PSM con 200 µl de glicerol al 85 % y se congelaron a -80°C (314). Se emplearon las mismas condiciones de electrotransformación descritas previamente. La presencia del vector en las cepas de *E. faecium* se confirmó por PCR y por PFGE utilizando digestión con la enzima SmaI, la cual presenta un solo sitio de corte en los plásmidos derivados de pAT392.

8.2.3.1 Evaluación de la estabilidad de los derivados de pAT392 *in vitro*- e *in vivo*

La estabilidad de los plásmidos derivados de pAT392 se evaluó cultivando las células en caldo BHI toda la noche a 37°C con agitación moderada. Al día siguiente se realizaron diluciones que fueron sembradas en agar BHI. Se recuperaron 100 colonias de cada una

Figura 9.

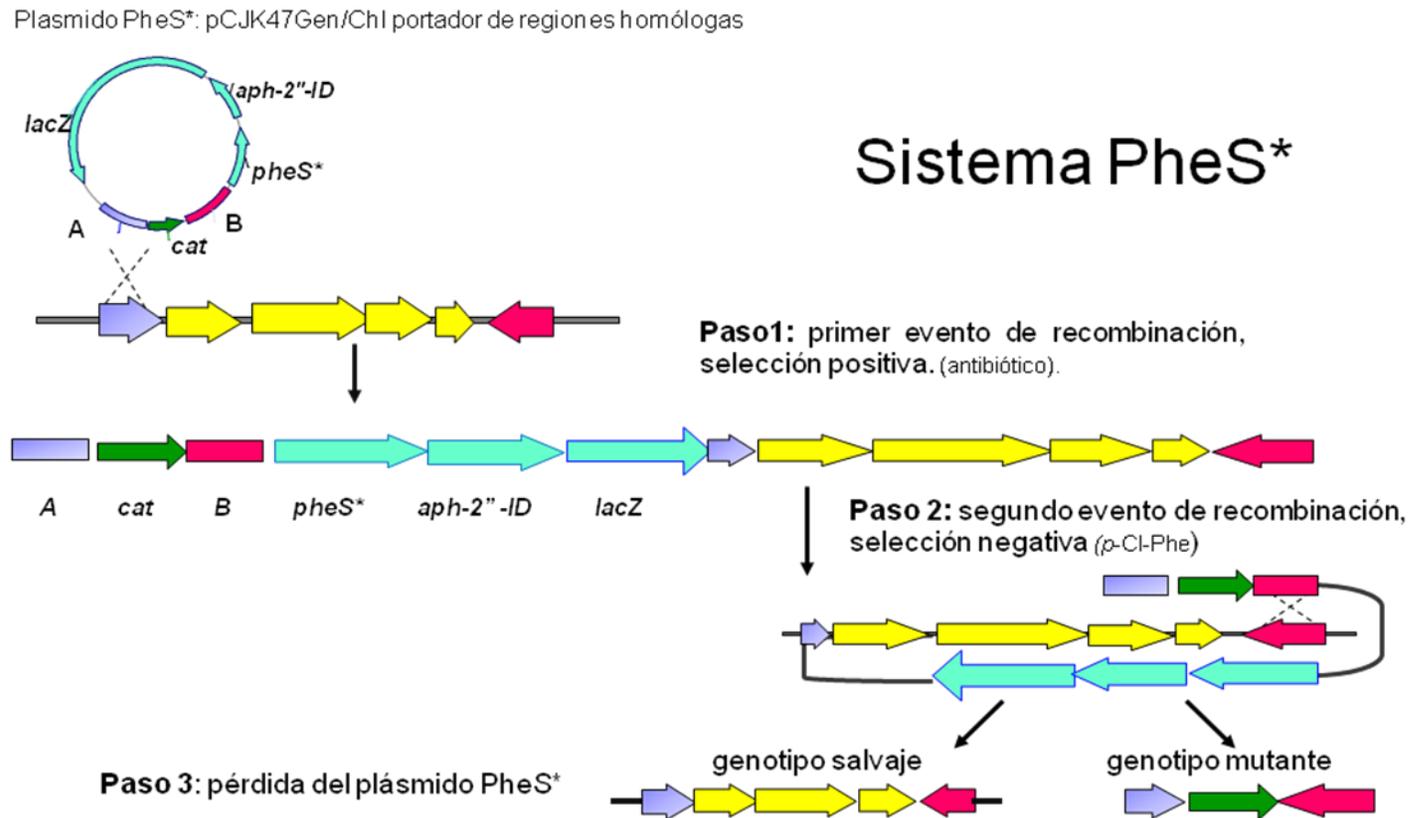


Figura 9. Metodología de selección sin marcación empleando en sistema PheS* para la delección en la región *hyl*_{Efm}. **Paso 1.** El plásmido portador de las regiones homólogas es introducido a la bacteria blanco por conjugación y las recombinantes portadoras del plásmido integrado son seleccionadas por crecimiento en gentamicina (solo se muestra el evento en la recombinación corriente arriba); **Paso 2.** Una colonia proveniente del primer evento de recombinación se cultiva en un medio selectivo con *p*-cl-phe para estimular el segundo evento de recombinación; **Paso 3.** Se produce una integración de región homóloga producción la delección esperada y la pérdida del plásmido PheS* o se presenta una reconstitución del genotipo salvaje. Nomenclatura: *lacZ*: β-galactosidasa; *pheS**: fenilalanina RNAt sintetasa (mutación G181D); *ermC*: gen de resistencia a eritromicina; *aph2''-ID*: gen de resistencia a gentamicina; *cat*: gen de resistencia a cloranfenicol; *p*-cl-phe: *p*-cloro-fenilalanina.

de las cepas, se sembraron simultáneamente en agar BHI y BHI suplementado con gentamicina 125 µg/ml, se incubaron a 37°C por 24 horas y se calculó el porcentaje de pérdida del plásmido por comparación entre el número de colonias resistentes o susceptibles a gentamicina. Adicionalmente, se determinó el porcentaje de pérdida de los plásmidos derivados de pAT392 *in vivo*. Para ello se recuperaron colonias provenientes del bazo de ratones que habían sido infectados vía intra-peritoneal con las diferentes cepas derivativas de pAT392 (ver sección 8.4.1). El bazo de los animales muertos fue removido, macerado en solución salina, se realizaron diluciones seriadas en solución salina y finalmente se recolectaron colonias las cuales fueron evaluadas de la misma manera que en el ensayo *in vitro* descrito previamente.

8.2.3.2 Experimentos de PCR con transcripción reversa (RT-PCR)

Con el objetivo de determinar si los genes clonados en el pAT392 se expresaban se evaluó la transcripción de los genes de la región *hylefm* por PCR con transcripción reversa y la extracción del RNA se realizó usando el reactivo comercial RNAwiz (Ambion, Austin, TX). Para ello, las bacterias se cultivaron en 10 ml de caldo BHI hasta llegar a fase exponencial y se centrifugó 2 ml de cultivo a 10.000 rpm por 10 minutos. Las células fueron resuspendidas en 500 µl del reactivo RNAwiz con 1 g de esferas de sílica y la solución se agitó por vortex a máxima revolución por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante se incubó con 500 µl del RNA wiz por 5 min, se adicionó 300 µl de cloroformo, se incubó por 10 minutos adicionales y se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 15 min. El sobrenadante obtenido se mezcló con 380 µl de agua libre de

Figura 10.

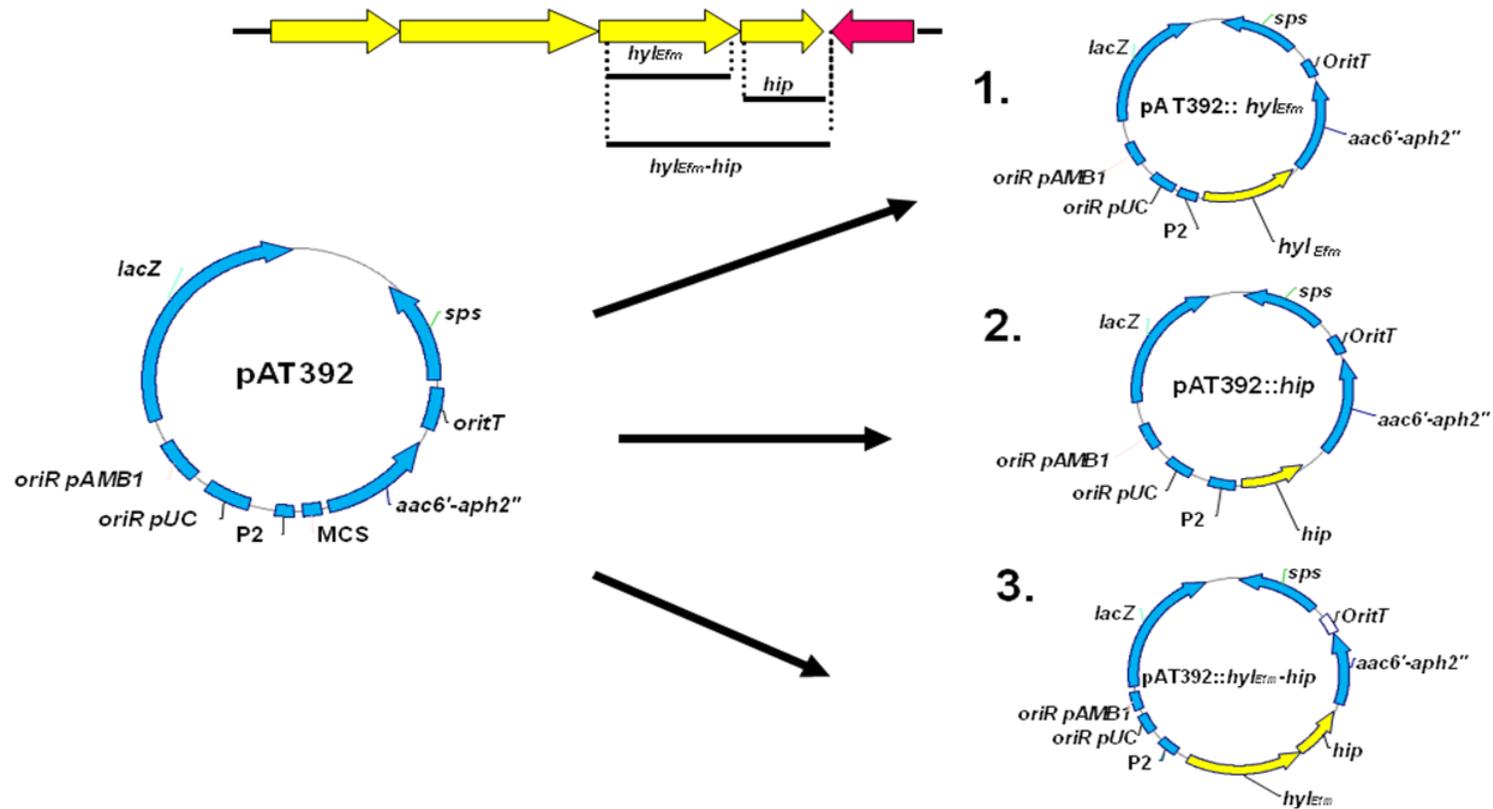


Figura 10. Construcción de plásmidos para complementación utilizando el vector de expresión pAT392. Se realizaron tres construcciones independientes, en la cuales el gen se clonó corriente abajo del promotor P2 que controla la transcripción de los genes clonados y del gen *aac6'-aph2''*. **1.** El gen *hylEfm* (1.6kb), fue clonado utilizando las enzimas *SacI* y *SmaI* en el MCS del pAT392; **2.** El gen *hip* de 0.9 kb se clonó utilizando la misma estrategia descrita; **3.** Los genes *hylEfm* y *hip* se clonaron conjuntamente en el pAT392 de la forma mencionada previamente. Nomenclatura: *lacZ*: β-galactosidasa; *sps*: gen de resistencia a espetinomicina; *aac6'-aph2''*: gen de resistencia a gentamicina; MCS: sitio múltiple de clonaje; P2: promotor proveniente de un plásmido de enterococos; *oriR pUC*: origen de replicación para Gram-negativos; *oriR pAMB1*: origen de replicación para Gram-positivos.

RNAsas y 760 μ l de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 10.000 rpm a 4 °C por 30 min. El precipitado obtenido fue resuspendido en 1 ml de etanol al 70 % y centrifugado nuevamente por 15 min con las condiciones descritas previamente. El RNA se cuantificó por espectrofotometría con medición a 260 nm y finalmente se corrió en un gel de agarosa al 0.8 % para determinar la calidad de la muestra obtenida.

La remoción del DNA contaminante se realizó por digestión con DNAsa (Ambion) utilizando 20 μ g de RNA, 1 μ l de DNAsa y 1X de buffer para DNAsa a 37°C por 30 min. Posteriormente, se adicionó 5 μ l del buffer de inactivación, se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto; el sobrenadante obtenido se digirió nuevamente realizando el mismo procedimiento.

La reacción de PCR con transcripción reversa se realizó por la técnica de un solo paso utilizando el estuche comercial SuperScript One Step RT-PCR with platinum Taq (Invitrogen corporation, Carlsbad, CA) empleando un volumen final de 50 μ l. La mezcla maestra se preparó con 100 ng de RNA, 1 X de buffer de reacción (dNTP 0.4 mM y MgSO₄ 2.4 mM), los iniciadores K y L (0.2 μ M), 1 μ l RT/Taq platinum y agua destilada estéril libre de RNAasas. El control de contaminación (presencia de DNA en la muestra) consistió en una reacción independiente con los mismos reactivos previamente mencionados pero adicionando únicamente Taq platinum. Los parámetros de la RT-PCR fueron los siguientes: *i*) transcripción del RNA: 50°C por 30 minutos y *ii*) amplificación del cDNA: 94°C 2 minutos, 35 ciclos: 94°C 15 seg, 55°C 30 seg, 72°C 1 min y 72°C 7 min.

8.2.4 Técnicas de genotipificación molecular

8.2.4.1 Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Esta metodología es útil para la comparación de diferentes cepas bacterianas por medio de digestión del DNA con enzimas de restricción, las cuales generan un patrón de bandas que permite obtener un perfil genético para cada cepa evaluada. Para realizar esta metodología, se inoculó una colonia de enterococo en 5 ml de caldo BHI y se incubó a 37°C con agitación moderada toda la noche. El cultivo bacteriano se centrifugó a 5.000 rpm por 10 min y se resuspendió en 1.5 ml de buffer PIV (tris-HCl pH 7.6 10 mM y NaCl 1 M). El DNA fue embebido en agarosa de bajo punto de fusión al 1.6 % (Incert agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc), los bloques de agarosa se solidificaron a 4°C por 10 min y se incubaron en 8 ml de buffer de lisis (tris-HCl pH 7.6 6 mM, NaCl 1 M, EDTA pH 7.5 100 mM, Brij-58 0.5 %, deoxicolato de sodio al 0.2 %, sarkosyl al 0.5 %, RNase 20 µg/ml y lisozima 1 mg/ml) a 37°C por 5 horas. Posteriormente, el buffer de lisis fue eliminado, los bloques se incubaron en solución ESP (EDTA 0.5 M pH 9.5, sarkosil al 1 % y proteinasa K 50 µg/ml) a 50°C y se lavaron 3 veces en buffer TE (tris-HCl 10 mM pH 7.5 y EDTA 1 mM pH 7.5) a temperatura ambiente por 1 hora (150).

El DNA fue digerido con 20 U/µl SmaI (Promega Corporation) a 25°C con buffer J1X (tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 7 mM, KCl 50 mM) BSA 1 X y agua desionizada estéril. La reacción enzimática fue detenida incubando con buffer TE a 37°C por 30 min. Los fragmentos de DNA fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa "Seakem gold" (Cambrex Bio Science Rockland Inc) al 1.6 % con buffer TBE 0.5 X (tris borato 44.5 mM, ácido bórico

44.5 mM y EDTA pH 8.0 1 mM) y utilizando el equipo CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, Inc, Richmond, CA). Los parámetros escogidos para el corrido electroforético fueron: voltaje de 6 V/cm, pulso inicial 2, pulso final 28, tiempo de corrido 22 horas, temperatura 14°C y se utilizó un marcador molecular “lambda ladder PFGE marker”, (New England Biolabs). Finalmente, el gel fue teñido en una solución con bromuro de etidio 0.5 µg/ml (Promega corporation) por treinta minutos, se visualizó con UV y las imágenes se digitalizaron utilizando el equipo Alfa Imager. El análisis de los patrones electroforéticos se evaluaron mediante el programa GelCompar II (Applied Maths NV, Belgium).

8.2.4.2. Tipificación de secuencia de múltiples locus (MLST)

Esta metodología permite la caracterización de especies bacterianas por evaluación de la secuencia del DNA de regiones internas de genes “housekeeping”, las cuales son comparadas en una base de datos generando un tipo de secuencia denominado ST. La tipificación MLST se realizó por evaluación de 7 genes “housekeeping” de *E. faecium* (son genes de tipo constitutivo que se transcriben a niveles constantes y generalmente son importantes para la sobrevivencia de la bacteria) los cuales corresponden a: adenilato kinasa (*adk*), ATP sintetasa subunidad alfa (*atpA*), D-Ala:D-Ala ligasa (*ddl*), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gyd*), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*gdh*), fosforibosil-aminoimidazol carboxylasa sub-unidad ATPasa (*purk*) y transportador de fosfato “ATP binding cassette”, ABC (*pstS*) (158). La amplificación de los genes se realizó empleando DNA genómico (el cual fue aislado con el protocolo previamente descrito) en un volumen final de 20 µl, con Taq polimerasa (Invitrogen) y aplicando las siguientes condiciones:

denaturación inicial 94°C por 3 min; 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg, y 72°C por 30 seg; extensión a 72°C por 5 min (158). Los productos obtenidos se purificaron utilizando el estuche comercial QIAquick-gel extraction kit (Qiagen Inc, Valencia, CA), se secuenciaron en los dos sentidos y en dos reacciones diferentes con los iniciadores reportados previamente (158). Se utilizó el método automatizado Taq dideoxy en el secuenciador automatizado ABI Prism (Applied Biosystem, Foster City CA). Las secuencias fueron ensambladas usando el programa DNASTAR (Lasergene, Madison, WI), los perfiles alélicos fueron obtenidos y el ST (tipo de secuencia) fue designado para cada perfil alélico teniendo en cuenta la base de datos de MLST (página electrónica: <http://www.efaecium.mlst.net>).

8.2.5 Estudio de plásmidos

8.2.5.1 Digestión con nucleasa S1 y digestion con I-Ceu-I

La separación del DNA de megaplásmidos (>100 kb) del DNA cromosomal es un procedimiento complicado debido a ciertas condiciones como: *i)* en un gel de electroforesis convencional es difícil separar estos plásmidos debido al tamaño que presentan, (208, 315-317), *ii)* sufren degradación por los procedimientos convencionales de extracción en el laboratorio, *iii)* debido a que las formas súper enrolladas migran muy despacio en un gel de PFGE, los plásmidos que presentan un corte en una hebra de DNA se mantienen atrapados en el pozo y no migran a través del gel (318-320). Por lo tanto, es necesario la aplicación de una metodología que permita el adecuado estudio y

caracterización de los megaplásmidos y para ello la digestión enzimática con la nucleasa S1 es una buena alternativa. La nucleasa S1 tiene actividad sobre la hebra sencilla del DNA de cualquier forma súper enrollada de los plásmidos, en los cuales debido a su torsión negativa presentan una región denaturada transitoria en la cual actúa la nucleasa S1. Una vez que una hebra es digerida la enzima hace un corte en la hebra opuesta generando de esta manera formas lineales del plásmido.

Esta metodología de la nucleasa S1 tiene como principales ventajas: *i)* no requiere el conocimiento previo de la secuencia del plásmido para su utilización como si sucede con el uso de enzimas endonucleasas de restricción las cuales pueden producir varios cortes impidiendo la adecuada determinación del tamaño del plásmido, *ii)* con la enzima S1 se pueden digerir todo tipo de plásmidos hasta un tamaño aproximado de 600 Kb, *iii)* el uso acoplado con hibridización permite la obtención de mayor información acerca del plásmido de estudio *iv)* tiene efecto autolimitado a diferencia de otras enzimas (DNasa I) o tratamientos (radiaciones ionizantes) que lineariza plásmidos, pero estas metodologías crean múltiples cortes hecho que requiere una estandarización muy precisa de las condiciones de digestión (321).

El protocolo incluye la lisis bacteriana de las células embebidas en bloques de agarosa y tratamiento de los mismos con nucleasa S1 generando formas lineales de los plásmidos los cuales son corridos por PFGE utilizando marcadores adecuados que permitan estimar el tamaño de los mismos (321). Esta técnica fue estandarizada para la determinación de plásmidos en *E. faecium*, para ello los bloques de agarosa fueron realizados utilizando el

protocolo de PFGE previamente descrito (150). El DNA fue a lisado con 0.01 U de nucleasa S1 de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en 200 µl de buffer (NaCl 50 mM, acetato de sodio pH 4.5 30 mM y ZnSO 45 mM) a 37°C por 45 min. Posteriormente, la reacción se detuvo con buffer ES (EDTA pH 8.0 0.5 M y N-lauryl sarcosina al 1 %) (321) y los bloques se corrieron en un gel de agarosa al 1.6 % siguiendo las mismas condiciones previamente descritas para PFGE.

Por otra parte, con el fin de utilizar una técnica que permitiera confirmar la presencia de elementos extracromosomales, se utilizó una metodología como la digestión con I-Ceu-I, utilizando PFGE e hibridización (322, 323). La enzima de restricción I-Ceu-I, pertenece a las endonucleasas tipo II, la cual esta codificada por el intrón móvil clase I, que se ha insertado en el gen *rrl* (gen que codifica para rRNA 23S) del cloroplasto de *Chlamydomonas eugamatos* (323). La enzima es específica por que reconoce una secuencia de 26 bp que se encuentra en el DNA de doble cadena de los genes rRNA 23S (operon *rrn*), por lo tanto digiere solo el DNA cromosomal (324) dejando el DNA plasmídico sin digestión; esta enzima ha sido ampliamente usada en el mapeo genético de *E. coli* y *Salmonella* spp. observándose la presencia de 7 copias del operón *rrn* (324), en *E. faecalis* 4 copias y en *E. faecium*, *E. avium* y *E. durans* se encuentran 6 copias del operon *rrn* (325).

La digestión del DNA se realizó empleando 40 U de I-Ceu-I (New England Biolabs, Boston, MA) en el buffer 4 (tris-acetato 20 mM, acetato de potasio 50 mM, acetato de magnesio 10 mM, ditiotreitól 1 mM) adicionando BSA 2 X e incubando a 37°C toda la noche (322). El

corrido electroforético se realizó por 22 horas, con un pulso inicial de 5 seg, un pulso final 45 seg a temperatura de 14°C y en buffer TBE 0.5 X. Posteriormente, el DNA se transfirió a una membrana de nylon Hybon⁺ y se hibridizó utilizando sondas para la detección del gen rRNA 23S y los genes de estudio siguiendo los protocolos de transferencia e hibridización descritos por Sambrook y colaboradores (307).

8.2.5.2 Aislamiento de plásmidos usando gradiente de densidad con cloruro de cesio

Debido al tamaño del plásmido *hyl_{Efm}* se empleó la técnica de aislamiento de DNA plasmídico (molécula de DNA circular cerrada super enrollada de alto peso molecular, DNA-CCC) desarrollada para la separación del DNA-CCC del DNA cromosomal, la cual se basa en la diferencia en densidad de estas dos formas en presencia de compuestos intercalantes del DNA como el bromuro de etidio (316). Este colorante se integra el DNA extendiendo ligeramente la hélice y por lo tanto permite disminuir su densidad, lo que contribuye a que ambos componentes del genoma bacteriano (DNA cromosomal y plasmídico) sean aislados y posteriormente purificados si se someten a una centrifugación con un gradiente de cloruro de cesio y bromuro de etidio (326). Esta técnica incluye los siguientes pasos: *i)* crecimiento bacteriano y lisis utilizando lisozima-sodio dodecil sulfato (SDS), *ii)* reducción de la viscosidad del lisado, *iii)* denaturación alcalina y neutralización, *iv)* precipitación con fenol y tratamiento con cloroformo e alcohol isoamílico, y *vi)* centrifugación por gradiente de densidad (316).

La cepa de *E. faecium* se cultivó en 50 ml de caldo BHI a 37°C y al día siguiente se transfirió a un litro de caldo BHI, se incubó por 16 horas a 37°C, se adicionó sucrosa al

0.01M y treonina al 0.01 M y se continuó su crecimiento por 4 horas. El cultivo bacteriano se centrifugó a 7.000 rpm por 15 minutos, se resuspendió en buffer fosfato (NaH_2PO_4 0.1 M, Na_2HPO_4 0.1 M) y se centrifugó nuevamente de la misma forma antes mencionada. El precipitado celular se resuspendió en buffer de lisis (tris 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, lisozima 4 mg/ml) y se incubó a 37°C por 30 min, luego se centrifugó nuevamente y se adicionó buffer TE (tris 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0, y SDS al 1.2 %); la suspensión se incubó a 37°C por 30 min y se refrigeró toda la noche.

Al día siguiente la solución bacteriana se mezcló en un dispositivo a baja velocidad (20 rpm por un minuto), se alcalinizó llevándola a pH 12 con una solución de NaOH 3 N bajo constante agitación por diez minutos. Posteriormente, la suspensión bacteriana se neutralizó con buffer tris 2 M pH7.0 y se adicionó el mismo volumen de fenol previamente saturado con NaCl al 3 % en una probeta de vidrio. La capa superior se recuperó y se trató con MgCl_2 15 mM, NaPO_4 5 mM y etanol al 95 %, esta solución se congeló a -20°C toda la noche.

Al día siguiente la suspensión de DNA se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos, el precipitado obtenido se disolvió con EDTA 0.1 M pH 8.0 y se dializó por dos horas en 500 ml de solución TES (tris 0.05 M pH 8.0, EDTA 0.05 M, NaCl 0.5). Finalmente, se midió el volumen obtenido y se adicionó el equivalente en gramos (al volumen de la suspensión del DNA previamente obtenida) de cloruro de cesio junto con 0.5 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml). Esta mezcla se adicionó a tubos de polialómero (50-70, Spinco type 40 rotor)

los cuales fueron pesados, balanceados, sellados y posteriormente centrifugados por 22 horas a 4°C (48.000 rpm) usando una ultracentrífuga Beckton Dickinson.

El gradiente que contenía los plásmidos fue iluminado con luz ultravioleta para visualizar el DNA acoplado al bromuro de etidio, la banda del DNA-CCC tiene mayor densidad que la banda del DNA cromosomal. Esta banda fue removida por punción en el tubo con aguja No 18 y la solución obtenida fue mezclada con alcohol isoamílico con el fin de remover el bromuro de etidio. El plásmido obtenido se precipitó con el mismo volumen de buffer TE y se adicionó etanol al 95 % (dos veces el volumen), se incubó a -20°C toda la noche. Posteriormente, esta solución se centrifugó (15.000 rpm) a 4°C por 20 min, se eliminó el sobrenadante, se realizaron dos lavados adicionales con etanol al 70% y el precipitado obtenido se resuspendió en agua desionizada estéril. Finalmente, el plásmido obtenido fue digerido con la enzima EcoRI (Promega), 1 X buffer A y BSA 1 X a 37°C por dos horas y fue corrido en un gel de agarosa al 0.8 % con 100 voltios por 2 horas. El gel fue transferido a una membrana de Nylon⁺ (Amershan- HybondN⁺, GE Health®, Buckinghamshire, UK) y fue hibridizado con las sondas correspondientes a los genes *hyl_{Efm}*, *fms 20* y *fms 21 (pilA)* siguiendo las condiciones descritas previamente (307).

8.2.6 Hibridizaciones

8.2.6.1 Southern blotting

Los geles obtenidos de PFGE se irradiaron 2 minutos con luz UV, se denaturaron por una hora con una solución de NaOH 0.4 N y se transfirieron a membranas de Nylon⁺ (Amershan- HybondN⁺, GE Health®, Buckinghamshire, UK) por 36 horas utilizando el

protocolo de transferencia por capilaridad utilizando buffer NaOH (0.4 N) (307). Las membranas se lavaron en solución de neutralización (tris 0.5 M pH 7.0) y en buffer SSC 2 X (NaCl 0.3 M y citrato de sodio 30 mM) por 5 minutos y finalmente el DNA se fijó a una membrana a 80°C por dos horas.

Las sondas se amplificaron por PCR, se purificaron con el estuche comercial (QIAquick-gel extraction kit) y se denaturaron a 94°C por 5 minutos. La marcación de las sondas se realizó con el estuche comercial (RadPrime DNA labeling system, Invitrogen, Carlsbad, CA), empleando 5µl de [α -32P] dCTP (GE Healthcare, Piscataway, USA) y la purificación con las columnas Bio-Spin 6 (Bio-Rad) se realizó siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Las hibridaciones se desarrollaron en condiciones de alta astringencia (150), para ello las membranas se incubaron en 25 ml de buffer de pre-hibridación [(SSPE (NaCl 3 M, fosfato de sodio 0.2 M, EDTA 0.02 M pH 7.4), solución Denhardt 5X, SDS 0.5 %, formamida 50 % y DNA de timo de ternero 100 µg/ml)] por 4 horas posteriormente, se adicionaron las sondas previamente marcadas a las membranas y se incubaron a 42°C por 16 horas. Finalmente, se realizaron dos lavados con solución A (SSPE 2 X y SDS al 0.1 %) por 15 minutos cada uno a temperatura ambiente y dos lavados con solución B (SSPE 1 X y SDS al 0.05 %) y solución C (SSPE 0.1 X y SDS al 0.05 %) a 52°C respectivamente, por 10 minutos. Las membranas se expusieron en un casete con película Kodak, se almacenaron en el congelador de -80°C por dos días y se revelaron en el equipo automatizado procesador de películas Konika Minolta.

8.2.6.2 Hibridización por lisis de colonias

Esta técnica permite el tamizaje de genes a partir del crecimiento de microorganismos sobre membranas de nylon⁺ (Amersham- HybondN⁺, GE Health®, Buckinghamshire, UK), las bacterias son lisadas utilizando lisozima y mutanolisina, los componentes celulares son removidos y finalmente el DNA es denaturado y fijado en las membranas para su posterior estudio por medio de la técnica de hibridización.

Los aislamientos de *E. faecium* se cultivaron en agar BHI por agotamiento, del cultivo puro se tomo una colonia, se sembró en caldo Brucella suplementado con glicerol al 15 % en microplacas de 96 pozos y las bacterias se incubaron toda la noche. De cada aislamiento se realizaron improntas en membranas HybondN⁺ (Amersham) estériles y se incubaron sobre cajas de agar BHI a 37°C por 24 horas. Posteriormente, las bacterias se sometieron a lisis con buffer L (Lisozima 10 mg/ml y mutanolisina 4 U/ml) a 37°C por una hora. Luego, se realizó denaturación del DNA bacteriano con NaOH 0.5 N y lavados consecutivos con buffer tris (1 M pH 7.6), buffer de lavado (tris 0.5M pH7.6, solución NaCl 1.5M), cloroformo y etanol al 95 %. Finalmente, el DNA se fijó en las membranas por incubación a 80°C por dos horas.

La hibridización fue realizada bajo condiciones de alta astringencia utilizando el buffer CH (formamida al 50 %, solución Denhardt 5 X, SSC 5 X, SDS al 0.1 %, DNA de timo de ternero 100 µg/ml) a 42°C. Las membranas se hibridizaron utilizando sondas las cuales fueron marcadas empleando el protocolo de marcación de sondas previamente descrito (ver sección 8.2.6.1). Las membranas fueron lavadas dos veces por cinco minutos a

temperatura ambiente con buffer A1 (SSC 2 X y SDS al 0.1 %) y dos últimos lavados se realizaron a 50°C por quince minutos usando buffer A2 (SSC al 0.1 % y SDS al 0.1 %). Las películas (Kodak) fueron expuestas a -80° por un día y fueron reveladas usando un equipo automatizado procesador de películas Konika Minolta.

8.3 Curvas de crecimiento y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Las curvas de crecimiento se realizaron en 50 ml de caldo BHI con incubación a 37°C y agitación constante. A partir de un cultivo de 16 horas se tomó un ml, se realizó una dilución 1/50 en caldo BHI y el crecimiento bacteriano fue monitoreado a una OD de 600 nm cada 60 minutos, durante 9 horas empleando un espectofotómetro. Cuando el cultivo alcanzó una OD de 0.6 se realizó una dilución 1/10 del cultivo original para realizar la medición de la OD y se continuó de la misma manera previamente descrita. Adicionalmente, de cada muestra evaluada por OD, se tomó una alícuota extra y se realizó un recuento de colonias empleando el método de Miles y Misra el cual permite determinar el número de células viables en un cultivo bacteriano. Para ello, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-8}) las cuales se sembraron 25 μ l por duplicado en cajas de agar BHI que se incubaron a 37°C por 24 horas para su posterior conteo visual (327). Las unidades formadoras de colonia (UFC), se calcularon empleando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \text{No de colonias} \times 40 \times \text{factor de dilución}$$

Para la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) se utilizó el método de dilución en agar siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical Laboratory Standar Institute, 2008)(328). Un inóculo bacteriano de 10^4 UFC, se sembró en agar

Muller-Hinton BBL (Becton Dickinson Dignostics) suplementado con las diferentes concentraciones de antibióticos y se incubó a 35°C por 24 horas. Los antibióticos evaluados fueron: ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, linezolid, teicoplanina y vancomicina. Adicionalmente, los altos niveles de resistencia a gentamicina 500 µ/ml (HLR-GEN) y a estreptomicina 2.000 µg/ml (HLR-STR) se evaluaron en agar BHI suplementado con el respectivo antibiótico. La cepa control de *E. faecalis* ATCC 29212 (328) se utilizó en todas las determinaciones de la CIM.

8.4 Modelos animales

8.4.1 Modelo de peritonitis en ratón

La evaluación de las diferentes cepas se realizó utilizando el método previamente estandarizado por Singh y colaboradores el cual fue aprobado por el comité de manejo de animales de la Universidad de Texas (animal welfare committte, University of Texas Health Science Center at Houston). Para ello, se utilizaron ratones (hembras ICR, Harlan Sprague Dawley) de 4 a 6 semanas de edad con un peso aproximado de 25 g, los cuales se infectaron por inyección intra-peritoneal con un ml del inóculo mezclado previamente (el rango desde 1×10^8 hasta 8×10^9 UFC/ml de cada cepa a evaluar) con extracto fecal de rata estéril, (SRFE) al 50 % y utilizando jeringas con aguja calibre 25. Este compuesto simula las condiciones fisiológicas en una perforación intestinal y ha sido usado de rutina en los modelos de peritonitis demostrando que disminuye la dosis letal LD₅₀ en los aislamientos de enterococos, lo que es útil para estudios de virulencia en estos microorganismos (235).

El inóculo se preparó cultivando las bacterias en 247.5 ml de caldo BHI, a 37°C en agitación constante a 150 rpm toda la noche, se centrifugaron a 9.000 rpm a 4°C por 10 min y el precipitado celular obtenido se resuspendió en 4 ml de solución salina (0.9 %). A partir de esta suspensión bacteriana se realizaron recuentos de colonias (con la metodología previamente descrita en el numeral 8.3) y adicionalmente el inóculo fue diluído 1/10 en SRFE al 50 %.

Una vez preparados los diferentes rangos de inóculos para cada cepa, se infectaron grupos de 10 ratones y como control se tomó un grupo de animales a los cuales se les inyectó solo SREF al 50 %. Se mantuvieron cinco ratones por jaula, con alimento y agua a su disposición durante los cinco días del experimento, durante este tiempo se realizaba la observación de los animales cuatro veces al día cada 6 horas y se obtenían los datos de mortalidad. De dos a cuatro animales muertos (por cepa evaluada) fueron recolectados y se extrajo el bazo de cada animal bajo condiciones asépticas. El órgano se maceró con 5 ml de solución salina al 0.9 % y se recuperaron colonias en agar BHI con el fin de confirmar la presencia de los microorganismos con los cuales se infectaron los animales.

Los animales que sobrevivieron fueron sacrificados al quinto día en cámara de CO₂ y la dosis letal 50 (LD₅₀) del inóculo bacteriano se determinó por el método de Reed and Muench (329). Las comparaciones estadísticas de las curvas de sobrevivencia de los animales a inóculos similares se realizaron usando la prueba de rango logarítmico con Prism para Windows (GraphPad Software versión 4.000). Un valor de P < 0.05 fue

considerado estadísticamente significativo y los experimentos se realizaron por duplicado en la todas las cepas.

8.4.2. Modelo de infección urinaria en ratón

Para el modelo de infección urinaria se empleó el mismo tipo de ratones que para el modelo de peritonitis, los animales fueron evaluados 12 horas antes del experimento para determinar la ausencia de infección urinaria y el protocolo se desarrolló bajo la aprobación del comité de manejo de animales de la Universidad de Texas. Las cepas evaluadas fueron cultivadas de la misma forma antes mencionada para el modelo de peritonitis empleando para ello diferentes rangos de inóculos (10^5 , 10^6 , 10^7).

Grupos de diez a once ratones en el ensayo de mono-infección, (en el cual se infectaba independientemente cada grupo de animales con la cepa de estudio) y doce para el de infección mixta o por competencia (consistía en infectar los animales con las dos cepas de estudio al mismo tiempo utilizando inóculos similares) fueron evaluados. Para ello, los animales fueron anestesiados utilizando isofluorano y se infectaron vía intra-uretral con un catéter de polietileno (Clay Adams 2.5-3 cm de largo y 0.61 mm de grosor) con 200 μ l de suspensión bacteriana; este volumen facilita la infección tanto de las vejigas como de los riñones de los ratones (300, 304). Finalmente, los catéteres fueron removidos después de la inyección con las respectivas bacterias.

Para el modelo de infección mixta se utilizó un inóculo en proporción 1:1 por cada cepa y los animales fueron observados diariamente. Los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂ y los órganos (vejiga y riñones) fueron removidos, pesados y homogenizados en

solución salina 0.9 % para recuperar las bacterias y determinar la colonización bacteriana en dichos órganos. Para la mono infección se hicieron diluciones seriadas, se sembraron en el agar BHI y agar bilis esculina (BEA) y se realizaron recuento de colonias.

Para la infección mixta los microorganismos también fueron obtenidos de la misma forma que en la mono infección sin embargo, las colonias que se recuperaron fueron cultivadas en microplacas de 96 pozos con caldo Brucella, se realizaron improntas de las mismas en membranas de nylonN⁺ y posteriormente estas bacterias fueron evaluadas por hibridización por lisis de colonias para diferenciar las cepas en la infección mixta. La identidad de las colonias fue evaluada por cultivo en agar BHI suplementado con FUS 25 µg/ml-RIF100 µg/ml, por PCR para la detección del gen *hyl_{Efm}* y por PFGE. La estadística se realizó empleando la prueba t-de student.

CAPÍTULO I

EL PLÁSMIDO PORTADOR DEL GEN *hyl_{Efm}* SE CO-TRANSFIERE CON GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN DIFERENTES CEPAS DE *E. faecium*

9. RESULTADOS

9.1. Transferencia de un plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente la cepa clínica A *E. faecium* (TX0016)

9.1.1. Resultados de la conjugación *in vitro* entre la cepa clínica A *E. faecium* (TX0016) y la cepa de *E. faecium* receptora TX1330RF

En la última década cepas de *E. faecium* pertenecientes al genogrupo CC17, han adquirido gran importancia como patógenos nosocomiales, probablemente debido a la combinación de diferentes elementos presentes en estos microorganismos, como son los genes de resistencia a diversos antibióticos y los factores de virulencia. Estudios previos han mostrado que el gen *hyl_{Efm}* se encuentra en plásmidos, es transferible por conjugación y se identifica más comúnmente en aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina que en aislamientos de la misma especie susceptibles a este antibiótico (22, 23).

Por lo tanto, se determinó si el plásmido portador de gen *hyl_{Efm}* es transferible de cepas clínicas a otras cepas de *E. faecium* y si determinantes de resistencia se co-transfieren junto con este plásmido. Para ello, se realizaron experimentos de conjugación *in vitro* en membrana, utilizando como donadora *E. faecium* cepa A (TX0016) perteneciente al CC17 (ST16) que era portadora del gen *hyl_{Efm}*. Como cepa receptora se utilizó *E. faecium* TX1330RF resistente a rifampicina y ácido fusídico, la cual se obtuvo exponiendo al *E.*

faecium TX1330 (proviene de un aislamiento de tipo fecal de un individuo sano) a concentraciones sub-inhedorias de estos antibióticos; generando una cepa resistente (TX1330RF) que es utilizada como receptora para los ensayos de conjugación *in vitro* en este trabajo (Tabla 2 en metodología).

Se evaluó la posibilidad de seleccionar la co-transferencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* utilizando diferentes antibióticos en ensayos separados de conjugación *in vitro*, utilizando la cepa donadora A (TX0016) y la receptora (TX1330RF). Se efectuó la incubación de las bacterias en una membrana y posteriormente las colonias transconjugantes fueron seleccionadas en un medio suplementado con eritromicina-ácido fusídico (200 µg/ml /25 µg/ml) y estreptomina-ácido fusídico (2.000 µg/ml/25 µg/ml). La eficiencia de la conjugación entre la cepa A (TX0016) y la receptora (TX1330RF) para eritromicina y HLR-STR fue de 1.7×10^{-5} y 6.25×10^{-5} transconjugantes por donador respectivamente. De cada ensayo de conjugación se realizó la detección del gen *hyl_{Efm}* por PCR de diez colonias de las cuales, siete fueron portadoras del gen *hyl_{Efm}*.

De las siete cepas transconjugantes obtenidas (positivas para el gen *hyl_{Efm}*) se evaluaron tres cepas por PFGE empleando digestión con la enzima *Sma*I, para determinar si presentaban un perfil electroforético similar con la cepa recipiente, que permitiera confirmar que correspondían a las transconjugantes. Los resultados de los pulsotipos de dos transconjugantes (TX1330RF A-1 y TX1330RF A-3) obtenidas a partir de la selección con eritromicina mostraron la presencia de un patrón electroforético similar a la receptora (Figura 11, panel A, línea 1 y 3) pero con la adquisición de una banda adicional,

que se encontraba entre 194 y 242.5 kb, bandas que posteriormente hibridaron con la sonda para el gen *hyl_{Efm}* al mismo nivel que la banda obtenida en la cepa donadora A (TX0016) (Figura 11, panel A, línea 4). Adicionalmente, se observó la presencia de una transconjugante (TX1330RF A-2) que presentaba también un patrón similar a la cepa receptora con una banda entre 242.5 kb y 291 kb (Figura 11, panel A, línea 2), cuando se realizó la hibridación con la sonda para el gen *hyl_{Efm}* se detectó la presencia de dos bandas, hecho que sugiere re-arreglos genéticos (como duplicaciones o co-integrados) al nivel de DNA en los cuales podría estar implicado el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*. Para estudios posteriores, se escogió la transconjugante TX1330RF A-1 que se observa en Figura 11, panel A, la línea 1.

Esta transconjugante TX1330RF A-1 fue caracterizada, por evaluación por PFGE empleando tres enzimas de restricción de corte infrecuente como NotI, SmaI y ApaI. Estos experimentos se desarrollaron con el fin de determinar el número de sitios de corte para el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* y de esta manera estimar de una forma aproximada el tamaño del plásmido. Se observó la presencia de una banda correspondiente tanto en la cepa donadora A (TX0016) como en la transconjugante TX1330RF A-1 con cada una de las enzimas utilizadas. Con la enzimas SmaI y ApaI se detectó una banda que migró entre 194 y 242.5 kb y que hibridizó con la sonda correspondiente al gen *hyl_{Efm}* en las dos cepas (Figura 11, panel B). Por otro lado, con la enzima NotI se identificó la presencia de una banda tanto en la cepa donadora como en la receptora, la cual corría entre 242.5 y 291 kb y que hibridizaba en las dos cepas con la sonda *hyl_{Efm}*. Estos resultados sugieren la

presencia de más de un sitio de corte para las enzimas SmaI y ApaI y la presencia de un solo sitio para la enzima NotI, indicando un tamaño aproximado del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* de ~250kb (Figura 11, panel B).

En la Tabla 4 se muestran los resultados de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de estas cepas, se observa que la donadora cepa A (TX0016) presentaba resistencia eritromicina y altos niveles de resistencia a estreptomycin así mismo la cepa transconjugante TR1330RF A-1. Indicando la transferencia de estos determinantes de resistencia a la cepa transconjugante.

Tabla 4. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para *E. faecium*

Cepas	Presencia del gen <i>hyl_{Efm}</i>	CIMs (µg/ml) ^a			HLR ^b	
		AMP	VAN	ERY	GEN	STR
A (TX0016)	+	4	1	>512	-	+
TX1330RF	-	1	0.5	0.5	-	-
TX1330RF A-1	+	1	0.5	>512	-	+

^a CIM para: AMP, (ampicilina); VAN, (vancomicina), ERY, (eritromicina). ^bHLR- GEN, (altos-niveles de resistencia para gentamicina), ^bHLR-STR, (altos-niveles de resistencia para estreptomycin). *E. faecium* cepa A donadora del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*; Cepa *E. faecium* receptora TX1330RF; Cepa *E. faecium* transconjugante TX1330RF A-1 obtenida de la conjugación *in vitro* entre la donante y la receptora descritas previamente.

Figura 11

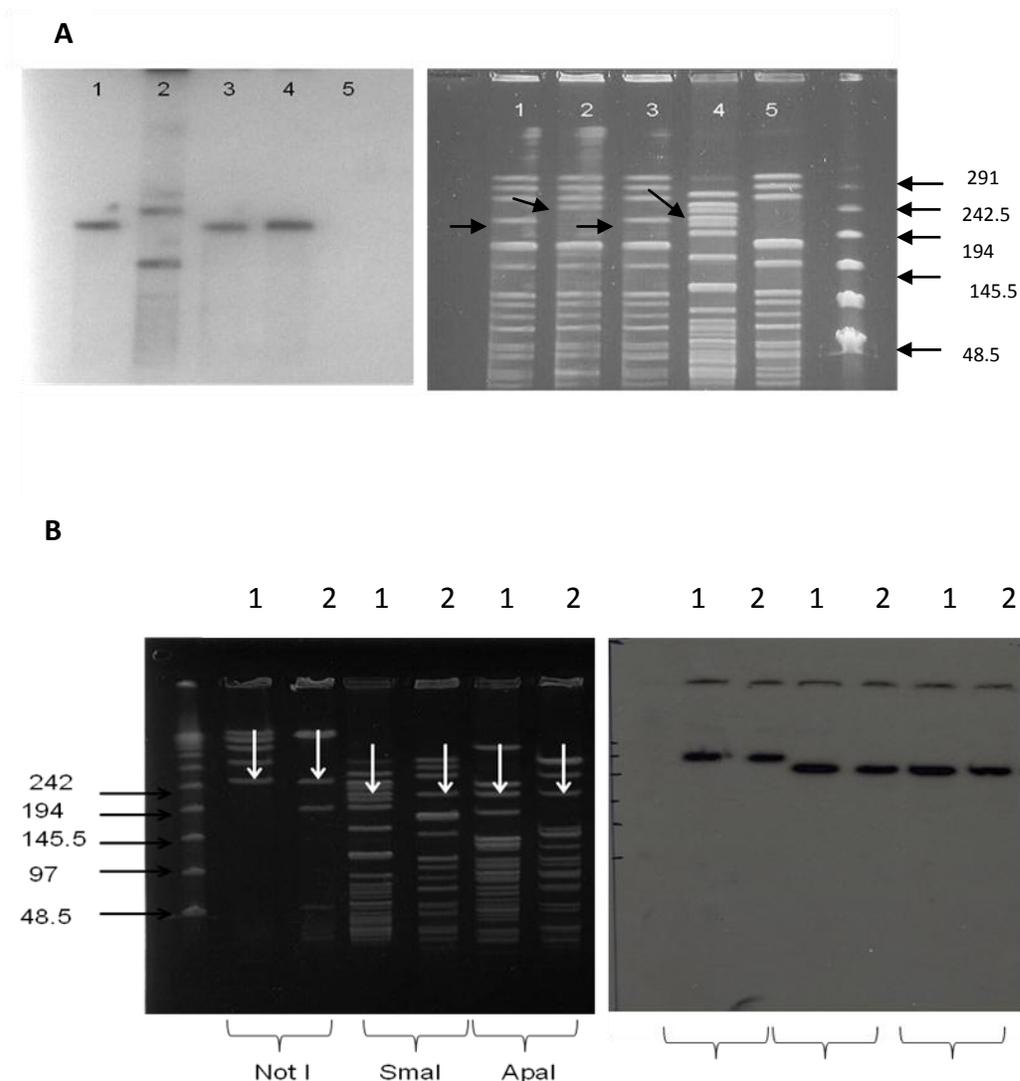


Figura 11. Resultados de PFGE e hibridación empleando la sonda *hyl_{Efm}*. Panel A. PFGE-SmaI. Se observa el resultado de la PFGE de las cepas: 1. *E. faecium* transconjugante TX1330RF A-1; 2. *E. faecium* transconjugante TX1330RF A-2; 3. *E. faecium* transconjugante TX1330RF A-3; 4. *E. faecium* cepa A donadora (TX0016); 5. *E. faecium* TX1330RF cepa receptora. Con las flechas se resalta la presencia de una banda localizada entre 194 y 242.5 en las cepas correspondientes a la línea 1 (TX1330RF A-1) y 3 (TX1330RF A-3) y la presencia de una bandas adicional en la cepa de la línea 3 (TX1330RF A-2) la cual migraba entre 242.5 y 291 kb. En la hibridización con la sonda *hyl_{Efm}* se observa la presencia de las bandas previamente descritas. **Panel B.** Resultados de PFGE- NotI, PFGE-SmaI, PFGE-ApaI de las cepas: 1. *E. faecium* cepa A donadora (TX0016); 2. *E. faecium* TX1330RF A-1. Se señalan con flechas donde se localiza el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* y en el panel de la derecha la hibridización con la sonda correspondiente gen *hyl_{Efm}*.

9.1.2 Estudio del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en *E. faecium* cepa A y TX1330RF A-1 empleando la enzima nucleasa S1

La cepa donadora *E. faecium* A (TX0016) proveniente de un paciente con endocarditis (USA), la cepa transconjugante (TX1330RF A-1) y la cepa receptora (TX1330RF), fueron estudiadas con la técnica de caracterización de plásmidos utilizando la enzima nucleasa S1, la cual permite la detección de plásmidos de gran tamaño cuando se combina con PFGE e hibridización con una sonda correspondiente al gen de estudio (metodología 8.2.5.1). Se resalta la presencia de megaplásmidos (> 100kb) en las tres cepas evaluadas, donde la cepa A (TX0016) y la transconjugante TX1330RF A-1 presentan un plásmido, el cual corre entre 242.5- 291 kb e hibridiza con la sonda *hyl_{Efm}* (Figura 12, panel A, línea 2 y 3). En la cepa receptora TX1330RF también se detecta un plásmido que corre entre 194-242.5 kb (con un tamaño aproximado de 200 kb) (Figura 12, panel A, línea 4) que no hibridiza con la sonda *hyl_{Efm}* y se elimina de la bacteria cuando el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* ingresa a la célula. Adicionalmente, en la cepa donadora A (TX0016), la transconjugante (TX1330RF A-1) y la receptora (TX1330RF) también se observa la presencia de varios plásmidos de menor tamaño que migran entre 48.5 y 97 kb.

Estos resultados sugieren que el gen *hyl_{Efm}* se encuentra localizado en un plásmido en la cepa donadora A (TX0016), hecho que se prueba al observar la presencia de una banda plasmídica producto de la digestión con la enzima S1 la cual hidridizó con la sonda correspondiente al gen *hyl_{Efm}*. Adicionalmente, se confirmó que el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* es transferible por conjugación, lo cual se ratifica por la presencia de la banda

plasmídica en la cepa transconjugante TX1330RF A-1 la cual también hibridiza con la sonda correspondiente al gen *hyl_{Efm}*.

Figura 12.

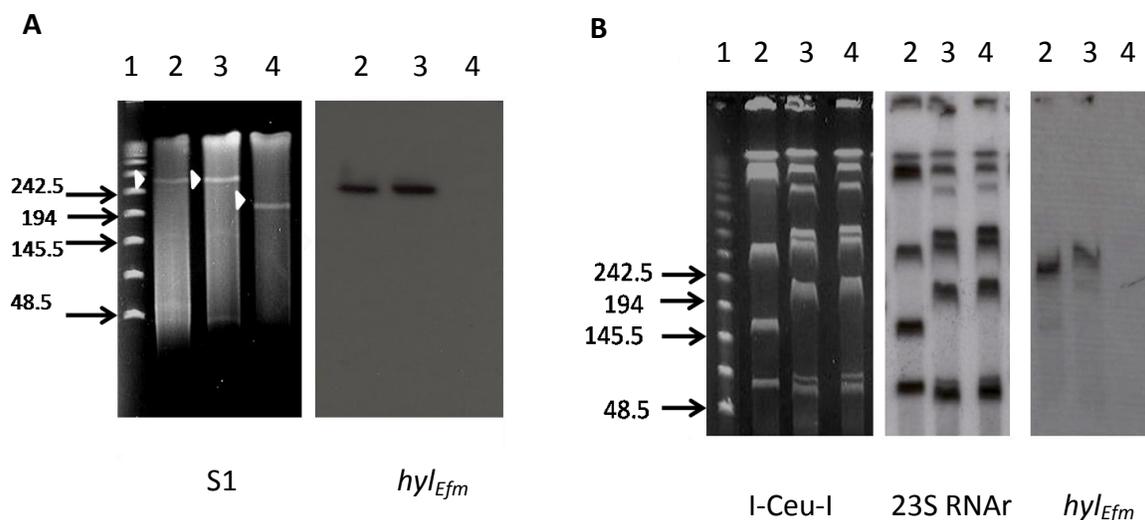


Figura 12. PFGE empleando la digestión enzimática con la nucleasa S1 y I-Ceu-I y los respectivos “Southern blot”. Panel A. Digestión con la nucleasa S1-PFGE de la cepas de *E. faecium* e hibridización con la sonda *hyl_{Efm}*. Los plásmidos se muestran como bandas linearizadas que han sido hibridizadas con el gen *hyl_{Efm}* y se observan señalados con flechas en la figura del gel. **Panel B.** PFGE empleando digestión con la enzima I-Ceu-I e hibridización con la sonda control 23S RNAr y *hyl_{Efm}*. 1. Marcador de peso molecular; 2. Cepa A (TX0016); 3. TX1330RF A-1; 4. TX1330RF. La figura está compuesta por geles y diferentes membranas provenientes de varios experimentos.

9.1.3 Confirmación de la presencia extra-cromosomal del gen *hyl_{Efm}* empleando la digestión con la enzima I- Ceu-I y PFGE

La localización extra-cromosomal del gen *hyl_{Efm}* en las cepas estudiadas (empleando la metodología de digestión con la nucleasa S1 y PFGE) fue confirmada utilizando la técnica de digestión con la enzima I-Ceu-I, PFGE e hibridización con la sonda *hyl_{Efm}* y con la sonda de control específica para el RNAr 23S (Figura 12, panel B). Para ello, el DNA de la cepa donadora, transconjugante y receptora fue digerido con la enzima I-Ceu-I, la cual

reconoce una secuencia única que se encuentra solamente en los genes que codifican para el RNAr 23S, produciendo fragmentos que corresponden solamente al DNA cromosomal (324, 325). En *E. faecium*, esta enzima produce 6 fragmentos los cuales hibridizan con la sonda control del RNAr 23S indicando que las 6 bandas cromosomales corresponden a DNA cromosomal. Sin embargo, en la cepa transconjugante TX1330RF A-1 (Figura 12, panel B, línea 3) y en la recipiente (TX1330RF) (Figura 12, panel B, línea 4) se observó la presencia de una séptima banda de menor intensidad que migra entre 48.5 y 97 kb y una octava banda entre 436,5-485 kb, estos fragmentos podrían corresponder a digestión parcial de la enzima I-Ceu-I.

Los resultados de hibridización con la sonda *hyl_{Efm}* muestran la presencia de una hibridización en forma de barrido tanto en la cepa donante A (TX0016) (Figura 12, panel B, línea 2) como en la transconjugante TX1330RF A-1 (Figura 12, panel B, línea 3) que no corresponde a ninguna de las bandas que hibridizan con la sonda correspondiente a la RNAr 23S, lo cual sugiere la presencia de diferentes formas del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*. Adicionalmente, en la cepa receptora TX1330RF no se observa la aparición de ninguna señal de hibridización (Figura 12, panel B, línea 4). Por lo tanto, los resultados provenientes de las metodologías PFGE empleando digestión con la nucleasa S1 y I-Ceu-I confirman que la cepa A de *E. faecium* (TX0016) es portadora de un megaplásmido que contienen el gen *hyl_{Efm}* y que este plásmido puede ser transferido a otras cepas de *E. faecium* por conjugación.

9.1.4 Transferencia de los genes de resistencia a eritromicina y HLR-STR partir de la cepa donadora A (TX0016)

Los resultados provenientes de las CIM a eritromicina y a HLR-STR de la cepa transconjugante TX1330RF A-1, sugieren que estos determinantes genéticos fueron transferidos en el proceso de conjugación, de la cepa de origen clínico A (TX0016) a la cepa receptora (TX1330RF). Por lo tanto, se construyeron sondas correspondientes a los genes que comúnmente codifican resistencia a eritromicina [*erm(B)*] y HLR-STR [*ant(6')*-I] y la cepa donadora A (TX0016), la receptora (TX1330RF) y la transconjugante (TX1330RF A-1) se hibridaron con estas sondas (Figura 13, panel, B-C). Los resultados de la hibridación proveniente del DNA digerido con la enzima *Sma*I de la cepa donadora A (TX0016) y la cepa transconjugante (TX1330RF A-1) mostraron la presencia de tres bandas con diferentes pesos moleculares cuando se hibridaron con estas dos sondas (Figura 13, panel B y C línea 2 y 3). Por el contrario, en la hibridación con el gen *hyl*_{Efm} en la cepa donadora A (TX0016) y en la transconjugante (TX1330RF A-1) se observó una banda única, presente en estas dos cepas que se encontraba localizada entre 194 y 242.5 kb (Figura 13, panel A línea 2 y 3); en la cepa recipiente (TX1330RF) no se detectó ninguna banda con ninguna de las sondas evaluadas (Figura 13, panel A, línea 4). Estos resultados, sugieren que los genes que codifican resistencia a eritromicina [*erm(B)*] y HLR-STR [*ant(6')*] probablemente se encuentran en un elemento genético diferente al plásmido portador del gen *hyl*_{Efm}.

Figura 13.

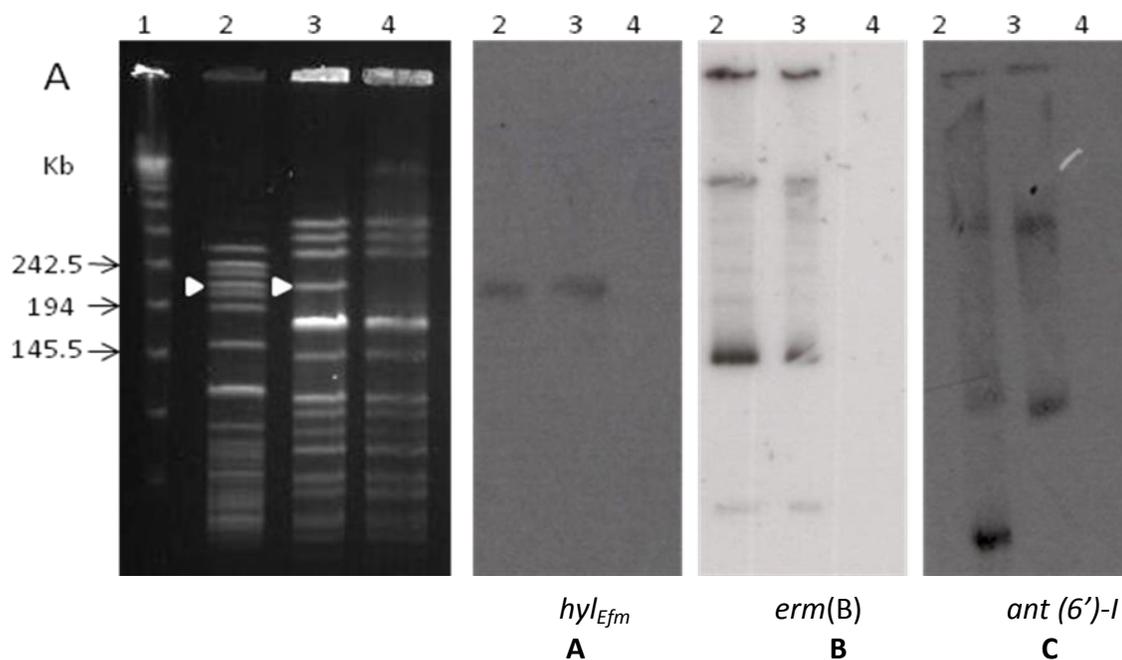


Figura 13. Resultados de PFGE de la cepa A (TX0016) y sus derivadas empleando la enzima *Sma*I y Southern blot con sondas dirigidas a los genes (A) *hyl_{Efm}*, (B) *erm(B)* y (C) *ant(6')-I*. Línea 1. Marcador de peso molecular lambda; 2. Cepa A (TX0016); 3. Transconjugante, TX1330RF-A1 en la cual el gen *hyl_{Efm}* fue transferido de la cepa A; 4. Receptora TX1330RF. Las flechas que señalan las bandas de la foto de PFGE indican donde hibridiza la sonda *hyl_{Efm}*. Los resultados provienen diferentes gels, los cuales se transfirieron a membranas que fueron hibridizadas con las sondas antes descritas

9.2. Un plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* también fue transferido de la cepa clínica donadora B (ERV99) aislada de un paciente Colombiano

9.2.1 Resultados de la conjugación *in vitro* entre la cepa clínica B *E. faecium* (ERV99) y la cepa de *E. faecium* receptora TX1330RF

Previamente se demostró que el plásmido portador del *hyl_{Efm}* proveniente de un cepa clínica de *E. faecium* (TX0016) fue transferible por conjugación, por lo tanto, se evaluó si la cepa B *E. faecium* (ERV99) perteneciente al CC17 pero de diferente origen geográfico era capaz de transferir este tipo de plásmidos por conjugación a la cepa TX1330RF. Para

ello, se escogió como donante el aislamiento clínico denominado ERV99 proveniente de un paciente Colombiano, que pertenece al ST18 por MLST, es resistente a vancomicina, eritromicina y presenta altos niveles de resistencia a gentamicina y estreptomicina.

El ensayo de conjugación *in vitro* entre la cepa donadora B (ERV99) y la receptora (TX1330RF) se realizó de la misma forma previamente descrita (metodología sección 8.2.2.2.3), pero se utilizó vancomicina y gentamicina como método de selección para la obtención de las colonias transconjugantes. En este ensayo la eficiencia de la conjugación para vancomicina fue de 5.4×10^{-5} transconjugantes por donador y para HLR-GEN 5.5×10^{-5} transconjugantes por donador. De estas colonias obtenidas, diez de ellas fueron positivas para el gen *hyl_{Efm}* y se escogieron dos que fueron evaluadas por PFGE-Smal, las cuales presentaron dos fenotipos diferentes: *i*) la transconjugante TX1330RF B-1 (Figura 14, panel A, línea 4) con un perfil electroforético similar a la receptora TX1330RF (Figura 14, panel A, línea 2), con la adquisición de una banda adicional localizada entre 145 y 242.5 kb y *ii*) la transconjugante TX1330RF B-2, (Figura 14, panel A, línea 5) presentó un perfil similar a la receptora TX1330RF pero con la adquisición de dos bandas adicionales localizadas entre 145.5 y 194 kb.

En la Tabla 5 se presentan los resultados de las CIM de las cepas transconjugantes evaluadas; la transconjugante TX1330RF B-1 adquirió la resistencia a vancomicina (128 µg/ml), eritromicina (> 512 µg/ml), HLR-GEN (>500 µg/ml) y HLR-STR (>2000 µg/ml) mientras que la TX1330RF B-2 solo presentó resistencia a vancomicina (>256 µg/ml) y

HLR-GEN (>500 µg/ml) , resultados que podrían sugerir la transferencia de la resistencia a las cepas transconjugantes por medio de elementos extra-cromosomales (Tabla 5).

Figura 14.

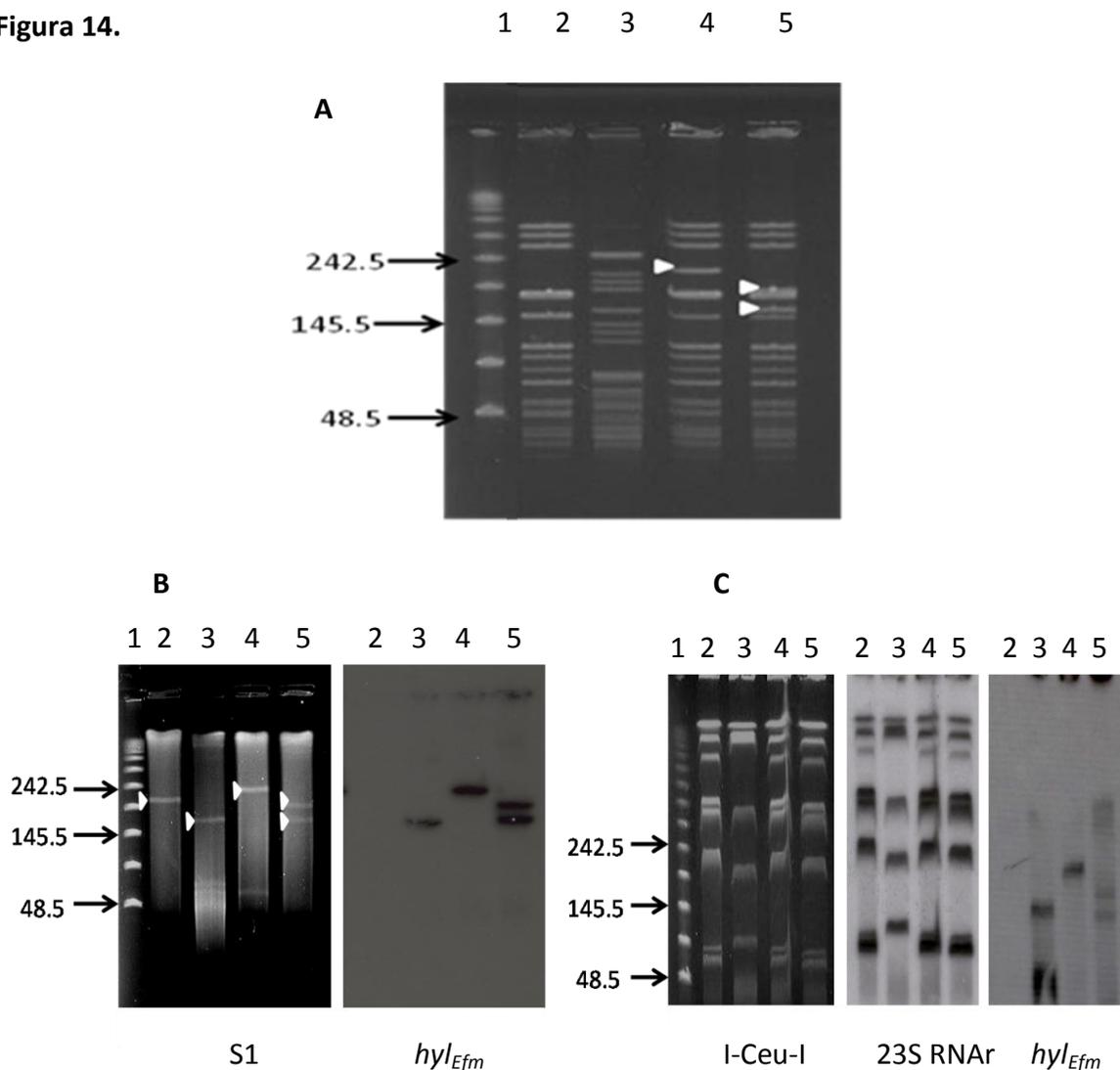


Figura 14. PFGE empleando la digestión enzimática con *Sma*I, la nucleasa S1 y I-Ceu-I y los respectivos "Southern blot". Panel A. Digestión con *Sma*I de las cepas de *E. faecium*. Panel B. Digestión con la nucleasa S1-PFGE de las cepas de *E. faecium* e hibridización con la sonda *hyl_{Efm}*. Los plásmidos se muestran como bandas linealizadas que han sido hibridizadas con el gen *hyl_{Efm}* y se observan señalados con flechas en la figura del gel. Panel C. PFGE empleando digestión con la enzima I-Ceu-I e hibridización con la sonda control 23S rNAr y *hyl_{Efm}*. 1. Marcador de peso molecular; 2. TX1330RF; 3. Cepa B (ERV99); 4. TX1330RF B-1; 5. TX1330RF B-2. La figura está compuesta por gels y diferentes membranas provenientes de varios experimentos.

9.2.2 Estudio del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en *E. faecium* cepa B (ERV99) y en las transconjugantes TX1330RF B-1, B-2 empleando la enzima nucleasa S1

Los plásmidos de la cepa ERV99 y las respectivas transconjugantes (TX1330RF B-1, B-2) fueron estudiados empleando la enzima nucleasa S1. En las diferentes cepas se halló la presencia de un megaplásmido que migraban entre 145 y 242.5 kb; específicamente en la cepa colombiana B (ERV99) se halló un megaplásmido que corría entre 145-194 kb (Figura 14, panel B, línea 3), en la receptora TX1330RF (194-242.5 kb) (Figura 14, panel B, línea 2) y en las transconjugantes TX1330RF B-1, B-2 (145- 242.5 kb) (Figura 14, panel B, línea 4 y 5). Adicionalmente, se observó la presencia de varios plásmidos de menor tamaño (entre 48,5 y 97 kb) tanto en la donante como en las transconjugantes (Figura 14, panel B, líneas 3, 4, 5). En la transconjugante TX1330RF B-1 se detectó un plásmido de un tamaño mayor tamaño que migraba entre 194–242.5 kb (Figura 14, panel B, línea 4) diferente al que presentaba la cepa donadora B (ERV99) el cual hibridizó con la sonda *hyl_{Efm}*; se destaca además en la transconjugante TX1330RF B-2 (Figura 14, panel B, línea 5), la presencia de dos plásmidos uno que corresponde al mismo tamaño del plásmido detectado en la cepa donadora B (ERV99) y otro que migra entre 145.5- 194 kb los cuales hibridizaron con el gen *hyl_{Efm}* (Figura 14, panel B, línea 5). Tomando en conjunto estos resultados, se sugiere que el gen *hyl_{Efm}* se encuentra localizado en un megaplásmido en el aislamiento clínico de *E. faecium* ERV99 proveniente de un paciente de Colombia el cual también fue transferible por conjugación; en este proceso probablemente se generaron re-arreglos

genéticos que generaron la producción de duplicaciones las cuales pueden ser causadas por el movimiento del transposones en los cuales *hyl_{Efm}* se podría encontrar asociado.

Tabla 5. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para *E. faecium*

Cepas	Presencia del gen <i>hyl_{Efm}</i>	CIMs (µg/ml) ^a			HLR ^b	
		AMP	VAN	ERY	GEN	STR
B (ERV99)	+	256	512	>512	+	+
TX1330RF B-1	+	1	128	>512	+	+
TX1330RF B-2	+	1	256	0.25	+	-
TX1330RF	-	1	0.5	0.5	-	-

^a CIM para : AMP, (ampicilina); VAN, (vancomicina), ERY, (eritromicina), ^b ; HLR- GEN, (altos-niveles de resistencia para gentamicina), ^bHLR-STR, (altos-niveles de resistencia para estreptomycinina). La cepa B *E. faecium* (ERV99): donadora del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*; Cepa *E. faecium* receptora: TX1330RF; Las cepas *E. faecium* transconjugantes obtenidas de la conjugación *in vitro* entre las donantes y las receptoras descritas previamente, las cuales se denominaron TX1330RF B-1, TX1330RF B-2.

9.2.3 Confirmación de la presencia extracromosomal del gen *hyl_{Efm}* empleando la digestión con la enzima I- *Ceu-I* y PFGE

La localización extracromosomal del gen *hyl_{Efm}* fue confirmada por medio de la enzima I- *Ceu-I*, en las cepas transconjugantes (TX1330RF B-1, B-2) (Figura 14, panel C, línea 4 y 5) y en la cepa donadora B (ERV99) (Figura 14, panel C, línea 3). Tanto en las transconjugantes como en la receptora se observó la presencia de una séptima banda de menor intensidad, característica similar a la observada en la transferencia del plásmido *hyl_{Efm}* proveniente de

la cepa A (TX0016) previamente descrito en la sección anterior. Los resultados de la hibridación con la sonda *hyl_{Efm}* muestran en la cepa donadora B (ERV99) una banda entre 145.5-194 kb (Figura 14 panel C, línea 3), mientras que en la transconjugante TX1330RF B-1, una banda que migraba entre 194-242.5 kb (Figura 14 panel C, línea 4). En la TX1330RF B-2 se identificaron dos bandas que migraban entre 145.5-194 kb (Figura 14, panel C, línea 5) y en la cepa receptora TX1330RF no se detectaron bandas que hibridaban con la sonda *hyl_{Efm}*. Las bandas observadas tanto en la donadora B (ERV99) como en las transconjugantes (TX1330RF B-1, B-2) no correspondieron a las bandas que hibridaban con la sonda 23S RNAr, confirmando la localización extracromosomal de *hyl_{Efm}*. Por lo tanto, tomando en conjunto los resultados de PFGE empleando digestión con la nucleasa S1 y I-Ceu-I se confirma que la cepa Colombiana de *E. faecium* ERV99, también es portadora de megaplásmidos que contienen el gen *hyl_{Efm}* y que pueden ser transferidas a otras cepas de *E. faecium* por conjugación.

9.2.4 Transferencia de los genes de resistencia a eritromicina, HLR-STR, HLR-GEN y vancomicina a partir de la cepa donadora B (ERV99)

Los resultados obtenidos de las CIM de la cepa transconjugante (TX1330RF B-1) mostraron que la resistencia a eritromicina, HLR STR, HLR-GEN y vancomicina fue transferida a partir de la cepa donadora B (ERV99) a la cepa receptora TX1330RF. En la transconjugante TX1330RF B-2 solo se detectó transferencia de resistencia a HLR-GEN y vancomicina y no se encontró resistencia a eritromicina y HLR-STR. Por lo tanto, estos resultados indican que adicionalmente al gen *hyl_{Efm}*, genes de resistencia a diferentes

antibióticos podrían estar presentes en el mismo plásmido. Con el objetivo de evaluar esta hipótesis, el DNA de las cepas donadoras, transconjugantes y receptoras se digirió con la enzima SmaI, se corrió en un gel de PFGE, se transfirió a una membrana y se hibridizó con sondas correspondientes para los genes más comúnmente asociados con resistencia a eritromicina [*erm* (B)], vancomicina (*vanA*), HLR-GEN[*aac*(6′)-*aph*(2′′)] y HLR-STR [*ant*(6′)-I] en *E. faecium* y adicionalmente se evaluó una sonda para el gen *hyl_{Efm}*. Los resultados de las hidridizaciones con las sondas *erm*(B) y *ant*(6′) mostraron que la cepa donadora B (ERV99) y la transconjugante TX1330RF B-1 presentaron diversas bandas de distintos pesos moleculares, las cuales fueron claramente diferentes de las bandas que hibridizaban con la sonda correspondiente al gen *hyl_{Efm}* sugiriendo localización de estos genes [*erm*(B) y *ant*(6′)] en un elemento extra-cromosomal diferente al plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*(Figura 15, panel D y E, línea 2 y 3). En la transconjugante TX1330RF B-2, no se observó hibridización con ninguna de las sondas *erm*(B) y *ant*(6′), resultados que se correlacionan con la susceptibilidad a eritromicina y HL-SRT obtenida en las CIM (Figura 15, panel D y E línea 4); igualmente no se detectó hibridización con estas sondas en la cepa receptora TX1330RF (Figura 15, panel D y E línea 5). Cuando se hibridizó con la sonda *hyl_{Efm}* en la cepa donadora B (ERV99) (Figura 15, panel A, línea 2) se observó una banda que migraba entre 145.5 y 194 kb mientras que en la cepa transconjugante TX1330RF B-1 se obtuvo la presencia de una sola banda que entre localizada 194-242.5 kb, (una banda de mayor tamaño que la presente en la donador B, ERV99) (Figura 15, panel A, línea 3). En la transconjugante TX1330RF B-2 se observaron

dos bandas que corrieron entre 145.5 y 194 kb (una de estas bandas migraba al mismo nivel que la banda presente en la cepa donadora B) (Figura 15, panel A, línea 4); mientras que en la cepa receptora TX1330RF no se observó la presencia de ninguna banda que hibridizó con la sonda *hyl_{Efm}*. Los patrones de hibridización sugieren que los genes *erm(B)* y *ant(6')-I* se localizan probablemente en un elemento genético diferente al que se encuentra el gen *hyl_{Efm}* en la transconjugante TX1330RF B-1 mientras que la cepa TX1330RF B-2, no adquirió el elemento genético portador de estos genes.

Los resultados de las hibridizaciones en la cepa donadora B (ERV99) con las sondas *vanA*, *aac(6')-aph(2'')* y *hyl_{Efm}* mostraron un patrón de hibridización similar que hibridizaba con estas tres sondas donde se observaba una banda que migraba entre 145.5 y 194 kb (Figura 15 panel A, B, C línea 2). La cepa transconjugante TX1330RF B-1 también presentó un patrón de hibridización similar con estas tres sondas, pero al compararse con la cepa donadora B (ERV99) la banda migró entre 194 y 242.5 kb (Figura 15 panel A, B, C línea 3). Adicionalmente, la transconjugante TX1330RF B-2 mostró un patrón de hibridización similar con las sondas *hyl_{Efm}* y *vanA* el cual se caracterizó por la presencia de dos bandas que corrían entre 145.5 y 194 kb, mientras que con la sonda *aac(6')-aph(2'')* solo se observaba la hibridización en una banda de menor tamaño (Figura 15, panel B, C línea 4). Tomando en conjunto, los resultados provenientes de la transferencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de una cepa de origen clínico colombiana resistente a múltiples antibióticos (ERV99), se demuestra que los genes de resistencia a vancomicina y gentamicina se co-transfirieron con el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en la

tranconjugante TX1330RF B-1 y por lo tanto este grupo de genes se encuentra localizado muy probablemente en el mismo elemento genético.

Figura 15.

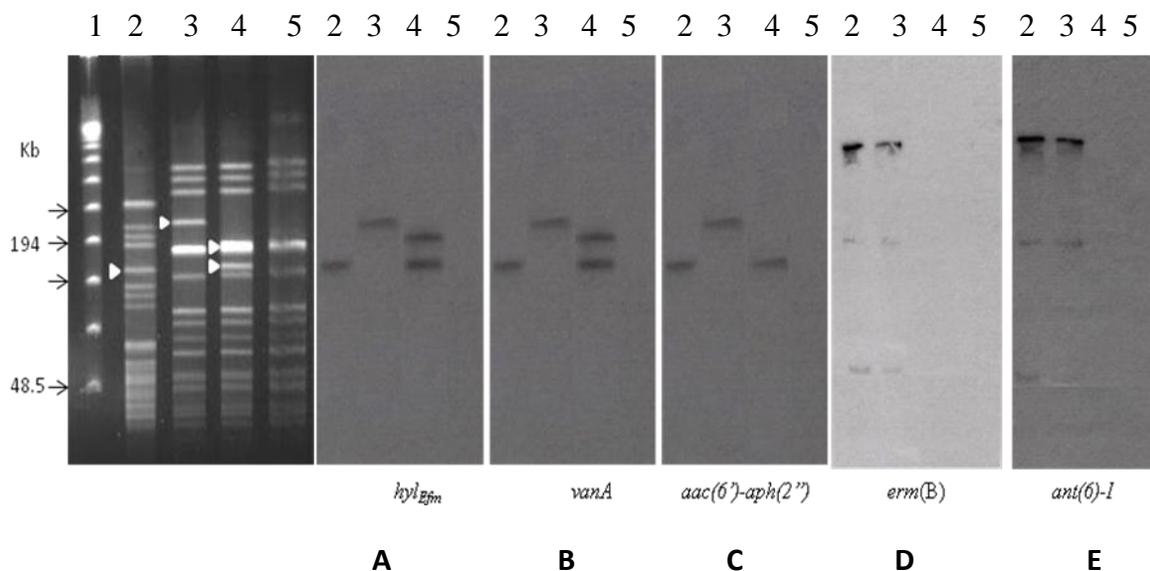


Figura 15. Resultados provenientes de PFGE de la cepa B (ERV99) y sus derivadas empleando la enzima SmaI e hibridizaciones con sondas dirigidas a los genes (A) *hyl_{Efm}*, (B) *vanA*, (C) *acc(6')-aph(2'')*, (D) *erm(B)* y (E) *ant(6)-I*. 1. Marcador de peso molecular lambda; 2. Cepa B (ERV99); 3. Transconjugante, TX1330RF-B1 en la cual el gen *hyl_{Efm}* fue transferido de la cepa B, presenta resistencia a vancomicina, eritromicina, HLR-GEN y estreptomina; 4. transconjugante, TX1330RF-B2 en la cual el gen *hyl_{Efm}* fue transferido de la cepa B, presenta resistencia a gentamicina y vancomicina; 5. Receptora TX1330RF, susceptible a todos los antibióticos evaluados. Las flechas que señalan las bandas de la foto de PFGE indican donde hibridiza la sonda *hyl_{Efm}*. Los resultados provienen de diferentes geles, los cuales se transfirieron a las membranas que fueron hibridizadas con los genes antes descritos.

9.3. El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* también fue transferido de la cepa C de *E.*

faecium donadora C (C68)

9.3.1 Transferencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* de la cepa clínica C *E. faecium* (C68) a la cepa de *E. faecium* receptora D344SRF

El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente del aislamiento de *E. faecium* resistente a vancomicina, de origen clínico perteneciente al CC17 (ST16) fue previamente transferido

por conjugación *in vitro* a la cepa de laboratorio *E. faecium* D344SRF por el grupo del Dr LB Rice (23) y las cepas donante (C68), transconjugante (D344SRF C-6) y receptora (D3444SRF) fueron enviadas a nuestro laboratorio para su posterior caracterización. En la Figura 16 se presenta el perfil electroforético de la cepa donadora C (C68) (Figura 16, línea 2), la transconjugante D344SRF C-6 (Figura 16, línea 3) y la receptora (Figura 16, línea 4), obtenido por PFGE-SmaI. La cepa receptora (D344SRF) y la transconjugante (D344SRF C-6) presentan un pulsotipo idéntico que no permite diferenciar la presencia de un posible elemento extra-cromosomal adicional en la transconjugante, resultado que podría sugerir la ausencia de un sitio de restricción SmaI en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de la cepa donadora C (C68). En cuanto a los perfiles de resistencia a los antibióticos evaluados en estas cepas, se observa que la resistencia a vancomicina presente en la cepa donadora C (256 µg/ml) no fue transferida a la cepa transconjugante D344SRF C-6 (2 µg/ml) mientras que la resistencia a HLR-GEN si se transfirió. Por otra parte, no se puede definir con exactitud si ocurrió la transferencia de la resistencia a eritromicina y HLR-STR a la cepa transconjugante debido a que la cepa receptora D344SRF es resistente a estos dos antibióticos (Tabla 6).

Figura 16.

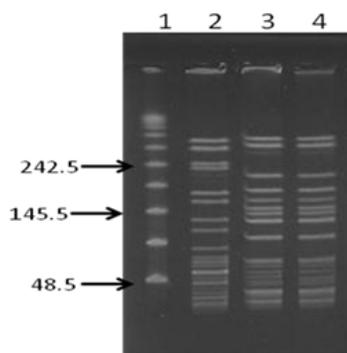


Figura 16. Resultados de PFGE-Smal de las cepas *E. faecium* C68, D344SRF y D344SRF C-6. 1. Marcador de peso molecular; 2. Cepa donadora C *E. faecium* C68; 3. Cepa receptora *E. faecium* D344SRF; 4. Cepa transconjugante *E. faecium* D344SRF C-6 proveniente de la conjugación *in vitro* entre la donante C (C68) y la receptora D344SRF.

9.3.2 Aislamiento del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* por extracción utilizando un gradiente de densidad con cloruro de cesio

El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* había sido previamente transferido por conjugación *in vitro* de la cepa donadora C (C68) a la cepa de laboratorio D344SRF obteniéndose la transconjugante D344SRF C-6 (TC6) (23) (Tabla 6). Con el fin de confirmar la presencia de este plásmido en la cepa transconjugante D344SRF C-6 se realizó la extracción de estos plásmidos utilizando la metodología de gradiente de densidad y cloruro de cesio. Una vez obtenido, se efectuó la digestión con la enzima de restricción EcoR I, se corrió en un gel de agarosa, se transfirió a una membrana de nylon y se hibridizó con la sonda *hyl_{Efm}*. Se observó la presencia de una señal, la cual hibridizaba en un fragmento de un tamaño ca 12 kb (Figura 17), indicando de esta manera que el gen *hyl_{Efm}* estaba localizado en un plásmido y no a nivel cromosomal en la cepa transconjugante D344SRF C-6. Esta

metodología se utilizó como una herramienta complementaria para la confirmación de la localización extra-cromosomal este plásmido.

Tabla 6. Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para *E. faecium*

Cepas	Presencia del gen <i>hyl_{Efm}</i>	CIMs (µg/ml) ^a			HLR ^b	
		AMP	VAN	ERY	GEN	STR
C68	+	128	256	>512	+	+
D344SRF C-6	+	<0.25	2	>512	+	+
D3444SRF	-	<0.25	2	512	-	+

^a CIM para : AMP, (ampicilina); VAN, (vancomicina); ERY, (eritromicina); ^bHLR- GEN, (altos-niveles de resistencia para gentamicina); ^bHLR-STR, (altos-niveles de resistencia para estreptomina). Cepa C *E. faecium* (C68): donadora del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*; Cepa *E. faecium* receptora: D344SRF; Cepa de *E. faecium* transconjugante D344SRF C-6 obtenida de la conjugación *in vitro* entre la donante y la receptora descritas previamente

Figura 17.

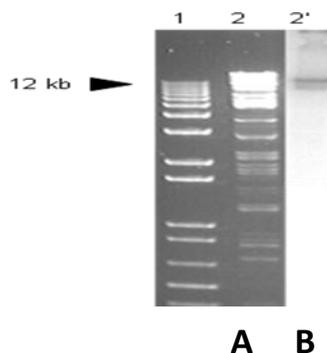


Figura 17. Panel A. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido portador del gen *hylEfm* digerido con la enzima EcoRI e hibridización con la sonda correspondiente al gen *hylEfm*. El plásmido fue aislado de la transconjugante D344SR C-6, (proviene de la conjugación empleando como donador el aislamiento clínico de *E. faecium* C (C68) y la cepa de laboratorio receptora *E. faecium* D344SRF) mediante la técnica de gradiente de densidad con cloruro de cesio. **Panel A.** Gel de agarosa correspondiente al plásmido digerido con la enzima EcoRI. 1. Marcador de peso molecular 1 Kb, 2. Plásmido digerido con la enzima EcoRI. **Panel B.** 2' "Southern blot" del mismo gel hidridizado con la sonda *hylEfm*.

9.3.3 Estudio del plásmido portador del gen *hylEfm* en la cepa donadora C (C68) y la transconjugante D344SRF C-6 empleando PFGE-S1 y confirmación con PFGE y I-Ceu-I

Con el fin de confirmar el tamaño del plásmido portador del gen *hylEfm*, la cepa donante C (C68), la receptora D344SRF y la transconjugante D344SRF C-6 se evaluaron por PFGE-S1 (Figura 18 panel A línea 2,3,4). Se observa la presencia de plásmidos que migraban entre 48 y 97 kb en las tres cepas evaluadas, pero se resalta la presencia de una banda que migraba al mismo nivel tanto en la donadora C (C68) como en la transconjugante (D344SRF C-6) la cual se encontraba entre 194 y 242.5 kb (tamaño aproximado 220 kb) (Figura 18, panel A, línea, 2 y 3) y se destaca la ausencia del mismo megaplásmido en la cepa receptora D344SRF (Figura 18, panel A, línea 4). Los resultados de la hibridización con la sonda correspondiente al gen *hylEfm* mostraron la presencia de señal en la banda

que migraba entre 194 y 242.5 kb en la cepa donadora (C68) y en la transconjugante (D344SRF C-6) pero no en la cepa receptora D344SRF.

Adicionalmente, la localización extra-cromosomal del gen *hyl_{Efm}* fue confirmada utilizando la técnica de digestión enzimática I-Ceu-I acoplada a PFGE e hibridización con la sonda *hyl_{Efm}* y con la sonda de control específica para el RNAr 23S (Figura 18, panel B). Con esta sonda de control se observa la presencia de 6 bandas correspondientes a las 6 copias del gen *rrn* en *E. faecium* en las tres cepas estudiadas, mientras que con la sonda *hyl_{Efm}* se obtiene la presencia de un barrido que no aparece en ninguna de las bandas que hibridizan con la sonda correspondiente al RNAr 23S tanto en la cepa donadora C (C68) (Figura 18, panel B, línea 2) como en la transconjugante (D344SRF C-6) (Figura 18, panel B, línea 3) característica que podría sugerir la presencia de diferentes formas del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* (Figura 18, panel B, línea 3). En la cepa receptora (D344SRF) no se observó la aparición de ninguna banda (Figura 18, panel B, línea 4). Por lo tanto, tomando en conjunto los resultados provenientes de las metodologías de extracción de plásmidos con gradiente de densidad con cloruro de cesio y PFGE-S1 y PFGE y I-Ceu-I, se confirma que el gen *hyl_{Efm}* se encuentra en un megaplásmido y que este es transferible por conjugación otras cepas de *E. faecium*.

Figura 18.

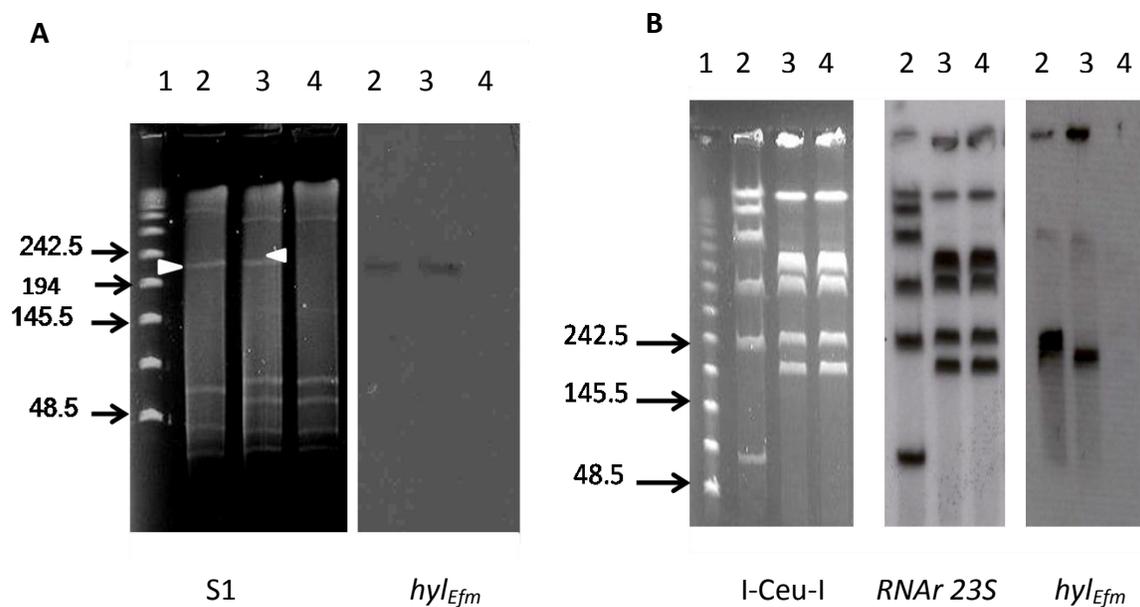


Figura 18. Panel A. Electroforesis en gel de agarosa del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* digerido con la enzima S1 e hibridización con la sonda correspondiente al gen *hyl_{Efm}*. Panel A. Digestión con la nucleasa S1-PFGE de la cepas de *E. faecium* e hibridización con la sonda *hyl_{Efm}*. Los plásmidos se muestran como bandas linearizadas que han sido hibridizadas con el gen *hyl_{Efm}* y se observan señalados con flechas en la figura del gel. Panel B. PFGE empleando digestión con la enzima I-Ceu-I e hibridización con la sonda control RNAr 23S y *hyl_{Efm}*. 1. Marcador de peso molecular; 2. Cepa C (C68); 3. Cepa transconjugante D344SRF C-6; 4. Cepa receptora D344SRF

10. DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Los enterococos son microorganismos que se caracterizan por su capacidad de intercambiar material genético y para ello uno de los mecanismos utilizado es la conjugación, que se define como la transferencia de DNA de una bacteria donadora a una receptora, por un proceso que involucra un contacto cercano entre dos células (330). Desde el punto de vista clínico, el proceso de conjugación es un mecanismo de gran importancia, debido a que cepas de origen nosocomial (generalmente poseen varios plásmidos que codifican determinantes de resistencia antibiótica) pueden participar en la transferencia horizontal de estos determinantes *in vivo*, generando la diseminación de genes de resistencia a antibióticos o de factores de virulencia tanto intra como inter especies (331). En enterococos, una gran variedad de plásmidos y transposones se han identificado como los plásmidos conjugativos que responden a feromonas en *E. faecalis*, los cuales han sido ampliamente estudiados incrementando el conocimiento a nivel del comportamiento de los elementos móviles en bacterias (331).

Diferentes estudios han mostrado la asociación entre cepas de *E. faecium* pertenecientes al CC17 con infecciones clínicas y brotes hospitalarios alrededor del mundo (27). Estas cepas se han caracterizado por resistencia a algunos antibióticos y por la presencia de determinantes de virulencia. En este trabajo se demostró que plásmidos portadores del gen *hyl_{Efm}* presentes en tres cepas de *E. faecium* de diferentes orígenes geográficos,

pertenecientes al CC17 que portaban diferentes marcadores de resistencia los cuales fueron transferidos por conjugación a diferentes cepas receptoras de *E. faecium*. Adicional-mente, los megaplásmidos provenientes de estas cepas fueron estudiados por PFGE e hibridización empleando la enzima nucleasa S1 la cual permite una adecuada detección, linearización y estimación del tamaño de megaplásmidos (321).

Se ha descrito asociación similar entre aislamientos de *E. faecium* pertenecientes al CC17 y el gen *esp_{Efm}* (variante de *esp* en *E. faecium*), gen que también se transfiere por procesos conjugativos entre aislamientos de enterococos (332). Sin embargo, a diferencia del gen *hyl_{Efm}* que se encuentra localizado en plásmidos, el gen *esp* se encuentra en una isla de patogenicidad en el cromosoma de *E. faecalis* y de *E. faecium* (29). Es así como, Oancea y colaboradores han demostrado la transferencia del gen *esp_{Efm}* desde el cromosoma de una cepa de *E. faecium* donadora a una cepa de *E. faecium* receptora, por la integración de este gen en un plásmido conjugativo. Por el contrario, en *E. faecalis* la movilización del gen *esp* fue producida por transferencia del gen del cromosoma de la cepa donadora al cromosoma de la cepa receptora (332). En el caso específico de las cepas de *E. faecium* evaluadas en este estudio, el gen *hyl_{Efm}* mantuvo la localización extra-cromosomal al transferirse como plásmido de cada una de las cepas donadores (A, B y C) a las cepas receptoras establecidas TX1330RF y D344RSR.

Los pulstipos obtenidos por PFGE empleando la enzima de corte infrecuente SmaI mostraron que la cepa receptora D344SRF y su respectiva transconjugante D344SRF C-6 presentaron un patrón electroforético idéntico, en el cual no se evidenció una banda que

pueda sugerir la presencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en la cepa transconjugante (D344SRF C-1). Sin embargo, cuando se utilizó la enzima S1 en la cepa donadora C (C68) y en la transconjugante D344SRF C-6 se detectó la presencia de un plásmido que migraba entre 194 y 242.5 kb (con un tamaño aproximado de ~220 kb) que se encontró tanto en la cepa donadora como en la transconjugante, el cual al ser hibridizado con la sonda para el gen *hyl_{Efm}* generó una señal positiva en estas dos cepas. Estos resultados fueron confirmados con PFGE y I-Ceu-I, con esta metodología se detectaron diversas bandas presentes en la cepa donadora como en la transconjugantes que hibridizó con la sonda del gen *hyl_{Efm}*, estas bandas no coincidían con las 6 bandas cromosomales obtenidas al hibridizar con la sonda control RNAr 23S sugiriendo la presencia extracromosomal de gen *hyl_{Efm}* en estas cepas.

Los resultados obtenidos previamente con las enzimas de restricción fueron confirmados cuando estas cepas (TX0016 y TX1330RF A-1) fueron digeridas con la enzima S1 e hibridizadas con la sonda *hyl_{Efm}*. Se observó una banda que correspondía al plásmido linearizado que migraba entre 242.5 y 291 kb (con un tamaño aproximado de ~250 kb) tanto en la cepa donadora A (TX0016) como en la cepa transconjugante (TX1330RF A-1) cuando se realizó la digestión con la enzima NotI. Por lo tanto, tomando en conjunto los resultados de PFGE con la enzima de restricción de corte infrecuente (NotI) y PFGE-S1, se resalta la presencia de un plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en esta cepa con un tamaño aproximado de ~250 kb.

Es interesante anotar, que la cepa receptora también presentaba un plásmido que migraba entre 194 y 242.2 kb que no hibridizaba con la sonda para el gen *hyl_{Efm}*, sin embargo, en el proceso de transferencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*, dicho plásmido se perdió probablemente por incompatibilidad de plásmidos en la célula. Este fenómeno de incompatibilidad de plásmidos se define como la imposibilidad que dos plásmidos co-residentes en una célula puedan ser heredados de manera estable en ausencia de una selección externa (333). Los plásmidos pueden ser incompatibles por que en alguna actividad esencial para su sobrevivencia como la replicación o la segregación no pueden distinguirse unos de otros. La incompatibilidad depende del hecho que los distintos miembros de un mismo grupo poseen el mismo tipo de sistema de control del número de copias y de reparto de dichas copias a las células hijas. En cada célula con dos plásmidos distintos del mismo grupo de incompatibilidad, el número total de copias no varía, pero por fluctuaciones aleatorias en el reparto, algunas células heredan más copias de uno de los plásmidos que del otro y después de varias generaciones aparecen células carentes de uno o del otro plásmido. Por ello, existen grupos de genes que controlan de una manera muy estricta este proceso de partición, el sistema más conocido está formado por el gen *parA* (codifica para una ATPasa) y *parB* (codifica para proteína de unión al centrómero). La proteína ParB es producida y se une activamente a una región de 43 bp de repeticiones invertidas en el plásmido, posteriormente ParA interacciona específicamente con ParB formando una estructura en forma de filamento (estructura similar a la actina) que separa cada uno de los plásmidos localizándolos en el polo de la

célula, generando de esta manera que se ubiquen distantes uno del otro, para que en el proceso de replicación de la célula sean segregados adecuadamente (334, 335).

En los experimentos de conjugación *in vitro* se destaca la adquisición y la co-transferencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* con genes de resistencia a antibióticos de uso frecuente a nivel clínico. Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede afirmar que *i)* los genes de resistencia evaluados [*vanA*, *aac (6')-aph(2')*, *erm(B)*, *ant(6)-I*] se transfieren con el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en una frecuencia relativamente alta, *ii)* los genes de resistencia a vancomicina (*vanA*) y los genes que confieren resistencia a HLR-GEN [*aac (6')-aph(2')*] en la transconjugante TX1330RF B-1 se encontraron físicamente unidos y muy probablemente se localizan en el mismo plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*, *iii)* los genes *erm(B)* y *ant(6)-I* (que confieren resistencia a eritromicina y HLR-STR) posiblemente se encuentran localizados en otro plásmido, sin embargo estos genes se co-transfieren con el gen *hyl_{Efm}*. Los resultados de PFGE e hibridización con estas sondas (*erm(B)* y *ant(6)-I*) mostraron la presencia de varias bandas en forma de barrido en la transconjugante TX1330RF B-1, sugiriendo que el elemento genético donde se encuentran estos genes no fue digerido por la enzima *SmaI* debido, probablemente este plásmido no presenta sitio de restricción para *SmaI*, *iv)* re-arreglos de DNA en la región *hyl_{Efm}* y en *vanA* de las cepas transconjugantes TX1330RF B-1 y B-2 posiblemente ocurrieron durante el proceso de conjugación, produciendo cambios genéticos probablemente ocasionadas por el movimiento de transposones en los cuales los genes *hyl_{Efm}*, *vanA* y *vanB* se han visto implicados (22, 336, 337). Adicionalmente, en la

transconjugante TX1330RF B-2 se detectó la presencia de dos plásmidos portadores del gen *hyl_{Efm}* y del gen *vanA*, sugiriendo que los plásmidos se replicaron pero no se segregaron adecuadamente.

Diversos reportes han mostrado que los transposones conjugativos son elementos genéticos muy importantes en la evolución bacteriana debido a que permiten la diseminación de genes inclusive entre organismos no relacionados (338, 339). Estos transposones conjugativos pueden generar deleciones, inserciones y re-arreglos los cuales pueden ser el sustrato para la recombinación homóloga, así como también pueden transferir genes de resistencia antibiótica a microorganismos patógenos (338, 339). De la misma manera, algunos estudios han demostrado que la conjugación es un mecanismo común entre los enterococos para la transferencia eficiente del grupo de genes *vanA* (104, 130, 340, 341). Es así como Heaton y colaboradores han demostrado re-arreglos genéticos en plásmidos portadores de transposones que presentan el grupo de genes *vanA*. Estos autores reportaron un plásmido de 92 kb (pHKK701) el cual se formó por la transferencia de un fragmento de 39 kb (portador del gen *erm(B)* y del Tn1546 proveniente del plásmido pHKK702), al plásmido conjugativo respondedor a feromonas pHKK703 presente en *E. faecium*; generando de esta manera un plásmido capaz de diseminarse a diferentes cepas de *E. faecium* gracias a sus capacidad de transferencia y a los determinantes genéticos tanto de resistencia como de virulencia adquiridos (342).

Tomando en conjunto los resultados obtenidos se puede concluir que cepas de *E. faecium* presentan megaplásmidos portadores del gen *hyl_{Efm}*, los cuales son capaces de

co-transferirse con marcadores de resistencia a antibióticos, estrategia que podría ser muy útil para la diseminación exitosa de estos microorganismos en ambientes hospitalarios.

11. CONCLUSIONES CAPÍTULO I

1. El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de las cepas A (TX0016), B (ERV99) y C (C68) es transferible por conjugación a las cepas de *E. faecium* D344SRF y TX1330RF.
2. Las cepas de *E. faecium* A (TX0016), B (ERV99) y C (C68) son portadoras de megaplásmidos con un tamaño mayor a 145 kb, los cuales co-residen con plásmidos de menor tamaño (48.5-97 kb).
3. El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de la cepa *E. faecium* A (TX0016) tiene un tamaño aproximado de 250 kb, presenta un sitio de corte para la enzima NotI y más de un sitio de restricción para las enzimas SmaI y ApaI.
4. El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de la cepa *E. faecium* A (TX0016) se co-transfiere junto con genes de resistencia a eritromicina y HLR-STR y probablemente estos genes se encuentran en un elemento genético diferente al plásmido *hyl_{Efm}*.
5. El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de la cepa *E. faecium* B (ERV99) se co-transfiere con genes de resistencia a eritromicina, vancomicina, HLR-GEN y HLR-STR.
6. El gen *hyl_{Efm}* de la cepa *E. faecium* B (ERV99) probablemente se encuentra en el mismo plásmido que el gen de resistencia a vancomicina *vanA*.

7. El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de la cepa *E. faecium* C (C68) presenta un tamaño aproximado de 220 kb.

CAPÍTULO II

EL PLÁSMIDO PORTADOR DEL GEN *hyl_{Efm}* TIENE UN EFECTO EN VIRULENCIA EN LOS MODELOS ANIMALES PERITONITIS E INFECCIÓN URINARIA

13. RESULTADOS

13.1. Análisis computacionales de la región *hyl_{Efm}*

El gen *hyl_{Efm}* está localizado en un plásmido de un tamaño aproximado ~250 kb en la cepa de *E. faecium* (TX0016). Este plásmido se caracteriza por presentar una región de aproximadamente ~ 20 kb, denominada región *hyl_{Efm}*, la cual está formada por un grupo de genes implicados en metabolismo y transporte de carbohidratos, así como también posee genes que presentan homología con sistemas reguladores de dos componentes (Figura 1) (22).

Análisis computacionales de la secuencia de la región *hyl_{Efm}* indican que este sistema de regulación presente en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*, está compuesto por una proteína de 524 aa con homología para histidina quinasa, formada por dos dominios localizados en el carboxilo terminal, uno perteneciente a la superfamilia de histidina kinasas y el otro a la superfamilia de unión al ATP. El segundo determinante genético es una proteína de 242 aa, con homología para un regulador de respuesta el cual pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC. Esta familia de reguladores, se encuentra ampliamente diseminada a nivel microbiano y presenta diversas funciones desde metabolismo de carbono, respuesta a stress y patogenesis bacteriana (343). La proteína AraC, es reguladora del operon L-arabinosa en *E. coli* y fue la primera de esta

familia identificada, purificada y caracterizada bioquímicamente (344-347). En el carboxilo terminal se encuentra el dominio perteneciente a la superfamilia AraC, que presenta dos dominios con estructura de hélice giro hélice, los cuales son requeridos para la unión al DNA (343); en el dominio amino terminal se encuentra una región en la cual se realiza la fosforilación de la proteína. Estos sistemas de dos componentes son importantes para multiples funciones puesto que le permiten a la bacteria controlar procesos celulares y regular la expresión de genes de virulencia, resistencia a antibióticos y genes metabólicos que les ayudan a adaptarse a diversos ambientes biológicos (348)(Figura 1).

Figura 1.

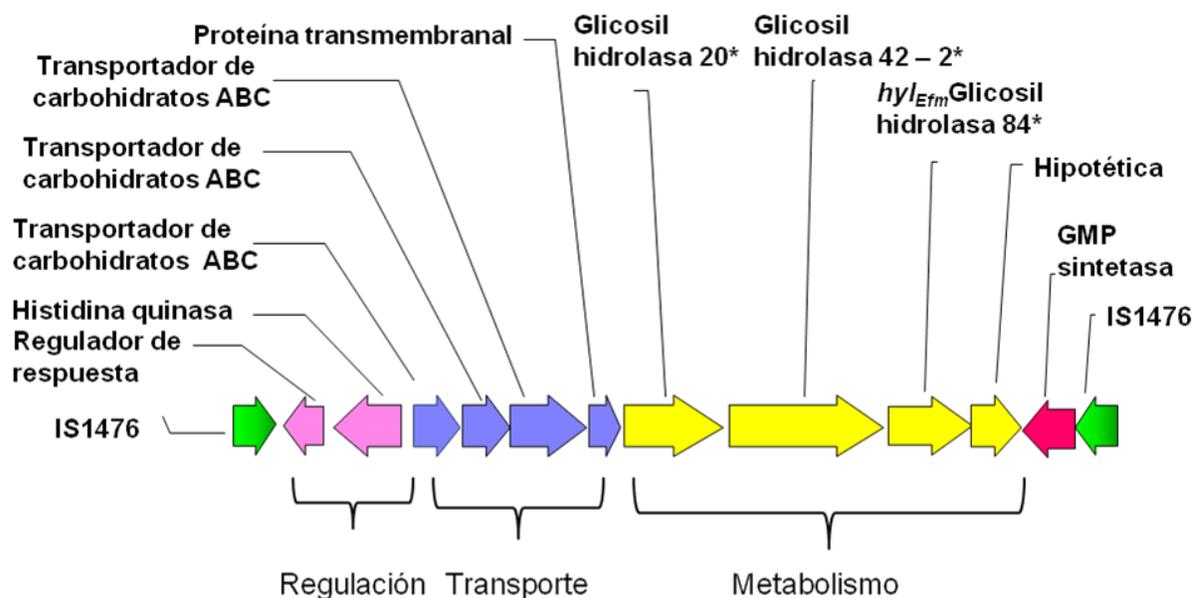


Figura 1. Mapa físico de la región *hylEfm* en *E. faecium*. La función putativa de los genes se observa en la parte superior. Los genes se dividen en tres grupos, implicados en regulación, transporte y metabolismo. Estas funciones putativas fueron obtenidas empleando el análisis por alineamiento de las secuencias de las proteínas de este grupo de genes, utilizando "The Basic Local Alignment Search Tool, (BLAST) por medio de la página electrónica NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Nomenclatura: * familia de Glicosil hidrolasa, ABC: cassette de unión de ATP, IS: secuencia de inserción.

Corriente abajo del sistema de dos componentes, se encuentran cuatro genes implicados en el transporte de carbohidratos. De estos genes, tres de ellos codifican para proteínas que presentan homología con un transportador de carbohidratos de tipo ABC (casete de unión a ATP) con características de proteínas tipo permeasas. El último gen de este grupo codifica para una proteína de 203 aa, con presencia de dominios transmembranales pero sin ninguna homología descrita hasta la fecha. El grupo de genes implicados en el metabolismo de azúcares esta formado por tres genes el primero codifica para: *i)* una proteína de 637aa con homología para una glicosil hidrolasa de la familia 20 (GH20), con un dominio perteneciente a la superfamilia de las hexoxaminidasas, *ii)* el segundo gen codifica para una proteína de 993aa, con homología para glicosil hidrolasa de la familia 42, con dos dominios glicosídicos y un dominio con homología para la fracción pequeña de la β -galactosidasa, *iii)* el tercer gen codifica para una proteína de 553 aa, inicialmente descrita como hialuronidasa (Hyl_{Efm}) (22), sin embargo, análisis posteriores indican que pertenece a la familia 84 de las glicosil hidrolasa y *iv)* un gen que codifica para una proteína hipotética de 310 aa la cual no se conoce con claridad su función y *v)* una proteína de 537 aa con homología para una GMP sintetasa cuya polaridad es en sentido opuesto (Figura 1).

El papel bioquímico de la proteína Hyl_{Efm} como enzima involucrada en la degradación de glicosaminglicanos (ácido hialurónico o condroitin sulfato entre otros) se ha estudiado por diversos ensayos como degradación del ácido hialurónico (HA) en plato de agar y zimografía utilizando diferentes sustratos (HA y condroitin sulfato entre otros), diferente

pH, con geles denaturados y sin denaturar, y finalmente con el sobrenadante de lisados celulares (comunicación personal Dr Murray). A pesar de estas diferentes aproximaciones experimentales la actividad de hialuronidasa nunca ha sido detectada en Hyl_{Efm}.

Estudios computacionales realizados en este trabajo indican que la proteína (Hyl_{Efm}) comparte homología estructural con la proteína Spy1600 del *S. pyogenes* con una identidad del 43.3 % a nivel de aminoácidos y una similaridad del 73 % (349) (Figura 19).

La proteína Spy1600 tiene un dominio putativo de hialuronidasa sin embargo, los ensayos bioquímicos indican que esta enzima tiene una actividad de β -N-acetyl-glucosaminidasa, pertenece a familia de las glicosil hidrolasas 84 (GH84) y no presenta actividad de hialuronidasa (349). Las glicosil hidrolasas son un grupo de enzimas clasificadas en el sistema numérico como EC 3.2.1 [“enzyme comision”, (EC)]; el cual se basa en agrupar las enzimas según las reacciones químicas que ellas catalizan. Las GH84 hidrolizan enlaces glicosídicos entre uno o mas carbohidratos o entre carbohidratos y compuestos de origen diferente a carbohidrato como proteínas. Específicamente la hidrólisis del enlace glicosídico se hace basado en dos residuos catalíticos: un ácido general (donador de protones) y una base nucleofílica, utilizando el mecanismo de doble desplazamiento catalítico (350).

La comparación de la secuencia de algunas enzimas pertenecientes a la familia de las GH84 (en un alineamiento del dominio hialuronidasa) con Hyl_{Efm} permitió identificar residuos importantes en este dominio, los cuales son conservados en las GH84. Dentro de ellos se encuentran dos aspartatos localizados en el sitio activo de las GH84 y los cuales se

presentan también en Hyl_{Efm} (Figura 19). Por lo tanto, con este tipo de evidencia es posible sugerir que el gen *hyl_{Efm}* podría codificar para una β-N-acetyl-glucosaminidasa y no para una hialuronidasa, siendo las características mas notables para soportar esta afirmación: *i)* la homología estructural con la proteína Spy1600, *ii)* la similitud en la organización de los genes adyacente a *spy1600*, *iii)* carencia de actividad para la degradación de sustratos como HA y condroitin sulfato y *iv)* residuos conservados en el dominio hialuronidasa de Hyl_{Efm} comparado con otras GH84.

13.2 El plásmido portador de *hyl_{Efm}* incrementa la virulencia en el modelo experimental de peritonitis en ratón.

La transferencia de DNA asociado con la presencia del gen *hyl_{Efm}* le confiere a cepas transconjugantes de *E. faecium* la habilidad para colonizar el TGI de ratones, capacidad que no parece estar relacionada específicamente con la expresión de determinantes de resistencia a antibióticos (23). La evaluación de este tipo de elementos genéticos en *E. faecium* se hace cada vez mas importante debido a la importancia que ha adquirido en los últimos años esta especie de enterococos, muy probablemente debido a una interacción entre factores de virulencia y genes de resistencia los cuales le han permitido diseminarse exitosamente en ambientes hospitalarios. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos hallazgos descritos previamente, es relevante estudiar el papel del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en virulencia.

Figura 19.

B. thetaiom	151	RGVVEGFYGT	PWSHQARLSQLK	FGYGNKMN	TYIY	GPKDDPYHSA	NWRLPY	PDKEAAQLQEL	VAVANENEV	221				
C. perfring	182	RGIVEGFYGT	PWTHKDRLLDQIK	FGYGNKLN	TYIY	YAPKDDPYHRE	KWREPY	PENEMQRMQEL	IDASAENKV	251				
S. pyogenes	132	RGIIEGFYGT	PWTREERLDCLRF	IGNKRMN	TYMY	YAPKDDYQQRK	LWRDLY	PEDWVTFKELL	LAVAKEEGL	201				
E. faecium	143	RGIIEGFYGI	PWTHEMRLSLFS	YMKDNQLN	TFMY	YAPKDDPELLRK	KWRELY	DAQELDKFKELL	SAAEASNI	212				
D. melanogaster	17	CGVIEGFYGR	PWTTEQRKDLFR	KLKSMGMG	SYMY	YAPKDDYKHRA	YWRELY	TVVEADHLSSL	IAAAKEAGI	89				
Meningioma	62	CGVVEGFYGR	PWVMEQRKELFR	RRLQKWELN	TYLY	YAPKDDYKHRM	FWREMY	SVEEAQLMTLI	SAAREYEI	131				
C. elegans	20	CGVVEGFYGR	PWTPEQRKHLFKR	QNLGLT	TYLY	YAPKDDIKHRS	LWRELY	NNEEMTYLRNL	VESAKDNV	89				
B. thetaiom	222	DFVWAIH	HPGQDIKW	KEDRDL	LLAK	FEKMYQLG	VRSFAVFF	DDI	EGTNPQQAEL	LNYYIDEKFAQVK	290			
C. perfring	252	DFVFGIS	SPGIDIRF	EEDFNHL	IAKAES	LYDMG	VRSFAIYWDDI	QDKSAAKHAQ	VLNRFNEEFVKAK	322				
S. pyogenes	202	DFWYMIS	SPGLDFDY	EADYQL	LYQK	LQQLLAL	GVCHFGLLLDDI	FKKTAYAQA	HLATEVHHFLNQQH	280				
E. faecium	213	DFWYLIS	SPGNIDIDI	EEDIQV	LLKLE	QLEIELG	VVFQFGLLLDDI	FREPAPAHAY	LVNRVVEEYLSTRL	291				
Drosophila	90	TFYYALS	SPGLDMTY	PKEIAT	LKRKLD	QVAQFG	CEAYALLFDDI	FQTFANAHV	SVTNEIYTHLGS	168				
Meningioma	132	EFIYALS	SPGLDITF	PKEVST	LKRKLD	QVSQFG	CRSFALLFDDI	FSSFAHAQV	SITNEIYQYLGEPE	210				
C. elegans	90	NEFYALS	SPGKDILY	DEEMDT	LKNKLD	QVRSVGCDS	FAVLFDDI	FTSFAHAQV	HIAANTIFKYLNTKT	168				
B. thetaiom	291	LVM	CPTEYN	NGN	Y	LLTLGDKLN	PSIQIMWTG	DRVI	D	ITRDGISWINERIKR	PAYIWNFP	362		
C. perfring	323	LITV	PTEYD	NGQ	Y	TRIFAETV	DPSIEVMWTG	PGVV	E	IPLSDAQLISGI	YNNMAVWNYP	398		
S. pyogenes	281	LVI	CPTEYD	NHH	Y	LQELSERI	PKEVAFFWTG	PSTL	Q	ISQADIETMAAVYQR	PIIWDNIP	349		
E. faecium	292	LVI	CPTEYD	NRH	Y	LATLSQEI	PEQLPFFWTG	PSTL	S	ISTEELQEMASVYQR	PMLIWDNIP	360		
Drosophila	169	FLF	CPTQYC	TVQ	Y	LNTLGSKLN	NEIDILWTG	DKVI	N	ISLESIQEITEVLR	RPPCIWDNLH	239		
Meningioma	211	FLF	CPTEYC	NVS	Y	LRTVGEKLL	PGIEVLWTG	PKVV	E	IPVSEIEVSKI	IKRAPVIWDNLH	282		
C. elegans	169	FMF	CPTEYC	TLE	Y	LNTIGEQL	AGDIHIMWTG	PRVI	Y	LTVHEHLARVGSVMR	RKPLIWDNLH	239		
B. thetaiom	363	VSD	YVVR	DH	LL	LG	YVYG. [4].IAKE	MSGFVT	NPMEHAESS	KIAIYSVAS	WNPAYK	418		
C. perfring	399	VTD	YFK	GK	LAL	GP	MHG. [4].LNQY	VDFFTV	NPMEHAEL	SKISIH	TAAD	WNMDNY	454	
S. pyogenes	350	VND	YQK	ER	LFL	T	PEAN. [4].LCQP	VKGIVSN	PMISWEL	SKLTLT	DMSH	WDANRY	410	
E. faecium	361	VND	YLE	EL	LF	M	SPYEN. [4].LSKE	VTGVVSN	PMQAEL	ASKFT	INSMAN	WNCERF	421	
Drosophila	240	AND	YDQ	KR	IF	M	GPYSG. [4].LIPH	LRGVM	TNP	NCFE	GNFVAI	HSLAF	WSRCSL	293
Meningioma	283	AND	YDQ	KR	LF	L	GPYKG. [4].LIPR	LKGVLT	NPNCFE	EANYVAI	HTLAT	WYKSNM	336	
C. elegans	240	AND	YDL	KK	IF	M	MMH. [4].IKEF	TSGLLS	NPNGRYE	ANFV	PFHTLSD	WNAADR	293	
B. thetaiom	419	DTW	Q	KDAI	PSA	AEE	L	FAMHNS	447					
C. perfring	455	DYD	KA	NRAI	GD	LAED	M	FANHST	483					
S. pyogenes	411	QPS	HS	LETL	TD	YTED	L	FAWHNG	441					
E. faecium	422	DPLE	T	TSVV	GSK	LQP	T	FPNHYT	455					
Drosophila	294	SKV	NS	LSAD	TEN	DDD	A	LSKNVY	325					
Meningioma	337	DSE	DS	VSIQ	NEG	SDE	L	YSPQMA	379					
C. elegans	294	DLRE	N	ESGI	SSR	NGV	I	IDCNTE	317					

Figura 19. Alineamiento del dominio hialuronidasa de *hyl_{Efm}* proveniente de *E. faecium* cepa A (TX0016) con otras glicosil hidrolasas de la familia 84 (GH84). La secuencia del gen *hyl_{Efm}* (resaltada en letras rojas) de la cepa A *E. faecium* (TX0016) se comparó con las secuencias de la enzimas procariotas *Spy1600* del *Streptococcus pyogenes* y con las de *Bacillus theataiotaomicron* y *Clostridium perfringens* (proteínas que han sido cristalizadas). Adicionalmente, se comparó con las enzimas de los eucariotas *Drosophila melanogaster*, *C. elegans* y con una enzima expresada en el meningioma. Los aminoácidos resaltados en amarillo representan residuos idénticos, los asteriscos en verde están relacionados a aminoácidos importantes en el sitio catalítico de las GH84 y los residuos en azul o violeta identifican diferentes aminoácidos.

Una de las formas más comúnmente utilizadas para la evaluación de determinantes de virulencia en enterococos es el modelo de peritonitis en ratón (235). Este modelo, emplea la infección bacteriana vía intra-peritoneal imitando las condiciones que suceden *in vivo* en los seres humanos y para ello utiliza un inóculo bacteriano en combinación con extracto fecal de rata estéril al 50% (SRFE 50 %) (ver metodología 8.4.1) compuesto que disminuye la dosis letal 50 (LD50) en los aislamientos de enterococos. Este extracto simula el ambiente que presenta una herida en los tejidos de la cavidad peritoneal del humano, estimula la inflamación y permite observar un efecto de mortalidad sin necesidad de recurrir a una infección con un inóculo demasiado alto, el cual no permitiría detectar la atenuación en las mutantes de una manera adecuada. Sin la implementación de este extracto se necesitaría utilizar sustancias menos fisiológicas como la mucina. Por ello, el SRFE se convierte en una buena alternativa para estudios de virulencia en estos microorganismos (235).

En este trabajo se determinó si la adquisición del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* por la cepa comensal de *E. faecium* TX1330RF y la cepa de laboratorio *E. faecium* D3444SRF, producían una variación en la virulencia después de la infección intra-peritoneal con estos microorganismos. Para ello, se tomaron grupos de 10 animales los cuales se infectaban con cinco inóculos diferentes (obtenidos por dilución a partir de un inóculo inicial) por cada cepa de estudio. En cada experimento se comparó la cepa salvaje portadora del plásmido frente la cepa que no lo presentaba, realizando de 2 a 3 repeticiones de cada experimento aplicando condiciones de inóculos similares (ver metodología sección 8.4.1).

Los resultados se expresaron empleando curvas de sobrevivencia aplicando el método de Kaplan-Meier y se compararon por la prueba del rango logarítmico con el software Stat View.

13.2.1 Incremento de la virulencia experimental en el modelo de peritonitis en las cepas derivadas de *E. faecium* D344SRF

En la Figura 20 se observa los resultados de tres experimentos independientes en los cuales los ratones que se infectaron con las cepas isogénicas de *E. faecium* D344SRF y la transconjugante D34SRF C-6, (plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*) empleando tres inóculos diferentes. Las curvas de sobrevivencia muestran que el panel A presentó un incremento en la letalidad de la cepa D34SRF C-6 (inóculo 6.5×10^8 UFC/ml) de una forma estadísticamente significativa ($p=0.0296$) frente a la cepa D344SRF (9.7×10^8 UFC/ml) (Figura 20, panel A); resultados similares se obtuvieron cuando se compararon en un experimento independiente estas mismas cepas, pero utilizando un inóculo de 1.07×10^9 UFC/ml para D344SRF C-6 y 1.55×10^9 UFC/ml para D344SRF ($P = 0.0053$) (Figura 20, panel B). Inóculos muy similares de las dos cepas D344SRF C-6 (2.6×10^9 UFC/ml) y D344SRF 3.9×10^9 UFC/ml también mostraron una diferencia significativa ($P=0.0348$) en la mortalidad de la cepa isogénica que presenta el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* (D344SRF C-6) (Figura 20, panel C)

Figura 20.

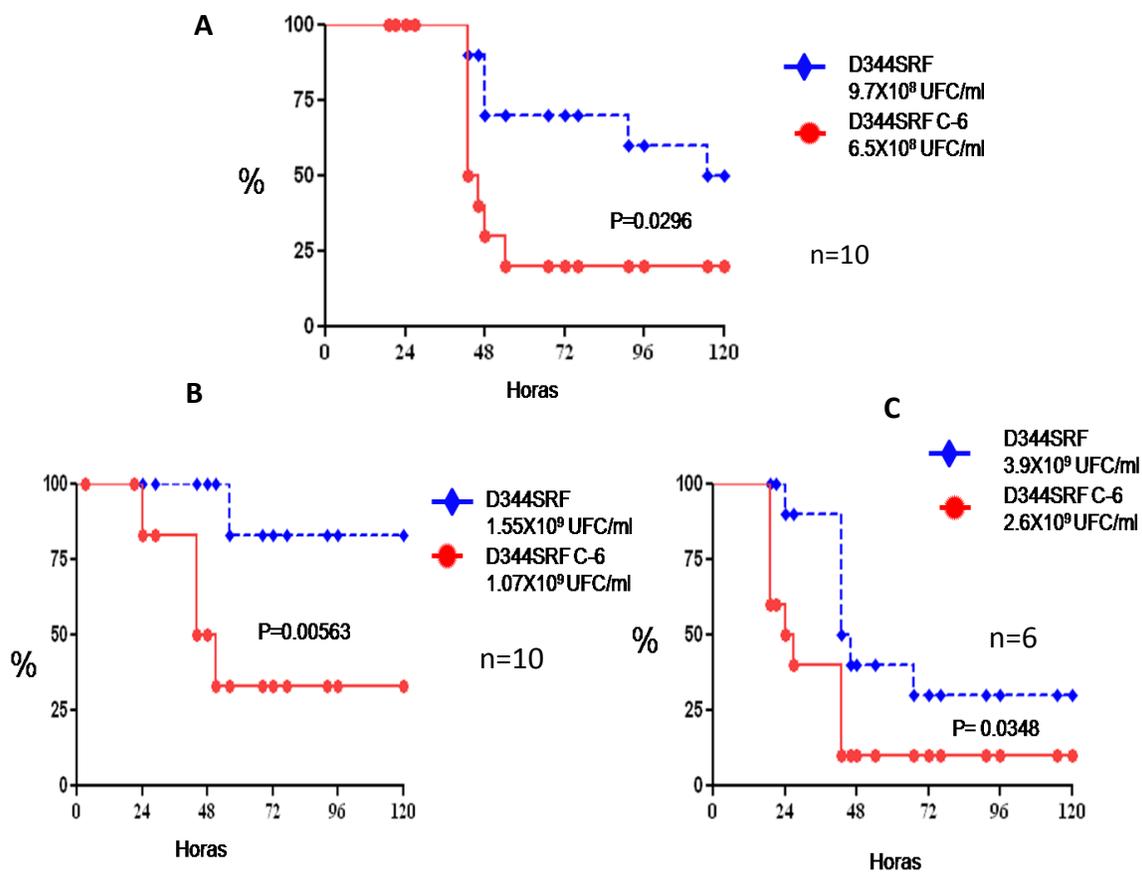


Figura 20. Curva de sobrevivencia del *E. faecium* D344SR en presencia y ausencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*. Se utilizaron tres diferentes inóculos para la cepa D344SRF y la D344SRF C-6 respectivamente. Los animales se observaron por 120 horas y se evaluó la sobrevivencia de los ratones empleando el método de Kaplan Meier. En el eje de la Y se grafica el porcentaje de sobrevivencia y en el eje de las X el tiempo en que se estudiaron los animales. Se evaluaron 10 ratones por cada inóculo en los paneles A y B, y 6 ratones en el panel C. Los resultados corresponden a experimentos independientes.

13.2.2. Incremento de la virulencia experimental en el modelo de peritonitis en las cepas derivadas de *E. faecium* TX1330RF

Con el fin de determinar si el efecto observado de aumento de la virulencia por parte de la cepa de laboratorio *E. faecium* D344SRF (la cual había adquirido el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*) se presentaba también en otra cepa que portaba el p Hyl_{Efm} , se evaluó si la presencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de *E. faecium* cepa A (TX0016) podría también influir en el aumento de la virulencia en el modelo de peritonitis de ratón. Para ello, se utilizó la cepa transconjugante *E. faecium* TX1330RF A-1 (portadora del plásmido *hyl_{Efm}*) la cual se comparó frente a la cepa *E. faecium* TX1330RF que no presentaba este plásmido. Se realizó la evaluación de las cepas empleando las condiciones previamente descritas utilizando cinco inóculos de cada cepa y se efectuaron cuatro repeticiones del experimento.

En la Figura 21 se muestra las curvas de sobrevivencia en la cual se compara la cepa TX1330RF A-1 con la cepa TX1330RF. Se observa que a pesar que la infección intra peritoneal se realizó con un inóculo ligeramente mayor en la cepa TX1330RF el efecto de mortalidad menor se mantuvo en todos los animales estudiados que fueron infectados con esta cepa. Se detectó aumento de la mortalidad en el grupo de ratones infectados con la cepa TX1330RF A-1 cuando se inocularon con 1.3×10^9 UFC/ml (Figura 21 panel A), comparada con la TX1330RF (1.8×10^9 UFC/ml) con una $P = 0.0133$. Este efecto también se observó en el inóculo de TX1330RF A-1 9.3×10^9 UFC/ml (Figura 21, panel B) y en TX1330RF 1×10^9 UFC/ml, resultados que fueron estadísticamente significativos con una

P=0.0006. Hallazgos similares y también estadísticamente significativos se obtuvieron con inóculos diferentes TX1330RF 2.5×10^8 UFC/ml vs TX1330RF A-1 2.3×10^8 UFC/ml con una P= 0.018 (Figura 21, panel C). Adicionalmente, se observó el inicio de la disminución de la sobrevivencia de los ratones entre la hora 60 y 80 en todos los ensayos realizados.

Con el fin de confirmar la estabilidad del plásmido proveniente de la cepa A (TX0016) se recolectaron colonias a partir del bazo de dos ratones que murieron en el transcurso del experimento. Las colonias provenientes del TX1330RF y TX1330RF A-1 presentaban una morfología similar evaluada por observación macroscópica y de una forma aleatoria se seleccionaron cuatro colonias de cada cepa y se realizó PFGE-SmaI para confirmar su clonalidad. En la Figura 22 se presenta el resultado de este ensayo, en el cual se observa que todas las cepas mantuvieron el mismo perfil electroforético previamente obtenido antes de ser inoculadas en el ratón. Tomando en conjunto estos resultados sugieren, que la adquisición del plásmido portador de *hyl_{Efm}* proveniente del *E. faecium* TX0016 confiere un aumento de la virulencia *in vivo* en el modelo de peritonitis en ratón y sin variaciones genéticas detectables.

Figura 21.

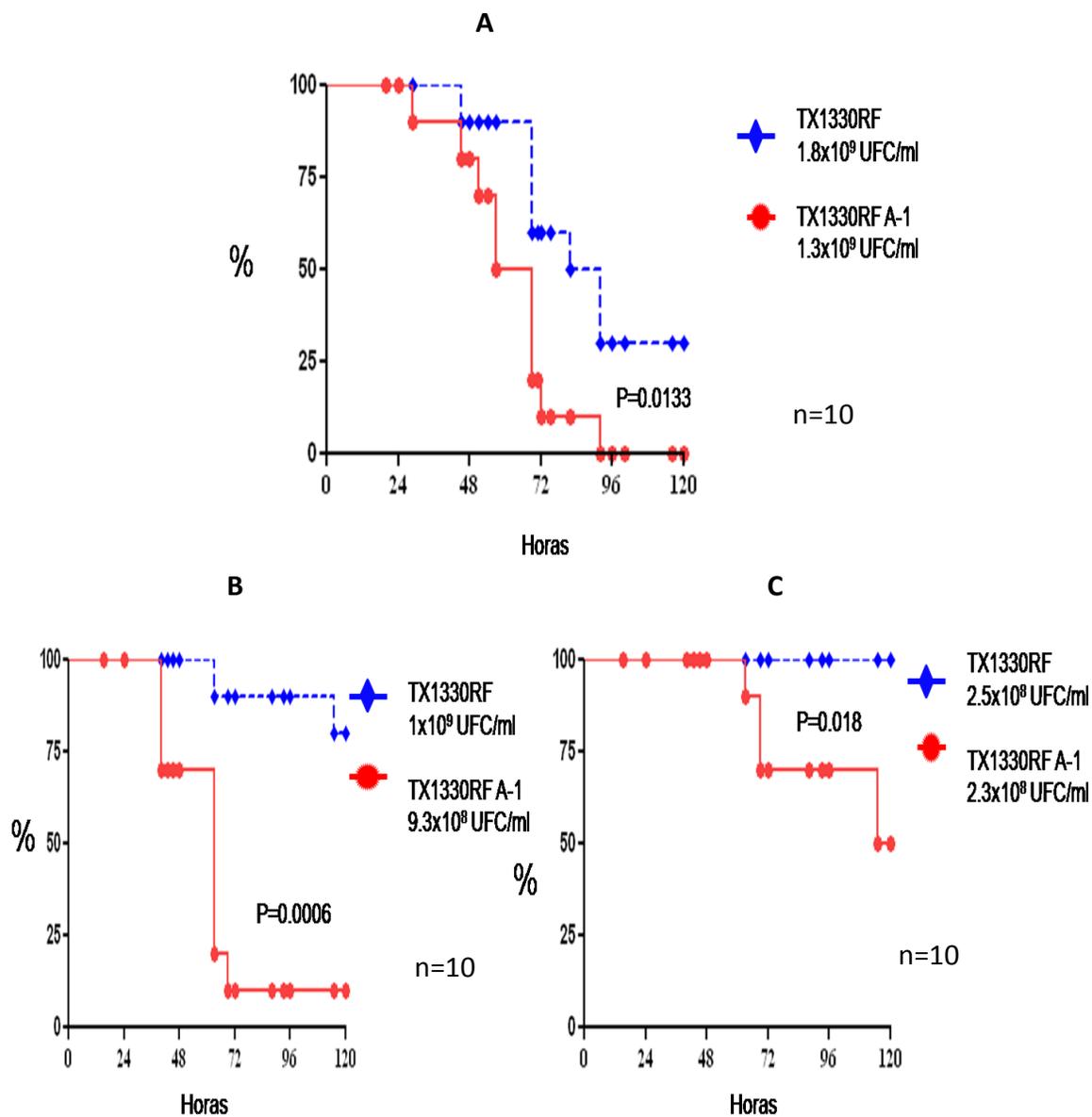


Figura 21. Curvas de sobrevivencia en el modelo de peritonitis en ratón por inoculación vía intra-peritoneal con cepas de *E. faecium*. Se observan en cada panel los resultados del modelo de peritonitis murina en el cual los animales se inocularon con las cepas TX1330RF y TX1330RF A-1 (transconjugante en la cual el plásmido *hyl_{Efm}* fue transferido a partir de la cepa donadora A, *E. faecium* TX0016) empleando diferentes inóculos. En el eje de la Y se grafica el porcentaje de sobrevivencia y en el eje de las X el tiempo en que se estudiaron los animales. Se evaluaron 10 ratones por grupo y se muestran los resultados de tres experimentos independientes.

Figura 22.

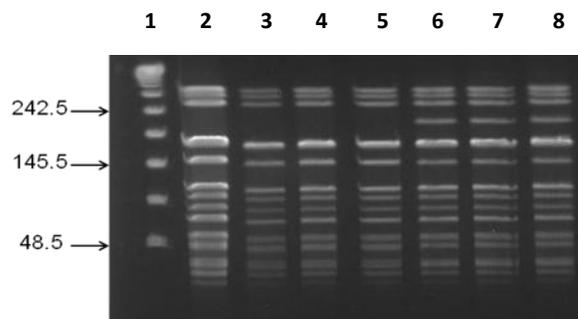


Figura 22. Resultados de PFGE-SmaI de las cepas TX1330RF y TX1330RF A-1 provenientes de colonias recuperadas del bazo de los ratones infectados vía intra-peritoneal en el modelo de peritonitis en ratón. Las colonias provienen de dos ratones diferentes infectados con la cepa *E. faecium* TX1330RF y TX1330RF A-1 las cuales no presentaban cambio en la morfología y fueron recuperadas de agar bilis esculina (BEA). 1. Marcador molecular lambda. Las líneas 2 al 5 corresponden a la cepa TX1330RF A y las líneas 6 al 8 al TX1330RF A-1 (portador del plásmido *hyl_{Efm}*)

13.3 Adquisición del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* también incrementa la colonización de *E. faecium* en el tracto genitourinario (riñones y vejigas) del ratón.

Los enterococos son uno de los microorganismos Gram-positivos más comúnmente identificados como agentes causales de infecciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados (92). En el ambiente hospitalario, diversos factores de riesgo se han señalado como elementos importantes para la adquisición de esta infección y dentro de ellos se encuentran: los catéteres urinarios, la estadía prolongada en una unidad de cuidado intensivo, la inmunosupresión de los pacientes y el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro (351).

Sin embargo, la patogénesis de la infección del tracto urinario causada por enterococos aún no ha sido totalmente esclarecida. Por ello, la aplicación del modelo murino de infección urinaria es una herramienta metodológica adecuada puesto que contribuye en

el avance del conocimiento de las infecciones urinarias en humanos ya que permite investigar las interacciones moleculares que existen tanto a nivel del huésped como a nivel del patógeno (352). Dentro de las bacterias más comúnmente estudiadas empleando este modelo se encuentran *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis* y *E. faecium* (264, 300, 304, 353, 354).

Resultados previos mostraron que la presencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en cepas de *E. faecium* incrementaban la virulencia en el modelo de peritonitis en ratón, por lo tanto se determinó si este plásmido presentaba algún efecto *in vivo* que pudiera ser evidenciado en un modelo de infección urinaria experimental. Hasta la fecha se han desarrollado diferentes modelos de infección urinaria (300, 355-358) los cuales presentan variaciones en la inoculación (intrauretral vs transuretral), en la composición del catéteres, en la concentración del inóculo, entre otros (352).

En el estudio de la virulencia en enterococos se ha aplicado el modelo de mono infección (264, 300, 358) en el cual cada grupo de ratones se infecta vía intra-uretral independientemente con una de las cepas a evaluar y se evalúan por lo menos 10 animales probando tres rangos de inóculo diferentes (10^5 a 10^7). En *E. faecalis* también se ha desarrollado (359) el modelo de infección mixta o infección por competencia, en el cual cada ratón se infecta vía intra-uretral usando una mezcla de cada una de las bacterias a estudiar en proporciones muy similares (~1:1). Esta metodología requiere un número menor de animales para su estudio, puesto que en cada modelo experimental (ratón) se evalúan las dos cepas de estudio al mismo tiempo, permitiendo de esta manera

controlar las diferencias propias del animal (variaciones inmunológicas). La eficiencia de este modelo ya ha sido comprobada en otros microorganismos Gram-positivos (ver metodología 8.4.2) (223, 236, 360). En este trabajo se emplearon las dos metodologías para estudiar las cepas TX1300RF y la cepa transconjugante TX1330RF A-1 a la cual el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* fue transferido por conjugación a partir de la cepa donadora A (TX0016).

13.3.1 Modelo de infección mixta

Un total de doce animales fueron evaluados los cuales se inocularon con una suspensión bacteriana que contenía proporciones similares de los dos microorganismos (~1:1) con un inóculo de 6.6×10^7 CFU/ml para TX1330RF y para TX1330RF A-1 6.4×10^7 CFU/ml. Posteriormente a la infección mixta, el catéter fue removido, los animales se mantuvieron en adecuadas condiciones de alimentación, 48 horas después se sacrificaron y los riñones y la vejiga fueron removidos para su posterior análisis. La solución celular obtenida de los órganos macerados fue diluida y sembrada en agar BHI, agar bilis esculina (BEA) medio específico para crecimiento de enterococos y en agar BHI suplementado con rifampicina (100 µg/ml) y ácido fusídico (25 µg/ml) con el fin de confirmar la presencia de las cepas derivadas de TX1330RF las cuales son resistentes a estos dos antibióticos. Un total de 552 colonias fueron recuperadas de los dos riñones provenientes de los 12 ratones infectados (un máximo de 46 colonias por ratón) y 463 colonias fueron obtenidas de las 9 vejigas infectadas (máximo 48 por ratón). Estas colonias recuperadas de los

órganos fueron estudiadas por medio de métodos fenotípicos (crecimiento en agar con antibióticos) y genotípicos (detección de genes).

La confirmación de las colonias obtenidas correspondían a enterococos y provenían de las cepas derivadas de TX1330RF se realizó por el crecimiento de las mismas en agar BEA y en agar BHI suplementado con rifampicina y ácido fusídico. Posteriormente, las colonias fueron evaluadas para la detección del gen *ddl* (identificación de especie de *E. faecium*) y del gen *hyl_{Efm}* (confirmación de la presencia del plásmido proveniente de TX0016) por medio de hibridización por lisis de colonias. El límite mínimo de detección de las bacterias estudiadas en este experimento fue de 10^2 UFC/gr de tejido.

Los resultados de la infección mixta (12 ratones) se presentan en porcentaje de bacterias recuperadas de cada cepa (TX1330RF–TX13330RF A-1) en los riñones o el la vejiga de los animales infectados. Se utilizó la prueba t-de student pareada para la comparación de la colonización del uro-epitelio por parte de dos cepas, puesto que esta prueba es útil cuando en el mismo modelo experimental (ratón) se evalúan las dos variables a comparar. En la figura 23, en el panel de la derecha se observa el inóculo inicial (6.6×10^7 UFC/ml) y se presentan al mismo tiempo los resultados provenientes de las colonias TX1330RF recuperadas a partir de los riñones y de las vejigas de los ratones. En el panel de la izquierda en la Figura 23 se indica el inóculo inicial (6.4×10^7 UFC/ml) de la cepa TX1330RF A-1 y se muestran los resultados provenientes de las colonias TX1330RF A-1 recuperadas a partir de los riñones y de las vejigas de los ratones. Se observa que la cepa TX1330RF A-1 (con el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*) fue capaz de colonizar mejor el

tracto genitourinario comparada con la cepa TX1330RF a las 48 horas de la infección en todos los ratones evaluados, resultados que fueron estadísticamente significativos ($P < 0.0001$) tanto en los riñones como en las vejigas (Figura 23). De esta manera se sugiere que la cepa portadora del plásmido *hyl_{Efm}* presenta mejor capacidad de colonizar el uroepitelio que la cepa TX1330RF que no presenta este plásmido

Figura 23.

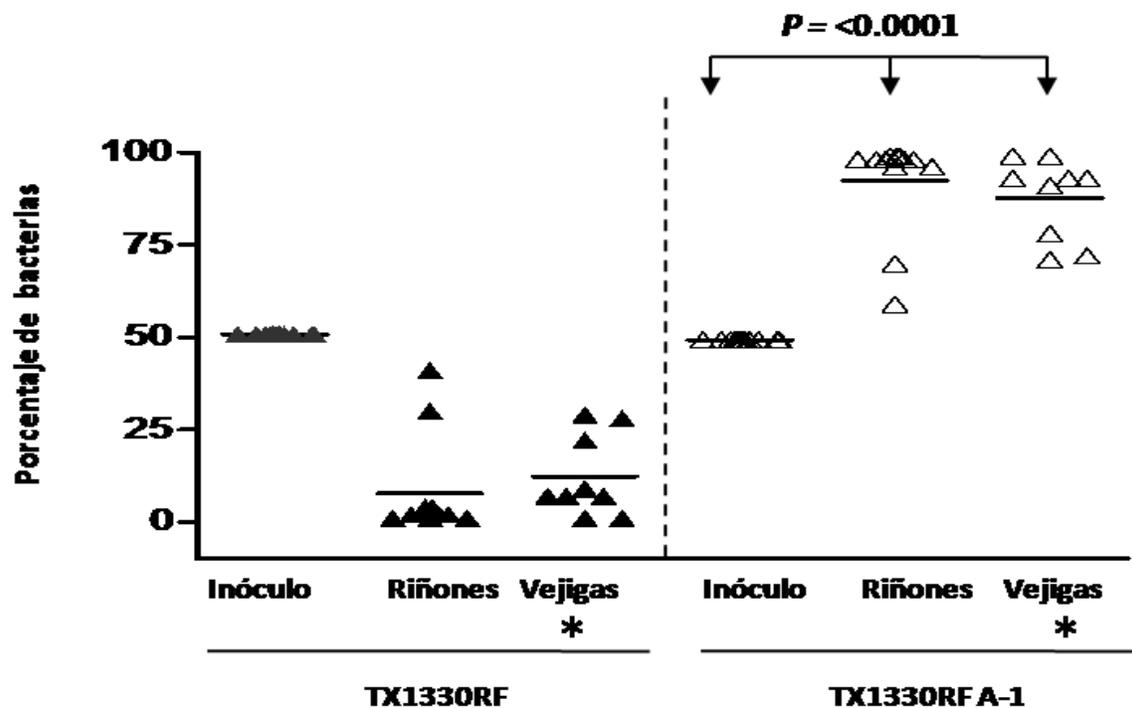


Figura 23. Modelo de infección urinaria mixta (ensayo competitivo). Se observan los resultados expresados en porcentaje de 12 ratones evaluados a partir del inóculo similar para las dos cepas (6.6×10^7 CFU/ml para TX1330RF y 6.4×10^7 CFU/ml para TX1330RF A-1) con el cual se infectaron los animales. Este inóculo está representado por las barras horizontales el cual se expresa en porcentaje de bacterias. Las colonias recuperadas de la infección mixta provenientes de los riñones y las vejigas se evaluaron por hibridación empleando la sonda *hyl_{Efm}* para diferenciar las cepas que presentaban el plásmido y con la sonda dirigida al gen *ddl* ligasa para confirmar la presencia de la especie de *E. faecium*. Los triángulos negros corresponden a la cepa TX1330RF y los blancos a la cepa TX1330RF A-1 (plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*). Los análisis estadísticos se realizaron empleando la prueba t- de student pareada

13.3.2 Modelo de mono-infección

En la prueba de mono-infección se compararon las mismas cepas (TX1330RF y TX1330RF A-1) pero en dos experimentos realizados independientemente. En cada ensayo se estudiaron de 5 a 6 ratones por inóculo, empleando 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/ml los cuales fueron infectados con cada cepa por separado y la información obtenida de los dos experimentos se combinó para posteriores análisis (Figura 24).

En este experimento se comparó, el número de colonias obtenidas (expresado como el \log_{10} de las UFC/gr de los órganos) de la cepa TX1330RF y TX1330RF A-1 provenientes de los riñones y la vejiga de los animales infectados. Los resultados provenientes del conteo de colonias de las bacterias recuperadas se evaluaron empleando la prueba t- de student unipareada.

Los resultados mostraron una tendencia hacia mejor colonización de los riñones por la cepa TX1330RF A-1 (con el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*) lo cual se observó en todos los inóculos evaluados con un máximo de diferencia de $1.4 \pm 0.7 \log_{10}$ UFC/gr en la colonización en el inóculo más bajo (10^5 UFC/ml); sin embargo, estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística ($P=0.053$) por la prueba de t-de student unipareada. En los dos inóculos más altos (10^7 UFC/ml y 10^6 UFC/ml) se detectaron pequeñas diferencias en la media UFC/ml en la cepa TX1330RF A-1 de $0.5 \pm 0.4 \log_{10}$ para el inóculo de 10^7 UFC/ml ($P= 0.2376$) y $0.4 \pm 0.8 \log_{10}$ para 10^6 UFC/ml comparada con TX1330RF ($P=0.5588$), resultados que sugieren una ligera predilección por parte de la

cepa TX1330RF A-1 hacia una mejor colonización de los riñones, sin embargo no alcanzaron una significancia por la prueba t- de student (Figura 24).

Figura 24.

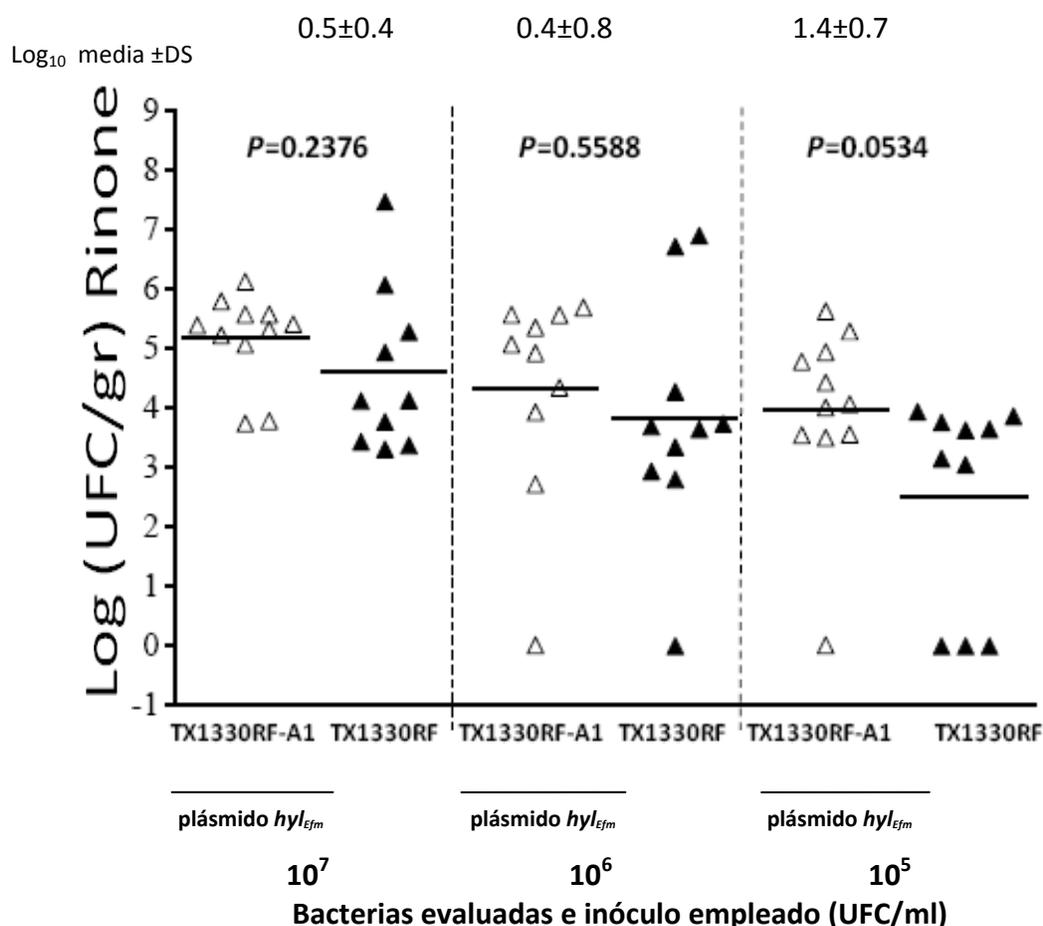


Figura 24. Resultados del modelo de infección urinaria (mono-infección). Se presentan tres inóculos empleados (10^5 UFC/ml, 10^6 UFC/ml, 10^7 UFC/ml) usando las cepas TX1330RF y TX1330RF A-1 (plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*). Los resultados provienen de dos diferentes experimentos en los cuales los datos obtenidos fueron combinados y se expresaron en Log₁₀ de UFC por gramo de tejido (riñón) de las cepas TX1330RF indicada por los triángulos negros y TX1330RF A-1 por los triángulos blancos. Las barras horizontales representan la media geométrica. También se presenta el promedio de la SD expresada en Log₁₀ de los recuentos de UFC dada para cada inóculo.

14. DISCUSIÓN CAPÍTULO II

La región *hyl_{Efm}* está formada por un grupo de genes que presentan una organización bien definida, la cual está delimitada por secuencias de inserción (IS1476) en los extremos 5' y 3' de la región *hyl_{Efm}* (Figura 1). En el extremo 5' se encuentran dos genes con homología para un sistema regulatorio de dos componentes, el cual es ampliamente disseminado en bacterias y podría estar implicado en regulación de la región *hyl_{Efm}*. Corriente abajo de estos genes se localizan cuatro genes con homología para proteínas transportadoras de carbohidratos, tres genes pertenecientes a la familia de glicosil hidrolasas (*gh20*, *gh42*, *gh84 (hyl_{Efm})*), un gen sin función descrita hasta la fecha (*hip*) y un gen que codifica para una GMP sintetasa (Figura 1). El análisis de la secuencia y alineamiento de Hyl_{Efm} con otras proteínas sugieren que esta posee actividad de glicosil hidrolasa (GH84) y no de hialuronidasa. Es así como Hyl_{Efm} presenta homología con Spy1600 de *S. pyogenes* compartiendo una identidad del 43.3 % a nivel de aminoácidos y una similaridad de 73%. Así mismo estudios *in silico* han mostrado que esta proteína no tiene péptido señal por lo tanto no parece ser secretada y los estudios bioquímicos han indicado que Spy1600 tiene actividad de β -N-acetylglucosaminidasa y no de hialuronidasa (349). La organización genética de la región *hyl_{Efm}* del *E. faecium* presenta similitudes con la encontrada en la cepa de *S. pyogenes*; el gen *spy1600*, se encuentra adyacente al represor transcripcional del operón arabinosa (*spy1602*) y probablemente se co-expresa con este regulador transcripcional putativo. Adicionalmente, en esta región se

encuentran otros genes que codifican para glicosidasas, incluyendo una β -glicosidasa putativa un marco de lectura abierto (ORF) *spy1599*, una α -manosidasa putativa y un ORF (*spy1604*); también se identifican genes implicados en unión y transporte de carbohidratos como son *spy1593* y *spy1595* (Figura 25).

Figura 25.

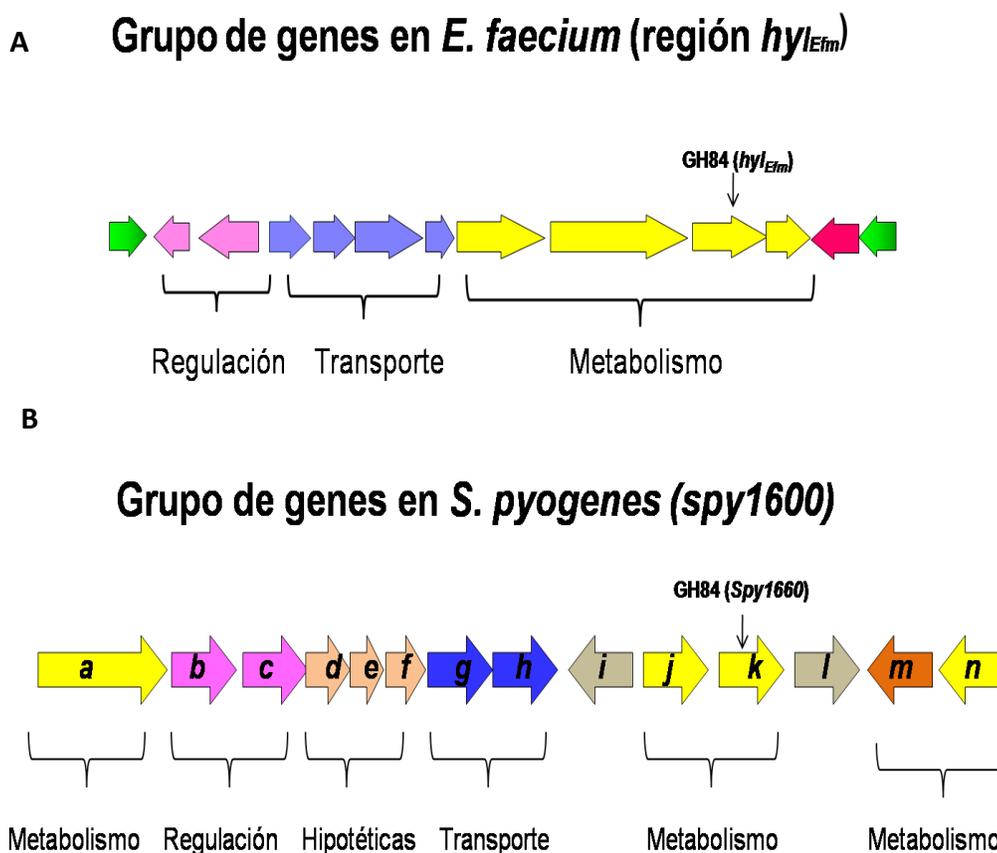


Figura 25. Grupo de genes en *E. faecium* y en *S. pyogenes*. Panel A: esquema de la región *hyl_{Efm}* previamente descrito en el documento. **Panel B:** grupo de genes adyacentes al gen *spy1600* en *S. pyogenes*. Los genes se denominan en este texto con letras las cuales corresponden al alfabeto de la a la n. Los genes que codifican para funciones putativas metabólicas son: *a* (β -galactosidasa), *j* (β -glucosidase), *k* (glicosil hidrolasa familia 84, *Spy1600*) y *n* (manosidasa); Los genes con funciones putativas de proteínas transporte: *g* (*Spy1595*) y *h* (*Spy1593*); Los genes que codifican para reguladores transcripcionales *i* (*Spy1602*) y *j* (*Spy1596*); Los genes que codifican para un sistema putativo regulatorio de dos componentes *b* (regulador de respuesta, *Spy1588*) y *c* (histidina quinasa, *Spy1587*); Los genes que codifican para proteínas hipotéticas *d* (*Spy1589*), *e* (*Spy1591*) y *f* (*Spy1592*).

Se ha demostrado que el *S. pyogenes* regula la expresión de genes de una forma diferencial cuando interacciona con los PMN en el proceso de fagocitosis, detectándose específicamente que los genes implicados en virulencia, estrés oxidativo, producción del peptidoglicano y regulación genética estaban sobre regulados durante la fagocitosis (361). Dentro de los genes de virulencia, se demostró que la proteína Spy1600 se sobre expresaba a los 180 minutos junto con otras 11 proteínas en *S. pyogenes*, resultados que son importantes pues sugieren que la evasión de la fagocitosis por este microorganismo está regulada a nivel de la transcripción genética (361).

A nivel de *E. faecium*, un estudio previo evaluó 26 cepas las cuales fueron examinadas por un ensayo de fagocitosis encontrando 50% de resistencia a la actividad fagocítica de los PMN (dentro de ellas se encontraba la cepa TX0016 portadora del plásmido *hyl_{Efm}*) en contraste con 20 cepas de *E. faecalis* que también fueron evaluadas, las cuales fueron susceptibles a la fagocitosis en presencia de suero humano normal (250). Por lo tanto, el gen *spy1600* y el gen *hyl_{Efm}* presentan una gran variedad de elementos en común con lo cual se podría sugerir que *hyl_{Efm}* o los genes localizados en la misma región *hyl_{Efm}*, podrían interferir con la función de los PMN *in vivo*.

Dentro de los factores de patogénesis en *E. faecium* solo *acm* (codifica para una adhesina de unión a colágeno) ha mostrado tener un papel importante *in vivo*, cuando se ha evaluado en el modelos experimentales de endocarditis en rata (21). Sin embargo, cuando su papel fue evaluado en el modelo de peritonitis en ratón no se detectó incremento en la virulencia de este microorganismo. Estos resultados sugieren, la

importancia biológica de la presencia de una adhesina como *acm* para la producción de endocarditis y la escasa relevancia de este gen para la producción de infección peritoneal (21). Es interesante anotar, que ni el gen *acm* ni el gen *esp_{Efm}* han presentado una función relevante en el modelo de peritonitis.

En este trabajo se muestra que la adquisición del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* (proveniente de la cepa de origen clínico C68) en la cepa de laboratorio D344SRF incrementa la virulencia en el modelo de peritonitis en ratón, resultados que se evidencian empleando tres diferentes inóculos. Sin embargo, se observó un crecimiento deficiente de la cepa de *E. faecium* D344SRF C-6 (derivada de D344SRF, es una cepa de laboratorio que ha perdido espontáneamente el gen *pbp5*) lo cual no permite generar conclusiones definitivas. Por ello, se evaluaron cepas adicionales que permitieran continuar con los estudios de virulencia en *E. faecium*, se escogió como donadora la cepa que presentaba el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* *E. faecium* TX0016, también conocida como *E. faecium* DO (250). Esta cepa fue recuperada de un paciente con endocarditis, pertenece al CC17 (ST16), su genoma ha sido secuenciado y parcialmente anotado. Adicionalmente, se escogió una cepa comensal (TX1330) que sirviera como receptora para todos los experimentos de conjugación, que fuera fácilmente transformable para lograr manipulación genética y susceptible a diversos antibióticos. Esta cepa se denominó TX1330RF y sus características han sido ampliamente descritas en este documento (Tabla 1) (ver metodología 8.1.1).

Con la nueva transconjugante obtenida (TX1330RF A-1) portadora del plásmido *hyl_{Efm}* se realizó la evaluación en el modelo de peritonitis en ratón comparando con la cepa receptora TX1330RF. Se encontró, que la adquisición de este plásmido incrementó significativamente la letalidad comparada con la cepa parental TX1330RF cuando se utilizaron inóculos similares (Figura 21). Se confirma entonces, que el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* juega un papel en virulencia en el modelo de peritonitis en ratón, siendo el primer factor que en *E. faecium* que presenta una función importante en este modelo. De la misma manera, estudios de Rice y colaboradores han demostrado que cepas transconjugantes que presentan el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* incrementan la capacidad del *E. faecium* para colonizar mejor el TGI de ratones, efecto que no parece estar relacionado con la expresión de genes de resistencia (23). Estos hallazgos son importantes debido a que representan la primera confirmación que otros factores independientes a los determinantes de resistencia, están asociados con la colonización del tracto gastrointestinal y por lo tanto pueden facilitar la invasión de la mucosa gástrica y contribuir a la degradación de carbohidratos que puedan servir como fuente de energía para el enterococo. De esta manera, el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* se convierte en una estructura importante, transferible entre cepas de *E. faecium* y capaz de intervenir tanto en procesos de colonización gastrointestinal (23) como de infección peritoneal.

Posteriormente, estas cepas fueron también evaluadas en el modelo murino de infección urinaria, debido a la relevancia que presentan los enterococos como agentes productores de infecciones del tracto genitourinario (86). Se determinó que la adquisición del

plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente de la cepa *E. faecium* TX0016 (Cepa A), aumenta la habilidad de la cepa TX1330RF para colonizar el uro-epitelio del ratón característica que fue prominente en el modelo experimental de infección mixta. Este modelo competitivo presenta mayores ventajas sobre el de mono-infección debido a que en un solo animal se evalúan las dos cepas de interés al mismo tiempo, eliminando de esta manera posibles variaciones propias del animal que puedan interferir en los resultados cuando se evalúan las dos cepas independientemente (359). Esta estrategia de evaluación de cepas por competencia (modelo de infección mixta) ha sido previamente descrita y se ha demostrado que es exitosa tanto el modelo de infección urinaria para la evaluación del operon (*epa*) en *E. faecalis* (359) como en el estudio del gen *acm* en *E. faecium*, el cual fue evaluado en el modelo de endocarditis en rata (21).

El modelo de infección urinaria ha sido utilizado para evaluar factores de virulencia putativos tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium* (264, 300, 304, 358, 359, 362). Con este tipo de sistemas se han podido establecer interacciones huésped-patógeno que permiten ampliar el conocimiento, acerca de la patogénesis de las infecciones del tracto urinario por estos microorganismos. Es así como Kau y colaboradores han demostrado el tropismo que presentan diferentes cepas de *E. faecalis* de origen urinario por los riñones de ratones C57BL/6J, sugiriendo que la mayoría de cepas de *E. faecalis* presentan un grupo de genes ("core genes") o determinantes de virulencia que son necesarios para causar enfermedad en los riñones. De esta manera, se propone que este modelo es adecuado para el estudio de factores involucrados en la patogénesis de las infecciones del tracto

urinario, sin embargo, las bases moleculares de este tropismo por los riñones aun no han sido claramente elucidadas (354).

Por otra parte, en *E. faecium*, se ha descrito un efecto temporal del gen esp_{Efm} en el modelo de infección urinaria en ratón para ello, se evaluó una mutante del gen esp_{Efm} , y se comparó con la respectiva cepa isogénica utilizando este modelo experimental. La cepa mutante mostró un efecto de atenuación transitorio (en las primeras 48 horas) en comparación con cepa salvaje que expresaba la proteína Esp_{Emf} y adicionalmente se detectaron altos niveles de citoquinas pro-inflamatorias en los animales estudiados (264). Estos resultados sugieren que el gen esp_{Efm} influye en el curso de la infección urinaria de una manera temporal facilitando posteriormente la producción de bacteriemia (264).

En este trabajo presenta evidencia por primera vez que un plásmido (portador del gen hyl_{Efm}) juega un papel importante en la patogénesis de *E. faecium*, indicando que la adquisición del mismo proveniente de *E. faecium* A (TX0016) aumenta la habilidad de colonizar el uroepitelio de ratones, característica que fue estadísticamente significativa en el modelo de infección urinaria por competencia (mixto) el cual ha demostrado gran utilidad puesto que permite controlar las diferencias propias de cada animal. Por lo tanto, estos resultados soportan las observaciones previas (21, 23) en las cuales se señala la importancia de los determinantes de virulencia (gen acm) (21) y colonización (gen hyl_{Efm}) (23) encontrados en cepas hospitalarias de *E. faecium* los cuales le permiten a este microorganismo ser capaz de sobrevivir y causar infección de una forma exitosa.

15. CONCLUSIONES CAPÍTULO II

1. El análisis de la secuencia de la proteína Hyl_{Efm} del *E. faecium* TX0016 sugiere que tiene homología con proteínas que pertenecen a la familia 84 de la glicosil hidrolasas (GH84) y especialmente comparte 43.3% de identidad y 73% de similaridad con la proteína Spy 1600 del *S. pyogenes*.
2. La adquisición del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente del *E. faecium* TX0016 por la cepa comensal del *E. faecium* TX1330RF incrementa la virulencia en el modelo de peritonitis en ratón.
3. La adquisición del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente del *E. faecium* TX0016 por la cepa comensal del *E. faecium* TX1330RF incrementa la colonización del uro epitelio de ratones en el modelo de infección urinaria.
4. La adquisición del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente del *E. faecium* C68 por la cepa de laboratorio *E. faecium* D344SRF incrementa la virulencia en el modelo de peritonitis en ratón.

CAPÍTULO III

MUTANTES EN LA REGION *hyl_{Efm}* PRESENTAN UN EFECTO DE ATENUACIÓN EN LA

VIRULENCIA DE *E. faecium*

16. RESULTADOS

16.1 Efecto *in vivo* de la delección de genes en la región *hyl_{Efm}* en *E. faecium*

16.1.1 Construcción de una mutante de 6 genes en la región *hyl_{Efm}* en *E. faecium*

utilizando el sistema PheS*

Los resultados previos mostraron que la adquisición del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* incrementa la virulencia en los modelos experimentales de peritonitis y de infección urinaria, por lo tanto se evaluó la posibilidad que la región *hyl_{Efm}* tuviera un papel en la producción de este efecto. Con el fin de desarrollar este objetivo se necesitaba de la creación de una mutante que permitiera estudiar el papel de esta región a nivel de virulencia y para ello se requería de un sistema de mutagénesis apropiado en *E. faecium*.

Por lo tanto, se modificó el sistema de contra-selección PheS* desarrollado para la creación de mutantes en *E. faecalis* (306) y se adaptó a *E. faecium* (Figura 5). El primer paso consistió en la remoción del gen *ermC* del vector pCJK47 y la clonación del gen *aph2-ID* en este vector, generando un nuevo plásmido denominado pCJK47Gen. Este vector mantiene las características del sistema de contra-selección PheS* y presenta un sitio múltiple de clonaje (MCS), un gen *aph2''-ID* como marcador de resistencia a gentamicina y los genes provenientes del pCJK47 que le confieren las características de contra-selección negativa (*pheS**) (Figura 5 y Figura 6). Posteriormente, una región de 992 bp la

cual presenta el gen de cloranfenicol acetil transferasa (*cat*), se clonó en pCJK47Gen producido previamente, generando de esta manera el nuevo vector pCJK47GenChl (ver metodología 8.2.2.2.1). Este plásmido presenta las características previamente descritas para el PCJK47Gen pero en lugar de un MCS presenta dos MCS en los cuales se clonan las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen o de los genes a deletar. La presencia del gen *cat*, es una herramienta útil en este sistema puesto que permite diferenciar la cepa mutante de la cepa salvaje, característica que es muy adecuada cuando se están comparando cepas en los modelos animales y se requiere de un método de tamizaje para confirmar la presencia de la mutante (Figura 7).

Con este nuevo vector pCJK47GenChl, se creó una mutante del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* por delección de un fragmento de 7,534 bp en la cepa clínica A (TX0016). La estrategia de mutagénesis produjo una delección de tres genes relacionados con la degradación de carbohidratos pertenecientes a la familia glicosil hidrolasa [*gh 20*, *gh 45-2*, *gh 84 (hyl_{Efm})*] y un gen con función desconocida (*hip*). Adicionalmente, se deletaron 226 nucleótidos de un gen que codifica para una proteína transmembranal hipotética localizada corriente arriba del gen que codifica para una GH20 y 202 nucleótidos de un gen que codifica para una GMP-sintetasa (el cual se transcribe en dirección opuesta grupo de genes *hyl_{Efm}* y se localiza corriente abajo del gen con función desconocida (*hip*) (Figura 1). En la Figura 26 se observa el grupo de genes de la región *hyl_{Efm}* en la cepa salvaje (cepa C, TX0016) y la estructura de la región *hyl_{Efm}* deletada la cual presentó un reemplazo alélico con el gen *cat*, la pérdida de cuatro genes completos y dos genes que fueron

delecionados parcialmente con el objetivo de evaluar si la mutante obtenida TX0016/ Δ -región *hyl_{Efm}* presentaba alguna diferencia o si presentaba mejor capacidad de supervivencia (“fitness”) con la cepa salvaje A (TX0016), se realizó una curva de crecimiento determinando la densidad óptica a 600nm del cultivo bacteriano con mediciones cada hora y al mismo tiempo se realizó el recuento de colonias de cada cepa. Como se observa en la Figura 27, la mutante no presentó defecto en el crecimiento cuando se comparó con la respectiva cepa isogénica TX0016.

Adicionalmente, estas dos cepas fueron evaluadas por PFGE-SmaI (Figura 28, panel A), como se observa en la figura la mutante TX0016/ Δ -región *hyl_{Efm}* presentó un ligero cambio en el patrón de electroforesis con la pérdida de una banda localizada en un rango entre 194 y 242.5 kb por la pérdida de un sitio de restricción (SmaI). Las hibridaciones con la sonda del gen *hyl_{Efm}* fueron positivas para la cepa isogénica A (TX0016) y negativa para la mutante (TX0016/ Δ -región *hyl_{Efm}*) (Figura 28); con la sonda correspondiente al gen *cat*, fueron positivas para la mutante y negativa para la cepa isogénica A (TX0016) (Figura 28).

Figura 26.

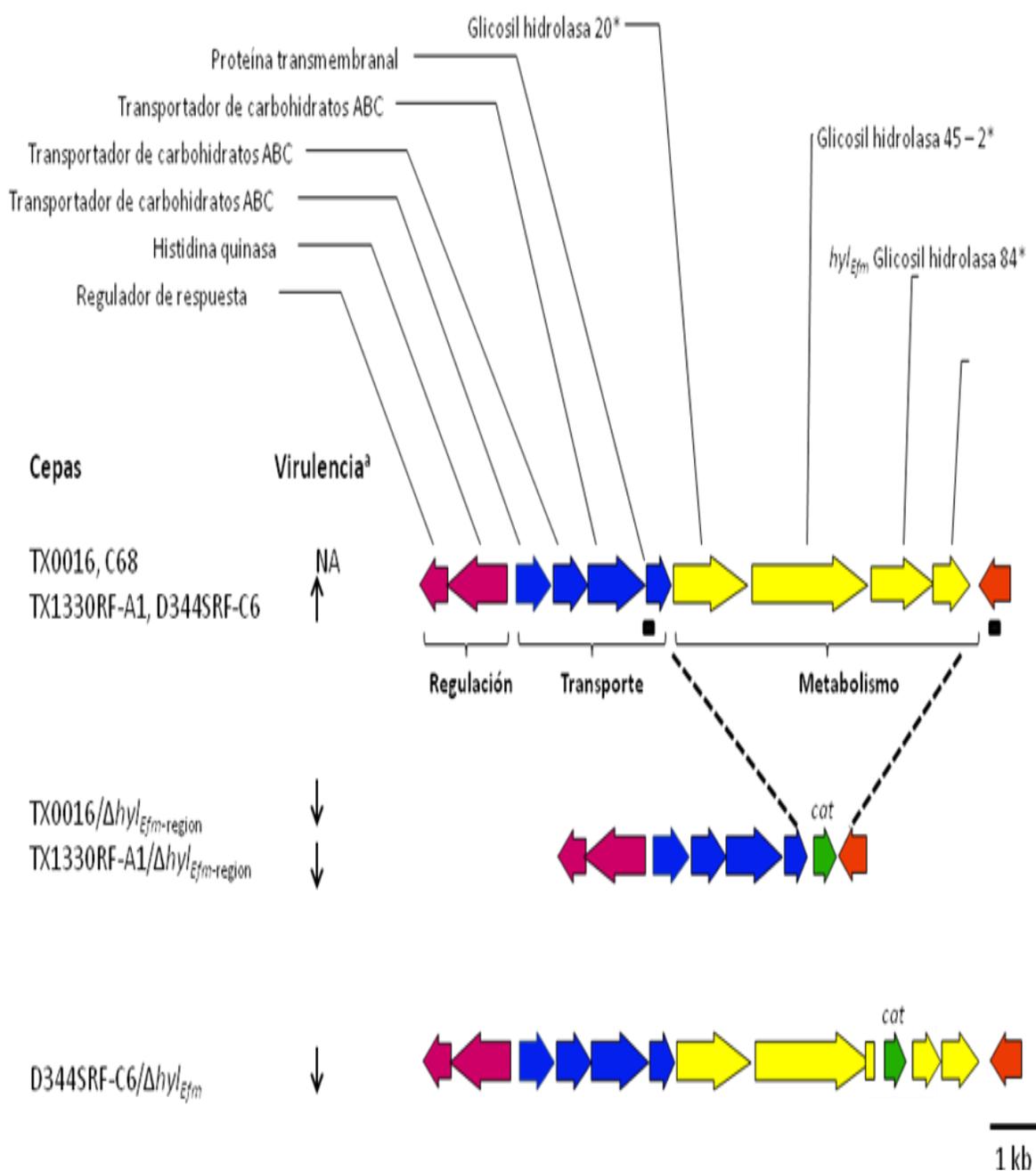
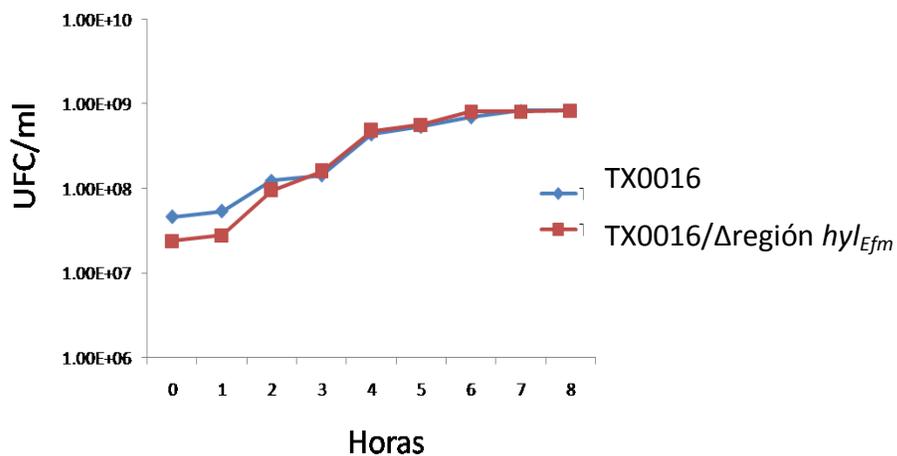


Figura 26. Mapa físico de la región hyl_{Efm} en diferentes cepas de *E. faecium* y sus respectivas mutantes. La función putativa de los genes se observa en la parte superior. Los genes se dividen en tres grupos (implicados en metabolismo, transporte y regulación) basados en las funciones putativas. Nomenclatura: * familia de glicosil hidrolasa, a Indica: aumento de la virulencia (\uparrow) o atenuación (\downarrow) en el modelo de peritonitis en ratón. La adquisición del plásmido hyl_{Efm} por la cepa TX1330RF (TX1330RF-A1) también presentó aumento en la colonización del uro-epitelio de ratones.

Figura 27.

A



B

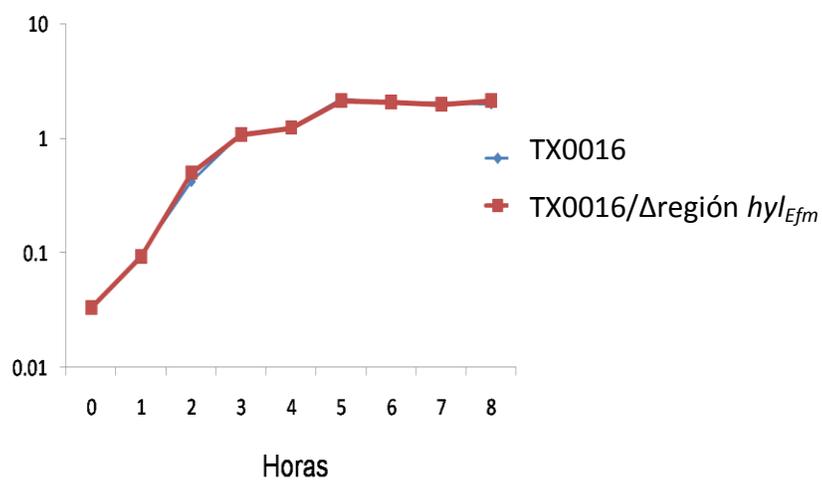


Figura 27. Curva de crecimiento de las cepas A (TX0016) y TX0016/Δ-región *hylEfm*. Se observa la curva de crecimiento en UFC/ml en el panel A y en el panel B en densidad óptica. Las curvas fueron realizadas en caldo BHI, las densidades ópticas y los recuentos de colonias se realizaron cada hora hasta ocho horas.

Figura 28.

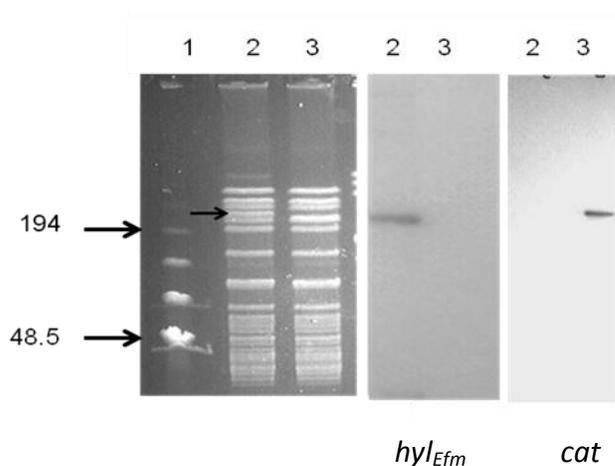


Figura 28. Perfil electroforético realizado por PFGE de las cepas de *E. faecium* y las respectivas mutantes digeridas con la enzima *Sma*I e hibridizadas con el gen *hylEfm* y el gen *cat* Panel A, 1. Marcador de peso molecular (λ); 2. *E. faecium* cepa A (TX0016); 3. *E. faecium* TX0016/ Δ -región *hylEfm*. En el panel A se indica con una flecha la banda donde se encuentra el plásmido (TX0016) y en la hibridización con la sonda *hylEfm* se detecta la señal correspondiente a la cepa A (TX0016) y la mutante presenta la pérdida de una banda y la hibridización es negativa. La hibridización con *cat* es positiva para la mutante y negativa para la cepa A (TX0016).

16.1.2 Evaluación de la mutante obtenida por el método PheS* empleando el modelo de peritonitis en ratón

Posteriormente, la mutante de seis genes (TX0016/ Δ -región *hylEfm*) y la cepa isogénica A (TX0016) fueron evaluadas en el modelo de peritonitis en ratón, siguiendo la misma metodología previamente descrita utilizando las curvas de supervivencia de Kaplan Meier. Los resultados obtenidos de la infección intra-peritoneal con las dos cepas empleando el inóculo 3×10^9 UFC/ml para la cepa A (TX0016) y 4×10^9 UFC/ml para la mutante (TX0016/ Δ -región *hylEfm*) no mostraron diferencia en la disminución de la mortalidad de la mutante comparada con la cepa salvaje, resultados similares se encontraron con tres inóculos adicionales evaluados (Figura 29 panel A,B, C, D) hallazgos

que indicaron que la mutación de 7,535 bp no tuvo ningún efecto *in vivo* en la cepa A (TX0016) de origen clínico.

Debido a los resultados previamente encontrados en las cepas derivadas de *E. faecium* cepa A (TX0016), se planteó la posibilidad de evaluar el efecto de esta mutación en otra cepa que no fuera de origen clínico. Por ello, se escogió la cepa *E. faecium* TX1330RF, la cual proviene de un paciente sano y no presenta resistencia a la mayoría de antibióticos de uso clínico, lo que hace su manipulación en el laboratorio muy apropiada. Adicionalmente, al ser una cepa comensal la cual no ha sido expuesta a ambientes hospitalarios (la presencia de un gran número de determinantes de virulencia es menos probable) la interpretación del efecto de la mutación en un gen implicado en patogenicidad es más fácil de identificar.

De esta manera, el plásmido mutado (producido por reemplazo alélico con el gen *cat*) proveniente de la cepa TX0016/ Δ -región *hyl_{Efm}*, se transfirió por conjugación *in vitro* a la cepa TX1330RF, obteniéndose la mutante TX1330RF A-1/ Δ -región *hyl_{Efm}*). Esta mutante fue posteriormente caracterizada por PFGE-Smal e hibridización con una sonda dirigida al gen *hyl_{Efm}* y al gen *cat* (Figura 30, línea 4). Adicionalmente, el resultado de la hibridización con la sonda *hyl_{Efm}* mostró la ausencia de señal tanto en la cepa TX1330RF que no presenta el plásmido *hyl_{Efm}* como en la cepa mutante TX1330RF-A1-/ Δ -región *hyl_{Efm}* (Figura 29, línea 2 y 4) y la presencia de señal en la banda correspondiente a la localización del plásmido en la cepa transconjugante TX1330RF A-1 (Figura 30, línea 3).

Figura 29.

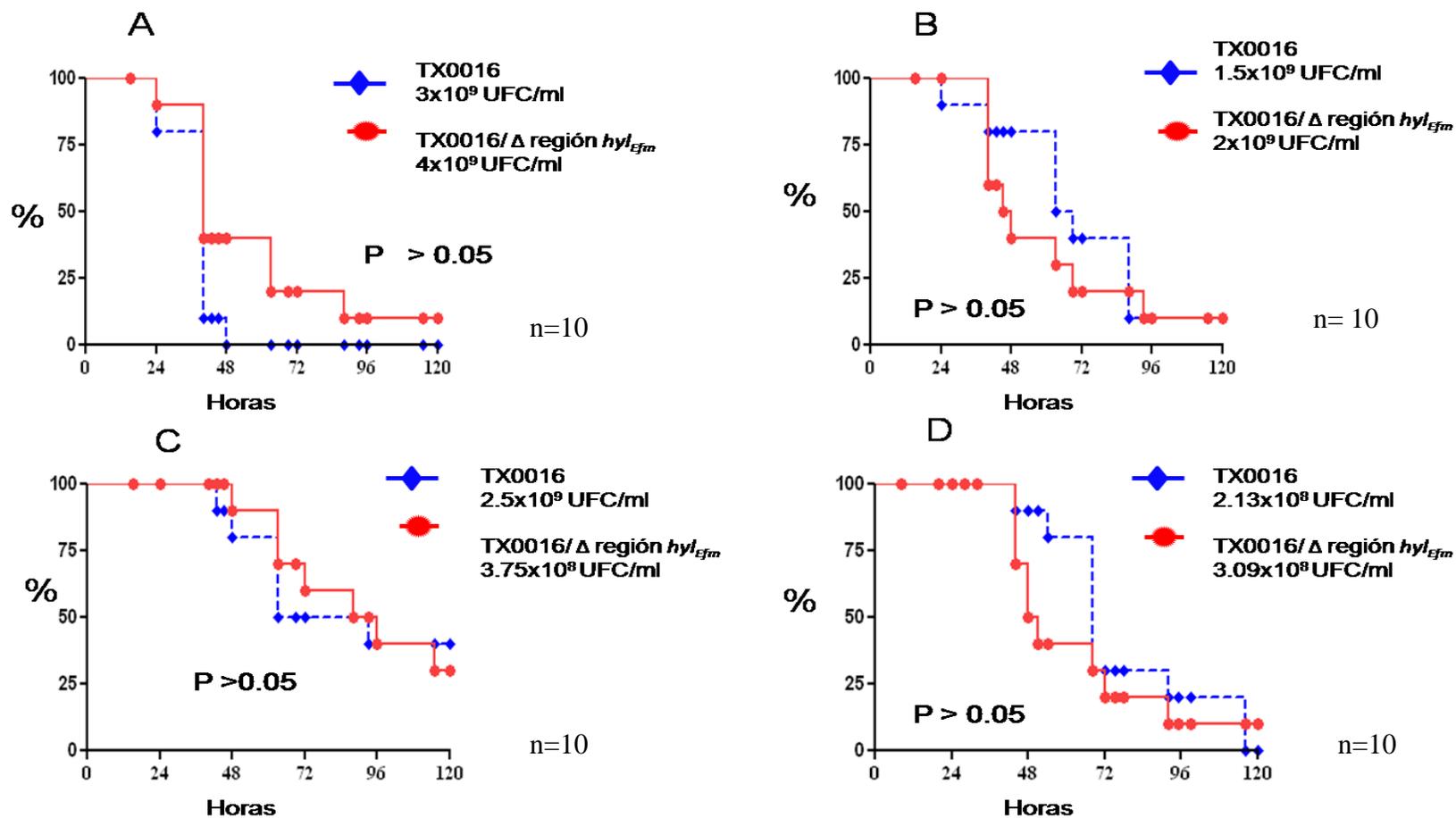


Figura 29. Curvas de supervivencia en el modelo experimental de peritonitis de ratón de la cepa A (TX0016) y la mutante isogénica TX0016/ Δ región *hyl_{Efm}*. En el panel A, B, C y D se observa que en los ensayos realizados y con diferentes rangos de inóculos, la mutante TX0016/ Δ región *hyl_{Efm}* no presentó diferencia en la mortalidad, comparada con la cepa salvaje en ninguno de los inóculos evaluados. Los resultados presentados en estas figuras corresponden a cuatro experimentos independientes. En el eje de la Y se presenta el porcentaje de supervivencia y en el de las X el tiempo de evaluación de los animales (horas).

Figura 30.

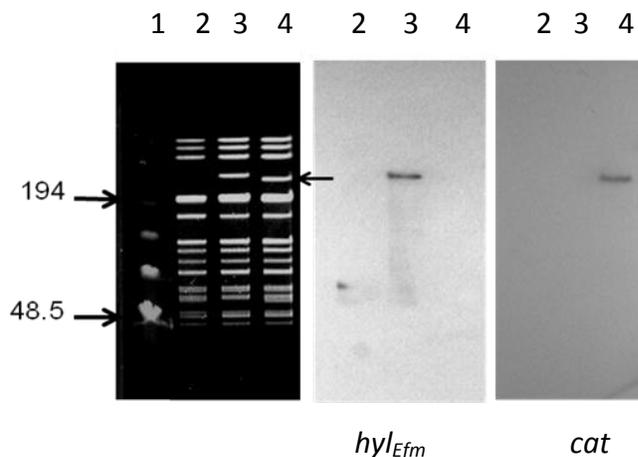


Figura 30. Caracterización de la cepa TX1330RF A-1/Δ región *hyl_{Efm}* por PFGE-Smal e hibridaciones con las sondas *hyl_{Efm}* y *cat*. 1. Marcador de peso molecular lambda; 2. *E. faecium* TX1330RF; 3. TX1330RF A-1; 4. TX1330RF A-1/Δ-región *hyl_{Efm}*. No se detecta señal en la hibridación en la mutante pero si en la TX1330RF A-1 cuando se hibridiza con la sonda *hyl_{Efm}*. La hibridación con el gen *cat* es positiva para la mutante y negativa para las derivativas de TX1330RF.

La hibridación con la sonda *cat* fue positiva para la mutante (Figura 30, línea 4) esta cepa presenta la deleción, y fue negativa para las cepas derivativas del TX1330RF y TX1330RF-A1 (Figura 30, línea 2 y 3). Adicionalmente, la mutante TX1330RF-A1-/Δ-región *hyl_{Efm}* fue evaluada por la metodología de PFGE-S1, demostrando que solo el plásmido mutado fue transferido a esta cepa. También, se realizó curva de crecimiento de esta cepa mutante en paralelo con la cepa isogénica TX1330RF A-1 (Figura 31 panel A y B). Los resultados obtenidos de la medición por densidad óptica como de los recuento de colonias mostraron un ligero defecto de crecimiento en la mutante TX1330RF-A1-/Δ-región *hyl_{Efm}*, comparada con la cepa TX1330RF A-1 (plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*) (Figura 31 panel A y B).

Figura 31.

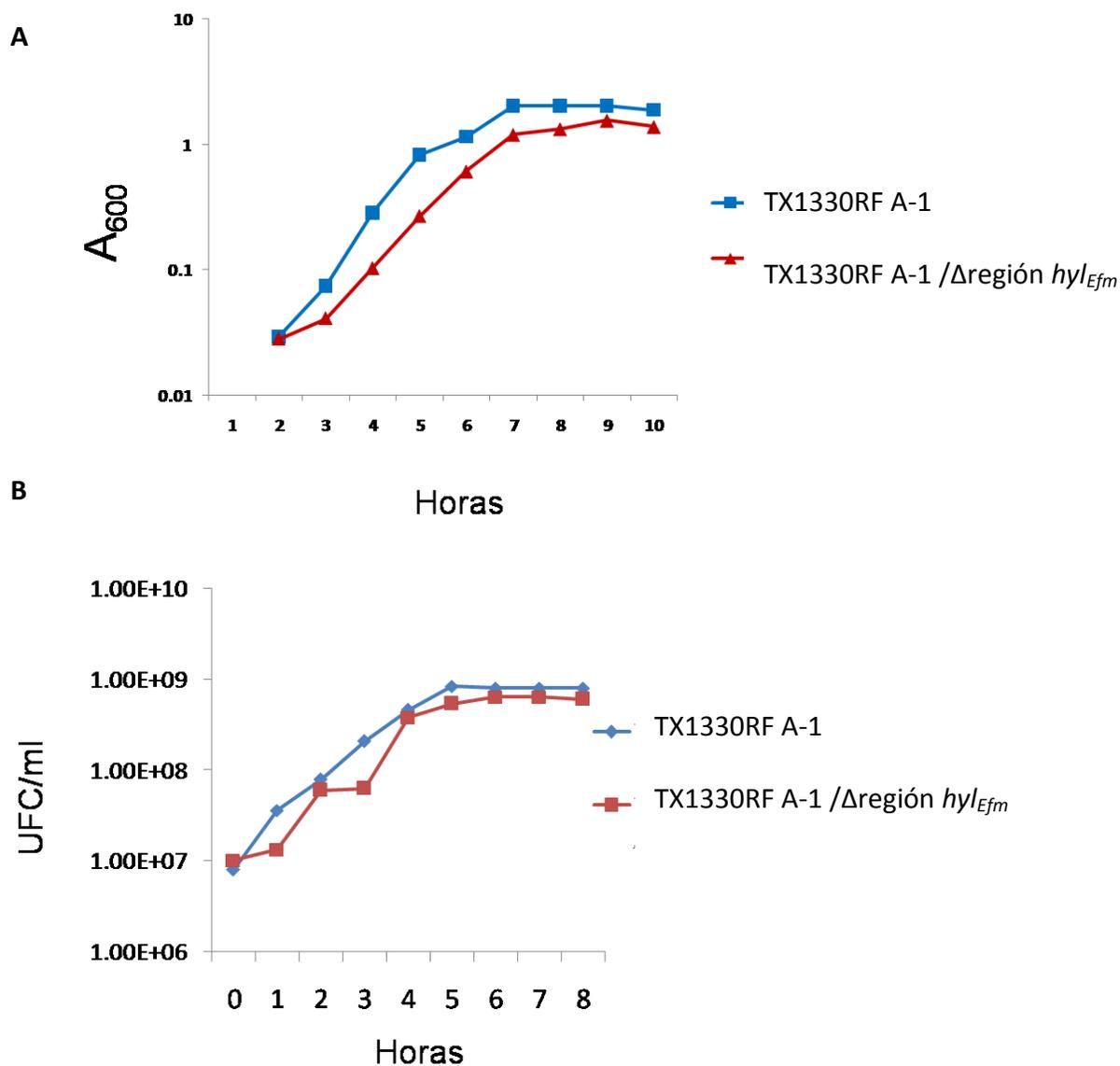


Figura 31. Curva de crecimiento de las cepas TX1330RF A-1 y TX1330RF A-1/ Δ región hyl_{Efm} . **Panel A.** Grafica de la curva de crecimiento en densidad óptica (A_{600nm}). **Panel B.** Recuentos bacterianos expresados en UFC/ml. Las curvas fueron realizadas en caldo BHI, las densidades ópticas y los recuentos de colonias se realizaron cada 60 minutos por 8 horas.

Posteriormente, la cepa mutante TX1330RF A-1 / Δ región hyl_{Efm} y la cepa TX1330RF A-1 se evaluaron en el modelo de peritonitis en ratón utilizando las condiciones previamente definidas. La mutante presentó disminución de la letalidad de una forma estadística-

mente significativa ($P=0.0416$) comparada con la cepa TX1330RF A-1 (Figura 32, panel B). Así mismo, cuando se utilizó diferentes inóculos se detectó también atenuación de la mutante de la misma forma significativa ($P= 0.032$) (Figura 31, panel A). De esta manera, los resultados obtenidos muestran que la delección correspondiente a 7,534 bp de la región *hyl_{Efm}*, podría atenuar la virulencia en las cepas derivadas del *E. faecium* TX1330RF en el modelo experimental de peritonitis.

Figura 32.

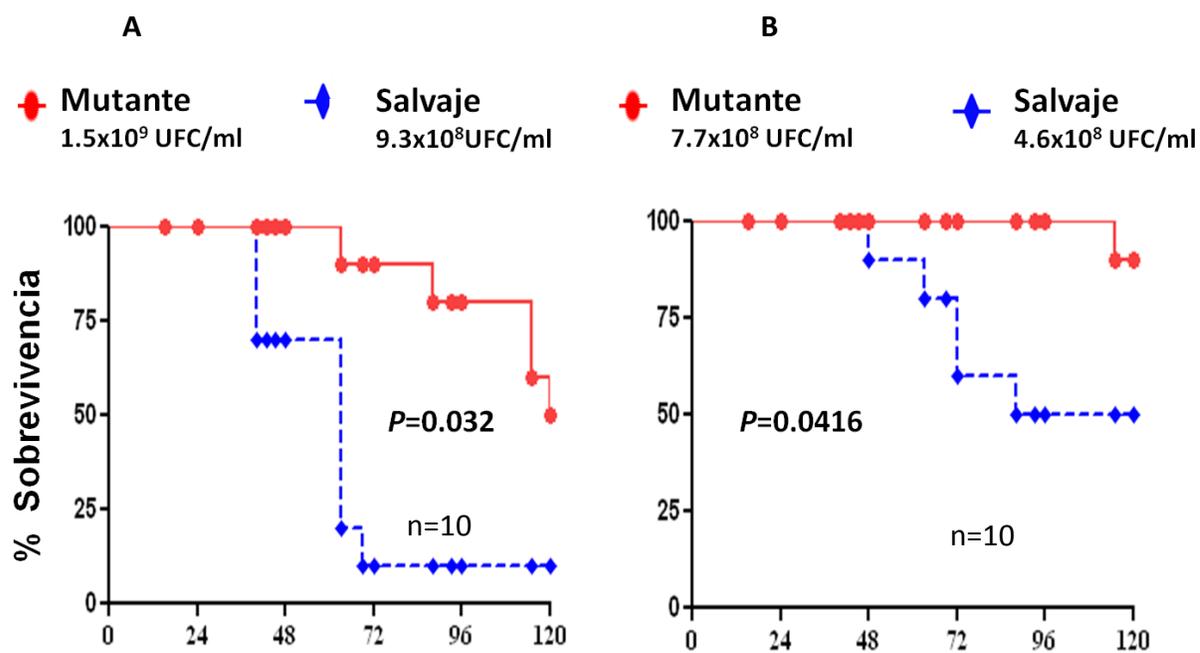


Figura 32. Curvas de sobrevivencia en el modelo experimental de peritonitis de ratón de las cepas derivadas de TX1330RF. Se presentan resultados de dos ensayos realizados con diferentes inóculos en experimentos independientes. La mutante TX1330RF A1/ Δ región *hyl_{Efm}* presentó atenuación de una comparada con la cepa salvaje TX1330RF A-1, con una $P=0.032$ para la curva de sobrevivencia del panel A y 0.0416 para la curva de sobrevivencia del panel B. En el eje de las Y se grafica el porcentaje de sobrevivencia de los animales y en el eje de las X el tiempo durante el cual se evaluaron.

Adicionalmente, las colonias provenientes del bazo de cinco ratones que fueron sacrificados en diferentes ensayos se cultivaron en agar BEA (para la confirmación de la presencia de enterococos), BHI suplementado con rifampicina y ácido fusídico (para la detección de cepas derivativas del TX1330RF); luego estas colonias se evaluaron por PFGE-Smal para determinar su fenotipo y su isogeneidad respectivamente. Posteriormente, se seleccionaron diez colonias se les realizó PFGE-Smal y se observó que todas ellas presentaron el mismo pulsotipo comparado con la cepa parental, indicando de esta forma que las colonias eran estables y no mostraban ningún tipo de re-arreglo genético evidenciado por PFGE posterior a su pase *in vivo* por el ratón.

16.1.3 Evaluación *in vivo* de las mutantes del gen *hyl_{Efm}* empleando el modelo de infección urinaria en ratón.

Experimentos previos mostraron que la cepa comensal *E. faecium* TX1330RF que adquiere el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* produce una mejor colonización del uro-epitelio comparada con la cepa TX1330RF que no presenta este plásmido en el modelo de infección urinaria en ratón. Por lo tanto, era relevante evaluar si la región *hyl_{Efm}* era un importante mediador de este efecto en el modelo experimental en ratón.

Con este objetivo se adaptó el sistema PheS* desarrollado previamente en *E. faecalis* y se obtuvo una mutante de seis genes en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*. Posteriormente, esta mutante (TX1330RF-A1- Δ -región *hyl_{Efm}*) y su respectiva cepa isogénica TX1330RF A-1 fueron evaluadas en el modelo de infección urinaria mixta. En la Figura 33 se observan los resultados de la infección mixta de los ratones con las dos cepas

descritas previamente. Los animales se infectaron vía intra-uretral con una solución bacteriana de cada cepa la cual presentaba un inóculo entre $1.6-1.3 \times 10^8$ para TX1330RF-A1 y $1.2-1.18 \times 10^8$ para TX1330RF-A1/ Δhyl_{Efm} -región) se mantuvieron en evaluación por 48 horas y posteriormente fueron sacrificados para recuperar los riñones y la vejiga. Estos órganos fueron pesados, resuspendidos, macerados con solución salina y diluidos para recuperar colonias las cuales posteriormente fueron evaluadas por hibridización. Los resultados provenientes de la hibridización con las sondas *ddl* (confirmación de especie de *E. faecium*), *hyl_{Efm}* (presencia del plásmido) y *cat* (confirmación de la cepa mutante) se expresaron en porcentaje de bacterias recuperadas a partir de los órganos evaluados (riñón y vejiga). Los datos obtenidos provenientes de dos experimentos independientes en los cuales se estudiaron un total de 26 animales, se combinaron para su análisis y el nivel mínimo de detección fue de 10 UFC/ gr de tejido evaluado. Se recuperaron colonias a partir de todos los animales infectados; en los riñones se determinó que la cepa TX1330RF A-1 presentó una capacidad de colonización mejor que la detectada en la mutante con resultados que fueron altamente significativos $P < 0.0001$; se recuperaron colonias a partir de 17 vejigas provenientes de los animales infectados y en este órgano se encontró, una marcada colonización por parte de la cepa TX1330RF A-1 mientras que la mutante mostró una colonización muy baja, resultados que también fueron estadísticamente significativos $P < 0.001$. Tomando en conjunto estos hallazgos, sugieren que la delección de 7,535 bp en la región *hyl_{Efm}* generada en la cepa TX1330RF A-1

producen una disminución en la habilidad de colonización del tejido uro-epitelial en el modelo experimental murino (Figura 33).

Figura 33.

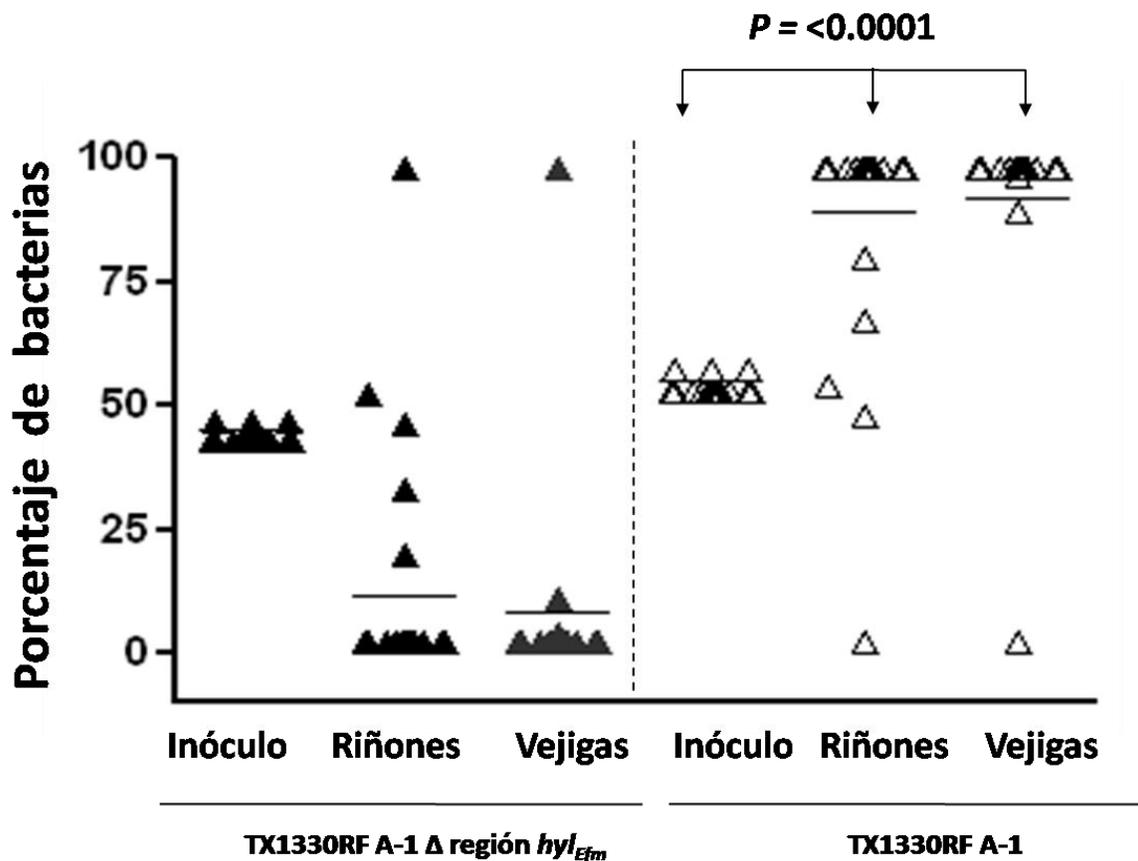


Figura 33. Infección mixta de la cepa salvaje de *E. faecium* TX1330RF A-1 (portadora del plásmido) comparada con la mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hylEfm*. Se evaluaron colonias provenientes de la infección mixta con un inóculo entre $1.6-1.3 \times 10^8$ para TX1330RF-A1 y $1.2-1.18 \times 10^8$ para TX1330RF-A1/ Δ *hylEfm*-región) las cuales fueron recuperadas tanto de riñones como de la vejiga de los ratones estudiados. Los triángulos blancos representan la cepa salvaje de *E. faecium* TX1330RF A-1 y los triángulos negros la cepa mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hylEfm*, las barras horizontales simbolizan la media geométrica y los datos se expresan en porcentaje de bacterias obtenidas proveniente de los órganos evaluados.

16.1.4 La interrupción del gen *hyl_{Efm}* produce atenuación de la virulencia en la cepa de laboratorio D334SRF que presenta el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*.

Los resultados previos mostraron que la delección de una región *hyl_{Efm}* en la cepa *E. faecium* TX1330RF A-1/ Δ *hyl_{Efm}*-región reduce la virulencia en el modelo de peritonitis murino y presentó menor capacidad de colonización en el modelo de infección urinaria en ratón, al compararse con la cepa portadora del plásmido intacto (TX1330RF A-1). Por lo tanto, se buscó evaluar si una interrupción del gen *hyl_{Efm}* generaba algún efecto en la atenuación de la virulencia en el modelo de peritonitis en ratón. Para ello, se utilizó una cepa de laboratorio (*E. faecium* D344SRF), que es ampliamente estudiada en ensayos de colonización gastrointestinal y la cual adquirió el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* a partir de la cepa donadora C (C68) (23). A partir de esta cepa transconjugante D344SRF C-6, se creó una mutante por interrupción del gen *hyl_{Efm}* en una cepa de laboratorio que permitiera hacer comparaciones con las cepas isogénicas obtenidas.

Esta mutante obtenida por el grupo del Dr Rice presenta una delección de 296 nucleótidos del gen *hyl_{Efm}* y un reemplazo alélico con el gen *cat*, la cual probablemente produce un efecto polar sobre el gen corriente abajo (*hip*) (Figura 34, panel A). La evaluación por PFGE-SmaI de esta mutante, mostró similitud en el perfil electroforético con la correspondiente cepa de *E. faecium* D344SRF C-6 (Figura 34, panel B) con la adquisición de una banda adicional entre 242.5 y 291 kb y la pérdida de una banda entre 194 y 242.5 kb, resultados que sugieren la pérdida de un sitio de restricción (SmaI) en la secuencia del DNA plasmídico por la introducción del vector de mutagénesis pTEX5501-TS-Mob+.

Adicionalmente, en la curva de crecimiento se evidenció que la mutante (D344SRF C-6/ Δhyl_{Efm}) posee un crecimiento ligeramente mejor comparado con la cepa D344SRF C-6 (*hyl_{Efm}*) hecho que podría estar relacionado con el efecto polar generado por la integración del vector pTEX5501-TS-Mob+ al plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*, y de esta manera se podría generar la inactivación o represión en otros genes de este plásmido.

Figura 34.

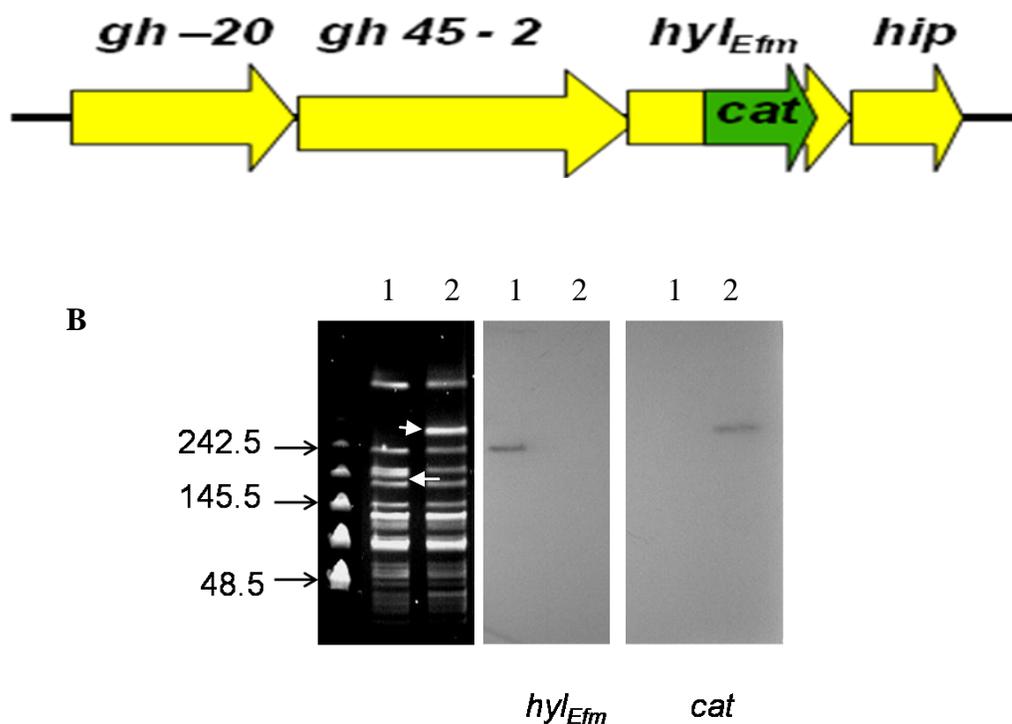


Figura 34. Resultados de PFGE-Apal e hibridación con la sonda *hyl_{Efm}* de las cepas *E. faecium* D344SRF C-6 y la mutante D344SRF/ Δhyl_{Efm} . Panel A. Grupo de genes correspondiente a la región donde se realizó el reemplazo alélico con *cat*, **Panel B.** PFGE-Apal y la respectiva hibridación con una sonda *hyl_{Efm}*, y con la sonda *cat*. Se observa un perfil electroforético similar entre la cepa salvaje D344SRF C-6 (1) y la mutante D344SRF C-6/ Δhyl_{Efm} (2) en la cual hay una pérdida de una banda entre 194 y 242.5 kb y ganancia entre 242.5-291 kb. Se presenta la hibridación positiva con la sonda *hyl_{Efm}* en la cepa D344SRF C-6 (portadora del plásmido *hyl_{Efm}*) y negativa en la mutante. La hibridación con la sonda *cat* fue positiva para la cepa mutante D344SRF C-6/ Δhyl_{Efm} y negativa para la cepa salvaje D344SRF C-6.

Esta mutante (D344SRF C-6/ Δhyl_{Efm}) fue evaluada frente a la respectiva cepa isogénica D344SRF C-6 (con plásmido portador del gen hyl_{Efm}) en el modelo de peritonitis en ratón. En la Figura 36 se observan los resultados de la mortalidad de los ratones infectados intra-peritonealmente con 3 diferentes inóculos que varían en un rango de 1.9×10^9 a 2×10^9 UFC/ml en la cepa D344SRF C-6 y de 2×10^9 a 4.7×10^9 UFC/ml para la mutante D344SRF C-6/ Δhyl_{Efm} . En inóculos muy similares (Figura 36 panel A y panel B) se observó una atenuación en la letalidad de la cepa mutante comparada con la cepa isogénica D344SRF C-6, resultados que fueron altamente significativos ($P=0.0040$) y ($P=0.0195$); hallazgos similares se observa en el panel C ($P=0.046$). Tomando en conjunto estos resultados, se podría sugerir interrupción de hyl_{Efm} o del gen corriente abajo (*hip*) causan un efecto en la virulencia de *E. faecium* en el modelo murino de peritonitis.

Figura 35.

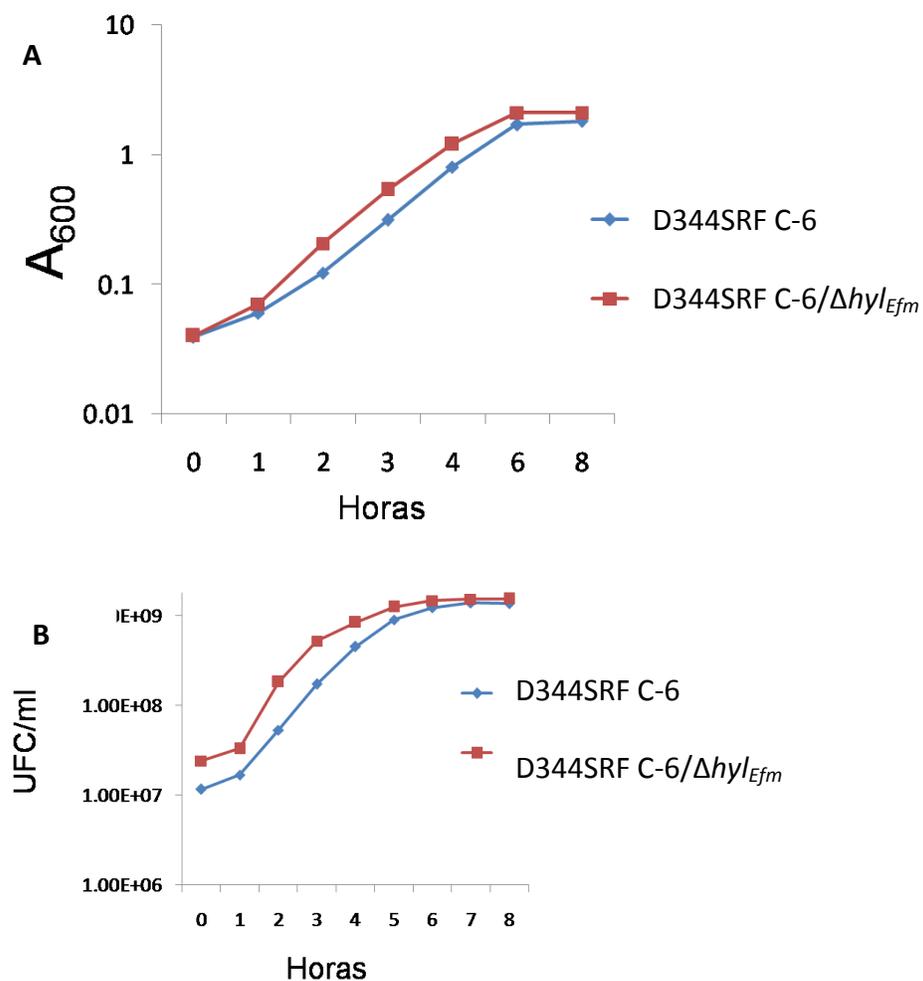


Figura 35. Curva de crecimiento de las cepas *E. faecium* D344SRF C-6 y la mutante D344SRF/ Δhyl_{Efm} . Panel A. Grafica de la curva de crecimiento en densidad óptica (A_{600m}). **Panel B.** Recuentos bacterianos expresados en UFC/ml. Las curvas fueron realizadas en caldo BHI, las densidades ópticas y los recuentos de colonias se realizaron cada hora hasta 8 horas. Se observa que la mutante presentó un crecimiento ligeramente mejor que la cepa salvaje D344SRF C-6 (con el plásmido portador del gen hyl_{Efm}).

Figura 36.

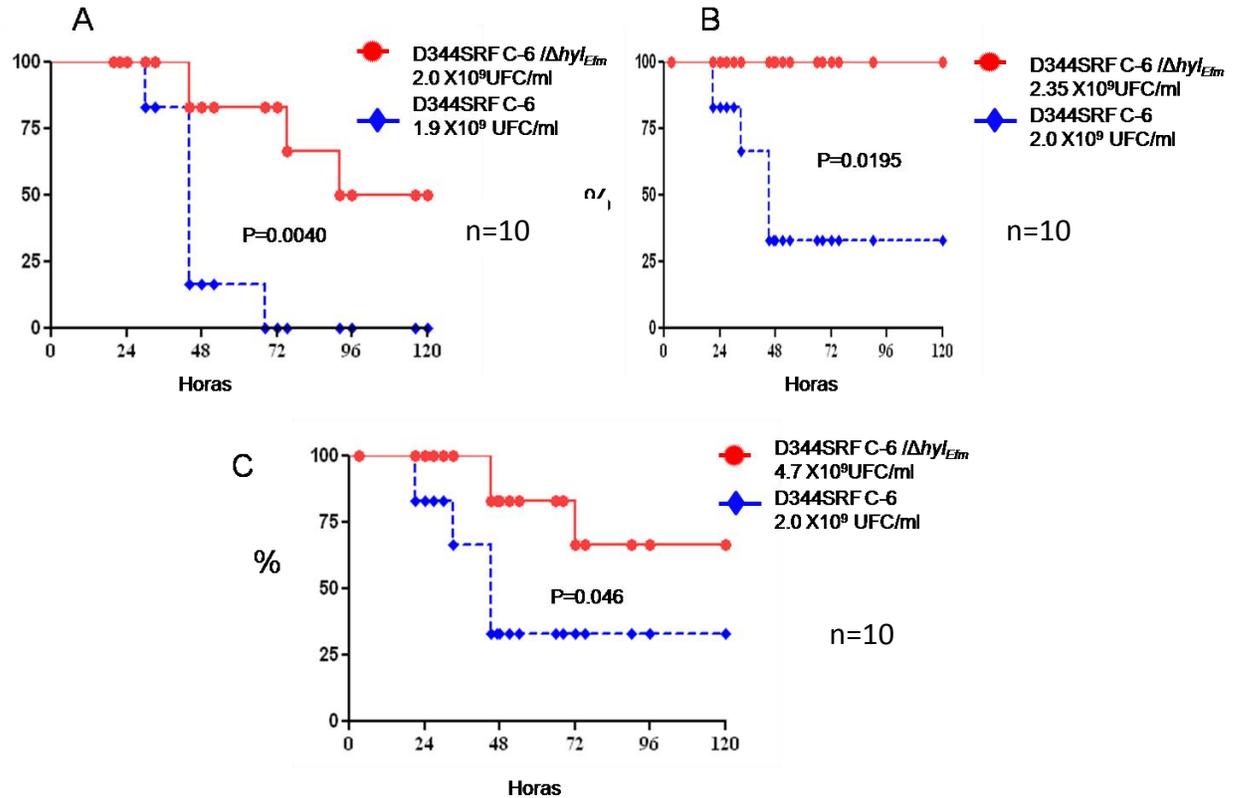


Figura 36. Curvas de supervivencia en el modelo de peritonitis en ratón empleando las cepas derivadas de *E. faecium* D344SRF. Panel A, B y C. Se muestran los resultados de tres ensayos independientes con diferentes inóculos, en los cuales se comparó la cepa salvaje D344SRF C-6 y la mutante D344SRF C-6 Δhyl_{Efm} la cual fue obtenida por reemplazo alélico con el gen *cat* y delección de 226 nucleótidos del gen *hyl_{Efm}*. Se utilizaron 10 ratones por inóculo evaluado. En el eje de las Y se grafica el porcentaje de supervivencia de los animales y en el eje de las X el tiempo durante el cual se evaluaron.

16.1.5. Complementación de las mutantes con el gen *hyl_{Efm}* y el gen localizado corriente abajo de *hyl_{Efm}* (*hip*).

Con el fin de confirmar si la atenuación de la virulencia observada en las mutantes provenientes de las cepas derivadas de *E. faecium* TX1330RF y *E. faecium* D344SRF fue.

Este vector es útil para estudios en enterococos debido a que permite clonar genes tanto en Gram-negativos (como *E. coli*) como también en bacterias Gram-positivas, presenta un promotor constitutivo P2 (que controla la expresión de los genes clonados) y posee genes de resistencia para gentamicina y espectinomicina como determinantes de selección del plásmido (126). Inicialmente, el vector pAT392 fue transferido por electrotransformación a la cepa TX1330RF, las colonias portadoras del plásmido fueron recuperadas en agar BHI suplementado con gentamicina y se confirmó la presencia del plásmido por PCR y PFGE (Figura 37, panel A, línea 2).

Posteriormente, se realizaron experimentos para establecer la estabilidad del plásmido *in vivo* utilizando el modelo de peritonitis murina; para ello, se infectaron por vía intraperitoneal 6 ratones con la cepa TX1330RF/pAT392 empleando diferentes inóculos (rango $\sim 10^9$ UFC/ml). Los ratones se sacrificaron a las 48 horas y los bazos fueron removidos, resuspendidos en solución salina, homogenizados, macerados y finalmente se realizaron diluciones que fueron sembradas simultáneamente en agar BHI y agar BHI suplementado con gentamicina 125 $\mu\text{g/ml}$ para realizar recuento de colonias. Adicionalmente, se recolectaron 384 colonias individuales, las cuales fueron sembradas en agar BHI y BHI suplementado con gentamicina para determinar la pérdida del plásmido pAT392.

A partir de estas colonias, se seleccionaron 20 las cuales se evaluaron por PCR empleando un iniciador sentido en el promotor P2 y uno antisentido en el gen *aac(6')-aph(2'')*. En la Tabla 7 se muestran los resultados de los recuentos de colonias, se observa que se recuperaron un número similar de colonias provenientes de los bazos de los animales

infectados, cuando se sembraron tanto en el medio BHI como en el medio suplementado con gentamicina.

Tabla 7. Recuentos de colonias de la cepa TX1330RF/pAT392 proveniente de bazo de ratones infectados por vía intra-peritoneal

	BHI	BHI suplementado con
	UFC/ml	Gentamicina (UFC/ml)
Cultivo de 16 horas de incubación	5.2×10^{10}	3.3×10^{10}
Bazo No 1	2.4×10^8	2.3×10^8
Bazo No 2	3×10^7	2.3×10^7
Bazo No 3	3×10^7	4×10^7
Bazo No 4	7.2×10^7	9×10^7
Bazo No 5	2.8×10^8	2.6×10^8
Bazo No 6	1.6×10^8	1.4×10^8

Se detectó la pérdida de la resistencia a gentamicina por la ausencia del pAT392 en 11 (2.8%) colonias seleccionadas a partir de las 384 colonias evaluadas, estas fueron cultivadas tanto en presencia como ausencia de gentamicina. Adicionalmente, las 20 colonias estudiadas por PCR fueron positivas para una región interna del plásmido pAT392, lo que confirma la presencia del plásmido pAT392 en la cepa TX1330RF. Estos resultados sugieren que el plásmido pAT392 es estable *in vivo* en la cepa *E. faecium* TX1330RF.

Una vez confirmada la estabilidad del plásmido en la cepa TX1330RF se procedió a realizar tres construcciones plasmídicas que permitieran realizar ensayos de complementación en con los genes *hyl_{Efm}* y *hip* para determinar la posibilidad del incremento en la mortalidad de las cepas cuando estos genes son expresados en *trans*. La primera construcción presentaba el gen *hyl_{Efm}* clonado en el MCS, la segunda el gen *hip* y la tercera presentaba tanto el gen *hyl_{Efm}* como el gen *hip* clonados en el mismo vector (pAT392). Estos genes se clonaron corriente arriba del gen de resistencia a gentamicina *aac(6')-aph (2'')*, que es controlado bajo el promotor constitutivo P2 (Figura 10.) (ver metodología 8.2.3).

Una vez realizadas las construcciones y confirmada la secuencia de los genes clonados [pAT392::*hyl_{Efm}*, pAT392::*hip*, pAT392::*hyl_{Efm}-hip*], se transfirieron por electrotransformación a las cepas de *E. faecium* TX1330RF, a la mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}* y a la mutante D344SRF C-6/ Δ *hyl_{Efm}* (Figura 37 panel B,C,D,E,F) los clones obtenidos fueron seleccionados en gentamicina y se comprobó la identidad isogénica de las cepas por PFGE-SmaI (Figura 37, panel A,B,C, D, E). Luego se determinó la transcripción de los genes clonados en el vector pAT392 por medio de RT-PCR en cada una de las cepas obtenidas.

Posteriormente, se evaluó la estabilidad de estas construcciones tanto *in vitro* (a partir del crecimiento en caldo BHI y siembra en agar BHI con gentamicina) como *in vivo* (a partir de las colonias obtenidas de los bazos de los animales infectados y que fallecieron en el experimento), se encontró una pérdida del plásmido mayor al 80 % en todas las cepas estudiadas tanto *in vitro* como *in vivo* en ausencia de la gentamicina. Sin embargo,

cuando se evaluaron las cepas TX1330RF y TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}* con los respectivos derivados de pAT392, pAT392::*hyl_{Efm}* y pAT392::*hyl_{Efm}-hip* en presencia de gentamicina, se observó que las construcciones fueron estables tanto *in vitro* como *in vivo* con una pérdida máxima del 5 %.

Figura 37.

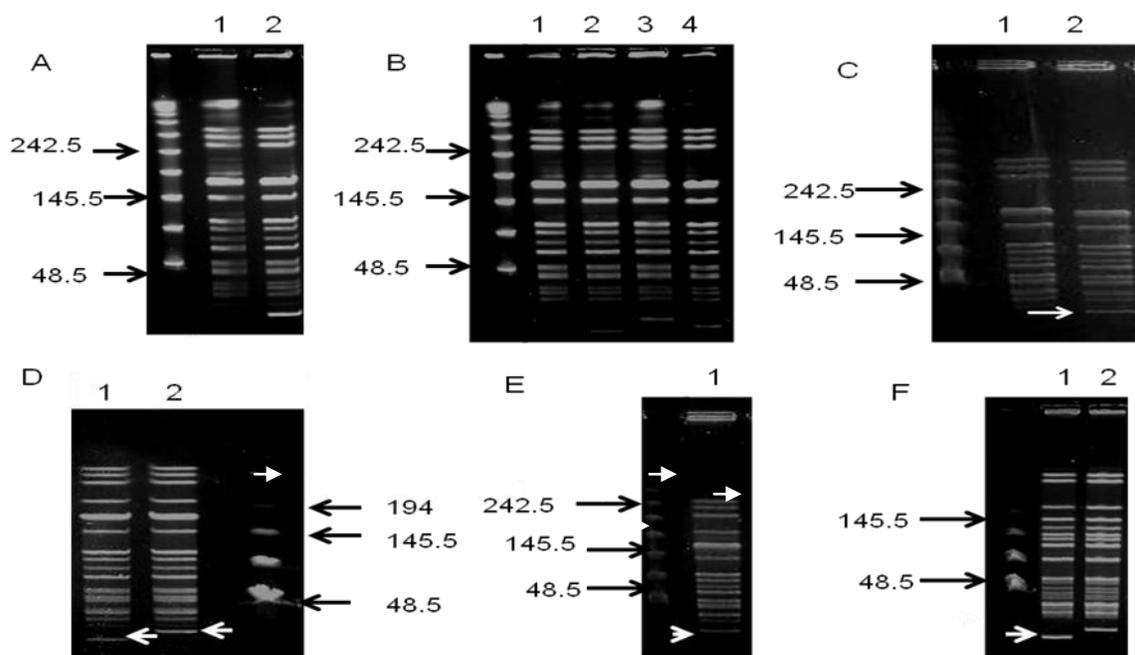


Figura 37. Resultados de PFGE- Smal de las cepas de *E. faecium* TX1330RF y sus derivadas y la mutante *E. faecium* D344SRF C-6/ Δ *hyl_{Efm}* transformadas con los plásmidos de pAT392. Panel A. Cepas derivadas de TX1330. 1. TX1330; 2. TX1330/pAT392. **Panel B.** Cepas derivadas de TX1330RF: 1. TX1330RF; 2. TX1330RF/pAT392; 3. TX1330RF/pAT392::*hyl_{Efm}*; 4. TX1330RF::*hip*. **Panel C** Cepas derivadas de TX1330RF. 1. TX1330RF; 2. TX1330RF/pAT392::*hyl_{Efm}-hip*. **Panel D.** Cepas derivadas de TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}*: 1. TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}* /pAT392; 2. TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}* /pAT392::*hyl_{Efm}*. **Panel E.** 2. TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}* /pAT392::*hyl_{Efm}-hip*. **Panel F.** Cepas derivadas de D344SRF: 1. D344SRF C-6/pAT392; 2. D344SRF C-6/pAT392::*hyl_{Efm}*. En cada uno de los paneles se señala con una flecha las bandas correspondientes al pAT392 y sus plásmidos derivados digeridos con la enzima Smal. Este plásmido tiene un sitio único de corte para esta enzima, lo que permite linearizar el vector e identificarse por PFGE.

No obstante, la construcción pAT392::*hip* continuó siendo inestable con una pérdida mayor al 70 % (Tabla 8). De la misma manera, las construcciones de los derivados de

pAT392 en las cepas de *E. faecium* D344SRF fueron también inestables observándose una pérdida del plásmido pAT392 mayor al 50 %, por lo tanto el efecto en el modelo de peritonitis no fue posible evaluarlo.

Tabla 8. Resultados de la evaluación de la estabilidad de los plásmidos derivados del pAT392 *in vitro* e *in vivo*.

Cepa	% de pérdida del plásmido pAT392 ^a (<i>in vitro</i>)	% de pérdida del plásmido pAT392 ^b (<i>in vivo</i>)
TX1330RF/pAT392	3 %	4 %
TX1330RF/pAT392. Caldo BHI suplementado con GEN 125 µg/ml	2 %	3 %
TX1330RF/pAT392:: <i>hyl_{Efm}</i>	28 %	60 %
TX1330RF/pAT392:: <i>hyl_{Efm}</i> . Caldo BHI suplementado con GEN 125 µg/ml	2 %	4 %
TX1330RF/pAT392:: <i>hip</i>	30 %	85 %
TX1330RF/pAT392:: <i>hip</i> . Caldo BHI suplementado con GEN 125 µg/ml	25 %	80 %
TX1330RF/pAT392:: <i>hyl_{Efm}-hip</i>	35 %	65 %
TX1330RF/pAT392:: <i>hyl_{Efm}-hip</i> . Caldo BHI suplementado con GEN 125 µg/ml	4 %	5 %

^a colonias provenientes de cultivo en caldo BHI (*in vitro*)

^b colonias provenientes del bazo de los animales muertos (*in vivo*).

Posteriormente, se realizaron los ensayos de peritonitis en ratón con las cepas derivativas de *E. faecium* TX1330RF con las diferentes construcciones en pAT392, con el fin de evaluar si el gen *hyl_{Efm}*, el gen *hip* o la presencia de los dos genes, expresados en *trans* incrementaban las propiedades patogénicas en la cepa comensal TX1330RF o reestablecían la virulencia en la mutante. Cada una de las tres construcciones obtenidas [pAT392::*hyl_{Efm}*, pAT392::*hip*, pAT392::*hyl_{Efm}-hip*] en la cepa TX1330RF fueron estudiadas realizando curvas de crecimiento (Figura 38) y por RT-PCR para confirmar la expresión de los genes clonados en pAT392.

Figura 38.

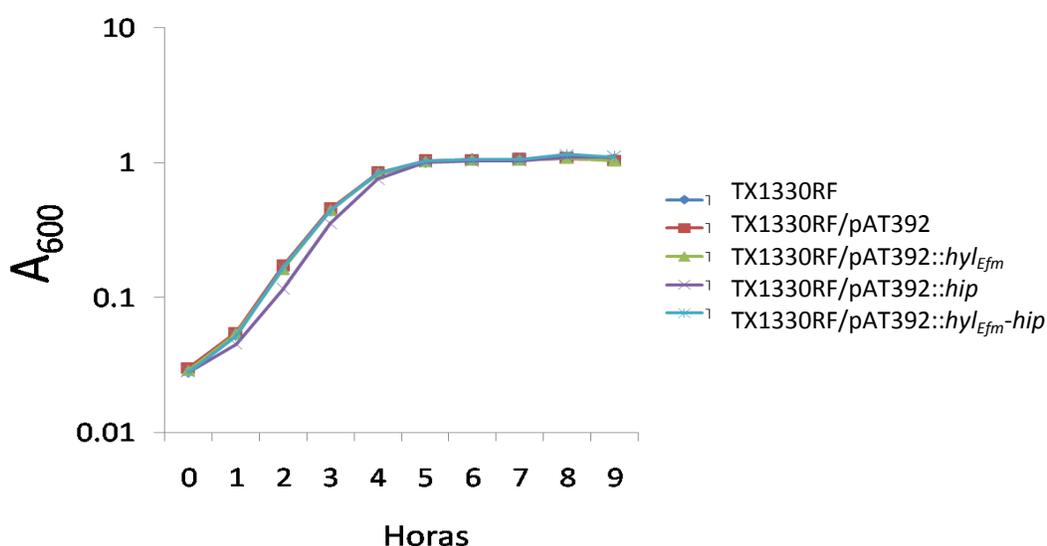


Figura 38. Curva de crecimiento de las cepas derivadas de *E. faecium* TX1330RF/pAT392. La curva se realizó en caldo BHI, se estudió el crecimiento de las bacterias cada hora durante 9 horas y se utilizó como control la cepa TX1330RF/pAT392.

Los experimentos de infección intra-peritoneal con las cepas portadoras de los plásmidos derivados de pAT392 mostraron que ninguna de las construcciones obtenidas empleando

diferentes inóculos bacteriano incrementaron el efecto de virulencia de la cepa comensal TX1330RF, cuando se compararon con la cepa TX1330RF/pAT392 sin inserto en presencia de gentamicina (Figura 39 y 40); indicando que la expresión de los genes en *trans* clonados independientemente o en combinación (*hyl_{Efm}-hip*) en el vector pAT392 no es suficiente para generar un aumento en la virulencia de la cepa TX1330RF. De la misma manera la expresión del gen *hyl_{Efm}* (Figura 41 panel A y B) o de los genes *hyl_{Efm}-hip* en la cepa mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}* (Figura 41 panel C y D) no restaura el fenotipo de virulencia presentado por la cepa TX1330RF A-1.

Figura 39.

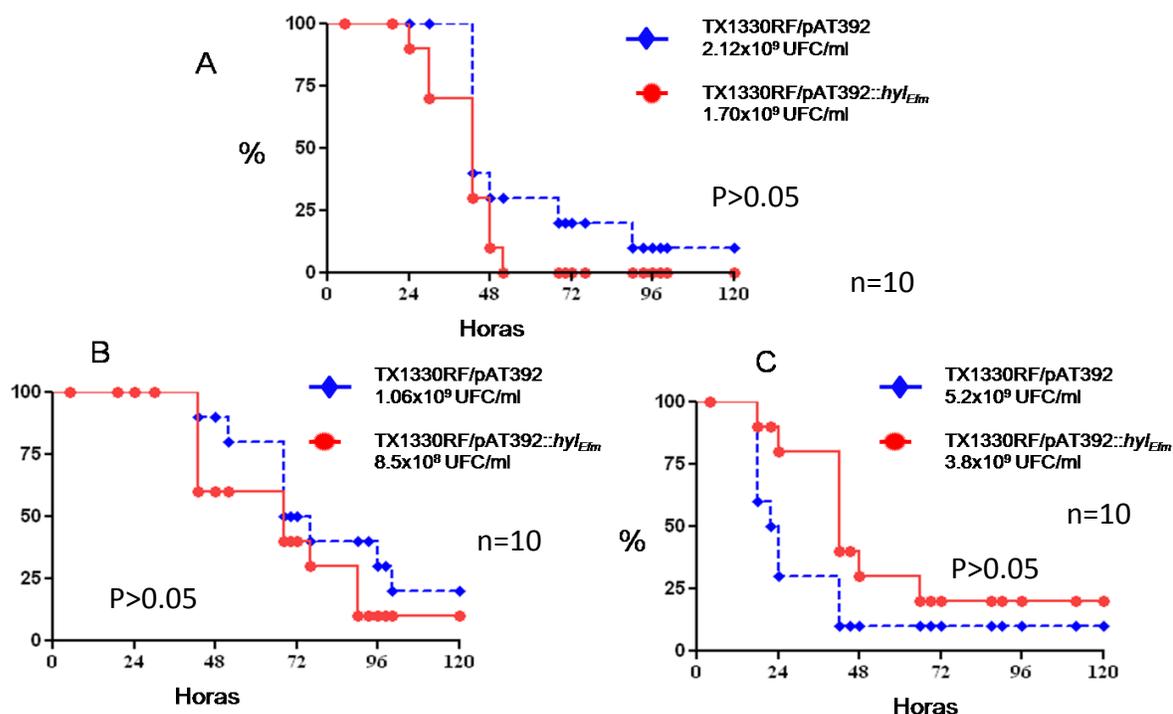


Figura 39. Curvas de sobrevivencia de las cepas derivadas de *E. faecium* TX1330RF portadoras del plásmido pAT392 y pAT392::*hyl_{Efm}* y evaluadas en el modelo de peritonitis en ratón. Resultados de tres experimentos independientes de las cepas TX1330RF portadoras del plásmido pAT392::*hyl_{Efm}* comparadas con la cepa TX1330RF/pAT392 empleando tres inóculos diferentes. En el eje de las Y se grafica el porcentaje de sobrevivencia de los animales y en el eje de las X el tiempo durante el cual se evaluaron.

Figura 40.

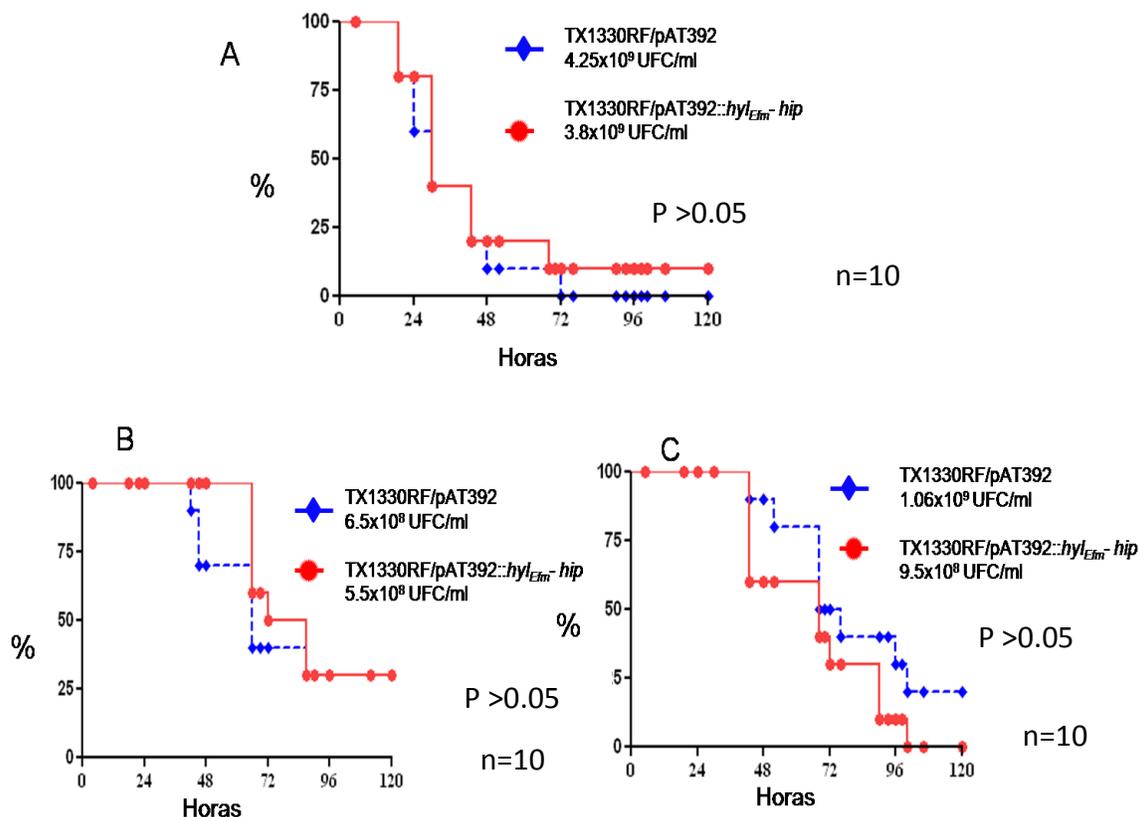


Figura 40. Curvas de sobrevivencia de las cepas derivadas de *E. faecium* TX1330RF portadoras del plásmido pAT392 y pAT392::hyl_{Efm}-hip y evaluadas en el modelo de peritonitis en ratón. Resultados de tres experimentos independientes de las cepas TX1330RF portadoras del plásmido pAT392::hyl_{Efm}-hip y comparadas con la cepa TX1330RF/pAT392 empleando tres diferentes inóculos. En el eje de las Y se grafica el porcentaje de sobrevivencia de los animales y en el eje de las X el tiempo durante el cual se evaluaron.

Figura 41.

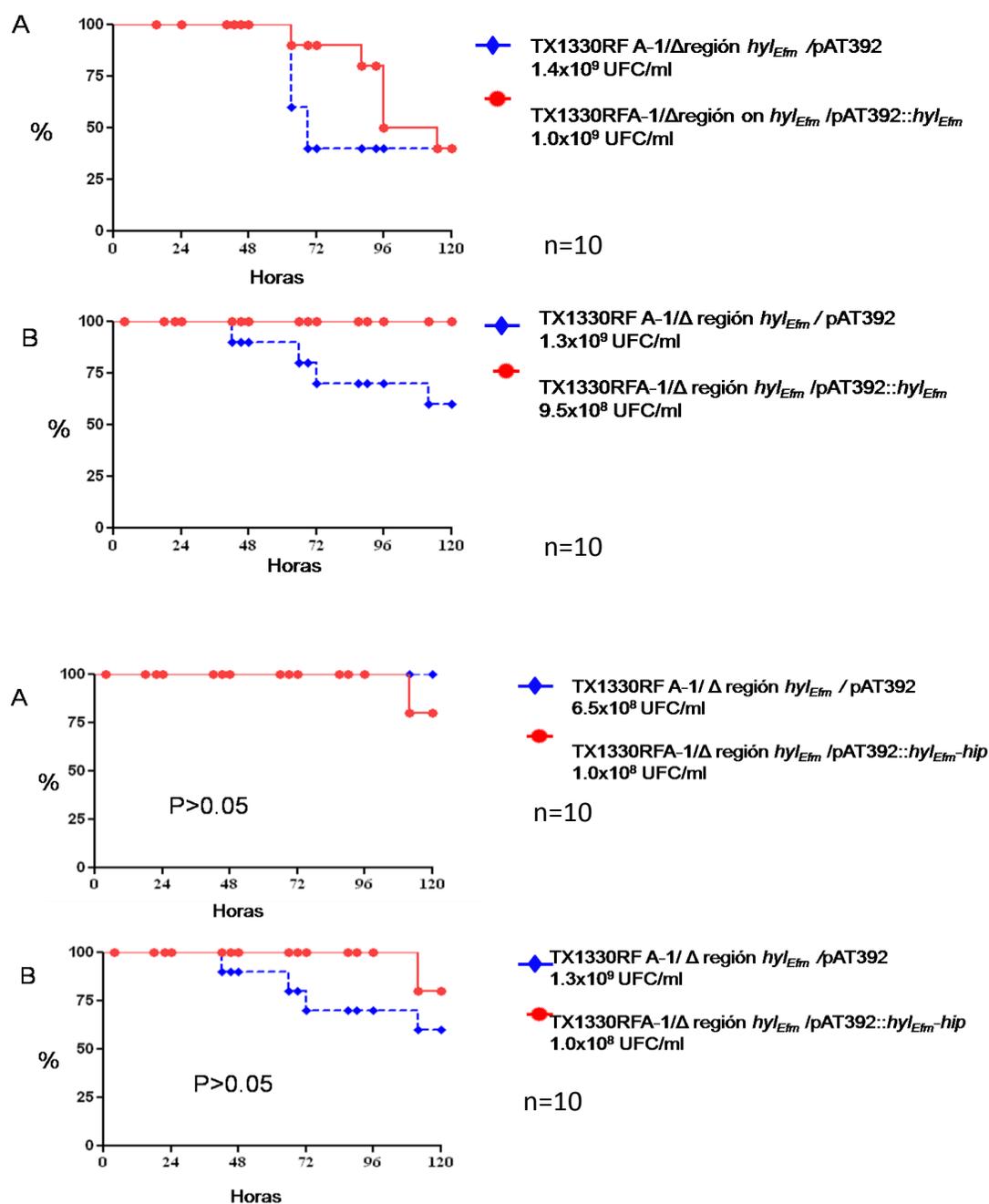


Figura 41. Curvas de sobrevivencia de la cepa mutante *E. faecium* TX1330RF A-1/ Δ región *hylEfm* complementadas con plásmido pAT392::*hylEfm* y pAT392::*hylEfm-hip* en el modelo de peritonitis en ratón. **Panel A y B.** Resultados de dos experimentos independientes de las cepas mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hylEfm* complementada con el plásmido pAT392::*hylEfm* comparadas con la mutante TX1330 RF A-1/ Δ región *hylEfm* /pAT392. **Panel C y D.** Resultados de dos experimentos independientes de las cepa mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hylEfm* complementada con el vector pAT392::*hylEfm-hip* comparada con la mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hylEfm* /pAT392.

17. DISCUSIÓN CAPÍTULO III

Previamente se ha demostrado que la presencia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en diferentes cepas de *E. faecium* (D344SRF y TX1330RF) incrementa la virulencia en el modelo experimental de peritonitis en ratón. Adicionalmente, se ha mostrado que la adquisición de este plásmido proveniente de la cepa A (TX0016) también aumenta la habilidad de la cepa TX1330RF para colonizar el uro-epitelio de los ratones, característica que fue estadísticamente significativa en el modelo por competencia de infección urinaria cuando se infectaron los animales con un inóculo mixto de la cepa portadora del plásmido *hyl_{Efm}* (TX1330RF A-1) y la cepa TX1330RF. Con el fin de profundizar en el estudio de virulencia de este plásmido se planteó la necesidad de desarrollar mutantes en esta región *hyl_{Efm}* las cuales pudieran contribuir a explicar si la virulencia observada por la adquisición del plásmido y de esta manera determinar si este efecto estaba relacionado con el gen *hyl_{Efm}* o con los genes adyacentes encontrados en esta región.

La creación de mutantes en *E. faecium* es una metodología de difícil aplicación y no se considera como una técnica de biología molecular de rutina como lo es en otros microorganismos (275). Esto se debe a que los enterococos son bacterias que tienen una baja capacidad de transformación en el laboratorio y presentan resistencia a múltiples antibióticos es difícil encontrar un vector adecuado de mutagénesis que tenga un marcador de selección antibiótica útil (275). Hasta la fecha, únicamente está disponible un vector adecuado que permite realizar mutagénesis en *E. faecium*, el cual utiliza un

plásmido sensible a la temperatura denominado pTEX5501-TS-Mob+(275). No obstante esta metodología aunque ha sido exitosa para la construcción de mutantes del gen *acm* y *esp_{Efm}* en *E. faecium* (176, 275) requiere la evaluación de un gran número de colonias (> 1,000) para la detección de la mutante esperada, proceso que la hace bastante laboriosa. Por lo tanto, con el fin de crear una herramienta adicional para mutagénesis en *E. faecium* que permitiera la creación de mutantes en la región *hyl_{Efm}*, se adaptó el sistema de construcción de mutantes PheS* desarrollado para *E. faecalis* (306) al *E. faecium*. Para este propósito se utilizó el pCJK47, plásmido que presenta el gen *ermC* el cual fue reemplazando por el gen *aph-ID* y adicionalmente se mantuvo los genes *pheS** y *lacZ*; de esta manera se obtuvo una nueva variante de este vector la cual se denominó pCJK47Gen. Posteriormente, tomando como templado este vector (pCJK47Gen) se desarrolló un vector adicional el pCJK47GenChl, que presenta las mismas características del pCJK47Gen pero posee adicionalmente dos sitios múltiples de clonaje (MCS) y el gen *cat* (que permite la diferenciación de entre una mutante y una cepa salvaje). Por lo tanto, con esta metodología desarrollada para *E. faecium* se obtienen varias ventajas como: *i)* una alta eficiencia de introducción del DNA debido a que se utiliza el sistema de conjugación desarrollado para *E. faecalis* el cual también es funcional para *E. faecium*, *ii)* permite la diferenciación de la mutante de la cepa salvaje por detección del gen *cat* y *iii)* a partir de un tamizaje de pocas colonias se puede lograr la detección de la mutante esperada.

Una vez desarrollado el vector adecuado para mutagénesis en *E. faecium* (pCJK47GenChI) por el sistema PheS*, se creó una mutante en la cepa A (TX0016) la cual presentaba una delección total de 4 genes y parcial de 2 genes (TX0016/ Δ región *hyl*_{Efm}). Posteriormente, esta mutante y la cepa A (TX0016) fueron evaluadas en el modelo de peritonitis en ratón, encontrándose que la mutante no presentó atenuación comparada con su respectiva cepa isogénica, resultado que podría ser explicado por el origen clínico, que presenta esta cepa. Lo anterior indica que es posible que la cepa A (TX0016) sea portadora de otros elementos de virulencia que le permitan compensar este tipo de mutaciones y por lo tanto la delección de este grupo de genes no genera mayor estrés para la bacteria.

Por lo tanto, con el fin de estudiar este tipo de mutaciones en otro ambiente genético, el plásmido intacto y el mutado se transfirieron a la cepa fecal TX1330RF (esta cepa no es de origen clínico y provenía de un individuo sano) con el fin de evaluar su patogenicidad. Es posible sugerir, que el efecto de virulencia *in vivo* pueda ser detectado más fácilmente en cepas que no han sido expuestas a ambientes hospitalarios, (a diferencia de la cepa A (TX0016) de origen nosocomial) en el cual pueden adquirir nuevos determinantes de virulencia, que les permiten estar mejor adaptadas para sobrevivir y generar infección. De esta manera, es bastante probable que sea posible detectar cualquier efecto de un gen o grupo de genes implicados en virulencia en una cepa comensal (TX1330RF) que no tiene la habilidad de producir enfermedad.

Por lo tanto, la cepa mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hyl*_{Efm} (delección de 7,534 bp) y la cepa portadora del plásmido intacto (TX1330RF A-1) también fueron evaluadas en el

modelo de peritonitis en ratón, encontrando que la mutante fue menos patogénica que la TX1330RF A-1. Sin embargo, como esta mutante presentó una pequeña diferencia en el crecimiento comparada con la cepa TX1330RF A-1, se podría inferir que la atenuación observada no solo estaría relacionada con la delección generada, sino que otros factores también podrían estar implicados en el efecto observado. Adicionalmente, la mutante D344SRF C-6/ Δhyl_{Efm} que presentaba una delección de 296 bp del gen *hyl_{Efm}* y un reemplazo alélico con el gen *cat* también fue evaluada en el modelo de peritonitis en ratón. Encontrándose atenuación por parte de la cepa mutada, posiblemente esta mutación produjo un efecto polar sobre el gen corriente abajo del *hyl_{Efm}* lo cual podría indicar que el gen *hyl_{Efm}* o el gen corriente abajo (*hip*) juegan un papel relevante en el incremento de la virulencia conferida por el plásmido.

El efecto de la delección de 7,534 bp también fue evaluado en el modelo de infección urinaria en ratón empleado la técnica de infección mixta o por competencia utilizando la cepa portadora del plásmido *hyl_{Efm}* TX1330RF A-1 y la cepa mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}*. Se observó una mejor colonización del uro-epitelio de los ratones que fueron infectados con la cepa portadora del plásmido intacto (TX1330RF A-1), comparada con los ratones infectados con la cepa mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}*. Sin embargo, como esta mutante presentó un defecto mínimo en el crecimiento, la atenuación observada posiblemente podría estar relacionada con otros factores diferentes a los relacionados con virulencia. Se podría postular que la región *hyl_{Efm}* esta involucrada en la adquisición y el metabolismo de carbohidratos externos (a partir del

sitio de la infección) lo cual le daría una habilidad adicional a la bacteria en los pasos iniciales de la infección (colonización). Por lo tanto, la delección de parte de estos genes podría ser una desventaja para la cepa mutante puesto que la adquisición de nutrientes para su metabolismo se podría reflejar en la disminución de la capacidad de sobrevivir *in vivo*. Este efecto, es esencialmente más notorio en cepas comensales las cuales no presentan condiciones de supervivencia para producir enfermedad, como si lo poseen los aislamientos de origen nosocomial.

Así mismo, con el objetivo de determinar el efecto en virulencia de los genes *hyl_{Efm}* y *hip* expresados en *trans*, estos genes se clonaron en un vector, se transfirieron a la cepa comensal y se evaluaron en el modelo de peritonitis en ratón. Para ello, se utilizó en el plásmido de expresión pAT392 (126). Este plásmido ha sido utilizado exitosamente para el estudio de los genes de resistencia vancomicina en *E. faecium* (126) y en *E. gallinarum* (136) por lo cual fue escogido para la expresión *in vivo* de los genes *hyl_{Efm}* y *hip*. Se realizaron dos construcciones las cuales expresaban el gen *hyl_{Efm}* y *hip* independientemente en el pAT392 (pAT392::*hyl_{Efm}* y pAT392::*hip*) y una construcción en la cual los dos genes se clonaron al mismo tiempo en el pAT392 (pAT392::*hyl_{Efm}-hip*). Sin embargo, a pesar que la estabilidad del plásmido fue controlada incluyendo gentamicina en los cultivos respectivos y se determinó la expresión de los genes clonados, ninguno de los plásmidos derivados de pAT392 logró incrementar la virulencia en la cepa TX1330RF o complementar la atenuación observada en la cepa mutante de seis genes (TX1330RF A-1/ Δ región *hyl_{Efm}*).

Se pueden proponer dos posibles explicaciones para la ausencia del efecto en la complementación observada en estos experimentos: *i)* la expresión constitutiva de *hyl_{Efm}* o *hip* podría ser deletérea para la bacteria, lo que sugeriría que la expresión del grupo de genes *hyl_{Efm}* esta específicamente regulada (dos genes con homología para el sistema regulatorio de dos componentes se encuentran en el extremo 5' de la región *hyl_{Efm}* (Figura 1) y *ii)* el gen *hyl_{Efm}* o *hip*, son necesarios pero no suficientes para restaurar la virulencia conferida por el plásmido que presenta la delección de 6 genes en la región *hyl_{Efm}* u otros genes localizados en esta región, son también necesarios para generar patogénesis en el modelo de peritonitis en ratón.

En resumen, se logró desarrollar un sistema exitoso para mutagénesis en *E. faecium*, el cual fue utilizado para la generación de una mutante de 6 genes en la región *hyl_{Efm}*. La mutante obtenida en TX1330RF presentó una atenuación en el modelo de peritonitis y en el modelo de infección urinaria comparada con la respectiva cepa isogénica. Sin embargo, se requiere de la creación de nuevas delecciones que permitan obtener mayor información acerca del papel de esta región *hyl_{Efm}* en virulencia. Por otro lado, no se detectó ni se restauró el efecto de virulencia con las construcciones evaluadas en TX1330RF ni en la mutante cuando se complementó en *trans* con los plásmidos derivados de pAT392.

18. CONCLUSIONES CAPÍTULO III

1. Se desarrolló un vector para la construcción de mutantes en *E. faecium* que se fundamenta en el sistema de contraselección PheS* con el cual se obtuvo una mutante de 6 genes de la región *hyl*_{Efm}.
2. Se obtuvo una mutante por reemplazo alélico con el gen *cat* por delección de 7,534 bp en el plásmido portador del gen *hyl*_{Efm} proveniente de la cepa *E. faecium* TX0016 empleando el sistema de mutagénesis PheS*.
3. La mutante TX0016/ Δ región *hyl*_{Efm} no presentó atenuación en el modelo murino de peritonitis cuando se comparó con la cepa isogénica TX0016.
4. Se observó efecto de atenuación en la mutante TX1330RF A-1/ Δ region *hyl*_{Efm} cuando se comparó con la cepa TX1330RF portadora de plásmido *hyl*_{Efm} cuando se evaluó en el modelo de peritonitis en ratón.
5. Se observó menor capacidad de colonización de la mutante TX1330RF A-1/ Δ región *hyl*_{Efm} cuando se comparó con la cepa TX1330RF portadora de plásmido *hyl*_{Efm} en el modelo murino de infección urinaria por competencia.
6. La interrupción del gen *hyl*_{Efm} en la cepa D344SRF C-6 también mostró una atenuación cuando se comparó con la cepa isogénica D344SRF en el modelo de peritonitis en ratón.
7. No se observó efecto en la virulencia en el modelo de peritonitis murina cuando se realizó complementación con los genes *hyl*_{Efm} y *hip* expresados en *trans*.

CAPÍTULO IV

EL PLÁSMIDO *hyl_{Efm}*, UN ELEMENTO GENÉTICO IMPORTANTE EN LOS AISLAMIENTOS DE *E. faecium* DE LOS PAISES DE LA REGIÓN ANDINA (Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela)

19. RESULTADOS CAPÍTULO IV

19.1 Características fenotípicas de los aislamientos de *E. faecium* de origen nosocomial provenientes de los países de la región Andina

Debido a la relevancia clínica que ha adquirido *E. faecium* en los últimos años especialmente debido a la interacción entre factores de virulencia y de resistencia, así como también los hallazgos previos de este trabajo en los cuales se determina la importancia del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en la patogénesis de *E. faecium*, se evaluaron aislamientos de *E. faecium* provenientes de cuatro países de la región Andina con el fin de determinar las características genéticas y moleculares de los enterococos circulantes en esta área geográfica de Sur America.

Para ello, se recolectaron 760 aislamientos consecutivos de *Enterococcus* spp a partir de un programa de vigilancia epidemiológica en los cuatro países de la región Andina. De estos aislamientos se descartaron 37, los cuales no cumplían con los criterios de inclusión delimitados en el estudio. Finalmente, se evaluó un total de 723 aislamientos de enterococos.

A partir de los 723 aislamientos, 560 correspondieron a *E. faecalis*, 111 a *E. faecium* y 52 a otras especies. En el presente trabajo, se incluyeron específicamente 111 aislamientos de *E. faecium* los cuales provenían de: Colombia 41 (37 %), Perú 29 (26 %), Ecuador 17 (15

%) y Venezuela 24 (22 %). El origen más común de los aislamientos de *E. faecium* fue orina (38 %) seguido de sangre (21 %), infecciones quirúrgicas (13 %) y otros (28 %). Las tasas de resistencia de los *E. faecium* (Figura 42), indican que los niveles de resistencia mas altos se encontraron para ampicilina (75 %), ciprofloxacina (68 %), HLR estreptomina (44 %), HLR gentamicina (36 %), vancomicina y teicoplanina (31.5 %). Los porcentajes de resistencia a cloranfenicol fueron bajos (4.5 %) y no se identificó ningún aislamiento resistente a linezolid. Las tasas mas altas de resistencia a ampicilina, vancomicina,HLR-GEN y HLR-STR se encontraron en Perú con 90 %, 48 %, 55 % y 65 % respectivamente, por el contrario, las tasas mas bajas para los antibióticos descritos previamente fueron observadas en Venezuela con 46 %, 25 %, 8 % y 21 %, respectivamente (Figura 43).

Figura 42.

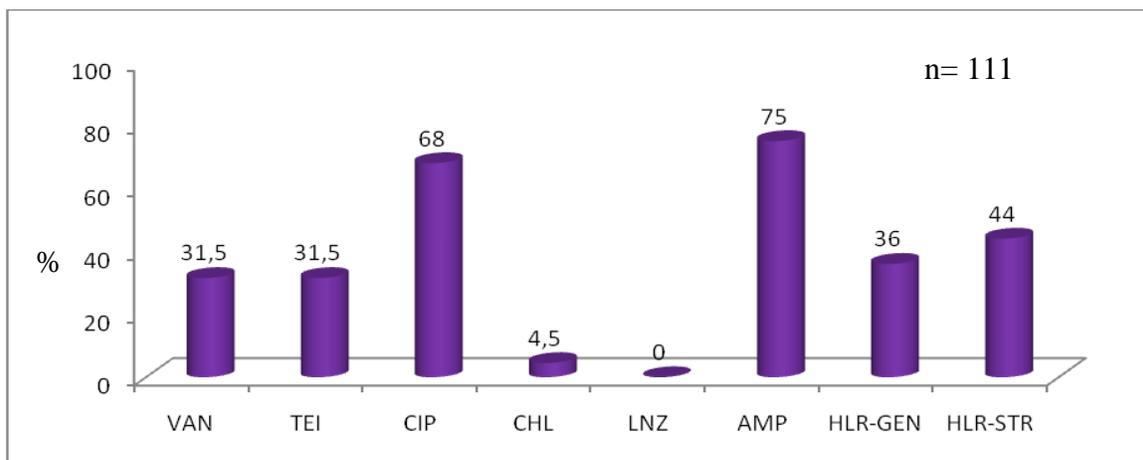


Figura 42. Perfiles de resistencia antibiótica de los 111 aislamientos de *E. faecium* provenientes de diferentes hospitales en la región Andina (Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela). Se muestran los resultados totales de la frecuencia de la resistencia a los antibióticos evaluados. Nomenclatura: vacomicina (VAN), teicoplanina (TEI), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CHI), linezolid (LNZ), ampicilina (AMP), altos niveles de resistencia a gentamicina (HLR-GEN), altos niveles de resistencia a estreptomina (HLR-STR). En el eje de las Y se muestra el porcentaje de resistencia (%) y en el eje de las X los antibióticos evaluados.

Figura 43.

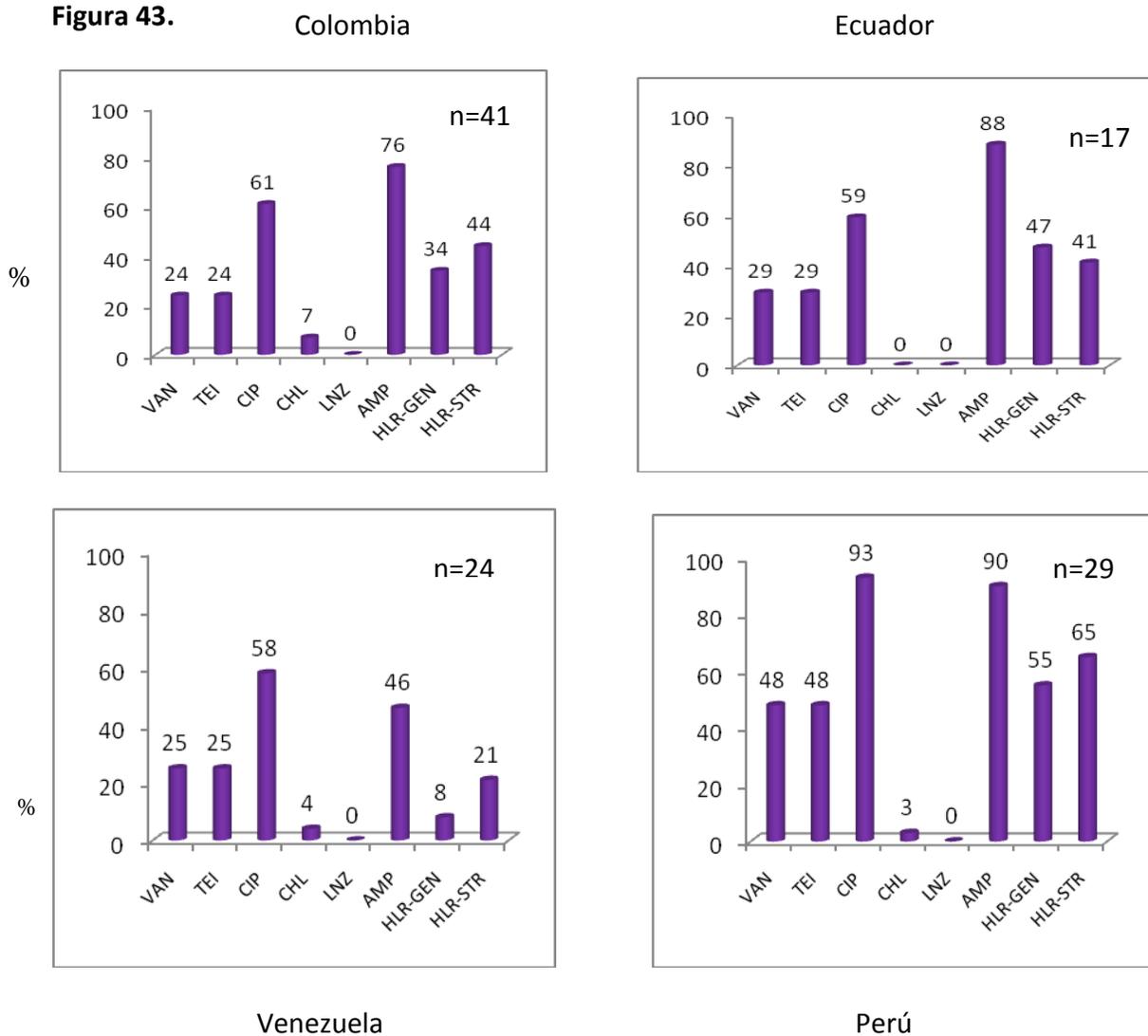


Figura 43. Perfiles de resistencia antibiótica de los 111 aislamientos de *E. faecium* provenientes de diferentes hospitales en la región Andina (Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela). Se muestran los resultados de la frecuencia de la resistencia a los antibióticos evaluados por cada uno de los países (Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela). Nomenclatura: vacomicina (VAN), teicoplanina (TEI), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CHI), linezolid (LNZ), ampicilina (AMP), altos niveles de resistencia a gentamicina (HLR-GEN), altos niveles de resistencia a estreptomycin (HLR-STR).

19.2 *E. faecium* perteneciente al CC17 se encuentra como genogrupo predominante en la región Andina

A partir de los 111 aislamientos de *E. faecium* evaluados se encontraron 35 aislamientos que presentaban fenotipo VanA (altos niveles de resistencia a vancomicina y a teicoplanina) y portaban el gen *vanA*. La tipificación molecular por PFGE reveló la presencia de 11 patrones electroforéticos diferentes los cuales fueron identificados con las letras A a la K (Figura 44). Los patrones A, C y E se encontraron en Colombia, en Perú los patrones A,B, E, F, G, H y K, en Ecuador D y I y en Venezuela A. Se observó el predominio de algunos clones de *E. faecium*: en Venezuela el patrón A, en Perú el patrón B, para Colombia el C y D en Ecuador (Figura 44).

Para el análisis por MLST se seleccionaron aislamientos representativos de cada tipo de PFGE, se determinó que todos los ST (secuencia tipo) pertenecieron al CC17, siendo el más frecuentemente identificado el ST412 (5 aislamientos). También, se identificaron ST17 (un aislamiento), ST18 (dos aislamientos), ST125 (un aislamiento), ST203 (un aislamiento), ST280 (dos aislamientos), ST282 (un aislamiento). Por otra parte, en un aislamiento proveniente de Perú con patrón electroforético J se identificó un nuevo ST el cual fue denominado ST494 el cual corresponde al CC17 (Figura 44).

Figura 44.

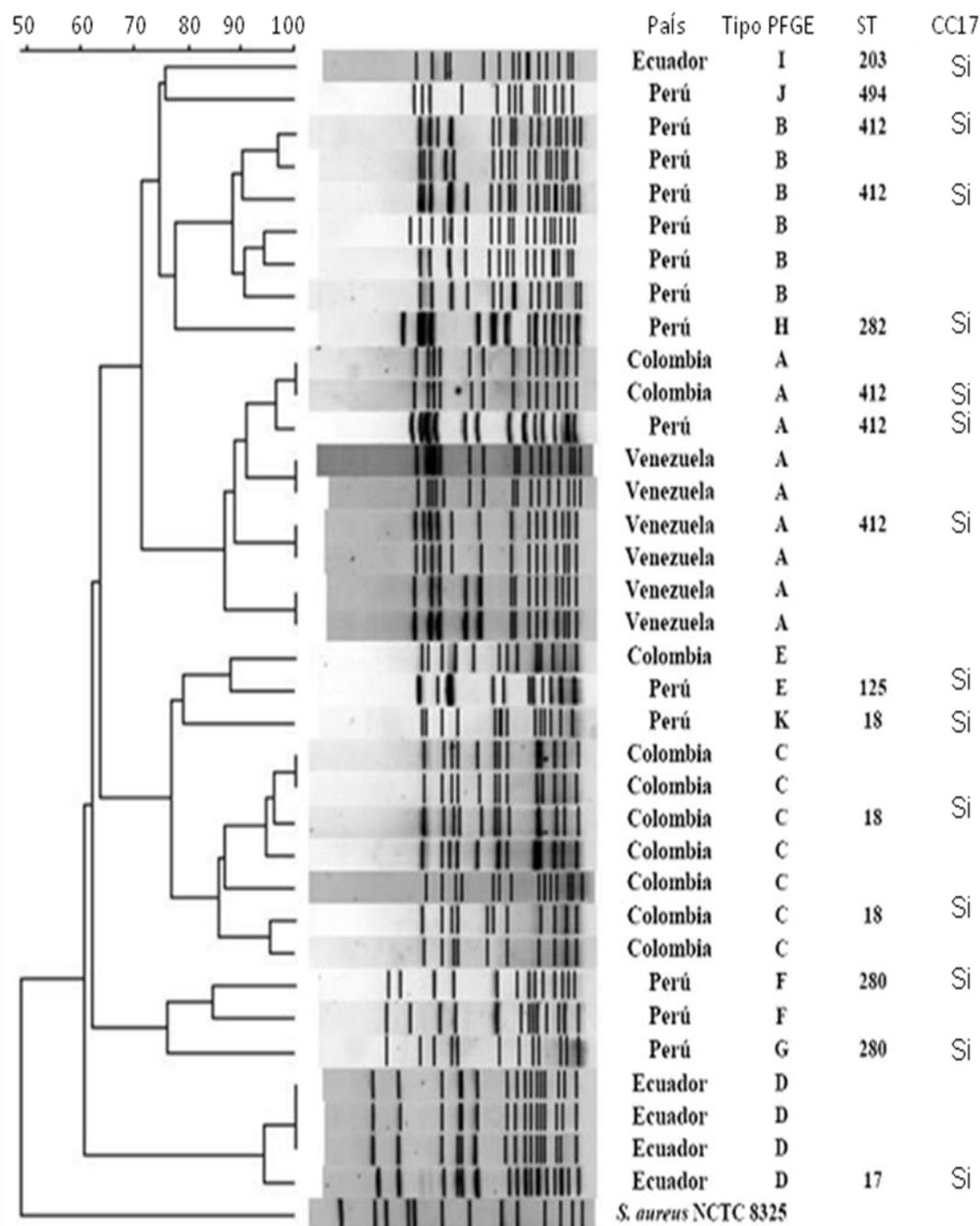


Figura 44. Tipificación molecular de *E. faecium* resistente a vancomicina provenientes de la región Andina empleando PFGE. El árbol filogenético se construyó utilizando el coeficiente de DICE y con el algoritmo de agrupamiento genético UPGMA con un punto de corte definido en 85 %. Nomenclatura: ST (secuencia tipo), CC17 (complejo clonal 17), NCTC 8325: Cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada como marcador de peso molecular.

19.3 Los genes *fms*, *esp*_{Efm} y *hyl*_{Efm} se encuentran frecuentemente en los aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina y pertenecientes al CC17 los cuales provienen de diferentes orígenes geográficos en la región Andina

Diversos reportes han señalado una mayor presencia de los genes putativos de virulencia *fms* así como también los genes *esp*_{Efm} y *hyl*_{Efm} en cepas de *E. faecium* de origen clínico pertenecientes al CC17 (22, 29, 33, 34, 146, 177). Por lo tanto, era importante evaluar la presencia de los genes *fms*, *esp*_{Efm} y *hyl*_{Efm} en los aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina circulantes en los hospitales de la región Andina. El grupo de genes *fms* 11-19-16 y *ebpA*_{Efm}, *ebpB*_{Efm}, *ebpC*_{Efm} (*pilB*) los cuales codifican para proteínas putativas para la producción de pili en bacterias Gram-positivas, se encontraron presentes en las 35 cepas de *E. faecium* resistente a vancomicina y el gen *scm* que codifica para una segunda adhesina de unión a colágeno se encontró en un 91 % de los aislamientos. El grupo de genes formado por *fms* 20 y *fms* 21 (*pilA*) se detectó en 74 % y 83 % respectivamente, el grupo de genes (*fms* 17, *fms* 13, *fms* 14) en 77 %, 80 % y 83 % respectivamente, el *fms* 18 en un 69 % y el *fms* 15 en un 97 % (Figura 45). Adicionalmente, los genes *esp*_{Efm} y *hyl*_{Efm} que también han sido asociados al CC17 se encontraron en un 69 % y 23 % respectivamente. De esta manera, la presencia de los 4 grupos de genes previamente descritos en la cepa A (TX0016) se encontraron en los aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina provenientes de diferentes hospitales de la región Andina (Figura 45).

Figura 45.

n=35

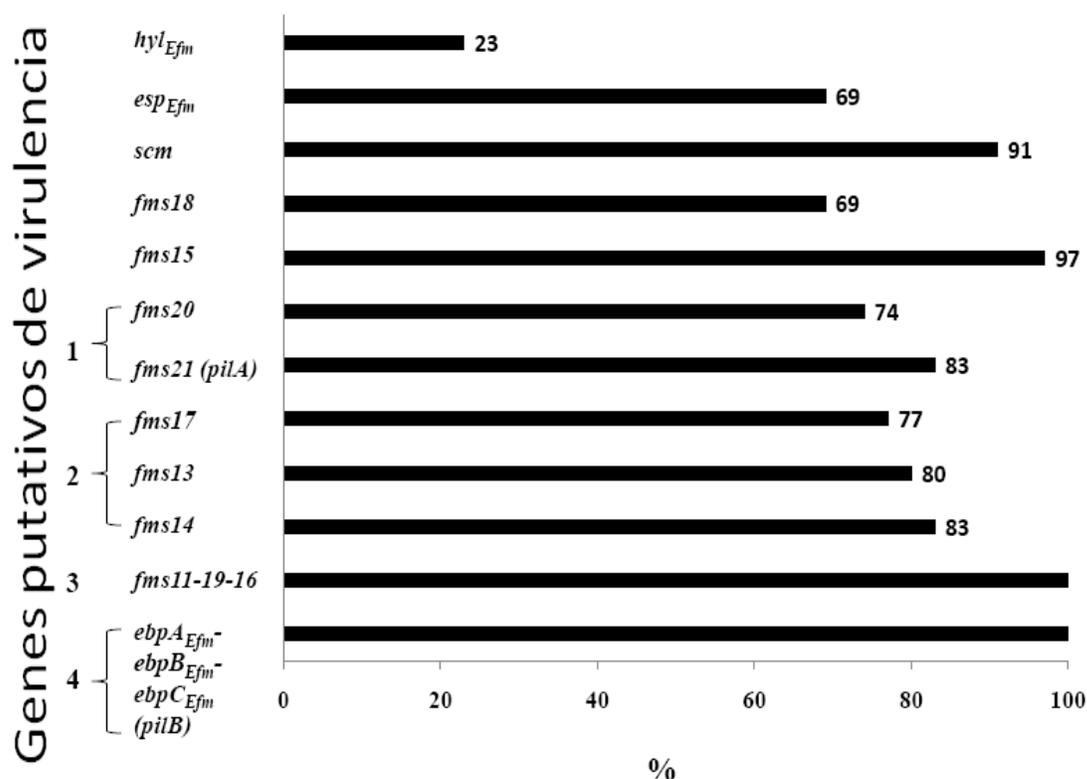


Figura 45. Frecuencia de los genes putativos de virulencia en los aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina provenientes de hospitales de la región Andina. Los grupos de genes *fms* y los genes *esp_{Efm}* y *hyl_{Efm}* se encuentran señalados a la izquierda y los números en la derecha indican la frecuencia obtenida para cada gen.

19.4 Los genes *fms 20* y *fms 21 (pilA)* se encuentran localizados en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* y su presencia se observa en cepas de *E. faecium* provenientes de hospitales en la región Andina.

Debido a los hallazgos descritos previamente del plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* era importante determinar la presencia de otros determinantes de virulencia putativos en este plásmido proveniente de la cepa A de origen clínico (TX0016). Para esto, se evaluó la

presencia de los genes *fms 20* y *fms21 (pilA)* por dos razones: *i)* estos genes presentan homología con genes que participan en la biogénesis del pili y además codifican para las proteínas MSCRAMMS las cuales se han visto relacionadas con la capacidad de adherencia de las bacterias patógenas a los tejidos del huésped y de esta manera producir infección y, *ii)* el hallazgo de la localización del gen *repA* adyacente a los genes *fms20* y *fms21 (pilA)* posiblemente sugiere que estos genes se encuentran probablemente en un plásmido y no a nivel cromosomal.

Se realizó la evaluación experimental de la localización extra cromosomal de estos genes empleado PFGE y digestión con nucleasa S1 (PFGE-S1) e hibridización con sondas dirigidas a los genes *fms 20 (pilA)* y *fms 21*. Para la confirmación de estos hallazgos se utilizó el protocolo de PFGE y digestión con I-Ceu-I (PFGE I-Ceu-I) e hibridización con las mismas sondas previamente descritas (*fms 20* y *fms 21(pilA)*) y empleando como control la sonda RNAr 23S. Para ello, la cepa A de *E. faecium* (TX0016) que presenta el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*, *E. faecium* TX1330RF (cepa receptora usada para ensayos de conjugación y que también presenta un plásmido de un tamaño aproximado ~ 190 kb) y *E. faecium* TX1330RF A-1 (cepa transconjugante que presenta el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*) fueron evaluadas.

Se encontró que los genes *fms 20* y *fms 21(pilA)* se localizaron en el mismo plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en las cepas TX0016 y TX1330RF A-1 (el cual migra entre 242.5 kb y 291 kb). En la cepa TX1330RF estos genes se encontraron localizados en un plásmido de menor tamaño que migra entre 194 kb y 242.5 kb (Figura 46 panel B y C). La ubicación de

estos dos genes fue posteriormente evaluada por digestión con la enzima I-Ceu-I confirmando de esta forma la localización plasmídica de los genes *fms20* (*pilA*) y *fms21*. Adicionalmente, con el fin de determinar la presencia de estos genes en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente del *E. faecium* la cepa clínica C (C68), este plásmido fue digerido con la enzima EcoRI, los fragmentos obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa, transferidos a una membrana de nylonbN⁺ y posteriormente hibridizados con las sondas *fms 20* y *fms 21* (*pilA*). Igualmente, se detectó la presencia de banda tanto en la hibridización con la sonda *fms 20* como en la sonda *fms 21* (*pilA*), confirmando de esta manera la localización plasmídica de estos genes (Figura 46, panel A).

Figura 46.

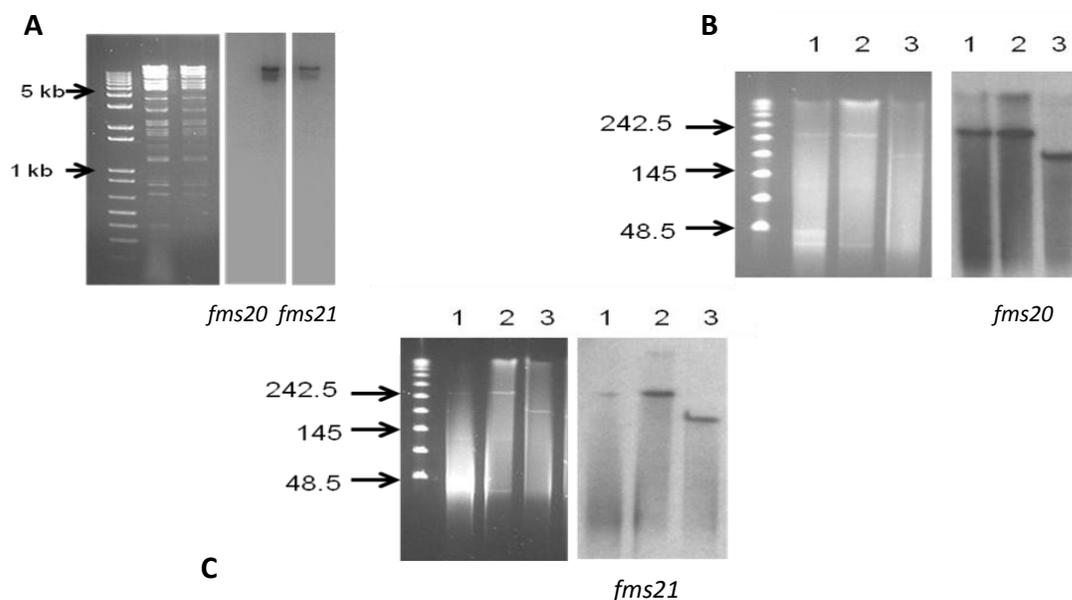


Figura 46. Detección de los genes *fms 20* y *fms21* (*pilA*) en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* (D344SRF C-6) y en la cepa A (TX0016), TX1330RF A-1 y TX1330RF. Panel A. Plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* (proveniente de la transconjugante D344SRF C-6) que fue aislado por medio de gradiente de densidad con cloruro de cesio, digerido con EcoRI y la hibridización se realizó con la sonda dirigida a los genes *fms20* (*pilA*) y *fms21*. **Panel B y C.** Detección de los genes *fms20* y *fms21* (*pilA*) por PFGE-S1 en las cepas: 1. Cepa A (TX0016); 2. TX1330RF A-1; 3. TX1330RF.

Resultados previos de este trabajo mostraron que cepas nosocomiales de *E. faecium* provenientes de orígenes geográficos diferentes poseen un plásmido portador del gen *hyl_{Efm}*, el cual es de gran tamaño, es transferible por conjugación y esta adicionalmente asociado con genes de resistencia a vancomicina y aminoglicósidos. Adicionalmente, este plásmido también es portador de genes implicados en la formación de pili como son *fms 20* y *fms 21(pilA)* los cuales son genes que podrían tener una función relevante como determinantes putativos de virulencia.

Por lo tanto, se evaluó si los aislamientos de *E. faecium* provenientes de los diferentes hospitales de la región Andina también eran portadores de estos genes a nivel plasmídico y si se encontraban localizados junto con los genes *vanA* y *hyl_{Efm}*. Para ello, se estudiaron aislamientos representativos de *E. faecium* resistentes a vancomicina por PFGE-S1 e hibridización con las sondas *fms 20 (pilA)*, *fms 21*, *vanA* y *hyl_{Efm}*. (Tabla 9, Figuras 47 y 48). Se observó que los genes *fms 20 -fms21 (pilA)* siempre se localizaron en plásmidos que migraban entre 60 kb a 242 kb, en algunos casos se detectó la presencia de una sola copia del gen *fms21* y en tres aislamientos provenientes de Perú (P575, P1139, P1986) se encontró la presencia de una copia adicional de gen *fms21* localizado en otro plásmido. Adicionalmente, en tres aislamientos diferentes se determinó que el grupo de genes *fms 20 (pilA)- fms 21* estaban localizados en el mismo plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* (P575, P1190, P2074), estos plásmidos migraron entre 190 kb y 230 kb. También, se identificó la presencia de tres aislamientos diferentes a los descritos previamente los cuales

Tabla 9. Localización plasmídica o cromosomal de los genes *fms20-fms21 (pilA)*, *hyl_{Efm}* y *vanA* en cepas de *E. faecium* resistente a vancomicina provenientes de hospitales de la región Andina

País	Código	Origen	Pulsotipo PFGE	Secuencia tipo (ST)	Plásmido (P) o cromosomal (C) localización				Tamaño estimado del plásmido
					<i>fms20</i>	<i>fms21(pilA)</i>	<i>hyl_{Efm}</i>	<i>vanA</i>	
Perú	P575	Orina	G	280	+	+	+	+	<i>hyl_{Efm}, fms20-21</i> (~ 190kb) <i>fms21</i> (~70 kb) <i>vanA</i> (~ 60 kb)
	P1123	Sangre	B	412	+	+	-	+	<i>fms20-21</i> (~ 70 kb) <i>vanA</i> (~ 48 kb)

Perú	P1137	Herida	E	18	-	-	-	+ (P)	<i>vanA</i> (~ 60 kb)
	P1139	Orina	F	280	+ (P)	+ (P)	-	+ (P)	<i>fms20-21</i> (~ 190 kb) <i>fms21</i> (~ 70 kb) <i>vanA</i> (<48 kb)
	P1140	Herida Qx	A	412	+ (P)	+ (P)	-	+ (P)	<i>fms20-21, vanA</i> (~ 60kb)
	P1190	Sangre	E	125	+ (P)	+ (P)	+ (P)	+ (P)	<i>hyl_{Efm}, fms20-21</i> (~ 23kb) <i>vanA</i> (~ 60 kb)
	P1985	Urine	B	412	+ (P)	+ (P)	-	+ (P)	<i>fms20-21</i> (~ 200 kb) <i>vanA</i> (~ 48 kb)
	P1986	Sangre	J	494	+ (P)	+ (P)	-	+ (C)	<i>fms20-21</i> (~ 80 kb) <i>fms21</i> (~ 60 kb)
	P2022	Absceso	H	282	+ (P)	+ (P)	-	+ (P)	<i>fms20-21</i> (~ 75 kb) <i>vanA</i> (~ 60 kb)

P2074	Sangre	F	ND ^a	+	(P)	+	(P)	+	(P)	+	(P)	<i>hyl_{Efm}, fms20-21</i> (~ 220 kb) <i>vanA</i> (~ 70 kb)
Colombia												
C497	Sangre	C	18	-	-	+	(P)	+	(P)	<i>hyl_{Efm}, vanA</i> (~160 kb)		
C621	L.Per	A	412	-	+	(P)	-	+	(P)	<i>fms21, vanA</i> (~ 60 kb)		
C1688	Sangre	C	ND ^a	+	(P)	+	(P)	-	+	(C)	<i>fms20-21</i> (~ 180 kb)	
C1904	Sangre	E	ND ^a	-	-	+	(P)	+	(P)	<i>hyl_{Efm}, vanA</i> (~160 kb)		
C1910	Orina	C	18	+	(P)	+	(P)	-	+	(P)	<i>fms20-21</i> (~ 180 kb) <i>vanA</i> (~ 48 kb)	
Ecuador												
E417	Sangre	D	17	+	(P)	+	(P)	-	+	(P)	<i>fms20-21</i> (~ 180 kb) <i>vanA</i> (< 48kb)	
E422	Orina	I	203	+	(P)	+	(P)	-	+	(C)	<i>fms20-21</i> (~ 70 kb)	

Venezuela

V689	Herida	A	412	+	(P)	+	(P)	-	+	(P)	<i>fms20-21, vanA</i> (~ 60 kb)
	Qx										
V2216	Absceso	A	ND ^a	+	(P)	+	(P)	-	+	(P)	<i>fms20-21, vanA</i> (~ 70 kb)
	abd										

^aND, No determinado: no se realizó MLST debido a que el aislamiento presentaba un patrón de electroforésis altamente relacionado

presentaban el gen *vanA* en el mismo plásmido portador de *fms20-fms21(pilA)* (P1140, V689, V2216). Sin embargo, no se encontró ningún aislamiento que presentara los genes *vanA*, *hyl_{Efm}* y *fms 20 fms 21(pilA)* en el mismo plásmido (Tabla 9, Figuras 47 y 48). Tomando en conjunto estos resultados se encontró la presencia de los genes *fms20-fms21* en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en la cepa A (TX0016) así como también se identificó su localización plasmídica en cepas de *E. faecium* provenientes de hospitales en la región Andina; de la misma forma estos genes se vieron asociados con el gen *vanA*.

Figura 47.

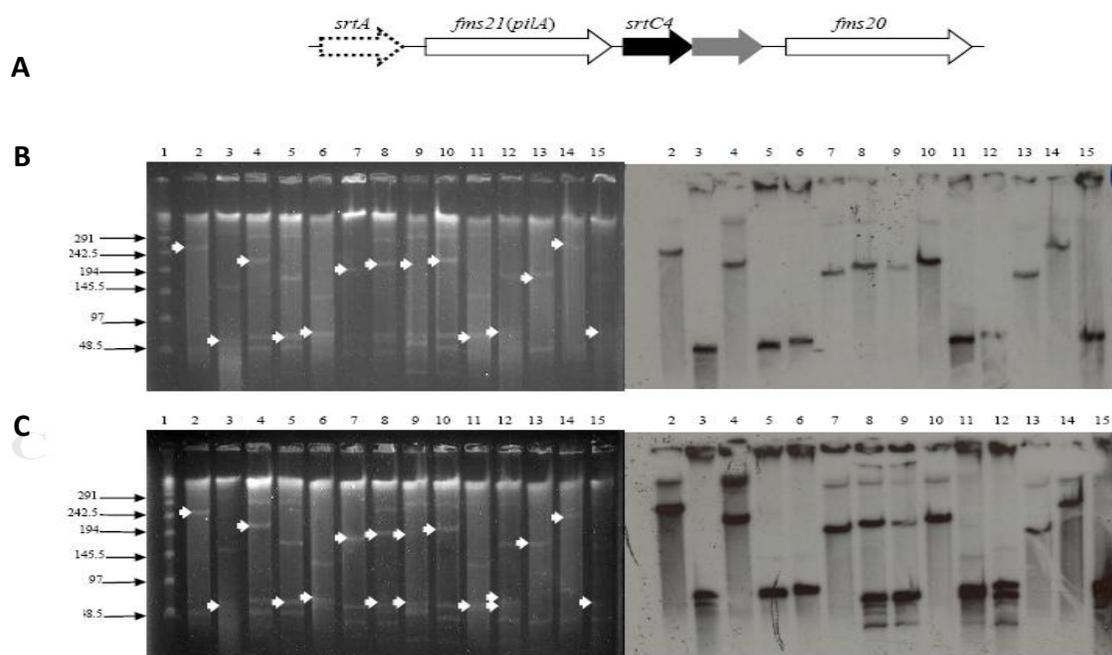


Figura 47. Resultados de PFGE-S1 de los plásmidos portadores de los genes *fms20* y *fms21 (pilA)* en aislamientos representativos de *E. faecium* provenientes de hospitales de la Región Andina en Sur America. Panel A. Figura de la organización genética de los genes *fms20* y *fms 21(pilA)* en *E. faecium* la cepa A (TX0016). Este locus presenta un gen (*srtC4*) que codifica para una sortasa putativa C y un gen que codifica para una sortasa A (*srtA*)(177). **Panel B.** PFGE-S1 de los aislamientos de *E. faecium* (panel de la izquierda) e hibridización con el gen *fms20* (panel de la derecha). 1. Marcador molecular lambda; 2. Cepa A (TX0016); 3. Cepa B (ERV99); 4. P1985 (Perú); 5. P1123 (Perú); 6.P2022 (Perú); 7.E417 (Ecuador); 8. P1139 (Perú); 9. P575 (Perú); 10. P2074 (Perú); 11. E422 (Ecuador); 12.P1986 (Perú); 13 C1688 (Colombia); 14. Cepa A (TX0016); 15. V2216 (Venezuela). Los plásmidos se muestran como bandas linealizadas en el gel y las flechas indican los plásmidos que fueron hibridizados con la sonda *fms20*. **Panel C.** PFGE-S1 de los aislamientos de *E. faecium* (panel de la izquierda) e hibridización con el gen *fms 21(pilA)* (panel de la derecha). Se presenta la misma organización del gel que el panel B.

Figura 48.

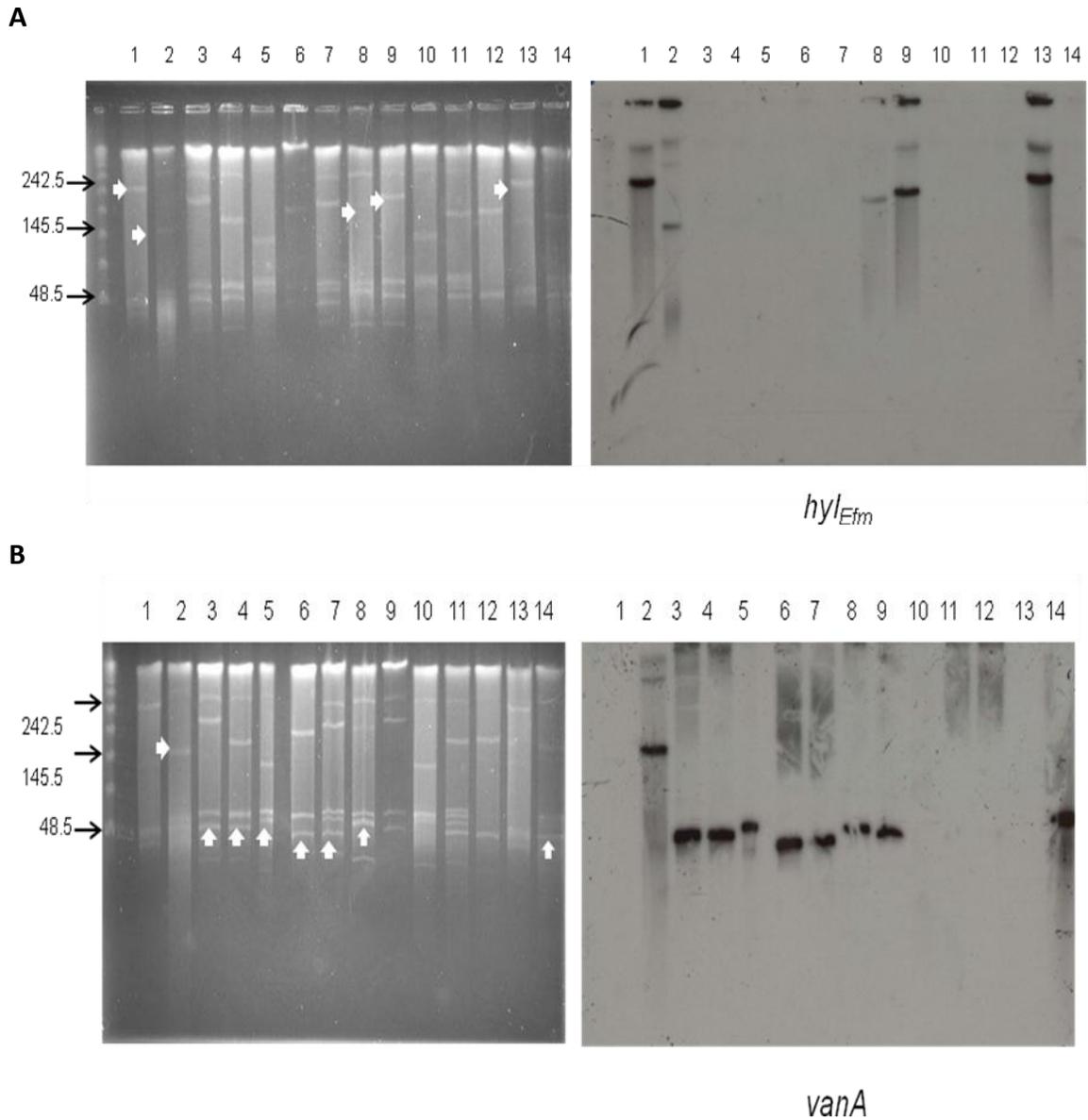


Figura 48. Resultados de PFGE-S1 de los plásmidos portadores de los genes *fms20* y *fms21* (*pilA*) en aislamientos representativos de *E. faecium* provenientes de hospitales de la Región Andina. Panel A. PFGE-S1 de los aislamientos de *E. faecium* (panel de la izquierda) e hibridización con el gen *hyl_{Efm}* (panel de la derecha). 1. Marcador molecular lambda; 2. Cepa A (TX0016); 3. Cepa B (ERV99); 4. P1985 (Perú); 5. P1123 (Perú); 6. P2022 (Perú); 7. E417 (Ecuador); 8. P1139 (Perú); 9. P575 (Perú); 10. P2074 (Perú); 11. E422 (Ecuador); 12. P1986 (Perú); 13. C1688 (Colombia); 14. Cepa A (TX0016); 15. V2216 (Venezuela). Los plásmidos se muestran como bandas linealizadas en el gel y las flechas indican los plásmidos que fueron hibridizados con la sonda *hyl_{Efm}*. Panel B. PFGE-S1 de los aislamientos de *E. faecium* (panel de la izquierda) e hibridización con el gen *vanA* (panel de la derecha). Se presenta la misma organización del gel que el panel A.

20. DISCUSIÓN CAPÍTULO IV

En este trabajo se evaluó la epidemiología molecular de aislamientos de *E. faecium* resistentes a vancomicina provenientes de diferentes hospitales en Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela recolectados a partir del primer estudio prospectivo multicéntrico y multinacional en la región Andina. Los resultados obtenidos indican que la prevalencia de la resistencia a vancomicina es relativamente baja en todos los países evaluados, se encontró únicamente en el 6 % de los aislamientos estudiados en este trabajo; comparado con la prevalencia de 33 % reportada en Estados Unidos (92) y en Europa con porcentajes que varían entre 1 % a >30 % (363).

Se observó una frecuencia alta para ampicilina del 50 % para los aislamientos provenientes de Venezuela y del 90 % para los aislamientos de Perú; resultados similares se observaron con ciprofloxacina concentrándose el porcentaje más bajo de resistencia de la región Andina en Venezuela (58 %) y el porcentaje más alto en Perú (93 %). Por otro lado, los niveles de resistencia a vancomicina fueron bastantes similares en Colombia (24 %), Ecuador (29 %) y Venezuela (25 %); sin embargo, en Perú se presentó un mayor porcentaje de resistencia (48 %) comparado con los otros países de la región. Claramente, se identifica un porcentaje de resistencia mayor en todos los antibióticos evaluados en los aislamientos de *E. faecium* provenientes de este país. Los resultados obtenidos en este estudio son de gran relevancia puesto que permiten generar los primeros datos de resistencia a antibióticos en esta zona geográfica del continente, en la cual no se habían realizado vigilancias epidemiológicas de este tipo.

Así mismo, los aislamientos colombianos de *E. faecium* evaluados en esta vigilancia presentaron frecuencias de resistencia bastante altas para ampicilina (76 %) seguido de ciprofloxacina (61 %), HLR-STR (44 %), HLR-GEN (34 %) y vancomicina y teicoplanina (24 %). Adicionalmente, se encontraron frecuencias de resistencia bajas a cloranfenicol (7 %) y no se encontraron aislamientos de *E. faecium* resistentes a linezolid. Por otro lado, un estudio multicéntrico de vigilancia en bacterias Gram-positivas en Colombia realizado durante el año 2001 al 2002 que incluyó 15 hospitales colombianos informó un 39 % de resistencia a vancomicina en *E. faecium* (123); mientras que los hallazgos provenientes de un estudio descriptivo sobre una cohorte de vigilancia epidemiológica a partir de aislamientos bacterianos de 14 instituciones hospitalarias en Bogotá (pertenecientes al red para el control de la resistencia en Bogotá, GREBO) señaló que la resistencia a vancomicina en *E. faecium* disminuyó del 14% en el año 2001 a 9% en el año 2002 y para el año 2003 descendió al 3% (364). Es probable que estos hallazgos de disminución de la resistencia a vancomicina en aislamientos de *E. faecium* en Colombia se deban a un mejor método de detección de la resistencia a este antibiótico en los hospitales, gracias al fomento de la educación, capacitación y así mismo a la concientización del personal de salud implicado en la detección y el tamizaje de la resistencia a los antimicrobianos en las entidades hospitalarias; por otra parte, es posible que la reducción observada en la resistencia a vancomicina en Colombia sea consecuencia del aumento en el número de hospitales evaluados generando de esta manera una disminución de la prevalencia la cual

representa de una forma más real los eventos que están sucediendo actualmente en los hospitales colombianos.

En la caracterización genotípica se observó que los aislamientos de *E. faecium* de la región Andina pertenecen al CC17 y especialmente se identificaron los ST412, ST18, ST17, ST282, ST203, ST125 con mayor prevalencia del ST412 y el ST18. De la misma forma, también se ha reportado la presencia de este CC17 en el continente suramericano en países como Brasil, Chile y Paraguay (27, 174, 175). En Brasil se ha detectado la presencia de algunas cepas pertenecientes al ST17 (27), así como también se han identificado quince ST asociados a seis complejos clonales (el ST114 fue encontrado en mayor proporción) los cuales no se agruparon en el CC17 (365). Por otro lado, en Chile se ha reportado la presencia de aislamientos que correspondían a *E. faecium vanB2* portador del transposón Tn5382 los cuales pertenecían al CC17 y con total predominio del ST64 (175); mientras que en Paraguay, los aislamientos identificados fueron *E. faecium vanA* portadores del Tn1546, pertenecían a los ST78, ST132 y ST210: con mayor prevalencia del ST78 e igualmente se reportó un nuevo tipo ST438 que no pertenecía al CC17 (174).

En los aislamientos de la región Andina también se encontró la presencia de los cuatro grupos de genes que codifican para las proteínas de superficie MSCRAMM (especialmente el grupo de genes *ebp_{Efm}* y los *fms 11-19-16*) y de una forma moderada la presencia de *hyl_{Efm}*, así como también se detectaron altos niveles de resistencia a ampicilina. Estos resultados son similares a los reportados recientemente en un estudio realizado por Galloway y colaboradores, en el cual se evaluó la presencia de las proteínas MSCRAMM

en aislamientos de *E. faecium* provenientes de diversos hospitales de Estados Unidos (146). Este estudio indicó que los *E. faecium* CC17 han circulado en este país desde 1982, este genogrupo ancestral de *E. faecium* fue inicialmente caracterizado por la gran proporción de genes *fms*, y posteriormente adquirió determinantes de virulencia como *esp_{Efm}*, *hyl_{Efm}* y el grupo de genes *van* (146). Así mismo, estos aislamientos presentaron altos niveles de resistencia a ampicilina con una CIM > 64 µg/ml, la cual aumentó progresivamente con el tiempo (146). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo permiten sugerir que los aislamientos de *E. faecium* provenientes de la región Andina presentan características similares a los aislamientos de *E. faecium* obtenidos de los hospitales de Estados Unidos durante la década de los ochenta. Adicionalmente, es posible que los aislamientos de *E. faecium* de nuestra región puedan diseminarse y establecerse a nivel nosocomial debido a la presencia de los determinantes de virulencia y resistencia.

Se ha visto que las proteínas asociadas a la biogénesis del pili podrían presentar un papel importante en la patogénesis del *E. faecium* y dentro de ellas se han podido identificar la presencia del locus *fms20* y *fms 21 (pilA)* en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* en la cepa A *E. faecium* (TX0016), en la transconjugante TX1330RF A-1 y en la cepa TX1330RF que portaba un plásmido diferente al plásmido *hyl_{Efm}*. Estos genes *fms20* y *fms 21 (pilA)* codifican para proteínas de tipo pili, estructura localizada en la superficie celular compuesta por trímeros formados por una subunidad mayor y dos subunidades menores que presentan en el dominio N- terminal un péptido señal y en el C- terminal un motivo

de LPXTG. Estas proteínas en enterococos han sido implicadas en la patogénesis experimental de endocarditis así como también en la infección urinaria (223, 359). Por lo tanto, era importante estudiar si los genes *fms20- fms 21 (pila)* se encontraban presentes en plásmidos en las cepas provenientes de la región Andina, así como también determinar si co-existían con los genes *hyl_{Efm}* y con el gen *vanA* como previamente se había demostrado en la cepa A (TX0016), TX1330RF A-1, TX1330RF. Los resultados de hibridación de colonias y PFGE-S1 mostraron la presencia del *fms20* y *fms 21 (pila)* en la mayoría de los aislamientos estudiados y en algunos aislamientos se observó la co-existencia de estos genes en el mismo plásmido junto con los genes *vanA* y *hyl_{Efm}*, hallazgos que generan evidencia que la diseminación de plásmidos portadores de determinantes de virulencia y resistencia podría ser una estrategia adoptada por ciertos linajes hospitalarios de *E. faecium*.

Los datos de los aislamientos provenientes de una vigilancia multinacional, multicéntrica de tipo prospectivo en la región Andina indican que la prevalencia de *E. faecium* es aún baja en los aislamientos clínicos; sin embargo, los análisis moleculares señalan que la genética de poblaciones de *E. faecium* circulantes en la región norte de Suramérica (región Andina) es similar a la tendencia observada en aislamientos recuperados hace 25 años en hospitales de Estados Unidos; postulando de esta manera la posibilidad de que estos microorganismos se diseminen a través de la expansión clonal de genogrupos de tipo hospitalarios, los cuales son capaces de transferir determinantes de virulencia y resistencia.

20. CONCLUSIONES CAPÍTULO IV

1. Los porcentajes de resistencia más altos en los aislamientos de *E. faecium* provenientes de hospitales de la región Andina se encontraron para ampicilina, ciprofloxacina, HLR-GEN, HLR-STR, además no se encontró resistencia a linezolid.
2. Los aislamientos de *E. faecium* provenientes de hospitales en Perú presentaron los porcentajes más altos de resistencia a ampicilina, ciprofloxacina, HLR-Gen, HLR-STR en la región.
3. Los aislamientos de *E. faecium* provenientes de la región Andina pertenecen al CC17 con predominio del ST 412.
4. Los genes *fms20-fms21 (pilA)* se encuentran localizados en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente del *E. faecium* TX0016.
5. Los genes *fms20-fms21 (pilA)* se encuentran localizados en el plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* proveniente del *E. faecium* D344SRF C-6.
6. Los genes *fms* se encuentran presentes en gran proporción en los aislamientos de *E. faecium* provenientes de la región Andina con presencia del operón *ebpABC* y *fms 11, 19 y 16* en todos los aislamientos.
7. Los genes *fms20-fms21(pilA)* se encuentran localizados en plásmidos en todos los aislamientos de *E. faecium* resistente a vancomicina evaluados.
8. Algunas cepas de *E. faecium* presentaron el gen *vanA* y los genes *fms20* y *fms21 (pilA)* en el mismo plásmido.

9. En algunas cepas de *E. faecium* el gen *hyl_{Efm}* y los genes *fms20* y *fms21* (*pilA*) se encontraron que co-existen en el mismo plásmido.

21. PERSPECTIVAS Y APLICACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de este trabajo se plantean propuestas y nuevas preguntas a desarrollar las cuales se presentan por cada capítulo de los resultados descritos:

Capítulo I: El plásmido portador del gen *hyl*_{Efm} se co-transfiere con genes de resistencia a antibióticos en diferentes cepas de *E. faecium*

1. Evaluar la localización específica de los genes de resistencia en los plásmidos presentes tanto de las cepas donadoras [Cepa A (TX0016), Cepa B (ERV99), Cepa C (C680)] como en las transconjugantes (TX1330RF A-1, TX1330RF B-1, TX1330RF B-2 y D344SRF C-6) puesto que en este trabajo se realizó utilizando digestión con la enzima SmaI y PFGE y se compararon los perfiles obtenidos. Esta aproximación permite digerir DNA o plásmidos que tenga el sitio de corte para SmaI, siendo una alternativa el uso de una enzima como la nucleasa S1, la cual no corta en un sitio específico y por lo tanto es muy útil para la linearización y estimación del tamaño de plásmidos sin necesidad de conocer la secuencia del mismo. Para ello, se puede complementar los experimentos descritos en este documento con ensayos adicionales con PFGE-S1 e hibridización con las diferentes sondas correspondientes a los genes de resistencia evaluados en este trabajo [*erm*(B), *ant*(6')-I, *vanA*, *aac* (6')-aph(2'')]. Estos resultados se podrían comparar con los presentados previamente y fácilmente correlacionarlos con los obtenidos con PFGE-S1 e hibridización con la sonda *hyl*_{Efm}.

Capítulo 2: El plásmido portador del gen *hyl_{Efm}* tiene un efecto en virulencia en los modelos animales de peritonitis en infección urinaria.

1. Debido a que el $pHyl_{Efm}$ ha mostrado un papel importante en virulencia tanto en el modelo de peritonitis como el en modelo de infección urinaria, el siguiente paso es realizar la evaluación de las cepas derivadas de TX1330RF (sin presencia del $pHyl_{Efm}$) y TX1330RF A-1 ($pHyl_{Efm}$) en el modelo de endocarditis, puesto que los enterococos son causa importante de endocarditis infecciosa. Los genes de la región *hyl_{Efm}* podrían presentar un papel en la captación de fuentes de carbohidratos para la bacteria, independiente del sitio de infección. Para ello, se implementaría el modelo experimental de endocarditis en rata, el cual se basa en la localización de un catéter intravascular el cual se inserta en el ventrículo izquierdo y posteriormente un inóculo bacteriano es aplicado. Los animales se sacrifican a las 72 horas y las vegetaciones provenientes del corazón son cultivadas con el fin de recuperar y evaluar las bacterias con las cual se infecta cada animal.

2. La secuenciación de $pHyl_{Efm}$ se hace cada vez más relevante puesto que la presencia de este plásmido constituye un mecanismo muy adecuado para que *E. faecium* aumente su potencial patogénico. Es por ello, que el análisis y anotación de la secuencia del $pHyl_{Efm}$ proveniente de la cepa A (TX0016) es una prioridad para la continuidad de este proyecto. Una vez terminado este primer proceso se confirmaría la presencia de por lo menos 25 genes de una forma experimental, para ello se escogería un gen cada 20 kb del plásmido y

se realizaría PFGE-S1 con hibridación empleando sondas para los 25 genes seleccionados. Adicionalmente, con esta secuencia se podrá identificar nuevos genes y de esta manera se podrá definir regiones de interés en el pHyl_{Efm} las cuales puedan ser evaluadas por medio de mutagénesis. Sería interesante también secuenciar el pHyl_{Efm} proveniente de la cepa colombiana B de *E. faecium* (ERV99), el cual presenta en este plásmido no solo el gen *hyl_{Efm}* sino genes de resistencia a antibióticos como vancomicina y gentamicina.

Capítulo 3: mutantes en la región *hyl_{Efm}* presentan un efecto de atenuación en la virulencia de *E. faecium*

1. Debido a los resultados obtenidos con la mutante de seis genes en la región *hyl_{Efm}* y a la mutante por interrupción del gen *hyl_{Efm}*, es necesaria la creación de mutantes adicionales que permitan contribuir al entendimiento del papel de la region *hyl_{Efm}* en la patogénesis del *E. faecium*. Especialmente, es importante construir deleciones no polares del gen *hyl_{Efm}*, del gen *hip* y de toda la región *hyl_{Efm}* utilizando para ello el sistema de contra-selección sin marcación (PheS*) desarrollado en este trabajo.

De acuerdo a los resultados que se obtengan con las mutantes del gen *hyl_{Efm}* o del gen *hip* o deleción de los dos genes de sería relevante la evaluación del papel bioquímico de Hyl_{Efm} o de Hip por producción y purificación de estas proteínas. Una vez obtenida la proteína recombinante Hyl_{Efm} se evaluaría su actividad con diferentes sustratos con el fin

de comprobar experimentalmente la actividad de glicosil hidrolasa de la familia 84; esto debido a que estas enzimas tienen un papel importante en el metabolismo de carbohidratos. En eucariotas y procariotas la degradación de enlaces glicosídicos es un paso implicado en procesos biológicos de regulación, es así como la proteína Spy1600 (la cual presenta homología con Hyl_{Efm}) ha mostrado que se sobreexpresa durante la fagocitosis en los PMN lo cual podría contribuir para que *S. pyogenes* pueda evadir la respuesta inmune humana. Por lo tanto, sería interesante determinar si Hyl_{Efm} (o otras proteínas) podrían interferir en la función de los PMN *in vivo* removiendo carbohidratos de las proteínas en los PMN, para este fin se evaluaría el papel de las cepas portadoras de pHyl_{Efm} por un ensayo de fagocitosis así como también se determinaría la expresión de los genes durante la infección de los PMN.

2. En este trabajo también se detectó la presencia de los genes *fms20-fms21 (pilA)* implicados en la formación del pili localizados en el pHyl_{Efm} proveniente de la cepa A *E. faecium* (TX0016). Por lo cual estos genes se convierten en un blanco interesante de estudio para la creación de mutantes puesto que la presencia de este tipo de adhesinas le darían una ventaja adicional al *E. faecium* en el proceso de colonización.

3. Es necesario también investigar la regulación transcripcional de la región *hyl_{Efm}* con el fin de determinar las condiciones adecuadas para la expresión de los genes y determinar si se transcriben con uno o varios promotores. La organización de esta región sugiere que

probablemente son transcritos por una unidad transcripcional regulada posiblemente por un sistema de dos componentes localizados en la región 5 de este grupo de genes (Figura 1). Para ello, se pueden realizar RT-PCR utilizando diferentes iniciadores que permitan definir si estos genes son co-transcritos, resultados que se confirmarían con Northern blot utilizando sondas para cada uno de los genes pertenecientes a esta región. Adicionalmente, se realizarían estudios *in silico* para determinar posibles promotores en esta región lo cual se confirmaría por ensayos experimentales de fusión con el gen de β -galactosidasa; una vez definido el promotor o los promotores se evaluaría el sitio inicial de la transcripción utilizando la técnica de “primer extension”. Igualmente, es importante evaluar las condiciones de expresión incluyendo la medición de los transcritos por medio de qRT-PCR en presencia de suero o diferentes sustratos. La expresión *in vivo* también podría ser evaluada a partir del líquido peritoneal obtenido de ratones infectados vía intra-peritoneal.

4. La complementación de la mutante de seis genes utilizando para ello la introducción de los genes mutados utilizando el plásmido pCJK47Gen previamente desarrollado en este trabajo sería una nueva estrategia implementar. Para ello se reemplazaría el gen *cat* presente en la mutante con los genes delecionados siendo la ventaja de esta aproximación la restauración del genotipo en su ambiente natural, mientras que la presencia de los genes en *trans* clonados en un plásmido como lo es pAT392 es una aproximación menos fisiológica, puesto que las condiciones de expresión de un gen o

genes no son totalmente iguales a las que se obtienen cuando un gen esta que en su entorno natural.

Anexo A. Iniciadores utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5'-3'	Amplicón	Características relevantes	Referencia
A	gaagatctgagataggttatgcaagat	1089bp	Sentido, sitio Nsil (subrayado). Utilizado para la amplificación de <i>aph-2'' ID</i> .	Este trabajo
B	ccaatgcatgattccggattctaaaaaagg		Anti-sentido, sitio BgIII (subrayado). Utilizado para la amplificación de <i>aph-2'' ID</i>	Este trabajo
C	cgggatccgtttaaaaccagctggaaaag	977bp	Sentido, sitio BamHI (subrayado). Localizado 1251 nucleótidos corriente arriba del codón de iniciación del gen putativo para la GH20 (Figura1)	Este trabajo
D	ccgctcgagcaattcaacattgcaaagac		Anti-sentido, sitio XhoI (subrayado). Localizado 274 nucleótidos corriente arriba del codón de iniciación del gen putativo para la *GH20 (Figura1)	Este trabajo
E	cgagggccctgaagtattgccagatgt	999bp	Sentido, sitio ApaI (sub-rayado). Localizado 591 nucleótidos corriente abajo del gen <i>hip</i> (Hipotético, Figura1)	Este trabajo
F	ccggaattcaaaagcagaattggaaatca		Anti-sentido, sitio EcoRI (sub-rayado). Localizado 1570 nucleótidos corriente abajo del gen <i>hip</i> (Hipotético, Figura1)	Este trabajo
G	gcgagctcgattactttcaaaggaga	1685bp	Sentido, sitio SacI (sub-rayado), **RBS de <i>hyl_{Efm}</i> , (cursiva)	Este trabajo
H	tccccgggctaacttttgataatttgctc		Anti-sentido, sitio SmaI (sub-rayado), codón de terminación del gen <i>hyl_{Efm}</i> , (cursiva)	Este trabajo
I	gcgagctcgagcaaatatcaaaag	933bp	Sentido, sitio SacI (sub-rayado), corriente arriba del gen <i>hip</i>	Este trabajo
J	tccccgggttagcgattgatcgagc		Anti-sentido, sitio SmaI (sub-rayado), codón de terminación del gen <i>hip</i> (cursiva)	Este trabajo
K	ttccaatcatgtcctgtac	698bp	Sentido, utilizado para RT-PCR nucleótidos 169 a 187 del gen <i>hyl_{Efm}</i>	Este trabajo
L	tgctaagatattccttactcg		Anti-sentido, utilizado para RT-PCR nucleótidos 865 a 844 del gen <i>hyl_{Efm}</i>	Este trabajo

M	ttctgaaacatgaacatca	277bp	Sentido, detección del gen <i>hyl_{Efm}</i>	Este trabajo
N	tcaatatcattccaggaactaa		Anti-sentido, detección del gen <i>hyl_{Efm}</i>	Este trabajo
<i>ermBF</i>	cgaaattggaacaggtaaag		Sentido, producción de una sonda para la detección del gen de resistencia a eritromicina	Secuencia TX0016
<i>ermBR</i>	attgaccattttgaaacaa		Anti-sentido, producción de una sonda para la detección del gen de resistencia a eritromicina	Secuencia TX0016
<i>aac(6')</i> <i>aph(2'')</i> F	tgatgatttcctttgatgt	1376bp	Sentido, producción de una sonda para detección del gen de resistencia a gentamicina	(4)
<i>aac(6')</i> - <i>aph(2'')</i> R	caatctttataagtcctttt		Anti-sentido, producción de una sonda para detección de resistencia a gentamicina	(4)
<i>ant(6)-IF</i>	actggcttaatacaattggg	578bp	Sentido, producción de una sonda para detección de resistencia a estreptomina	(4)
<i>ant(6)-IR</i>	gccttccgccacctcaccg		Anti-sentido, producción de una sonda para detección de resistencia a estreptomina	(4)
<i>vanAF</i>	gggaaaacgacaattgc	732bp	Sentido, producción de una sonda para la detección de resistencia a vancomicina	(309)
<i>vanAR</i>	gtacaatgcgccgctta		Anti-sentido, producción de una sonda para la detección de resistencia a vancomicina	(309)
<i>ddl EfmF</i>	tagagacattgaatatgcc	550bp	Sentido, determinación de especie en <i>E. faecium</i>	(309)
<i>ddl EfmR</i>	tcgaatgtgctacaatc		Anti-sentido, determinación de especie en <i>E. faecium</i>	
<i>catF</i>	ttgaaccaacaaacgactt	537bp	Sentido, amplificación del gen <i>cat</i> a partir del pTX5501-TS-Mob+	Este trabajo
<i>catR</i>	caatcctgcatgataacca		Anti-sentido, amplificación del gen <i>cat</i> a partir del pTX5501-TS-Mob+	Este trabajo
MSCF	gccgataactaaacgaaataaacg		Sentido, localizado en el vector pTEX5501-TS-Mob+	
MSCR	gacaatactgataagataatatac		Anti-sentido, localizado en el vector pTEX5501-TS-Mob+	
<i>fms1F</i>	accaaagccagacgaaatagaagaag	898bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms1R</i>	attgttttggtcaggtgcatcataga		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms5F</i>	atgtttaccgcagaagcaac	766bb	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms5R</i>	acttgatccgttggtgtt		Hibridización de colonias	(146)

<i>fms9F</i>	gaggagacagcagctcaag	1674bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms9R</i>	tgtaccttgtgtttatttgta		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms10F</i>	gaaacatacattcctaaagacctgg	921bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms10R</i>	accattgtcgtgataaaatatt		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms11F</i>	tgctaaccaaacgacagaggagac	832bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms11R</i>	ttgtgcaaagaatagcccgttac		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms13F</i>	gaagaagtcgcacaaaaac	1494bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms13R</i>	tgaccgcgtttcatattcg		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms14F</i>	ctggcgaaattacgactatgctacta	924bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms14R</i>	gtcgttttattatctctcttttac		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms15F</i>	gagcttttagcagaacagccagagcfg	1734bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms15R</i>	tcgattgtcactattcacaag		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms16F</i>	gccgtatcacctacaccag	1206bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms16R</i>	gattccttaggttggttattc		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms17F</i>	atgaaaatgatggcttggtc	828bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms17R</i>	ggatgatgacctgattctc		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms18F</i>	attgatgtggaactgaggg	1227bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms18R</i>	tccttctggagcctctact		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms19F</i>	gtgtggaagacgcacaaaaga	350bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms19R</i>	gggactttatccccatctgc		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms20F</i>	cattgtttgggttaaaaacag	804bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms20R</i>	tcagcttagagcttctcct		Hibridización de colonias	(146)
<i>fms21F</i>	cttattggaatgttagaatcat	758bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>fms21R</i>	tcagtagcagctgctttcc		Hibridización de colonias	(146)
<i>espEfmF</i>	ttgtaatgctagtccacgacc	945bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>espEfmR</i>	gcgtcaacacttgattgccga		Hibridización de colonias	(146)
<i>acmF</i>	caggcagagatatcagcag	1474bp	Hibridización de colonias	(146)
<i>acmR</i>	attctcatttgaacgactagc		Hibridización de colonias	(146)

*GH, Glicosil hidrolasa ** RBS, Sitio de unión al ribosoma

23. BIBLIOGRAFIA

1. Murray BE. The life and times of the Enterococcus. Clin Microbiol Rev. 1990 Jan;3(1):46-65.
2. Facklam RR, CM, Teixeira LM. History, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: Gilmore MS, CD, Courvalin, P., Dunny GM., Murray BE., Rice, LB, editor. The Enterococci, Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. Washington: ASM press; 2002. p. 1-54.
3. Ruoff KL, de la Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1990 Mar;28(3):435-7.
4. Gordon S, Swenson JM, Hill BC, Pigott NE, Facklam RR, Cooksey RC, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. J Clin Microbiol. 1992 Sep;30(9):2373-8.
5. Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, Biedenbach DJ, Jones RN. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007 Jun;58(2):163-70.
6. Iwen PC, Kelly DM, Linder J, Hinrichs SH, Dominguez EA, Rupp ME, et al. Change in prevalence and antibiotic resistance of Enterococcus species isolated from blood cultures over an 8-year period. Antimicrob Agents Chemother. 1997 Feb;41(2):494-5.
7. NNIS. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999. Am J Infect Control. 1999;6:520-32.
8. Treitman AN, Yarnold PR, Warren J, Noskin GA. Emerging incidence of Enterococcus faecium among hospital isolates (1993 to 2002). J Clin Microbiol. 2005 Jan;43(1):462-3.
9. Fontana R, Amalfitano G, Rossi L, Satta G. Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci. Clin Infect Dis. 1992 Sep;15(3):486-9.
10. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. Clin Infect Dis. 2000 Aug;31(2):586-9.
11. Bradley CR, FA. Heat and chemical resistance of enterococci. J Hosp Infect. 1996;34:191-6.
12. Wendt C, Wiesenthal B, Dietz E, Ruden H. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. J Clin Microbiol. 1998 Dec;36(12):3734-6.
13. Neely AN, Maley MP. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabrics and plastic. J Clin Microbiol. 2000 Feb;38(2):724-6.
14. Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Apr;52(3):297-308.
15. Clewell DB. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1990 Feb;9(2):90-102.
16. Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. Cell. 1993 Apr 9;73(1):9-12.
17. Osborn AM, da Silva Tatley FM, Steyn LM, Pickup RW, Saunders JR. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. Microbiology. 2000 Sep;146 (Pt 9):2267-75.
18. Hallgren A, Abednazari H, Ekdahl C, Hanberger H, Nilsson M, Samuelsson A, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul;48(1):53-62.
19. Arias CaM, BE. Enterococcus species, *Streptococcus bovis* Group, Leuconostoc Species. In: Mandel.G.L, editor. Principles and practices of infectious diseases, 7th edition. Philadelphia Churchill livingstone, Elsevier; 2009. p. 2643-53.
20. Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance. Curr Opin Microbiol. 2009 Oct;12(5):476-81.
21. Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. Infect Immun. 2008 Sep;76(9):4120-8.
22. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, *hyl_{Efm}* predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. J Infect Dis. 2003 Feb 1;187(3):508-12.

23. Rice LB, Lakticova V, Carias LL, Rudin S, Hutton R, Marshall SH. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. *J Infect Dis.* 2009 Feb 1;199(3):342-9.
24. 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 Oct;42(10):4473-9.
25. Willems RJ, van Schaik W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future Microbiol.* 2009 Nov;4:1125-35.
26. Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):454-60.
27. Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis.* 2005 Jun;11(6):821-8.
28. Leavis HL, Willems RJ, van Wamel WJ, Schuren FH, Caspers MP, Bonten MJ. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog.* 2007 Jan;3(1):e7.
29. Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheuevel M, Tribe D, Manziros X, et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet.* 2001 Mar 17;357(9259):853-5.
30. Torell E, Kuhn I, Olsson-Liljequist B, Haeggman S, Hoffman BM, Lindahl C, et al. Clonality among ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in Sweden and relationship with ciprofloxacin resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Oct;9(10):1011-9.
31. Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol.* 2004 Feb;186(3):672-82.
32. Werner G, Klare I, Spencker FB, Witte W. Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric ward of a German hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jul;52(1):113-5.
33. Hendrickx AP, van Wamel WJ, Posthuma G, Bonten MJ, Willems RJ. Five genes encoding surface-exposed LPXTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex 17 isolates. *J Bacteriol.* 2007 Nov;189(22):8321-32.
34. Sillanpaa J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and Pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2009 Apr;47(4):896-901.
35. Turner KM, Hanage WP, Fraser C, Connor TR, Spratt BG. Assessing the reliability of eBURST using simulated populations with known ancestry. *BMC Microbiol.* 2007;7:30.
36. Schleifer. KH, and R. Kilpper. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev.as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. *Int JSyst Bacteriol.* 1984;34:31-4.
37. Thiercelin ME. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogen. *CR Soc Biol.* 1899;5:269-71.
38. Maccallum WG, Hastings TW. A Case of Acute Endocarditis Caused by *Micrococcus Zymogenes* (Nov. Spec.), with a Description of the Microorganism. *J Exp Med.* 1899 Sep 1;4(5-6):521-34.
39. Andrewes FW, and T.J. Horder. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* 1906;ii:708-13.
40. Orla-Jensen S. The lactic acid bacteria. *Mem AcadR Soc Danemark Sec SciSer* 8; 1919. p. 81-197.
41. Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol.* 1989 Apr;27(4):731-4.
42. Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol.* 2006 Jan 15;106(1):1-24.
43. Sherman JM. The Streptococci. *Bacteriol Rev.* 1937 Dec;1(1):3-97.
44. Kearns AM, Freeman R, Lightfoot NF. Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite. *J Hosp Infect.* 1995 Jul;30(3):193-9.

45. Freeman R, Kearns AM, Lightfoot NF. Heat resistance of nosocomial enterococci. *Lancet*. 1994 Jul 2;344(8914):64-5.
46. Bradley CR, Fraiese AP. Heat and chemical resistance of enterococci. *J Hosp Infect*. 1996 Nov;34(3):191-6.
47. Arias CA, Murray BE. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008 Oct;6(5):637-55.
48. Facklam R, Bosley GS, Rhoden D, Franklin AR, Weaver N, Schulman R. Comparative evaluation of the API 20S and AutoMicrobic gram-positive identification systems for non-beta-hemolytic streptococci and aerococci. *J Clin Microbiol*. 1985 Apr;21(4):535-41.
49. Contreras GA, DiazGranados CA, Cortes L, Reyes J, Vanegas S, Panesso D, et al. Nosocomial outbreak of *Enterococcus gallinarum*: untaming of rare species of enterococci. *J Hosp Infect*. 2008 Dec;70(4):346-52.
50. Noble CJ. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J Clin Pathol*. 1978 Dec;31(12):1182-6.
51. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJ, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Jun;66(6):2578-88.
52. Matsuda K, Tsuji H, Asahara T, Matsumoto K, Takada T, Nomoto K. Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Apr;75(7):1961-9.
53. Thadepalli H, Lou MA, Bach VT, Matsui TK, Mandal AK. Microflora of the human small intestine. *Am J Surg*. 1979 Dec;138(6):845-50.
54. Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol*. 2005 Nov;54(Pt 11):1093-101.
55. Malathum K, Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resist Updat*. 1999 Aug;2(4):224-43.
56. Rice LB, Shlaes DM. Vancomycin resistance in the enterococcus. Relevance in pediatrics. *Pediatr Clin North Am*. 1995 Jun;42(3):601-18.
57. Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol*. 2003 Dec 1;88(2-3):255-62.
58. Scharek L, Guth J, Reiter K, Weyrauch KD, Taras D, Schwerk P, et al. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet Immunol Immunopathol*. 2005 May 1;105(1-2):151-61.
59. Stropfova V, Marcinakova M, Simonova M, Gancarcikova S, Jonecova Z, Scirankova L, et al. *Enterococcus faecium* EK13--an enterocin a-producing strain with probiotic character and its effect in piglets. *Anaerobe*. 2006 Oct-Dec;12(5-6):242-8.
60. Pollmann M, Nordhoff M, Pospischil A, Tedin K, Wieler LH. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. *Infect Immun*. 2005 Jul;73(7):4346-53.
61. Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother*. 1994 Oct;34(4):507-14.
62. Devriese LA, Ieven M, Goossens H, Vandamme P, Pot B, Hommez J, et al. Presence of vancomycin-resistant enterococci in farm and pet animals. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Oct;40(10):2285-7.
63. Aarestrup FM, P. Butaye, W. Witte. Non human reservoirs of enterococci In: Gilmore MS, D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray, and B.B. Rice., editor. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Washington, USA: American Society for Microbiology; 2002. p. 55-99.
64. Devriese LA, Hommez J, Wijfels R, Haesebrouck F. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J Appl Bacteriol*. 1991 Jul;71(1):46-50.
65. Devriese LA, A. van De Kerckhove, R. Kilpper-Balz, and K.H. Schleiffer. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int J Syst Bacteriol*. 1987;37:257-9.

66. Malani PN, Thal L, Donabedian SM, Robinson-Dunn B, Kauffman CA, Chow JW, et al. Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* from Michigan hospitals during a 10 year period. *J Antimicrob Chemother.* 2002 May;49(5):841-3.
67. Hayden MK, Blom DW, Lyle EA, Moore CG, Weinstein RA. Risk of hand or glove contamination after contact with patients colonized with vancomycin-resistant enterococcus or the colonized patients' environment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008 Feb;29(2):149-54.
68. Hayden MK, Bonten MJ, Blom DW, Lyle EA, van de Vijver DA, Weinstein RA. Reduction in acquisition of vancomycin-resistant enterococcus after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clin Infect Dis.* 2006 Jun 1;42(11):1552-60.
69. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Oct;13(4):686-707.
70. Ostrowsky BE, Venkataraman L, D'Agata EM, Gold HS, DeGirolami PC, Samore MH. Vancomycin-resistant enterococci in intensive care units: high frequency of stool carriage during a non-outbreak period. *Arch Intern Med.* 1999 Jul 12;159(13):1467-72.
71. McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerg Infect Dis.* 1997 Jul-Sep;3(3):311-7.
72. McNeil SA, Malani PN, Chenoweth CE, Fontana RJ, Magee JC, Punch JD, et al. Vancomycin-resistant enterococcal colonization and infection in liver transplant candidates and recipients: a prospective surveillance study. *Clin Infect Dis.* 2006 Jan 15;42(2):195-203.
73. Malani PN, Dyke DB, Pagani FD, Chenoweth CE. Nosocomial infections in left ventricular assist device recipients. *Clin Infect Dis.* 2002 May 15;34(10):1295-300.
74. Wells CL, Juni BA, Cameron SB, Mason KR, Dunn DL, Ferrieri P, et al. Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. *Clin Infect Dis.* 1995 Jul;21(1):45-50.
75. Tornieporth NG, Roberts RB, John J, Hafner A, Riley LW. Risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis.* 1996 Oct;23(4):767-72.
76. Arias CA, Murray BE. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century a clinical super-challenge. *N Engl J Med.* 2009 Jan 29;360(5):439-43.
77. Zaas AK, Song X, Tucker P, Perl TM. Risk factors for development of vancomycin-resistant enterococcal bloodstream infection in patients with cancer who are colonized with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis.* 2002 Nov 15;35(10):1139-46.
78. Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev.* 2002 Jun;26(2):163-71.
79. Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 2003 Dec 1;88(2-3):215-22.
80. Muller T, Ulrich A, Ott EM, Muller M. Identification of plant-associated enterococci. *J Appl Microbiol.* 2001 Aug;91(2):268-78.
81. Giraffa G, Gatti M, Carminati D, Neviani E. Biochemical and metabolic characteristics of strains belonging to *Enterococcus* genus isolated from dairy products. *Proceedings of the Congress Biotechnology and Molecular Biology of Lactic Acid Bacteria for the Improvement of Foods and Feeds Quality; 1993; Naples; 1993.*
82. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989 May;66(5):365-78.
83. Moellering RC, Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis.* 1992 Jun;14(6):1173-6.
84. Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000 Jan;19(1):39-42.
85. Gray JW, Pedler SJ. Antibiotic-resistant enterococci. *J Hosp Infect.* 1992 May;21(1):1-14.
86. Morrison AJ, Jr., Wenzel RP. Nosocomial urinary tract infections due to enterococcus. Ten years' experience at a university hospital. *Arch Intern Med.* 1986 Aug;146(8):1549-51.
87. Bayer AS, Seidel JS, Yoshikawa TT, Anthony BF, Guze LB. Group D enterococcal meningitis. Clinical and therapeutic considerations with report of three cases and review of the literature. *Arch Intern Med.* 1976 Aug;136(8):883-6.

88. Ghanem G, Hachem R, Jiang Y, Chemaly RF, Raad I. Outcomes for and risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in cancer patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Sep;28(9):1054-9.
89. Rice LB, Calderwood SB, Eliopoulos GM, Farber BF, Karchmer AW. Enterococcal endocarditis: a comparison of prosthetic and native valve disease. *Rev Infect Dis.* 1991 Jan-Feb;13(1):1-7.
90. Dargere S, Vergnaud M, Verdon R, Saloux E, Le Page O, Leclercq R, et al. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):2308-10.
91. Mandell GL, Kaye D, Levison ME, Hook EW. Enterococcal endocarditis. An analysis of 38 patients observed at the New York Hospital-Cornell Medical Center. *Arch Intern Med.* 1970 Feb;125(2):258-64.
92. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008 Nov;29(11):996-1011.
93. Stamey TA, Mihara G. Observations on the growth of urethral and vaginal bacteria in sterile urine. *J Urol.* 1980 Oct;124(4):461-3.
94. Harbarth S, Uckay I. Are there patients with peritonitis who require empiric therapy for enterococcus? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004 Feb;23(2):73-7.
95. Onderdonk AB, Bartlett JG, Louie T, Sullivan-Seigler N, Gorbach SL. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. *Infect Immun.* 1976 Jan;13(1):22-6.
96. Curry N, McCallum RW, Guth PH. Spontaneous peritonitis in cirrhotic ascites. A decade of experience. *Am J Dig Dis.* 1974 Aug;19(8):685-92.
97. Weinstein MP, Iannini PB, Stratton CW, Eickhoff TC. Spontaneous bacterial peritonitis. A review of 28 cases with emphasis on improved survival and factors influencing prognosis. *Am J Med.* 1978 Apr;64(4):592-8.
98. Till M, Wixson RL, Pertel PE. Linezolid treatment for osteomyelitis due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis.* 2002 May 15;34(10):1412-4.
99. Eigler JO, Wellman WE, Rooke ED, Keith HM, Svien HJ. Bacterial meningitis. I. General review (294 cases). *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1961 Jul 19;36:357-65.
100. Linden PK, Pasculle AW, Manez R, Kramer DJ, Fung JJ, Pinna AD, et al. Differences in outcomes for patients with bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* or vancomycin-susceptible *E. faecium*. *Clin Infect Dis.* 1996 Apr;22(4):663-70.
101. Roghmann MC, Qaiyumi S, Johnson JA, Schwalbe R, Morris JG, Jr. Recurrent vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in a leukemia patient who was persistently colonized with vancomycin-resistant enterococci for two years. *Clin Infect Dis.* 1997 Mar;24(3):514-5.
102. Hidrom AI, J.R. Edwards, J . Patel, T.C. Horan, D.M. Sievert, D.A. Pollock, and S.K. Fridkin. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. Erratum. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;1:107.
103. Top J, Willems R, Blok H, de Regt M, Jalink K, Troelstra A, et al. Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Mar;13(3):316-9.
104. Leclercq R, E. Derlot, M. Weber, J. Duval and P.Courvalin. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:10-5.
105. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* 1988 Jan 2-9;1(8575-6):57-8.
106. Sahn DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, et al. *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 Sep;33(9):1588-91.
107. Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis.* 2001 Dec;1(5):314-25.

108. Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis.* 1999 May-Jun;5(3):329-35.
109. Hershberger E, Oprea SF, Donabedian SM, Perri M, Bozigar P, Bartlett P, et al. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jan;55(1):127-30.
110. DeLisle S, Perl TM. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest.* 2003 May;123(5 Suppl):504S-18S.
111. Ridwan B, Mascini E, van Der Reijden N, Verhoef J, Bonten M. What action should be taken to prevent spread of vancomycin resistant enterococci in European hospitals? *Bmj.* 2002 Mar 16;324(7338):666-8.
112. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med.* 2000 Mar 9;342(10):710-21.
113. Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM, Hill H, Tenover FC, Lawton R, et al. The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 U.S. adult intensive care units. *Ann Intern Med.* 2001 Aug 7;135(3):175-83.
114. Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 May;42(5):1303-4.
115. Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998 Aug;36(8):2187-90.
116. Ko KS, Baek JY, Lee JY, Oh WS, Peck KR, Lee N, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Korea. *J Clin Microbiol.* 2005 May;43(5):2303-6.
117. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine.* 2004 Feb 17;22(7):822-30.
118. Matsumoto T, Muratani T, Okada K, Shiraishi M, Hayashida T, Oki T, et al. No regional spread of vancomycin-resistant enterococci with *vanA* or *vanB* in Kitakyushu, Japan. *J Infect Chemother.* 2004 Dec;10(6):331-4.
119. Marin ME, Mera JR, Arduino RC, Correa AP, Coque TM, Stambouliau D, et al. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clin Infect Dis.* 1998 Jan;26(1):235-6.
120. Dalla Costa LM, Souza DC, Martins LT, Zanella RC, Brandilone MC, Bokermann S, et al. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First Case in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 1998 Jun;2(3):160-3.
121. Panesso D, Ospina S, Robledo J, Vela MC, Pena J, Hernandez O, et al. First characterization of a cluster of VanA-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium*, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2002 Sep;8(9):961-5.
122. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004 Sep;50(1):59-69.
123. Arias CA, Reyes J, Zuniga M, Cortes L, Cruz C, Rico CL, et al. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jan;51(1):59-68.
124. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol.* 1996 Oct;4(10):401-7.
125. Billot-Klein D, Gutmann L, Sable S, Guittet E, van Heijenoort J. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J Bacteriol.* 1994 Apr;176(8):2398-405.
126. Arthur M, Depardieu F, Snaith HA, Reynolds PE, Courvalin P. Contribution of VanY D,D-carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 Sep;38(9):1899-903.

127. Reynolds PE, Depardieu F, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol Microbiol.* 1994 Sep;13(6):1065-70.
128. Reynolds PE, Arias CA, Courvalin P. Gene vanXYC encodes D,D -dipeptidase (VanX) and D,D-carboxypeptidase (VanY) activities in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol.* 1999 Oct;34(2):341-9.
129. Arias CA, Martin-Martinez M, Blundell TL, Arthur M, Courvalin P, Reynolds PE. Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol.* 1999 Mar;31(6):1653-64.
130. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Aug;37(8):1563-71.
131. Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Sep;41(9):2016-8.
132. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Sep;43(9):2161-4.
133. Casadewall B, Courvalin P. Characterization of the vanD glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J Bacteriol.* 1999 Jun;181(12):3644-8.
134. Depardieu F, Reynolds PE, Courvalin P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan;47(1):7-18.
135. Clark NC, Teixeira LM, Facklam RR, Tenover FC. Detection and differentiation of vanC-1, vanC-2, and vanC-3 glycopeptide resistance genes in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1998 Aug;36(8):2294-7.
136. Arias CA, Courvalin P, Reynolds PE. vanC cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Jun;44(6):1660-6.
137. Dutta I, Reynolds PE. The vanC-3 vancomycin resistance gene cluster of *Enterococcus flavescens* CCM 439. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Mar;51(3):703-6.
138. McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Nov;44(11):3224-8.
139. Depardieu F, Bonora MG, Reynolds PE, Courvalin P. The vanG glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. *Mol Microbiol.* 2003 Nov;50(3):931-48.
140. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jul;52(7):2667-72.
141. Coque TM, Willems R, Canton R, Del Campo R, Baquero F. High occurrence of esp among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Dec;50(6):1035-8.
142. de Regt MJ, van der Wagen LE, Top J, Blok HE, Hopmans TE, Dekker AW, et al. High acquisition and environmental contamination rates of CC17 ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in a Dutch hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Dec;62(6):1401-6.
143. Harthug S, Jureen R, Mohn SC, Digranes A, Simonsen GS, Sundsfjord A, et al. The prevalence of faecal carriage of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci among inpatients at 10 major Norwegian hospitals. *J Hosp Infect.* 2002 Feb;50(2):145-54.
144. Oteo J, Cuevas O, Navarro C, Aracil B, Campos J. Trends in antimicrobial resistance in 3469 enterococci isolated from blood (EARSS experience 2001-06, Spain): increasing ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother.* 2007 May;59(5):1044-5.
145. Top J, Willems R, van der Velden S, Asbroek M, Bonten M. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2008 Jan;46(1):214-9.
146. Galloway-Pena JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis.* 2009 Nov 15;200(10):1566-73.
147. Luginbuhl LM, Rotbart HA, Facklam RR, Roe MH, Elliot JA. Neonatal enterococcal sepsis: case-control study and description of an outbreak. *Pediatr Infect Dis J.* 1987 Nov;6(11):1022-6.

148. Zervos MJ, Kauffman CA, Therasse PM, Bergman AG, Mikesell TS, Schaberg DR. Nosocomial infection by gentamicin-resistant *Streptococcus faecalis*. An epidemiologic study. *Ann Intern Med*. 1987 May;106(5):687-91.
149. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*. 1986 Dec 19;234(4783):1582-5.
150. Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. *J Clin Microbiol*. 1990 Sep;28(9):2059-63.
151. Goering RV, Winters MA. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 1992 Mar;30(3):577-80.
152. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 Sep;33(9):2233-9.
153. Kim WJ, Weinstein RA, Hayden MK. The changing molecular epidemiology and establishment of endemicity of vancomycin resistance in enterococci at one hospital over a 6-year period. *J Infect Dis*. 1999 Jan;179(1):163-71.
154. Morrison D, Woodford N, Barrett SP, Sisson P, Cookson BD. DNA banding pattern polymorphism in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and criteria for defining strains. *J Clin Microbiol*. 1999 Apr;37(4):1084-91.
155. Willems RJ, Top J, van Den Braak N, van Belkum A, Endtz H, Mevius D, et al. Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis*. 2000 Sep;182(3):816-23.
156. Nallapareddy SR, Duh RW, Singh KV, Murray BE. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*. 2002 Mar;40(3):868-76.
157. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3140-5.
158. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):1963-71.
159. Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, van Voorhis J, Matushek M, Slaughter S, et al. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1996 Dec 14;348(9042):1615-9.
160. Suppola JP, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M. *vanA* and *vanB* incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality. *J Clin Microbiol*. 1999 Dec;37(12):3934-9.
161. Novais C, Sousa JC, Coque TM, Peixe LV. Molecular characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Portuguese hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):3073-9.
162. Talebi M, Pourshafie MR, Katouli M, Mollby R. Molecular structure and transferability of Tn1546-like elements in *Enterococcus faecium* isolates from clinical, sewage, and surface water samples in Iran. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Mar;74(5):1350-6.
163. Zheng B, Tomita H, Xiao YH, Wang S, Li Y, Ike Y. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from mainland China. *J Clin Microbiol*. 2007 Sep;45(9):2813-8.
164. Yoo SJ, Sung H, Cho YU, Kim MN, Pai CH, Kim YS. Role of horizontal transfer of the transposon Tn1546 in the nosocomial spread of *vanA* vancomycin-resistant enterococci at a tertiary care hospital in Korea. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006 Oct;27(10):1081-7.
165. Timmers GJ, van der Zwet WC, Simoons-Smit IM, Savelkoul PH, Meester HH, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a haematology unit: risk factor assessment and successful control of the epidemic. *Br J Haematol*. 2002 Mar;116(4):826-33.
166. Mascini EM, Troelstra A, Beitsma M, Blok HE, Jalink KP, Hopmans TE, et al. Genotyping and preemptive isolation to control an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis*. 2006 Mar 15;42(6):739-46.

167. Bonora MG, Solbiati M, Stepan E, Zorzi A, Luzzani A, Catania MR, et al. Emergence of linezolid resistance in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* multilocus sequence typing C1 epidemic lineage. *J Clin Microbiol.* 2006 Mar;44(3):1153-5.
168. Peta M, Carretto E, Barbarini D, Zamperoni A, Carnevale L, Perversi L, et al. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in an Italian general intensive care unit. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Feb;12(2):163-9.
169. Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. *J Clin Microbiol.* 2005 Apr;43(4):1575-80.
170. Granlund M, Carlsson C, Edebro H, Emanuelsson K, Lundholm R. Nosocomial outbreak of vanB2 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Sweden. *J Hosp Infect.* 2006 Feb;62(2):254-6.
171. Koh TH, Hsu LY, Chiu LL, Lin RV. Emergence of epidemic clones of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Singapore. *J Hosp Infect.* 2006 Jun;63(2):234-6.
172. Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecon MA, Ortega M, Coque TM, et al. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Jan;63(1):17-20.
173. Camargo IL, Gilmore MS, Darini AL. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Nov;12(11):1123-30.
174. Khan MA, Northwood JB, Loor RG, Tholen AT, Riera E, Falcon M, et al. High prevalence of ST-78 infection-associated vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from hospitals in Asuncion, Paraguay. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Jul 20.
175. Lopez M, Hormazabal JC, 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 Jun;15(6):586-8.
176. Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol.* 2007 Nov;189(22):8233-40.
177. Sillanpaa J, Nallapareddy SR, Prakash VP, Qin X, Hook M, Weinstock GM, et al. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiology.* 2008 Oct;154(Pt 10):3199-211.
178. Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):411-20.
179. Vaishnava S, Behrendt CL, Hooper LV. Innate immune responses to commensal bacteria in the gut epithelium. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Apr;46 Suppl 1:E10-1.
180. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jun;4(6):478-85.
181. Kinnebrew MA, Ubeda C, Zenewicz LA, Smith N, Flavell RA, Pamer EG. Bacterial flagellin stimulates Toll-like receptor 5-dependent defense against vancomycin-resistant *Enterococcus* infection. *J Infect Dis.* Feb 15;201(4):534-43.
182. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Dec;60(12):2622-36.
183. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994 Oct;7(4):462-78.
184. Garza-Velazco R H-AK, Mejia-Chavez, A. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica en *Enterococcus faecalis*. *Lab acta.* 2002;14:11-20.
185. Morris JG, Jr., Shay DK, Hebden JN, McCarter RJ, Jr., Perdue BE, Jarvis W, et al. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. *Ann Intern Med.* 1995 Aug 15;123(4):250-9.
186. Wells CL, Moore EA, Hoag JA, Hirt H, Dunny GM, Erlandsen SL. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):7190-4.

187. Giacometti A, Cirioni O, Schimizzi AM, Del Prete MS, Barchiesi F, D'Errico MM, et al. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *J Clin Microbiol*. 2000 Feb;38(2):918-22.
188. Sartingen S, Rozdzinski E, Muscholl-Silberhorn A, Marre R. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells *in vitro*. *Infect Immun*. 2000 Oct;68(10):6044-7.
189. Finlay BB. Interactions of enteric pathogens with human epithelial cells. Bacterial exploitation of host processes. *Adv Exp Med Biol*. 1997;412:289-93.
190. Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris JG, Jr. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol Rev*. 1996;18(1):29-51.
191. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisner W, Maslow JN, McGeer A, et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science*. 1993 Jan 8;259(5092):227-30.
192. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Jun;44(6):1549-55.
193. Hacker J, Blum-Oehler G, Muhldorfer I, Tschape H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*. 1997 Mar;23(6):1089-97.
194. Mundy LM, Sahn DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Oct;13(4):513-22.
195. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 2009 Jun;155(Pt 6):1749-57.
196. Hendrickx AP, Willems RJ, Bonten MJ, van Schaik W. LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends Microbiol*. 2009 Sep;17(9):423-30.
197. Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun*. 1992 Jan;60(1):25-30.
198. Vanek NN, Simon SI, Jacques-Palaz K, Mariscalco MM, Dunny GM, Rakita RM. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999 Oct;26(1):49-60.
199. Clewell DB, and G.M.Dunny. Conjugation and Genetic Exchange in Enterococci. In: Gilmore MS, D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray, and B.B. Rice., editor. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. Washington: American Society for Microbiology Press; 2002. p. 265-300.
200. Olmsted SB, Dunny GM, Erlandsen SL, Wells CL. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J Infect Dis*. 1994 Dec;170(6):1549-56.
201. Rozdzinski E, Marre R, Susa M, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb Pathog*. 2001 Apr;30(4):211-20.
202. Sussmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun*. 2000 Sep;68(9):4900-6.
203. Chuang ON, Schlievert PM, Wells CL, Manias DA, Tripp TJ, Dunny GM. Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. *Infect Immun*. 2009 Jan;77(1):539-48.
204. Waters CM, Dunny GM. Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *J Bacteriol*. 2001 Oct;183(19):5659-67.
205. Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991 Aug;35(8):1626-34.
206. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*. 1999 Jan;67(1):193-200.

207. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. 2002 Jun 13;417(6890):746-50.
208. Mazmanian SK, Liu G, Ton-That H, Schneewind O. Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):760-3.
209. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2004 Oct;72(10):6032-9.
210. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2005 Sep;187(17):6213-22.
211. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006 Mar;256(1):145-50.
212. Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2004 Jan;186(1):154-63.
213. Shankar N, Lockett CV, Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun*. 2001 Jul;69(7):4366-72.
214. Pultz NJ, Shankar N, Baghdayan AS, Donskey CJ. Enterococcal surface protein Esp does not facilitate intestinal colonization or translocation of *Enterococcus faecalis* in clindamycin-treated mice. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Jan 15;242(2):217-9.
215. Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SV, Weinstock GM, et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem*. 1999 Sep 17;274(38):26939-45.
216. Duh RW, Singh KV, Malathum K, Murray BE. *In vitro* activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb Drug Resist*. 2001 Spring;7(1):39-46.
217. Nallapareddy SR, Singh KV, Duh RW, Weinstock GM, Murray BE. 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 Sep;68(9):5210-7.
218. Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR, Gillespie MJ. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *J Endod*. 2006 Jul;32(7):634-7.
219. Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. *Enterococcus faecalis* adhesin, *ace*, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun*. 2000 Sep;68(9):5218-24.
220. Liu Q, Ponnuraj K, Xu Y, Ganesh VK, Sillanpaa J, Murray BE, et al. The *Enterococcus faecalis* MSCRAMM ACE binds its ligand by the Collagen Hug model. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6;282(27):19629-37.
221. Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpaa J, Murray BE. Correction: Importance of the Collagen Adhesin Ace in Pathogenesis and Protection against *Enterococcus faecalis* Experimental Endocarditis. *PLoS Pathog*. 2010;6(2).
222. Mandlik A, Das A, Ton-That H. The molecular switch that activates the cell wall anchoring step of pilus assembly in gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 16;105(37):14147-52.
223. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, Garsin DA, Hook M, Erlandsen SL, et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2799-807.
224. Bourgogne A, Singh KV, Fox KA, Pflughoeft KJ, Murray BE, Garsin DA. EbpR is important for biofilm formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus operon (*ebpABC*) of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol*. 2007 Sep;189(17):6490-3.
225. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2006 Mar;188(6):2063-72.

226. Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J Bacteriol.* 1994 Dec;176(23):7335-44.
227. Libertin CR, Dumitru R, Stein DS. The hemolysin/bacteriocin produced by enterococci is a marker of pathogenicity. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1992 Feb;15(2):115-20.
228. Ike Y, Flannagan SE, Clewell DB. Hyperhemolytic phenomena associated with insertions of Tn916 into the hemolysin determinant of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1. *J Bacteriol.* 1992 Mar;174(6):1801-9.
229. Ike Y, Clewell DB, Segarra RA, Gilmore MS. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J Bacteriol.* 1990 Jan;172(1):155-63.
230. 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.* 2004 Apr;293(7-8):609-18.
231. Jett BD, Jensen HG, Nordquist RE, Gilmore MS. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun.* 1992 Jun;60(6):2445-52.
232. Jett BD, Jensen HG, Atkuri RV, Gilmore MS. Evaluation of therapeutic measures for treating endophthalmitis caused by isogenic toxin-producing and toxin-nonproducing *Enterococcus faecalis* strains. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995 Jan;36(1):9-15.
233. Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Nov;37(11):2474-7.
234. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.* 2007 Dec;56(Pt 12):1581-8.
235. Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J Infect Dis.* 1998 Nov;178(5):1416-20.
236. Singh KV, Nallapareddy SR, Nannini EC, Murray BE. Fsr-independent production of protease(s) may explain the lack of attenuation of an *Enterococcus faecalis* *fsr* mutant versus a *gelE-sprE* mutant in induction of endocarditis. *Infect Immun.* 2005 Aug;73(8):4888-94.
237. Engelbert M, Mylonakis E, Ausubel FM, Calderwood SB, Gilmore MS. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun.* 2004 Jun;72(6):3628-33.
238. Sifri CD, Mylonakis E, Singh KV, Qin X, Garsin DA, Murray BE, et al. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect Immun.* 2002 Oct;70(10):5647-50.
239. Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol.* 2001 Jun;183(11):3372-82.
240. Lopes Mde F. MS, A.P. Tenreiro, J.J. Figueiredo Marques, M.T. Crespo. activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol* 2006;112:208-14.
241. Nakayama J, Cao Y, Horii T, Sakuda S, Nagasawa H. Chemical synthesis and biological activity of the gelatinase biosynthesis-activating pheromone of *Enterococcus faecalis* and its analogs. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001 Oct;65(10):2322-5.
242. Hancock LE, Perego M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J Bacteriol.* 2004 Sep;186(17):5629-39.
243. Mylonakis E, Engelbert M, Qin X, Sifri CD, Murray BE, Ausubel FM, et al. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect Immun.* 2002 Aug;70(8):4678-81.
244. Hancock LE, Gilmore MS. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 5;99(3):1574-9.
245. Xu Y, Singh KV, Qin X, Murray BE, Weinstock GM. Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect Immun.* 2000 Feb;68(2):815-23.

246. Teng F, Singh KV, Bourgogne A, Zeng J, Murray BE. Further characterization of the *epa* gene cluster and Epa polysaccharides of *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*. 2009 Sep;77(9):3759-67.
247. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis*. 1995 May;171(5):1223-9.
248. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Apr;67(4):1628-35.
249. Huycke MM, Gilmore MS. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. *Dev Biol Stand*. 1995;85:47-50.
250. Arduino RC, Jacques-Palaz K, Murray BE, Rakita RM. Resistance of *Enterococcus faecium* to neutrophil-mediated phagocytosis. *Infect Immun*. 1994 Dec;62(12):5587-94.
251. Arduino RC, Murray BE, Rakita RM. Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci. *Infect Immun*. 1994 Mar;62(3):987-93.
252. Willems RJ, Bonten MJ. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*. 2007 Aug;20(4):384-90.
253. Eaton TJ, Gasson MJ. A variant enterococcal surface protein Esp(fm) in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Nov 5;216(2):269-75.
254. Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T, Larsson C, Lindahl G. The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Mol Microbiol*. 1999 Jul;33(1):208-19.
255. Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L, Lindahl G. Protein rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J Exp Med*. 1993 Jun 1;177(6):1593-603.
256. Michel JL, Madoff LC, Kling DE, Kasper DL, Ausubel FM. Cloned alpha and beta C-protein antigens of group B streptococci elicit protective immunity. *Infect Immun*. 1991 Jun;59(6):2023-8.
257. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001 May;183(9):2888-96.
258. Lindahl G, Stalhammar-Carlemalm M, Areschoug T. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Jan;18(1):102-27.
259. Baldassarri L, Bertuccini L, Ammendolia MG, Gherardi G, Creti R. Variant *esp* gene in vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. *Lancet*. 2001 Jun 2;357(9270):1802.
260. Hammerum AM, Jensen LB. Prevalence of *esp*, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark. *J Clin Microbiol*. 2002 Nov;40(11):4396.
261. Van Wamel WJ, Hendrickx AP, Bonten MJ, Top J, Posthuma G, Willems RJ. Growth condition-dependent *Esp* expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun*. 2007 Feb;75(2):924-31.
262. Lund B, Edlund C. Bloodstream isolates of *Enterococcus faecium* enriched with the enterococcal surface protein gene, *esp*, show increased adhesion to eukaryotic cells. *J Clin Microbiol*. 2003 Nov;41(11):5183-5.
263. Heikens E, Leendertse M, Wijnands LM, van Luit-Asbroek M, Bonten MJ, van der Poll T, et al. Enterococcal surface protein *Esp* is not essential for cell adhesion and intestinal colonization of *Enterococcus faecium* in mice. *BMC Microbiol*. 2009;9:19.
264. Leendertse M, Heikens E, Wijnands LM, van Luit-Asbroek M, Teske GJ, Roelofs JJ, et al. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. *J Infect Dis*. 2009 Oct 1;200(7):1162-5.
265. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *Acm*, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol*. 2003 Mar;47(6):1733-47.

266. Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Ryden C, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immun*. 1994 Jan;62(1):152-61.
267. Patti JM, Boles JO, Hook M. Identification and biochemical characterization of the ligand binding domain of the collagen adhesin from *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*. 1993 Oct 26;32(42):11428-35.
268. Boden MK, Flock JI. Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 1994 May;12(4):599-606.
269. Courtney HS, Dale JB, Hasty DI. Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEP-2 tissue culture cells. *Infect Immun*. 1996 Jul;64(7):2415-9.
270. Hartford O, McDevitt D, Foster TJ. Matrix-binding proteins of *Staphylococcus aureus*: functional analysis of mutant and hybrid molecules. *Microbiology*. 1999 Sep;145 (Pt 9):2497-505.
271. Nallapareddy SR, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun*. 2008 Sep;76(9):4110-9.
272. Lannergard J, Frykberg L, Guss B. CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 May 16;222(1):69-74.
273. Shimoji Y, Ogawa Y, Osaki M, Kabeya H, Maruyama S, Mikami T, et al. Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. *J Bacteriol*. 2003 May;185(9):2739-48.
274. Sato Y, Okamoto K, Kagami A, Yamamoto Y, Igarashi T, Kizaki H. *Streptococcus mutans* strains harboring collagen-binding adhesin. *J Dent Res*. 2004 Jul;83(7):534-9.
275. Nallapareddy SR, Singh KV, Murray BE. Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding *acm* gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jan;72(1):334-45.
276. Zong Y, Xu Y, Liang X, Keene DR, Hook A, Gurusiddappa S, et al. A 'Collagen Hug' model for *Staphylococcus aureus* CNA binding to collagen. *Embo J*. 2005 Dec 21;24(24):4224-36.
277. Teng F, Kawalec M, Weinstock GM, Hryniewicz W, Murray BE. An *Enterococcus faecium* secreted antigen, SagA, exhibits broad-spectrum binding to extracellular matrix proteins and appears essential for *E. faecium* growth. *Infect Immun*. 2003 Sep;71(9):5033-41.
278. Deivanayagam CC, Wann ER, Chen W, Carson M, Rajashankar KR, Hook M, et al. A novel variant of the immunoglobulin fold in surface adhesins of *Staphylococcus aureus*: crystal structure of the fibrinogen-binding MSCRAMM, clumping factor A. *Embo J*. 2002 Dec 16;21(24):6660-72.
279. Perkins S, Walsh EJ, Deivanayagam CC, Narayana SV, Foster TJ, Hook M. Structural organization of the fibrinogen-binding region of the clumping factor B MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2001 Nov 30;276(48):44721-8.
280. Sillanpaa J, Xu Y, Nallapareddy SR, Murray BE, Hook M. A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*. 2004 Jul;150(Pt 7):2069-78.
281. Lauer P, Rinaudo CD, Soriani M, Margarit I, Maione D, Rosini R, et al. Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus. *Science*. 2005 Jul 1;309(5731):105.
282. Yeung MK, Kozelsky CS. Transfection of *Actinomyces* spp. by genomic DNA of bacteriophages from human dental plaque. *Plasmid*. 1997;37(2):141-53.
283. Yeung MK, Donkersloot JA, Cisar JO, Ragsdale PA. Identification of a gene involved in assembly of *Actinomyces naeslundii* T14V type 2 fimbriae. *Infect Immun*. 1998 Apr;66(4):1482-91.
284. Ton-That H, Schneewind O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol*. 2003 Nov;50(4):1429-38.
285. Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran KS. Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol*. 2007 Feb;189(4):1464-7.
286. Abbot EL, Smith WD, Siou GP, Chiriboga C, Smith RJ, Wilson JA, et al. Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell Microbiol*. 2007 Jul;9(7):1822-33.

287. Hendrickx AP, Bonten MJ, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CM, Kragten AH, Willems RJ. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology*. 2008 Oct;154(Pt 10):3212-23.
288. Hendrickx AP, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CM, van Wamel WJ, Braat JC, Wijnands LM, et al. SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect Immun*. 2009 Nov;77(11):5097-106.
289. Carlin B, Jaffe R, Bender B, Chung AE. Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem*. 1981 May 25;256(10):5209-14.
290. Kohfeldt E, Sasaki T, Gohring W, Timpl R. Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J Mol Biol*. 1998 Sep 11;282(1):99-109.
291. Deivanayagam CC, Rich RL, Carson M, Owens RT, Danthuluri S, Bice T, et al. Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure*. 2000 Jan 15;8(1):67-78.
292. Dupont H, Montravers P, Mohler J, Carbon C. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2570-5.
293. Gutschik E, Moller S, Christensen N. Experimental endocarditis in rabbits. 3. Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1979 Dec;87(6):353-62.
294. Gutschik E. The *Enterococcus* endocarditis model in experimental animals and its relevance to human infection. *J Antimicrob Chemother*. 1993 May;31 Suppl D:87-95.
295. Santoro J, Kaye D. Recurrent urinary tract infections. Pathogenesis and management. *Med Clin North Am*. 1978 Sep;62(5):1005-20.
296. Dougherty SH, Hentges DJ, Casey SW, Thal WR. Impact of LY146032 on *Streptococcus (Enterococcus faecalis)* translocation in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988 Mar;32(3):337-40.
297. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis*. 1990 Jul;162(1):82-90.
298. Jett BD, Atkuri RV, Gilmore MS. *Enterococcus faecalis* localization in experimental endophthalmitis: role of plasmid-encoded aggregation substance. *Infect Immun*. 1998 Feb;66(2):843-8.
299. Stevens SX, Jensen HG, Jett BD, Gilmore MS. A hemolysin-encoding plasmid contributes to bacterial virulence in experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992 Apr;33(5):1650-6.
300. Kau AL, Martin SM, Lyon W, Hayes E, Caparon MG, Hultgren SJ. *Enterococcus faecalis* tropism for the kidneys in the urinary tract of C57BL/6J mice. *Infect Immun*. 2005 Apr;73(4):2461-8.
301. Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, Qin X, Singh KV, Murray BE, et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10892-7.
302. Gaspar F, Teixeira N, Rigottier-Gois L, Marujo P, Nielsen-LeRoux C, Crespo MT, et al. Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: the role of *fsrB* and *gelE*. *Microbiology*. 2009 Nov;155(Pt 11):3564-71.
303. Gentry-Weeks C, Estay M, Loui C, Baker D. Intravenous mouse infection model for studying the pathology of *Enterococcus faecalis* infections. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1434-41.
304. Singh KV, Nallapareddy SR, Murray BE. Importance of the *ebp* (endocarditis- and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *J Infect Dis*. 2007 Jun 1;195(11):1671-7.
305. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2605-9.
306. Kristich CJ, Chandler JR, Dunny GM. Development of a host-genotype-independent counterselectable marker and a high-frequency conjugative delivery system and their use in genetic analysis of *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*. 2007 Mar;57(2):131-44.

307. Sambrook J, E.F. Fritsch and T. Maniatis. Plasmids and their usefulness in molecular cloning. New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.
308. Leenhouts K, Buist G, Bolhuis A, ten Berge A, Kiel J, Mierau I, et al. A general system for generating unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes. *Mol Gen Genet.* 1996 Nov 27;253(1-2):217-24.
309. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;33(1):24-7.
310. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 May;33(5):1434.
311. Wirth R, An FY, Clewell DB. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *J Bacteriol.* 1986 Mar;165(3):831-6.
312. Bae T, Kozłowicz B, Dunny GM. Two targets in pCF10 DNA for PrgX binding: their role in production of Qa and prgX mRNA and in regulation of pheromone-inducible conjugation. *J Mol Biol.* 2002 Feb 1;315(5):995-1007.
313. Tomita H, Pierson C, Lim SK, Clewell DB, Ike Y. Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3326-33.
314. Cruz-Rodz AL, Gilmore MS. High efficiency introduction of plasmid DNA into glycine treated *Enterococcus faecalis* by electroporation. *Mol Gen Genet.* 1990 Oct;224(1):152-4.
315. Sobral BW, Honeycutt RJ, Atherly AG. The genomes of the family Rhizobiaceae: size, stability, and rarely cutting restriction endonucleases. *J Bacteriol.* 1991 Jan;173(2):704-9.
316. Currier TC, Nester EW. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal Biochem.* 1976 Dec;76(2):431-41.
317. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 1984 May;37(1):67-75.
318. Levene SD, Zimm BH. Separations of open-circular DNA using pulsed-field electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jun;84(12):4054-7.
319. Hightower RC, Bliska JB, Cozzarelli NR, Santi DV. Analysis of amplified DNAs from drug-resistant *Leishmania* by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. The effect of size and topology on mobility. *J Biol Chem.* 1989 Feb 15;264(5):2979-84.
320. Suwanto A, Kaplan S. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *J Bacteriol.* 1989 Nov;171(11):5850-9.
321. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 1995 Apr 10;226(2):235-40.
322. Coburn PS, Baghdayan AS, Dolan GT, Shankar N. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol Microbiol.* 2007 Jan;63(2):530-44.
323. Liu SL, Sanderson KE. I-CeuI reveals conservation of the genome of independent strains of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* 1995 Jun;177(11):3355-7.
324. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul 15;90(14):6874-8.
325. Oana K, Okimura Y, Kawakami Y, Hayashida N, Shimosaka M, Okazaki M, et al. Physical and genetic map of *Enterococcus faecium* ATCC19434 and demonstration of intra- and interspecific genomic diversity in enterococci. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Feb 5;207(2):133-9.
326. Bauer W, Vinograd J. The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV40 DNA in the presence and absence of dye. *J Mol Biol.* 1968 Apr 14;33(1):141-71.
327. Miles AA, and S.S Misra. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hygiene.* 1938;38:732-49.
328. Clinical and Laboratory Standards Institute C. Clinical and Laboratory Standards Institute, 19th informational supplement M100-S19. 2009.

329. Reed LJ, and H. Muench. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The A J of Hyg.* 1938;27:493-7.
330. Lederberg J, and L. Tatum. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature.* 1946;158(558).
331. Clewell DaGMD. Conjugation and Genetic Exchange in Enterococci. In: Gilmore MS, D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray, and B.B. Rice., editor. *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance.* Washington: American Society for Microbiology Press; 2002. p. 265-300.
332. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, *esp*, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jul;54(1):232-5.
333. Novick RP SM. Independence of plasmid incompatibility and replication control functions in *Staphylococcus aureus*. *Nature* 1976; 262(5569):623-6.
334. Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev.* 1987 Dec;51(4):381-95.
335. Bouet JY, Nordstrom K, Lane D. Plasmid partition and incompatibility the focus shifts. *Mol Microbiol.* 2007 Sep;65(6):1405-14.
336. Garcia-Migura L, Liebana E, Jensen LB. Transposon characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Aug;60(2):263-8.
337. Carias LL, Rudin SD, Donskey CJ, Rice LB. Genetic linkage and cotransfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *J Bacteriol.* 1998 Sep;180(17):4426-34.
338. Clewell DB FS, Jaworski DD. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* 1995;3(6.):229-36.
339. Scott JR CG. Conjugative transposition. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:367-97.
340. Dutka-Malen S, Leclercq R, Coutant V, Duval J, Courvalin P. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Oct;34(10):1875-9.
341. Handwerger S SJ. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39((11)):2446-53.
342. Heaton MP, Discotto LF, Pucci MJ, Handwerger S. Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. *Gene.* 1996 May 24;171(1):9-17.
343. Gallegos MT SR, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL. Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61(4):393-410.
344. Greenblatt J SR. Arabinose C protein: regulation of the arabinose operon *in vitro*. *Nat New Biol.* 1971;233(40):166-70.
345. Schleif RF, and M.A.Favreau. Hyperproduction of araC protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1982 21:778-82.
346. Schleif R. Induction of the L-arabinose operon. *J Mol Biol.* 1969;46(1):197-9.
347. Schleif R. Gene regulation: why should DNA loop? *Nature* 1987;327(6121):369-70.
348. Stephenson KaH, JA. Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol Ther.* 2002;93((2-3)):293-305.
349. Sheldon WL, Macauley MS, Taylor EJ, Robinson CE, Charnock SJ, Davies GJ, et al. Functional analysis of a group A streptococcal glycoside hydrolase Spy1600 from family 84 reveals it is a beta-N-acetylglucosaminidase and not a hyaluronidase. *Biochem J.* 2006 Oct 15;399(2):241-7.
350. Davies G, and B. Henrissat. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 1995 3:853-9.
351. Mathai D JR, Pfaller MA; SENTRY Participant Group North America. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;40(3):129-36.
352. Hung CS DK, Hultgren SJ. A murine model of urinary tract infection. *Nat Protoc.* 2009;4(8):1230-43.

353. Rosen DA, J.S. Pinkner, J.N. Walker, J.S. Elam, J.M.Jones, and S.J. Hultgren. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract *Infect Immun*. 2008;76:3346-56.
354. Kau AL, Hunstad DA, Hultgren SJ. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Curr Opin Microbiol*. 2005 Feb;8(1):54-9.
355. Hopkins WJ G-FA, Balish E, Uehling DT. Time course and host responses to *Escherichia coli* urinary tract infection in genetically distinct mouse strains. *Infect Immun* 1998;66(6):2798-802.
356. Schaeffer AJ, Schwan WR, Hultgren SJ, Duncan JL. Relationship of type 1 pilus expression in *Escherichia coli* to ascending urinary tract infections in mice. *Infect Immun*. 1987 Feb;55(2):373-80.
357. Hagberg L HR, Hull S, Falkow S, Freter R, Svanborg Edén C. Contribution of adhesion to bacterial persistence in the mouse urinary tract. *Infect Immun*. 1983;40(1):265-72.
358. Kemp KD, K.V.Singh, S.R. Nallapareddy, and B.E.Murray. Relative contributions of *Enterococcus faecalis* OG1RF sortase-encoding genes, *srtA* and *bps (srtC)*, to biofilm formation and a murine model of urinary tract infection. *Infect Immun*. 2007 75:5399-404.
359. Singh KV LR, Murray BE. Importance of the *epa* locus of *Enterococcus faecalis* OG1RF in a mouse model of ascending urinary tract infection. *J Infect Dis* 2009;200(3):417-20.
360. Hienz SA ST, Heimdahl A, Flock JI. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J Infect Dis*. 1996 174(1):83-8.
361. Voyich JM, Sturdevant DE, Braughton KR, Kobayashi SD, Lei B, Virtaneva K, et al. Genome-wide protective response used by group A Streptococcus to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):1996-2001.
362. Montgomerie JZ KG, Guze LB. Virulence of enterococci in experimental pyelonephritis. *Urol Res*. 1977;5(3):99-102.
363. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. 2008 Nov 20;13(47).
364. Leal AL E-SJ, Alvarez C, Buitrago G, Méndez M; Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana en Bogotá. Endemic tendencies and bacterial resistance markers in third-level hospitals in Bogotá, Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)* 2006 (Suppl 1):59-70.
365. Titze-de-Almeida R VBA, Felipe MS, Zanella RC, Top J, Willems RJ. Multilocus sequence typing of hospital-associated *Enterococcus faecium* from Brazil reveals their unique evolutionary history. *Microb Drug Resist* 2006;12(2)(121).