

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

## Determinantes de virulencia (gelatinasa y citolisina) en *Enterococcus spp* aislados de río y aguas residuales hospitalarias

### TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL  
ÁREA DE CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

**Q.F.B. LENDO HERNÁNDEZ HÉCTOR MANUEL**

DIRECTOR DE TESIS:

**Dra. VERÓNICA ALEJANDRA MONDRAGÓN JAIMES**

CODIRECTOR:

**Dr. JESÚS BERNARDINO VELÁZQUEZ FERNÁNDEZ**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

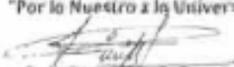
CBAP/091/17.

Xalisco, Nayarit, 20 de junio de 2017.

**M.C. JOSE ERNESTO VILLANUEVA TREJO**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**PRESENTE.**

Con base al oficio de fecha 14 de junio del presente, enviado por los CC. Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes, Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández, Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez, Dr. José Navarro Partida, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza al **C. Héctor Manuel Lendo Hernández**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Ambientales.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"Por lo Nuestro a la Universidad"  
  
Dr. Diego García Paredes  
Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente

Asento

Tepic, Nayarit a 14 de junio del 2017.

**Dr. Diego Garcia Paredes**

**Coordinador del Programa de**

**Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias**

**Presente**

Los que suscribimos, integrantes del comité tutorial del QFB. **Héctor Manuel Lendo Hernández**, declaramos que hemos revisado la tesis titulada **"Determinantes de virulencia (gelatinasa y citolicina) en *Enterococcus spp* aislados de río y aguas residuales hospitalarias"** y determinamos que la tesis puede ser presentada por el estudiante de maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias, con opción terminal en Ciencias Ambientales.

**Atentamente**

**EL COMITÉ TUTORIAL**

**Directora de Tesis: Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes**

**Coodirector de Tesis: Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández**

**Asesora de Tesis: Dra. Jackellne Lizzeta Arvizu Gómez**

**Asesor de Tesis: Dr. José Navarro Partida.**



Jackellne Arvizu G



## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo se lo dedico a toda mi familia, este proyecto representa la culminación de un paso más en mi trayectoria de estudios, un paso que sin duda me ha marcado de forma muy profunda. Aquí se encuentran plasmados mi esfuerzo, tiempo y pasión hacia una de las vertientes en mi vida que más he disfrutado pero que a la vez me ha hecho madurar en más de un sentido.*

*Les agradezco a todos los que en algún momento de mi vida llegaron a ser una motivación y fuente de inspiración y con ello poder seguir adelante, superar los obstáculos que se presentaron en más de una ocasión y finalmente poder llegar a la culminación de este proyecto que tomo 2 años y medio, incluso más tiempo si es que nos referimos a cuando paso por primera vez por mi cabeza.*

*A ustedes les debo este logro y por ello con ustedes lo comparto.*

*Con todo el cariño y amor que les tengo*

*Héctor Manuel Lendo Hernández*

## AGRADECIMIENTOS

### **A mis Padres**

*Un simple gracias no basta para expresar la inmensa gratitud que siento por todos estos años en los cuales he recibido de forma tan desinteresada todo su apoyo incondicional, por todos esos momentos en los cuales han estado para mí cuando los necesité, muchas gracias. Por cada llamada de atención para que siguiera adelante y no me rindiera, nuevamente muchas gracias. Por darme un excelente ejemplo a seguir y no rendirme ante los problemas, todos sus consejos, sus opiniones, su tiempo, energía y esfuerzo infinitas gracias. Por siempre estar detrás de mí y empujarme a dar siempre un paso hacia adelante y un paso delante del último, gracias, gracias, gracias...*

### **A mi Hermano**

*Josias, por tu forma tan única de ser y mi ser tan igual de único cuando estoy contigo, por tus preguntas, por tus arranques, por estar ahí siempre para mí, por pasar momentos especiales que nos hacen olvidar todo lo que nos rodea y a la vez por esos momentos que me hacen pensar sin respuesta alguna, por todos estos años muchas gracias.*

### **A Yajaira**

*Mi querida esposa, aún recuerdo vividamente nuestros primeros encuentros y aquella sensación que tenía al verte me da mucho gusto poder decir que aun la siento cuando estas a mi lado. Gracias por siempre estar dispuesta a brindarme tu apoyo, tu tiempo, tu paciencia, pero sobre todo, tu amor y tu cariño, gracias por llegar a mi vida y se uno de los motivos por los cuales me levanto cada mañana, agradezco de lo que esta vida me ha dado. Te amo mi niña, gracias por estar ahí para mí siempre.*

### **A mi pequeño Héctor**

*A mi pequeño corazoncito que hace que cada día mi corazón lata más fuerte para llegar más lejos, por tu sonrisa que me hace sacar lo mejor de mí, el ver como cada día que pasa aprendes cosas nuevas y vuelves más capaz. Nunca hubiera imaginado el impacto que tendrías en mí desde el día que llegaste a mi vida y espero poder darte un correcto ejemplo que seguir para el resto de tu vida.*

### **A mis Familiares**

*Por estar ahí siempre para uno, por hacerme sentir orgulloso de todo lo que he realizado en estos últimos años, Gracias a todos ustedes.*

### **A la Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes**

*Nuevamente le agradezco por permitirme llegar a cumplir una meta más en mi vida, hace poco más de 2 años que me permitió obtener mi primer título y ahora una vez más estamos al cierre de un nuevo proyecto, el cual sin duda ha dejado una gran huella en mi vida, y que llevaré orgullosamente a donde sea que me dirija, gracias por abrirme las puertas de su vida, por recibirme en su casa y permitirme aprender tanto en su laboratorio todos los años que estuve con usted. Le debo mi gusto y vocación por la investigación, me han sido invaluable todos sus consejos, toda su enseñanza y sus anécdotas, el apoyo que brindó cada vez que necesite de usted, pero sobre todo, por depositar su confianza en mí, muchísimas gracias por todo Dra, muchas, muchas gracias!!!*

### **Al Dr. Jesús Bernardino Velázquez Fernández**

*Gracias Dr. por su tiempo y esfuerzo invertidos en mí, una lástima no haber trabajado desde mucho antes con usted ya que en verdad disfrute de sus clases y sus enseñanzas, por su contribución en este proyecto que en más de una ocasión nos permitieron sobrepasar los obstáculos que se presentaron. Muchas gracias nuevamente por toda su atención brindada en estos dos años y medio.*

**A mis Sinodales**

*Gracias Dr. José Navarro Partida y Dra. Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez por su tiempo, sus valiosas observaciones, consejos y apoyo, que me han permitido ver de una forma distinta el trabajo al que le he dedicado todo este tiempo, muchas gracias!!!*

**A mis amigos y compañeros**

*A todos ustedes por ser parte de una sana competencia, por ser parte de mi vida y permitir el desarrollar nuevas facetas en mi vida, por sus consejos, por permitirme el ayudarlos en sus problemas y ustedes en los míos, Muchas gracias!!!*

*A todos los que han pasado por el Laboratorio de Resistencia Bacteriana y a los que se quedan, gracias por convivir y compartir tantas experiencias, anécdotas y momentos tan especiales con migo. Elisa, Daniel, Karina, Xuxu, Gloria, Laura, Miguel, Sergio, Julio, a donde sea que nos dirijamos cada uno, espero que sea siempre para mejor.*

**Maestra Nallelhy, Dra. Adela.**

*Muchas gracias por sus concejos a lo largo de todos estos años, sin lugar a dudas me han sido de mucha utilidad y las convivencias en las que hemos estado sin lugar a dudas son irremplazables, Muchas Gracias!!!*

## **AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES**

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado a mi persona en la modalidad de becas estudiantiles para alumnos de maestría.*

*Al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, cuya coordinación se encuentra a cargo del Dr. Juan Diego García Paredes, agradezco el apoyo brindado a cada paso durante la realización de mi maestría.*

*A la dirección de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas por permitir el uso de las instalaciones del Laboratorio de Resistencia Bacteriana para el desarrollo experimental de la presente investigación.*

*Al Laboratorio de Resistencia Bacteriana de la UAN por permitir la realización de la mayor parte de los experimentos realizados en esta investigación.*

*A las instituciones de salud por permitir llevar a cabo el análisis correspondiente a las muestras recolectadas, Hospital Civil "Dr. Antonio González Guevara" (Servicios de Salud de Nayarit), Hospital General de la Zona 1 (Instituto Mexicano del Seguro Social) y Hospital General "Dr. Aquiles Calles Ramírez" (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado).*

**AGRADECIMIENTO A FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la dirección de la Dra. Verónica Alejandra Mondragón Jaimes y fue financiado por la SEP, a través del programa FECES-2015.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

ÍNDICE

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xviii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Enterococos: Factores de virulencia y regulación.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Gelatinasa enterocócica <i>GelE</i> .....	4
1.1.2 Citolisina enterocócica <i>CytA</i> .....	5
1.1.3 Proteína de superficie enterocócica <i>Esp</i> .....	6
1.1.4 Sustancia de agregación <i>Agg</i> o <i>Asa1</i> .....	8
1.1.5 Adhesina de colágeno <i>Ace</i> .....	9
1.1.6 Antígeno A <i>EfaA</i> .....	10
1.1.7 Hialuronidasa <i>Hyl</i> .....	11
<b>1.2 Enterococos y sus patologías.....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Endocarditis.....	12
1.2.2 Bacteriemia.....	12
1.2.3 Infección de vías urinarias.....	12
1.2.4 Infecciones abdominales.....	13
1.2.5 Meningitis.....	13
<b>1.3 Hábitat como promotor de virulencia.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Repercusiones al ambiente.....</b>	<b>14</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>16</b>

3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVO GENERAL.....	21
4.1 Objetivos específicos.....	21
5. HIPÓTESIS.....	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1 Material biológico.....	23
6.2 Recolección de muestras.....	23
6.3 Cultivo bacteriano.....	24
6.4 Selección de cepas, mediante la expresión fenotípica de virulencia.....	25
6.5 Extracción del ADN.....	26
6.6 Confirmación molecular de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> .....	27
6.7 Purificación de fragmento de PCR y Secuenciación.....	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
7.1 Muestreo y conteo de UFC.....	30
7.2 Aislamiento de enterococos a partir de las muestras.....	33
7.3 Ensayo de gelatinasa enterocócica.....	33
7.4 Ensayo de $\beta$ -hemólisis "Citolisina enterocócica".....	36
7.5 Confirmación de las especies de enterococos.....	39
7.6 <i>Enterococcus faecium</i> gelatinasa positivos y $\beta$ -hemolíticos.....	41
7.7 Secuenciación de los fragmentos de PCR.....	42
8. CONCLUSIONES.....	44

9. PPROSPECTIVAS.....	45
10. BIBLIOGRAFIA.....	46
11. ANEXOS.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Principales factores de virulencia descritos en <i>Enterococcus spp.</i> ...	3
<b>Tabla 2.</b> Condiciones y oligonucleótidos utilizados para la amplificación de <i>ddl-E. faecalis</i> , <i>ddl-E. faecium</i> , <i>rrs</i> .....	28
<b>Tabla 3.</b> Número de cepas gelatinasa positivas sobre cada punto de muestreo.....	34
<b>Tabla 4.</b> Relación de las cepas gelatinasa positivas con actividad hemolítica.....	38
<b>Tabla 5.</b> Resumen de los resultados obtenidos durante la PCR en la identificación de especie para los enterococos hemolíticos, gelatinasa positivos.....	41
<b>Tabla 6.</b> Resumen general de la información obtenida del cepario.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ubicación geográfica de la toma de muestra ambiental y hospitalaria.....	24
Figura 2. Puntos de recolección de muestra.....	30
Figura 3. Unidades Formadoras de Colonias de <i>Enterococcus</i> , obtenidas por punto de muestreo.....	31
Figura 4. Comparativa de los niveles para determinar la calidad microbiológica en cuerpos de agua superficiales.....	32
Figura 5. Ensayo de licuefacción de gelatina.....	34
Figura 6. % de cepas con actividad de gelatinasa obtenidas por cada punto de muestreo.....	35
Figura 7. Resultado de la prueba de hemolisina.....	37
Figura 8. Gel de agarosa con muestras de ADN.....	39
Figura 9. Gel de agarosa con la amplificación de las secuencias para identificar las especies de <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> y 16S ( <i>rrs</i> ).....	40

ABREVIATURAS

Acel	Adhesina del colágeno 1
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Asal	Sustancia de agregación
ATP	Adenosin Trifosfato
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
CylA	Citolisina enterocócica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EfaA	Antígeno A de <i>Enterococcus faecalis</i>
Efar	Regulador de la expresión de EfaA
ELISA	"Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
EMBL	"European Molecular Biology Laboratory" (Laboratorio Europeo de Biología Molecular).
Esp	Proteína enterocócica de superficie
Etc.	Etcétera
GBAPP	"gelatinase biosynthesis-activating pheromone" (feromona activadora de la biosíntesis de la gelatinasa)
GelE	Gelatinasa enterocócica
GvrRS	"Global Regulator of Virulence" (Regulador global de la virulencia)
HCl	Ácido Clorhídrico
HLR	"High Level Resistance" (Resistencia de alto nivel)
Hyl	Hialuronidasa
KF	Kenner Fecal
ICEEfm1	"Integrative Conjugative Element of <i>Enterococcus faecium</i> 1" (Elemento conjugativo e integrativo de <i>Enterococcus faecium</i> 1)

IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
Kb	Kilobases
kDa	KiloDalton (Unidad de masa atómica)
LB	Caldo Luria Bertani
mARN	Ácido Ribonucleico mensajero
MSCRAMM	" <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i> " (Componentes de la superficie microbianas que reconocen moléculas de la matriz de adhesivo)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	" <i>National Center for Biotechnology Information</i> " (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAI	" <i>Pathogenicity islands</i> " (Islas de patogenicidad)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PYR	Pirrolidoniil- $\beta$ -naftilamida
QS	Quorum sensing
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
RR15	Regulador de respuesta 15
SDS	" <i>Sodium Dodecylsulfate</i> " (Dodecil Sulfato de Sodio)
sprE	Serin proteasa de <i>Enterococcus faecalis</i>

SSA	Servicios de Salud
SSC	"Saline Sodium Citrate" (Solución salada de Sodio y citrato)
TE	Tris HCl-EDTA
UACQByF	Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTIs	"Urinary Tract Infections" (Infección de las vías urinarias)
VRE	Enterococos Resistentes a Vancomicina

## RESUMEN

En la presente investigación se trabajó con cepas de enterococo, fueron aisladas a partir de aguas residuales de los hospitales más importantes de la ciudad de Tepic y del cauce del río Mololoa. El propósito consistió en determinar la actividad de la gelatinasa enterocócica y la citolisina enterocócica en estos aislados ya que son factores importantes durante la infección por enterococos, posteriormente se identificó la especie de aquellos que mostraron actividad a ambas enzimas. Lo anterior se justifica por el creciente problema que engloba a los enterococos y los problemas a la salud que se generan por la presencia de elementos de virulencia dentro de su genoma, sumado al impacto que tienen los ambientes hospitalarios con la formación y permanencia de estos elementos de virulencia y su propagación hacia la naturaleza, eventos ya confirmados. Las muestras se recolectaron conforme a las normas establecidas, las bacterias se cultivaron en medio KF y caldo LB; las pruebas realizadas fueron la técnica de licuefacción de gelatina para la gelatinasa enterocócica y prueba de hemólisis en agar sangre para la detección de citolisina, así mismo se utilizó PCR para la especiación de los enterococos y secuenciación de las amplificaciones para confirmarlas. Se obtuvieron 373 aislados de los cuales 232 fueron gelatinasa positivas (64%), un porcentaje mayor al reportado en otros estudios para el caso de las muestras de agua residual, en el caso de la muestra de río esta se encontró dentro de los valores reportados. 36 enterococos mostraron una actividad combinada, por lo que el porcentaje de enterococos hemolíticos se comportó en los valores reportados. Sin embargo, resalta que en la muestra del IMSS ninguno resulto positivo. De los 36 aislados, 33 fueron *E. faecium* lo que superó enormemente la distribución que tiene hacia *E. faecalis* ya que este se encontró en 2 ocasiones, 1 aislado no amplificó para ninguna de las 2 especies. Resalta el uso de una técnica económica y accesible para la detección de gelatinasa en enterococos y la existencia de *E. faecium* con actividad de gelatinasa y  $\beta$ -hemólisis junto a su reciente listado por parte de la OMS en el grupo de bacterias con prioridad elevada dentro de la Lista de Patógenos Prioritarios.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los enterococos son bacterias comensales de las comunidades intestinales en mamíferos y aves, se eliminan del organismo por las heces y son de fácil cultivo. Bajo condiciones favorables se comportan como patógenos oportunistas causando millones de infecciones anualmente. Se usan como indicadores de patógenos y de material fecal en la investigación y análisis de calidad de agua. Esto para predecir los riesgos en la salud humana ante la exposición de aguas contaminadas (Sinclair *et al.*, 2012). Evidencias de varias décadas de investigación, demuestran que los enterococos pueden estar presentes en altas densidades poblacionales aun en ausencia de fuentes fecales obvias y que los reservorios ambientales de estos, son fuentes y sumideros importantes, con potencial para afectar la calidad del agua (Byappanahalli *et al.*, 2012).

El grupo de los *Enterococcus* son cocos Gram positivos que se observan al microscopio de forma aislada, en parejas o cadenas. Son mesofilicos, sin embargo, son capaces de crecer en un amplio rango de temperatura que va desde 10 a 45 °C, incluso hasta los 60 °C por un periodo corto. Además, presentan capacidad para hidrolizar la bilis esculina y la pirrolidoniol- $\beta$ -naftilamida (PYR); crecen sobre bilis hasta concentraciones del 40%, 6.5% de NaCl y toleran pHs hasta de 9.5. Son además, citocromo oxidasa negativo (Quiñones, 2010).

*Enterococcus faecalis* y *E. faecium* son las especies dominantes del género en el tracto gastrointestinal humano, ya que representan hasta el 95% de la población microbiana que ahí habita. Esta frecuencia de aislamiento por especie es constante incluso en muestras clínicas provenientes de infecciones nosocomiales (Ronconi & Merino, 2004). Su repercusión como patógenos y sus consecuencias han ido en aumento por la aparición de cepas multirresistentes ya que restan la disponibilidad de tratamientos a antibióticos accesibles y eficaces (Aldana, 2007). El género *Enterococcus* ocupaba el cuarto lugar como agente en infecciones nosocomiales, pero con el paso del tiempo ha llegado a tomar el segundo lugar en los últimos 10 años. *E. faecalis* representa hasta el 90% de las infecciones nosocomiales por

enterococos en humanos (Arias & Murray, 2012). Esta tendencia se ha atribuido a la creciente resistencia a los antibióticos entre los aislados clínicos de los enterococos. Una rápida propagación en la resistencia a vancomicina por los enterococos (VRE), ha sido motivo de especial preocupación debido a que es la última opción terapéutica ante infecciones. Muchas cepas asociadas a la salud que son resistentes a la vancomicina también muestran resistencia a la penicilina, así como resistencia de alto nivel (HLR) a los aminoglucósidos (Agudelo & Huycke, 2014).

Sumado a la resistencia a antibióticos, la presencia de factores de virulencia en los enterococos da como resultado, aislados con un alto potencial de patogenicidad. Como factor de virulencia se entiende a los diversos componentes o sustancias producidas por los microorganismos que son necesarios para causar enfermedad o potenciar su capacidad de hacerlo. Estas moléculas les permiten a los microorganismos incrementar su gravedad en la enfermedad, o les facilita el poder hospedarse en su huésped, a pesar de su patogenicidad relativa (Padilla *et al.*, 2012).

### 1.1 Enterococos: Factores de virulencia y regulación

En la actualidad se tiene pleno conocimiento que la virulencia de un organismo está mediada por la codificación de genes de virulencia, los cuales están presentes en regiones especiales dentro del genoma, a las cuales se les denominan islas de patogenicidad (PAI). En el género *Enterococcus* se identificaron por primera vez dentro del genoma de una cepa resistente a múltiples fármacos de *E. faecalis* (MMH594) (Girdhara *et al.*, 2009)

Son varios los factores de virulencia que han sido descritos en el género *Enterococcus*, entre ellos, principalmente los referidos para las de cepas *E. faecalis*. Entre estos encontramos el Antígeno A (EfaA), Adhesina del colágeno (Ace) la Sustancia de agregación (Asal o Agg), Gelatinasa (GelE), Proteína enterocócica de superficie (Esp), Citolisina enterocócica (CylA) y Hialuronidasa (Hyl) (Silva *et al.*, 2012). Estos factores genéticos, codifican proteínas o enzimas que les permiten a los

microorganismos incrementar su severidad en la enfermedad, o les facilita el poder hospedarse en su hospedero (Padilla *et al.*, 2012).

Tabla 1. Principales factores de virulencia descritos en *Enterococcus spp.*

Factor de virulencia	Gen	Descripción y función
Antígeno A	<i>efaA</i>	Componente lipoproteico, de un transportador de metales ABC en donde probablemente funcione como un receptor de la proteína de unión del complejo ABC.
Adhesina del colágeno	<i>ace</i>	Es una adhesina que se une a los colágenos tipo I y IV además de laminina. Es un factor de virulencia en infecciones de endocarditis y tracto urinario, se ha demostrado que sus concentraciones aumentan bajo la presencia de suero, sales biliares, orina, colágeno y temperaturas de 46 °C.
Sustancia de agregación	<i>asaI</i> o <i>agg</i>	Proteína unida a la superficie que se expresa en respuesta a la inducción de feromonas, convierte la superficie de la bacteria en un adherente potencial hacia células receptoras, formando cúmulos y facilita la transferencia de plásmidos.
Gelatinasa enterocócica	<i>gelE</i>	Enzima, zinc metaloproteasa, factor en la promoción de la formación de biofilm; se hipotetiza que podría ser capaz de modificar la superficie celular, factor de virulencia importante en peritonitis y endoftalmitis usando ratones como modelo.
Proteína enterocócica de superficie	<i>esp</i>	Es uno de los factores reportados como importantes dentro de la formación de biofilm y además se piensa que es una adhesina que contribuye en la colonización de células epiteliales del tracto urinario.
Citolisina enterocócica	<i>cyl</i>	Toxina lítica, asociada en infecciones agudas y terminales, constituida por dos subunidades las cuales provocan lisis celular, actúa sobre un amplio espectro de células entre ellas provocar la lisis de los eritrocitos.
Hialuronidasa	<i>hyl</i>	Proteína, se considera que esta hialuronidasa contribuye en la invasión de la nasofaringe y neumonía pneumococcal. La enzima es principalmente degradativa y se asocia a daño de tejidos.

### 1.1.1 Gelatinasa enterocócica *GelE*

La zinc metaloproteasa *gelE*, es un factor que le permite a la bacteria actuar sobre el sistema inmunológico del hospedero además de ser un factor en la promoción de formación de biofilm, los determinantes de *gelE* están adyacentes y río arriba de *sprE* (el determinante que codifica para una serina proteasa), ambos genes son co-transcritos y están bajo control del sistema de *Quorum sensing* (QS), *fsr* (Dunny *et al.*, 2014).

La inactivación y caracterización fenotípica de los 18 reguladores de respuesta por mutación mostraron la atenuación en la habilidad de formación de biofilm en el caso del regulador de respuesta 15 (RR15) el cual previamente había sido reportado como parte del transductor de señal de QS del sistema *Fsr* el cual responde a la acumulación de GBAP (Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone) un péptido lactona de 11 amino ácidos. El sistema *Fsr* de *E. faecalis* parcialmente se asemeja al sistema *Agr* de *Staphylococcus*, donde una histidin kinasa (*FsrC*) responde a la acumulación de GBAP para fosforilar el regulador de respuesta cognado (*FsrA*) (Dunny *et al.*, 2014). Por lo tanto, es claramente un sistema de dos componentes. Posterior a esto se demostró que la forma fosforilada de *FrsA* es requerida para reconocer la secuencia diana del ADN para promover la transcripción y que su dominio de reconocimiento al ADN es del tipo *LytTR* (Litter domain Transcriptional Regulator), consta de cuatro cadenas beta y tres hélices alfa). La producción de GBAP surge del procesamiento de un precursor pro péptido de 53 aminoácidos codificada por *fsrD*. El procesamiento del pro péptido y su exportación por la membrana, mediante *FsrB*, conduce a la acumulación externa de GBAP. El sistema *Fsr* se ha visto involucrado en la regulación de muchos genes, incluida la autorregulación del operón *fsrBCD*, y de los genes co-transcritos *gelE-sprE* (Dunny *et al.*, 2014).

El mecanismo por el cual *GelE* regula positivamente la formación de biofilm hasta el momento sigue desconocido, aunque se hipotetiza que *GelE*, así como *Esp*, podrían ser capaces de modificar la superficie celular bacteriana en virtud de su habilidad de

romper los substratos en residuos hidrofóbicos. Una hipótesis alternativa involucra la habilidad de GelE de activar autolisinas de la pared celular, SprE también se ha mostrado en ser un factor de virulencia importante en peritonitis usando ratones como modelo o en endoftalmitis de ratón como modelo (Tendolkar *et al.*, 2004).

### 1.1.2 Citolisina enterocócica *CylA*

Es una toxina lítica, asociada en infecciones agudas y terminales; se encuentra constituida por dos subunidades, mismas que interactúan para provocar la lisis celular. Ejerce actividad contra un amplio espectro de células, incluye; bacterias gram positivas, eritrocitos, células de retina, leucocitos polimorfonucleares y células epiteliales intestinales. Es una proteína modificada postranscripcionalmente y ha sido determinada en el 60% de los brotes de *E. faecalis*. Las características que se atribuyen a la citolisina son relevantes, ya que además de causar la lisis de eritrocitos humanos, también presenta un efecto organotóxico (Mundy *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado un mecanismo autoprotector en *Enterococcus* productores de citolisina, lo que facilita la prevalencia de *Enterococcus* en el sitio de la infección (Sánchez, 2008).

El gen que la codifica, forma parte de un operón que contiene ocho genes, los cuales son, *cylR1*, *cylR2*, *cylI1*, *cylS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* y *cylI* (Coburns & Gilmore, 2003). Un complejo que codifica 5 productos genéticos que son necesarios y suficientes para la producción de citolisina. El modelo de expresión de la citolisina, maduración, secreción y activación, incluye dos subunidades estructurales (codificadas por los genes *cylLL* y *cylLS*), que son modificados post transcripcionalmente e intracelularmente por el producto del gen *cylM* y transportado fuera de la célula por un transportador de cassette con unión a ATP, codificado por *cylB*; después de la externalización, los componentes precursores de la citolisina son activados por el producto genético de *cylA*, un activador extracelular serin-proteasa. El sexto gen (*cylI*) codifica una proteína responsable de la inmunidad de la bacteria productora de citolisina hacia la citolisina. Los seis marcos de lectura abierta están incrustados y orientados en la misma dirección. La regulación de la expresión de citolisina fue

descrito en 2002 por Haas y colaboradores, como un sistema de dos componentes en respuesta a una autoinducción de QS. Estudios adicionales, demostraron, que otros dos genes (*cylR1* y *cylR2*) codifican productos que están implicados en la represión de la transcripción de los genes de citolisina por un mecanismo de QS (Semedo *et al.*, 2003).

### 1.1.3 Proteína de superficie enterocócica *Esp*

La proteína de superficie enterocócica, es uno de los factores reportados como importantes dentro de la formación de biofilm en *E. faecalis*, fue inicialmente identificado en un aislado resistente a gentamicina (MMH594) y posteriormente en una isla de patogenicidad (Tendolkar *et al.*, 2004). Se expresa como una larga proteína expuesta en superficie con una masa molecular de aproximadamente 202 kDa, se piensa que es una adhesina que contribuye a la colonización de células epiteliales del tracto urinario y en la formación de biofilm. Su presencia en brotes de VRE en hospitales, sugieren un papel del gen en la transmisión nosocomial (Leavis *et al.*, 2004).

De la secuenciación y análisis del gen *esp* procedente de la cepa P61 de *E. faecium* se reveló que pertenece a la familia de las proteínas de superficie expuestas con estructuras repetitivas como la C alfa y Rib de *Streptococcus agalactiae* y la R28 de *S. pyogenes* o la proteína Bap de *S. aureus*, todas estas involucradas en virulencia y protección ante sistemas inmunitarios, incluso se ha observado una similitud entre las secuencias predominantemente en las regiones repetidas (Leavis *et al.*, 2004).

Uno de los estudios realizados a la isla de patogenicidad donde procede *Esp*, reportó 7 marcos de lectura incluido el gen *esp*, en su búsqueda de homología usando GenBank/EMBL se predijo la secuencia de aminoácidos de los 7 marcos de lectura y de estos, el tercero correspondió al gen *esp* (Leavis *et al.*, 2004).

En el 2011, Top y colaboradores demostraron que la isla de patogenicidad es auto transmisible y contiene características de un elemento conjugativo integrativo, por lo que fue renombrado ICEEfm1 (Integrative Conjugative Element of *Enterococcus*

*faecium* 1") (Top *et al.*, 2011). Sumado a las pruebas de que Esp está involucrado en la formación de biofilm y contribuye en ciertas patologías, se demostró una expresión variable de Esp entre cepas y condiciones de crecimiento (Wamel *et al.*, 2007). Estudios más profundos hacia ICEEfm1 identificaron genes codificantes río arriba de *esp*, un marco de lectura con similitud a la familia AraC, un regulador transcripcional (Top *et al.*, 2013). El análisis de la organización genética de la región de *esp* sugiere que es parte de un operón que tiene 5 genes, que incluye a *nox* que codifica para una NADH oxidasa putativa, *efmE1162\_1544* (que codifica para una muramidasa putativa, *efmE1162\_1543* (que codifica para una permeasa que confiere resistencia a drogas) y *efmE1162\_1541* (además de otra proteína putativa *efmE1162\_1542*) (Leavis *et al.*, 2004).

En la investigación realizada por Top y colaboradores en 2013, se identificó el regulador de la expresión de *esp*, designado como EbrB, (Enterococcal Biofilm Regulator B) el cual está localizado justo río arriba del gen *esp*. Además, se demostró que *esp* es parte de un operón que incluye por lo menos dos, o posiblemente tres genes que están localizados río abajo. EbrB, una proteína que contiene características C-terminal de HTH (helix-turn-helix) procedente de un regulador transcripcional tipo AraC, regula positivamente la expresión la proteína Esp que pertenece a la familia de proteínas Alp tanto en *E. faecalis* y *E. faecium*, tal como se venía sugiriendo desde investigaciones realizadas en diciembre de 2012. Sin embargo, el regulador AraC, es un factor de transcripción que regula la expresión de las proteínas del catabolismo de la L-arabinosa. Observaciones en la expresión de Esp durante condiciones de crecimiento dependiente, indicaron que la regulación por parte de EbrB se induce por señales ambientales, además de que se observó que durante el crecimiento bacteriano se incrementaba Esp a nivel de mRNA y proteína, con los niveles más altos durante la fase estacionaria, lo que sugiere un sistema de regulación tipo QS aún sin identificar (Top *et al.*, 2013).

#### 1.1.4 Sustancia de agregación *Agg* o *Asa1*

La Sustancia de agregación es una proteína unida a la superficie, codificada en un plásmido de *E. faecalis* y se expresa en respuesta a la inducción de feromonas. Esta proteína convierte la superficie de la bacteria en un adherente potencial hacia células receptoras, lo que causa la agregación o formación de cúmulos, además de que facilita la transferencia de plásmidos. El gen que codifica para la sustancia de agregación se localizó a 9.4 Kb desde el origen, dentro del plásmido pAD1 (Bradley *et al.*, 1994). Esta proteína mantiene interacción con las integrinas CD11b, CD18 y CR3, gracias a dos regiones Arg-Gly-Asp, similares a los que se reportaron inicialmente en fibronectinas, las cuales son capaces de unir a los receptores de las integrinas en células eucarióticas (Garza *et al.*, 2000).

La familia de plásmidos de feromonas sexuales en *E. faecalis* son de los sistemas de conjugación bacteriana más eficientes conocidos; consisten en más de 20 plásmidos los cuales muestran alta homología en sus secuencias y pueden coexistir en algunas cepas de *E. faecalis*, ya que estas bacterias, pueden hospedar varios de estos plásmidos. El genoma de la cepa V583, que fue el primer aislado resistente a vancomicina en Estados Unidos, fue secuenciado por "The Institute for Genomic Research"; en la cepa se encontraron dos plásmidos de feromonas sexuales cuya homología correspondió a los plásmidos pAD1 (pTEF1) y pCF10 (pTEF2) (Hirt *et al.*, 2005).

A pesar de la facilidad con la que pueden ser diseminados estos plásmidos, dicha transferencia está altamente regulada y solo es inducida por células receptoras las cuales están próximas a las donadoras. El proceso surge desde la célula receptora, la cual secreta feromonas hidrofóbicas compuestas de 7 u 8 aminoácidos de longitud. Estas moléculas se anclan a una proteína codificada por el plásmido, entonces la feromona es tomada e introducida a la célula donadora lo cual libera un bloque transcripcional de la familia represora PrgX (Sex pheromone receptor proteins). Uno de los primeros transcritos posterior a la inducción, codifica la proteína de superficie "Sustancia de Agregación o Asa1", dicha expresión da como resultado

un contacto físico firme entre la célula donadora y receptora, permitiendo así la transferencia de plásmidos (Hirt *et al.*, 2005).

### 1.1.5 Adhesina de colágeno Ace

La Adhesina de Colágeno tal como su nombre lo indica, es una adhesina que se une a los colágenos tipo I y IV además de laminina, pertenece a la familia de MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules), identificada por homología de secuencia al factor de virulencia Cna, otro MSCRAMM de la especie *S. aureus*. La expresión de *ace*, codifica un factor de virulencia en infecciones de endocarditis y tracto urinario. Se ha demostrado que se incrementa bajo ciertas condiciones como son la presencia de suero, sales biliares, orina y colágeno, o temperaturas de 46 °C (Rich *et al.*, 1999). El mecanismo de regulación del gen *ace*, se considera incierto. Sin embargo, Lebreton y colaboradores en 2009, mostraron que en una cepa de *E. faecalis* (JH2-2), el regulador enterococcal de supervivencia (Ers), regula negativamente la expresión de *ace* a la vez que este regula positivamente otros genes. Cuando se adicionaron sales biliares a la cepa JH2-2, la expresión de *ers* disminuyó. No obstante, dicha expresión no se vio afectada por la adición de colágeno o por suero de caballo, ni por el aumento de temperatura a los 46 °C, por lo que se considera que otros factores regulan la expresión de *ace* bajo esas condiciones (Lebreton *et al.*, 2009).

Por otra parte, en el 2014, Cohen y colaboradores pusieron a prueba el regulador *ers* en la cepa OG1RF de *E. faecalis* y encontraron que *Ers* en esta cepa no está involucrado en la regulación de *ace* por lo menos, no a un nivel postranscripcional, además de determinar que hay diferencias en la regiones río arriba de *ace* entre las cepas JH2-2 y OG1RF, dichas diferencias pudieran jugar un papel en la regulación de este factor de virulencia (Cohen *et al.*, 2013).

Se postula además un sistema de dos componentes "GrvRS" (Global Regulator of Virulence; antes conocido como EtaRS), como un regulador positivo de la transcripción de *ace* en *E. faecalis* OG1RF, bajo varias condiciones ambientales

(Roh *et al.*, 2015). Al utilizar mutación disruptiva y una fusión del promotor de *ace*, se encontró que el sistema de dos componentes GrvRS, aparentemente controla la expresión de *ace* en respuesta al suero, generando una regulación positiva de la expresión de *ace*, dejando postulado que GrvRS es el mayor regulador de *ace* e importante para la virulencia de la cepa OG1RF de *E. faecalis* (Roh *et al.*, 2015).

### 1.1.6 Antígeno A EfaA

Dentro del grupo de enterococos, la especie *E. faecalis* lidera como causal en infecciones de endocarditis. Estudios sobre cepas de esta especie dieron a conocer un antígeno dominante de 37 kDa, reconocido en suero, mediante serodiagnóstico con ELISA, el gen que codifica para este antígeno fue clonado, secuenciado y designado *efaA* (Lowe *et al.*, 1995). El gen *efaA* forma parte del operón *efaCBA*, se postula que codifican un transportador tipo ABC, donde *efaA* representa el componente lipoproteico (Low *et al.*, 2003).

El gen *efaA* es el tercer gen dentro del operón, la homología de la secuencia, sugiere que codifican un sistema de transporte de metales tipo ABC, donde el primer gen, *efaC*, codifica una proteína de unión al ATP; La segunda, *efaB*, codifica una proteína transmembranal hidrofóbica y *efaA* probablemente funcione como un receptor de la proteína de unión del complejo ABC. Rio arriba de la secuencia codificante de *efaC* se encuentran putativamente secuencias Shine-Dalgarno, las secuencias consenso -10 y -35 y dos secuencias palindrómicas que se han determinado cajas EfaR (Amtzen *et al.*, 2015, Low *et al.*, 2003). Estas dos secuencias, invertidas y repetidas, asemejan un sitio de unión para proteínas metaloregulatorias como DtxR de *Corynebacterium diphtheriae*; Por lo tanto, se hipotetizó que la regulación de la expresión del operón *efaCBA* era a través de manganeso via un regulador transcripcional doble tipo DtxR y que participa en el metabolismo del hierro en *C. glutamicum* (Low *et al.*, 2003).

Un homólogo de DtxR fue identificado en el cromosoma de *E. faecalis* V583, designado Efar (EFA Regulator of expression), con una longitud de 222 aminoácidos

y una masa molecular de 25.5 kDa. En 2013 Abrantes y colaboradores mostraron que EfaR es el mayor regulador transcripcional de transportadores de manganeso en *E. faecalis* y que una mutación en el gen que lo codifica, reduce la habilidad de *E. faecalis* para formar biofilms, sobrevivir dentro de macrófagos o tolerar el estrés oxidativo, además de todas las propiedades asociadas a colonización e infección (Amtzen *et al.*, 2015). La unión de EfaR a la región promotora de *efaCBA* es promovida por manganeso, el que actúa como un correpressor (Abrantes *et al.*, 2013).

### 1.1.7 Hialuronidasa *Hyl*

La proteína hialuronidasa enterocócica, muestra homología con hialuronidasas descritas previamente en *S. pyogenes*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*, las cuales se consideran que contribuyen en la invasión de la nasofaringe y neumonía pneumococcal (Vankerckhoven *et al.*, 2004). La hialuronidasa, se identificó por primera vez dentro de la cepa *E. faecium* CV133 y fue confirmada después en C68 (Rice *et al.*, 2003). La enzima es principalmente degradativa y se asocia a daño de tejidos (Golińska *et al.*, 2013).

## 1.2 Enterococos y sus patologías

Entre las infecciones que producen los *Enterococcus* a los seres humanos, son frecuentes las del tracto urinario, torrente sanguíneo, endocardio, abdomen, el tracto biliar y heridas por quemaduras. Los dispositivos como catéteres, marcapasos, o fistulas, suelen ser predisponentes a estas infecciones (Bradley *et al.*, 1994). A partir de los años 70's y 80's, los enterococos se han establecido como patógenos nosocomiales y se consideran uno de los principales agentes etiológicos de infecciones adquiridas intrahospitalariamente. Ocupa el segundo lugar como agente causal de bacteriemias y el tercer agente más común de infecciones situadas en el tracto urinario (Hidron *et al.*, 2008). Desplazando incluso a las infecciones ocasionadas por *Escherichia coli* y *S.aureus* (Arias & Murray, 2012).

### 1.2.1 Endocarditis

La afección corresponde a la infección de una o más válvulas cardíacas, lo cual en dos terceras partes de los casos, es posterior a ciertas patologías cardiovasculares preexistentes (Garza-Velasco *et al.*, 2000). Inicia con un episodio bacterémico, al ingresar el microorganismo a la sangre de afecciones cutáneas, manipulaciones dentales, intervenciones quirúrgicas en la rinofaringe, exploraciones endoscópicas de las vías genitourinarias o abscesos pulmonares (Aldana, 2007).

La endocarditis es una de las más graves infecciones por enterococos. Debido a la resistencia intrínseca de los enterococos a la actividad bactericida de la mayoría de los antibióticos, el tratamiento es difícil, incluso cuando enterococos relativamente susceptibles están involucrados (Murdoch, *et al.*, 2009).

### 1.2.2 Bacteriemia

Se define la bacteriemia como la presencia de bacterias en la sangre, la mayor frecuencia es en hombres de más de 50 años con una afección médica preexistente, como una intervención quirúrgica, quemaduras graves y traumatismos múltiples. Alrededor del 80% son casos de infecciones nosocomiales y su mortalidad asciende alrededor del 35% (Bearman & Wenzel, 2005). La bacteriemia y endocarditis son las manifestaciones más comunes de las infecciones por enterococos (Hidron, *et al.*, 2008).

### 1.2.3 Infección de vías urinarias

Los enterococos son agentes etiológicos comunes de las infecciones del tracto urinario (UTIs), patologías consideradas como las más frecuentes entre los pacientes ubicados en las unidades de cuidados intensivos y están estrechamente relacionadas con el uso de catéteres. Las bacterias patógenas aisladas con mayor frecuencia son *E. coli*, *Enterococcus sp* y *Pseudomonas aeruginosa* (Garza-Velasco *et al.*, 2000). Los factores de riesgo incluyen disminución de las defensas en el hospedero (Aldana, 2007).

#### 1.2.4 Infecciones abdominales

Las infecciones abdominales por *E. faecalis* pueden producir infecciones intraabdominales casi siempre como parte de una infección mixta por *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermidis* (Aldana, 2007). La tasa de mortalidad es elevada cuando la infección contiene tanto *Enterococcus* como *E. coli* (Resnick & Novick, 2000). La peritonitis, una infección del revestimiento abdominal, ocurre más a menudo en combinación con cirrosis hepática o en pacientes que reciben diálisis peritoneal crónica. Los enterococos pueden causar infección monomicrobiana en estas situaciones, aunque se producen en menor frecuencia que con *E. coli* o *S. aureus* para la peritonitis asociada a diálisis (Agudelo & Huycke, 2014).

#### 1.2.5 Meningitis

La meningitis es la inflamación de las membranas que cubren el cerebro y la médula espinal. Es poco frecuente que las meningitis sean causadas por *E. faecalis* y *E. faecium*. Sin embargo, en esos casos se asocia con una alta tasa de mortalidad (Chiara *et al.*, 2005). La meningitis ocasionada por *E. faecium* en neonatos, se ha relacionado con el descuido de enfermeras y suelen provocar epidemias esporádicas (Aldana, 2007).

#### 1.3 Hábitat como promotor de virulencia

Las infecciones nosocomiales son un problema actual y en constante evolución en todo el mundo. Aunque desde hace siglos ha existido un gran interés por el tema de las infecciones nosocomiales, ha sido hasta hace pocas décadas que el campo ha tenido aceptación general que las reconoce como un problema relevante de la salud pública de gran trascendencia económica y social, además de constituir un desafío para las instituciones hospitalarias (Espinal, 2003). El uso de los antibióticos para el tratamiento de infecciones, supone una presión selectiva para el desarrollo de resistencia y su transmisión repercute en la supervivencia en el ambiente a largo plazo (Iweriebor *et al.*, 2015).

La plasticidad genética que presenta el enterococo de forma nativa, sumado a la resistencia intrínseca que presenta a algunos de los antimicrobianos, es lo que lo ha posicionado actualmente como uno de los principales agentes etiológicos de infecciones nosocomiales. Por otra parte, poseen gran capacidad para la adquisición de nuevos mecanismos como son los genes de virulencia, gracias a elementos genéticos móviles como plásmidos o mutaciones (Díaz *et al.*, 2010). Aunado a lo anterior, la presencia de cepas multiresistentes de *Enterococcus* se está convirtiendo en una amenaza, ya que las opciones terapéuticas son limitadas a tal grado que algunas cepas ya son resistentes a todos los antimicrobianos disponibles. Por otra parte, la automedicación desmesurada en México, que se presentó en años anteriores agravó esta situación (Amábile-Cuevas, 2010).

La persistencia de estas condiciones originada en el ambiente hospitalario y que acompaña a las bacterias hasta el ambiente, supone una presión constante para estas. Esto las obliga a generar y transferir los mecanismos necesarios para asegurar su supervivencia en cualquier medio donde puedan encontrarse. Lo anterior, puede ocurrir en ambientes propicios, ya sea hospitalario o natural. En ambientes naturales, los contenedores de basura a cielo abierto, cuerpos de aguas contaminadas, plantas de tratamientos, sedimentos, etc, generan las condiciones adecuadas para la transferencia de características genéticas que aseguran la sobrevivencia ante diversas presiones selectivas (Amábile-Cuevas, 2010).

#### 1.4 Repercusiones al ambiente

La diseminación de la resistencia a antibióticos en bacterias procedentes de hospitales puede ocurrir por varias rutas, aguas residuales de hospitales, la descarga de pacientes, fómites y el personal. Los antibióticos en las aguas residuales podrían provenir de la orina de pacientes, disposición de medicamentos caducos o derrames accidentales de estos. En conjunto, estos eventos sirven como una presión selectiva adicional sobre las bacterias presentes en las aguas residuales (Iweriebor *et al.*, 2015). Por otra parte, la dispersión al ambiente de patógenos provenientes de nosocomios, representa un riesgo para la salud pública, ya que este tipo de

microorganismos contienen las capacidades genéticas de virulencia y, en muchos de los casos, de resistencia a antibióticos (Mondragón *et al.*, 2011). Los microorganismos con este potencial genético, liberados al ambiente, podrán eventualmente dispersar y perpetuar algunas de sus características genéticas, lo que constituye un riesgo para la salud de humanos y animales.

La transmisión de estos microorganismos hacia el medio ambiente se lleva a cabo principalmente a través de la salida de las aguas residuales procedentes de estos lugares. La mecánica y el flujo que tienen, hasta llegar a las zonas donde serán tratadas, produce una dispersión de microorganismos en el aire, que se traduce en una propagación de las bacterias en una amplia zona. Del mismo modo, las plantas de tratamiento de aguas residuales en el caso de los depósitos, o los estanques de aireación, son medio de proliferación para las bacterias, lo que aumenta su concentración y la probabilidad de ser dispersadas en el ambiente (Korzeniewska & Harnisz, 2012).

## 2. ANTECEDENTES

En México, el manejo de aguas residuales y disposición de basura son ineficientes e insuficientes lo que propicia la dispersión de microorganismos inoecuos y patógenos (Amáñile-Cuevas, 2010). En el caso particular de la ciudad de Tepic, se tiene evidenciada la ineficacia de los sistemas de saneamiento de aguas residuales, ya que las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales que vierten su producto al cauce del río Mololoa (principal efluente que cruza por la ciudad), son insuficientes para la demanda que se requiere; adicional a esto, la existencia de descargas clandestinas de aguas residuales municipales no hacen más que agravar la problemática de contaminación del río (Jáuregui-Medina *et al.*, 2007). La deficiencia en el saneamiento de las aguas residuales que se producen, puede permitir la libre propagación de bacterias con características genéticas precedentemente mencionadas, hacia el ambiente. Lo anterior, genera un grave problema a la salud pública dada las actividades en las que son utilizadas las aguas del río Mololoa, de igual modo al ecosistema ante la posible interacción con bacterias silvestres de la región, además de la contaminación producida.

Ante esta problemática, en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana de la UACQByF, se investigó y demostró la presencia de bacterias de importancia médica y veterinaria en los lixiviados que provienen del confinamiento de basura y las aguas del río Mololoa, *E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa*, entre otras especies. De igual forma, se determinó, en dichos aislados, la resistencia a metales pesados tanto fenotípica como genotípicamente, entre ellos mercurio, arsénico, cromo y cadmio. En estos mismos aislados, se ha comprobado que existe capacidad de transferencia de información genética de dicha resistencia, por conjugación (Mondragón *et al.*, 2011). Así mismo, se ha identificado la resistencia a antibióticos como vancomicina, kanamicina, ciprofloxacino, gentamicina y beta-lactámicos. Por otra parte, también se demostró la presencia de determinantes genéticos de virulencia propios de *E. coli* en *Enterobacter sp.*, del lugar. Esto pone en evidencia la dinámica de transferencia horizontal que se lleva a cabo en el ambiente

y subraya la importancia de realizar estudios poblacionales bacterianos con repercusiones en salud (Pacheco, 2014). De igual forma, fue posible determinar la relación clonal entre diversas especies de proteobacterias aisladas de las aguas negras que llegan a la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales "El Punto", con las de los lixiviados del basurero municipal "El Ixtete". Ambas corrientes confluyen en el río Mololoa. Además, de presentar las mismas características genéticas, estos grupos comparten plásmidos con el mismo peso molecular a su respectiva clona (Pacheco, 2014).

De los aislados enterocócicos del río Mololoa, se reportó la presencia de los genes de virulencia *asa1* y *gelE* en 15 cepas aisladas de 3 sitios distintos en la periferia del río (Gutiérrez-Meza, 2013), genes involucrados en la expresión de virulencia durante patologías (*asa1*, *gelE*) e involucrados en procesos como la formación de biofilm u obtención de nutrientes (*gelE*). Posteriormente, los genes *acef*, *efaA* (Antígeno A) y *esp*, fueron reportados en un mayor número de enterococos obtenidos de los mismos sitios de muestreo (Lendo-Hernández, 2014); nuevamente, genes cuya expresión está relacionada a procesos patológicos y a la virulencia de la cepa. Así mismo, ha sido posible identificar en estos aislados, la presencia del gen *vanB*, que es uno de los genes que codifican para la resistencia a vancomicina.

Por otra parte, se ha demostrado que, a partir de actividades humanas como la agricultura intensiva y las plantas de tratamiento de aguas cloacales, es frecuente la contaminación por enterococos en los diferentes hábitats en los que se incide (Byappanahalli *et al.*, 2012). Como resultado de lo anterior, las aguas contaminadas por enterococos de origen antrópico o animal, gracias a su capacidad para adaptarse a condiciones adversas, podrían formar parte de la microbiota ambiental por tiempos prolongados o de forma permanente y dispersarse a partir de estos sitios a nuevos hábitats u hospederos; humanos y animales. De esta manera, una de las hipótesis que se puede plantear es: las aguas residuales generadas por hospitales y las del cauce del río Mololoa, albergan *Enterococcus* potencialmente patógenos con capacidad hemolítica y actividad de gelatinasa.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las evidencias sobre las características genéticas que poseen los aislados del género *Enterococcus*, de las aguas del río Mololoa, nos muestran su potencial de virulencia. Sin embargo, fenotípicamente no ha sido demostrada su expresión. Por lo anterior, se plantea determinar la expresión fenotípica de dos de los genes de virulencia identificados en *Enterococcus*, los cuales se tiene demostrado su papel y repercusiones en salud durante un proceso infeccioso (Vankerckhoven *et al.*, 2004). Por un lado, la expresión de una enzima, la gelatina enterocócica, codificada por el gen *gelE*, que además de aportarle nutrientes a la bacteria, está involucrada en el proceso de formación de biofilm y actuar contra las defensas inmunológicas del huésped durante una infección (Padilla *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2013). Por otra parte, la producción de una toxina, la citolisina enterocócica (Cyl), codificada por el plásmido pAD1 y constituida por tres subunidades, mismas que interactúan para provocar la lisis celular; no obstante, solo una de ellas, definida como el activador (CylA), es la que ha concentrado la atención de los especialistas (Vankerckhoven *et al.*, 2004). La citolisina enterocócica se asocia a infecciones agudas, y ejerce una actividad contra un amplio espectro de células, actúa como bactericida y tiene actividad hemolítica (Cox *et al.*, 2005). Se ha demostrado además, que pAD1 es responsable de conferir resistencia a vancomicina, radiación ultravioleta y poseer propiedades conjugativas (Clewell, 2007).

Enterococos con características capaces de repercutir en la salud, pueden originarse en hospitales y distribirse en el ambiente a través de efluentes cloacales, como ya se ha demostrado en otro sitio (Leclercq *et al.*, 2013).

Se sabe que, en la ciudad de Tepic, las aguas de residuos municipales, llegan a la Planta de Tratamientos de Aguas Residuales (PTAR) "El punto" y a la PTAR "Norte", y son vertidos al río Mololoa previo a su tratamiento y posterior a ello. Por otra parte, los hospitales del municipio, no cuentan con PTARs propias, por lo que no tienen cuidado de sanear sus residuos de agua, antes de conectarlos a los sistemas de alcantarillado municipales.

Actualmente, no contamos con la información que nos permita conocer si los efluentes nosocomiales juegan un papel en la dispersión de cepas de *Enterococcus* portadoras de factores de virulencia hacia el ambiente, desconocemos además, si se expresan las características genéticas de virulencia en las poblaciones de *Enterococcus* nosocomiales y de aquellas que se localizan en otros cuerpos de aguas como las del río Mololoa. Por lo anterior, es posible cuestionarse sobre la posible contribución de *Enterococcus* con estas características desde los hospitales al ambiente y finalmente al cauce del río Mololoa. De encontrar bacterias que expresan fenotípicamente factores de virulencia como lo son la citolisina enterocócica o la gelatinasa enterocócica, hablaríamos de organismos con mecanismos que les facilitarían llevar a cabo un proceso infeccioso y con altos riesgos para la salud pública. Por lo que, el buscar la expresión fenotípica de estos factores en aislados de enterococos ambientales y nosocomiales, nos permitirá dar el primer paso en la búsqueda de la relación que pueden tener los enterococos en estos 2 ambientes.

El conocer la distribución y las características de los enterococos en estas zonas de estudio, sentará precedente que permitirá iniciar la búsqueda de la relación clonal que pudieran tener entre sí, los enterococos que proceden de cada punto, y con ello establecer si existe o no una dispersión de las bacterias. Además, saber si estas poseen características que debieran ser tomadas en consideración, dado su papel infeccioso y el riesgo que supondría para la salud pública.

En este estudio, se pretende demostrar la expresión de dos de los diversos factores de virulencia en enterococos: la citolisina enterocócica y su actividad hemolítica. La citolisina se libera en las primeras fases de la infección por enterococos, lo que sugiere una función necesaria o relevante para el desarrollo de la enfermedad. Entre algunas funciones, parece provocar la liberación de mediadores pro-inflamatorios lo que puede incrementar la severidad del proceso inflamatorio, junto con la actividad hemolítica y empeorar el cuadro clínico de la enfermedad. (Rangel-Arenas, 2010). De igual modo, la gelatinasa (gelE) es una metaloendopeptidasa extracelular, capaz de

degradar diversos sustratos (gelatina, fragmentos insolubles de colágeno, la cadena B de la insulina y otros péptidos bioactivos) de los tejidos del hospedador, mejorando la migración y difusión de los enterococos por los tejidos dañados. Además, también está implicada en la degradación de feromonas sexuales y de péptidos involucrados en la transferencia de plásmidos por conjugación entre diferentes cepas de enterococos. Esta enzima contribuye a la patogénesis en diferentes modelos de infección en animales, entre los que se incluyen los de peritonitis en ratones y endoftalmítis en conejos (Padilla *et al.*, 2012, Ledesma *et al.*, 2015).

El estudiar la actividad hemolítica y gelatinasa en enterococos aislados del río Mololoa así como de las aguas residuales nosocomiales arrojará información sobre la posible relación y distribución entre *Enterococcus* fenotípicamente virulentos y el riesgo que representan a la salud pública, más aún, al estar presentes en muestras ambientales.

Dicho conocimiento permitirá proponer soluciones concretas, a la postre, a las instancias pertinentes, y su inmediata atención por parte de autoridades gubernamentales. Su omisión podría poner en riesgo la salud humana, lo que redundaría en casos clínicos costosos y difíciles de tratar.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión fenotípica de la gelatinasa enterocócica y la citolisina enterocócica en aislados de *Enterococcus spp* obtenidos del cauce del río Mololoa y de las aguas residuales de hospitales en Tepic, Nayarit.

#### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar *Enterococcus* del cauce del río Mololoa y de aguas residuales de hospitales en Tepic, Nayarit.
2. Determinar la expresión fenotípica de virulencia de la gelatinasa enterocócica y la citolisina enterocócica en los enterococos aislados.
3. Confirmar molecularmente la especie *E. faecalis* y *E. faecium* de los aislados con expresión fenotípica.

## **5. HIPÓTESIS**

Las aguas residuales generadas por hospitales y las del cauce del río Mololoa, presentan enterococos hemolíticos, gelatinasa positivos.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico

**Muestras ambientales:** los aislados bacterianos ambientales se obtuvieron de dos puntos establecidos en el cauce del río Mololoa, uno sobre el afluente del río Mololoa en las coordenadas 21°26'18.6"N 104°50'11.0"W a una altura de 951 m. La segunda toma de las aguas del río Mololoa se realizó sobre efluente de este a la ciudad de Tepic Nayarit, en las coordenadas 21°33'19.8"N 104°53'41.8"W a una altura de 883 m; este segundo lugar, ubicado a 500 m del río de bajo a la salida de agua tratada por la Planta de Tratamientos de Aguas Residuales "El Punto" en Tepic (Figura 1).

**Muestras de agua residual hospitalaria:** las muestras de agua residual de los hospitales de la ciudad de Tepic, fueron tomadas de la caja de registro de aguas residuales de cada uno de los hospitales seleccionados: Hospital Civil "Dr. Antonio González Guevara" perteneciente a Servicios de Salud, Hospital General de la Zona 1 perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social y Hospital General "Dr. Aquiles Calles Ramírez" perteneciente al Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

El muestreo se realizó en un solo tiempo. El estudio es de corte transversal, comparativo, descriptivo y prospectivo.

### 6.2 Recolección de muestras

Para la recolección de muestras, se utilizaron frascos herméticos esterilizados, en los cuales se recolectó un volumen de 200 cm<sup>3</sup> de agua por sitio de muestreo, acorde al volumen establecido para muestras de agua destinadas para estudio microbiológico. Las muestras obtenidas de los registros de descargas de agua residual fueron colectadas directamente del chorro de descarga, en el caso de las muestras ambientales, el agua fue recolectada directamente a la mitad del cauce del río. Las muestras fueron transportadas en cajas con hielo al laboratorio para su análisis microbiológico en las 3 horas posteriores a su recolección (Iweriebor *et al.*, 2015).



Figura 1. Ubicación geográfica de la toma de muestra ambiental y hospitalaria. En azul la toma en el afluyente del río, rojo la toma en el efluente del río, en verde la toma a la muestra de agua residual en el hospital del IMSS, en morado la toma a las aguas residuales del hospital del ISSSTE, en negro la toma a las aguas residuales del hospital de Servicios de Salud, en amarillo se muestra la dirección que lleva la corriente del cauce del río Mololoa. (I) fotografía tomada al registro de descargas de aguas residuales que pertenece al hospital de Servicios de Salud. (II) fotografía tomada al cauce del río Mololoa en la toma del efluente.

### 6.3 Cultivo bacteriano

UFC/mL: para la determinación del número de unidades formadoras (UFC) de colonias de *Enterococcus* por mililitro de muestra se llevaron a cabo diluciones seriadas con cada una de las muestras recolectadas. Brevemente, cada una de las muestras se homogeneizó y se tomó 1 mL el cual fue incorporado a 9 mL de solución salina fisiológica. Esta primera solución correspondió a la dilución 1/10, a partir de esta, se realizaron las diluciones 1/100, 1/1000, 1/10 000 y 1/100 000. De todas las diluciones realizadas, incluyendo las muestras sin diluir, se inocularon 100  $\mu$ L en cajas con agar selectivo para enterococos Kenner Fecal (KF) y se sembraron en masivo, las muestras se incubaron a 37 °C por 48 h. Se realizó una serie de diluciones por cada toma de muestra.

**Elaboración del cepario:** de cada una de las muestras, se tomaron 100 colonias al azar a partir de una caja con crecimiento, de la dilución donde se obtuvo un número más cercano a este. Cada una de las colonias fue tomada mediante picadura e inoculada en un tubo con caldo Luria Bertani (LB), enriquecido con glucosa al 5% y NaCl al 3%, su incubación fue a 37 °C por 24 h. Para la crioconservación, se partió de un cultivo en LB de cada cepa, del que se tomaron 600 µL y se les adicionó 400 µL de glicerol estéril, se homogeneizó la preparación e inmediatamente fueron almacenados en criotubos a -20 °C.

#### 6.4 Selección de cepas, mediante la expresión fenotípica de virulencia

Para la obtención de enterococos fenotípicamente virulentos su seleccionaron aquellos que expresaran la gelatinasa enterocócica y la citolisina, al ser la factores importantes durante la infección por enterococos, en el caso de la citolisina se considera como una proteína capaz de liberar mediadores inflamatorios. De igual modo la gelatinasa enterocócica, un factor que le permite a la bacteria actuar sobre el sistema inmunológico del hospedero y se le ha asociado, además, a otros procesos vitales de la bacteria como lo es la formación de biofilm. Los métodos para estos ensayos se explican brevemente:

**Prueba de gelatinasa enterocócica:** para llevar a cabo esta prueba se utilizó el método de licuefacción de gelatina en cada uno de los 373 aislados, para lo cual se prepararon tubos de ensayo con 2 mL de gelatina nutritiva enriquecida con caldo nutritivo, respetando las cantidades establecidas por el fabricante. Los tubos con el medio fueron inoculados a partir de una colonia aislada de cada una de las cepas mediante picadura, la incubación de los tubos fue a 37 °C por 72 h, registrándose los resultados a las 24, 48 y 72 horas posteriores a su inoculación. Para revelar el resultado, los tubos fueron sometidos a 4 °C por media hora para su posterior análisis, en este caso, los tubos que permanecían sólidos a esta temperatura, se consideraron negativos y aquellos en los que el medio estaba líquido (licuado) se consideraron positivos. El ensayo se realizó una sola vez por aislado y se empleó como control positivo cepas de *Pseudomona sp* y como negativo una cepa de *E. coli*.

**Prueba de hemolisina (expresión de citolisina):** los enterococos que mostraron actividad a la gelatinasa, fueron seleccionados para evaluar su actividad hemolítica, para esta prueba se utilizaron cajas con agar sangre (sangre de cordero al 5%). Las cepas fueron inoculadas a partir de un cultivo puro mediante picadura e incubadas a 37 °C por 48 h, las colonias que presentaron un halo transparente a su alrededor ( $\beta$ -hemólisis) fueron consideradas positivas a esta prueba. La prueba se realizó una única vez por aislado y se utilizó como control positivo cepas de *Streptococcus sp.* y como control negativo una cepa de *E. coli*.

### 6.5 Extracción del ADN

El paso siguiente fue determinar mediante PCR, la especie de los enterococos que resultaron hemolíticos y gelatinasa positivos, se buscaron las especies de *faecalis* y *faecium*, para ello primeramente se extrajo ADN a las bacterias que presentaron ambas características fenotípicas.

Para la extracción de ADN cromosomal, se cultivaron las bacterias, en LB enriquecido con glucosa al 5% y NaCl al 3%, a 37 °C con agitación constante por un máximo de 24 h (overnight). Posteriormente, las bacterias se concentraron en un microtubo por centrifugación a 12,000 rpm por 3 min. La extracción del ADN se realizó por el método establecido en el "Shorts Protocols in Molecular Biology" (Sambrook & Russell, 1989). Se explica a continuación.

Un cultivo bacteriano de toda la noche, se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min. La pastilla generada se lavó con 1 mL agua estéril filtrada y se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min nuevamente, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL de Buffer TE pH 8 (Tris-HCl 25 mM – EDTA 25 mM). A continuación, se centrifugó nuevamente a la misma velocidad por 3 min, el sobrenadante se desechó. Se resuspendió el concentrado en 250  $\mu$ L de Buffer TE y 250  $\mu$ L de Lisozima (10 mg/mL), se incubó a 37 °C por 15 min. Terminada la incubación, se adicionó 30  $\mu$ L de SSC20x (175 g de NaCl – 88 g de Citrato de Sodio / litro) y se incubó nuevamente por 5 min a temperatura ambiente, al término de esto se agregaron 20  $\mu$ L de SDS al

10% y se incubó nuevamente por 5 min a temperatura ambiente. Se agregó un volumen 1:1 de Fenol-Cloroformo 5:1, se centrifugó a 12,000 rpm por 6 min, se separó cuidadosamente la fase acuosa de la reacción (fase superior del tubo, y se continuó trabajando con esa fase) y se colocó en otro tubo. Se agregaron 450  $\mu$ L de etanol absoluto grado biología molecular y se precipitó a -20 °C, se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min y se decantó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol grado biología molecular al 70 % (1 mL), se centrifugó nuevamente por 3 min. Se desechó el sobrenadante y se dejó secar el tubo por 30 min a temperatura ambiente, se resuspendió el ADN con 30  $\mu$ L de agua estéril.

La calidad e integridad del ADN se revisó en gel de agarosa al 1.2% y su pureza y concentración mediante lector de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific®).

#### 6.6 Confirmación molecular de *E. faecalis* y *E. faecium*

Se utilizó y modificó el procedimiento descrito por Kariyama *et al.* 2000, la identificación de enterococos se basa en la detección de un gen que codifica una D-alanina-D-alanina específica para cada especie de enterococo *E. faecalis* y *E. faecium*, con un producto esperado de 941 y 658 pb respectivamente. Además, se utilizó un par de oligonucleótidos como control de ADN dirigido a una región del ADNr 16S (*rrs*) de 320 pb. La mezcla de reacción que se empleó fue de un volumen de 25  $\mu$ L que contenía: 1  $\mu$ L de la extracción de ADN (150-290 pg), 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl (Invitrogen), 3.0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.2 mM de cada dNTP (Invitrogen) y 0.5 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Invitrogen), la cantidad de oligonucleótidos utilizada fue de 15 pmol de cada uno, la amplificación se llevó a cabo en un termociclador MultiGene OptiMAX (Labnet International, Inc.). Las secuencias de cebadores que se emplearon se encuentran en la tabla 2. Las condiciones de los ciclos de PCR consistieron en la desnaturalización inicial de 95 °C/5 min, 35 ciclos de amplificación (94 °C/60 s, 54 °C/70 s, 72 °C/60 s), extensión final de 72 °C / 10 min (Kariyama *et al.*, 2000). La amplificación se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.3% teñido con bromuro de etidio (0.97  $\mu$ L/30 ml agarosa) sometido a 90 voltios por 60 min. El tamaño del amplicón se verificó con

base en el marcador de peso molecular 1Kb plus (PROMEGA; Madison, WI-USA) y visualizado con transiluminador UV de sobremesa.

Tabla 2. Condiciones y oligonucleótidos utilizados para la amplificación de *ddl-E. faecalis*, *ddl-E. faecium*, *rrs* (Kariyama et al., 2000).

Condiciones	Inicio	Amplificación	Final
<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , 16S	94 °C/5'	35X (94 °C/60", 54 °C/70", 72 °C/60")	72 °C/10'
Especie	Primers	Secuencia (5' a 3')	Producto (pb)
<i>E. faecalis</i>	faecals Fw faecals Rv	ATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAG ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT	941
<i>E. faecium</i>	faecium Fw faecium Rv	TTGAGGCAGACCAGATTGACG TATGACAGCGACTCCGATTCC	658
16S ADNr	rrs Fw rrs Rv	GGATTAGATACCCCTGGTAGTCC TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC	320

### 6.7 Purificación de fragmento de PCR y Secuenciación

Para la purificación de los fragmentos de PCR de *E. faecalis* y *E. faecium* que posteriormente fueron enviados a secuenciar para confirmar la correcta identificación de las especies, se empleó el kit GenElute™ PCR Clean-up de Sigma-Aldrich®, el procedimiento se explica brevemente:

Para preparar la columna, primero se insertó esta (tubo con aro azul) en el tubo colector, y se adicionaron 0.5 mL de la "Solución preparadora de columna", se centrifugó a 12,000 g por 1 min y se descartó el sobrenadante. Se mezclaron 5 volúmenes de la solución "Binding Solution" por cada volumen de la reacción de PCR. Esta mezcla se introdujo en la columna para posteriormente centrifugarla a 16000 g por otro minuto. Se descartó el sobrenadante, al filtro de la columna se le agregó ahora 0.5 mL de "Diluted Wash Solution" y se centrifugó nuevamente a 16000 g por 1 min, se descartó el sobrenadante, se recolocó la columna y nuevamente se centrifugó a la misma velocidad pero por 2 min esta vez, con la finalidad de eliminar cualquier resto de etanol. Se desechó cualquier residuo y se pasó la columna a un

tubo nuevo, se le añadió entonces al centro del filtro 50  $\mu$ L de "Elution Solution", se dejó reposar por un minuto y después se centrifugó a 16,000 g por 1 min. Se desechó la columna y se guardó el tubo con el sobrenadante a -20 °C (fragmento de PCR purificado) hasta su envío para ser secuenciado.

La secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos, México, el proceso de secuenciación fue mediante un secuenciador automático de ADN de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130xl).

El resultado de la secuenciación, se analizó con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) a través de la herramienta de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El análisis se realizó utilizando megablast, para localizar las secuencias altamente similares, se seleccionó la base de datos de la colección nucleotídica (Nucleotide collection nr/nt) del gen Bank y con valores por default que maneja el sistema (E value =0) (Zheng *et al.*, 2000). Además, con la finalidad de realizar un análisis más robusto, no se excluyó ningún organismo, ni se establecieron límites para la búsqueda en la colección de datos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



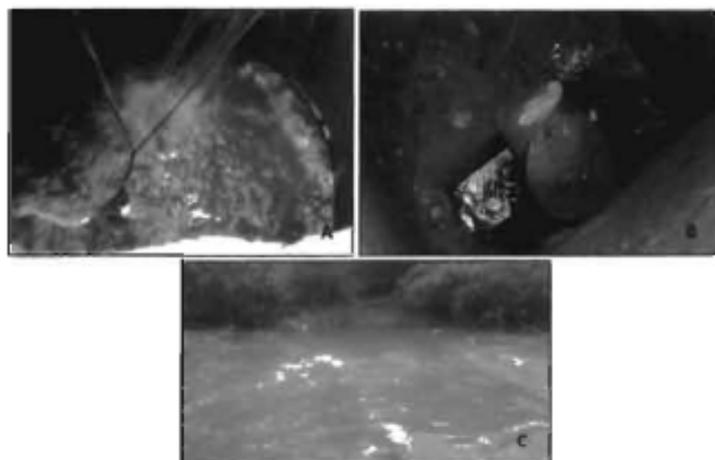
SISTEMA DE BIBLIOTECAS

## **7. Resultados y Discusión**

### **7.1 Muestreo y conteo de UFC**

La recolección de muestras se llevó a cabo a finales del mes de febrero de 2016, se contemplaba realizarla en la segunda mitad del año 2015 pero las constantes lluvias que iniciaron semanas antes de la fecha programada alteraron la concentración de enterococos presentes en la muestra de Río y con ello se habrían limitado las posibilidades de llevar a cabo los objetivos originalmente planteados.

Se realizaron 3 pruebas piloto a las aguas del río Mololoa en los meses de enero y febrero de 2016 con la finalidad de comprobar si los niveles bacterianos se encontraban estables; en dichas pruebas los valores permanecieron en el mismo orden de magnitud, oscilando entre  $1.5 \times 10^4$  a  $2.1 \times 10^4$  enterococos por mL; para la recolección de estas muestras se siguió el mismo protocolo establecido.



**Figura 2.** Puntos de recolección de muestra. (A) Registro de descarga de aguas residuales de Servicios de Salud. (B) Registro de descarga de aguas residuales del hospital del IMSS. (C) Efluente del río Mololoa

Una vez asegurada la estabilidad en la muestra ambiental se pasó a recolectar cada una de las muestra contempladas, 3 procedentes de aguas residuales hospitalarias (IMSS, ISSSTE y SSA) y dos muestras procedentes del cauce del río Mololoa (afluente y efluente), dicha recolección se realizó en un solo tiempo, su transporte acorde a lo reglamentado fue a 4 °C y su análisis se llevó a cabo en las 3 horas posteriores a su toma. Cada muestra por separado y en condiciones estériles fue homogeneizada y diluida por duplicado con los siguientes factores de dilución: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000, 1/100 000 con la finalidad de conocer la concentración de enterococos presenta en cada zona de estudio; cada una de las diluciones fue inoculada en una caja de Petri con agar KF e incubadas a 37 °C por 48 h. A partir de las diluciones, se obtuvo el número de UFC/mL de *Enterococcus* presentes en cada lugar y en la figura 3 observamos dicho contraste encontrado en las diferentes muestras.



Figura 3. Unidades Formadoras de Colonias de *Enterococcus*, obtenidas por punto de muestreo.

La mayor concentración de enterococos se encontró en las aguas residuales del Hospital General de la Zona 1 del IMSS, con un número de  $4 \times 10^5$  UFC enterococos/mL. Comparado con el resto de muestras, éste superó ampliamente al resto, ya que los valores que encontramos en los otros 4 lugares son un orden inferior. Por ejemplo, el número de enterococos presentes en el Río (efluente) fue de  $2 \times 10^4$  UFC/mL. Sorpresivamente no se encontraron enterococos en la muestra tomada en el afluente del río Mololoa, lo cual nos deja de antemano el conocimiento que la carga de enterococos que encontramos en la muestra del efluente, procede en su totalidad de la ciudad de Tepic.

El análisis de los niveles microbiológicos del agua del río Mololoa contra los niveles permitidos para los cuerpos de aguas superficiales (Olivas-Enriquez *et al.*, 2011; Vermont, 2009) nos permite observar lo siguiente (Figura 4). Primeramente la publicación "Calidad del Agua" de la Organización Mundial de la Salud, estima una relación de 10:1 de coliformes fecales por cada enterococo. Por lo que los niveles de contaminación de las aguas del río mololoa matemáticamente se encontrarían hasta

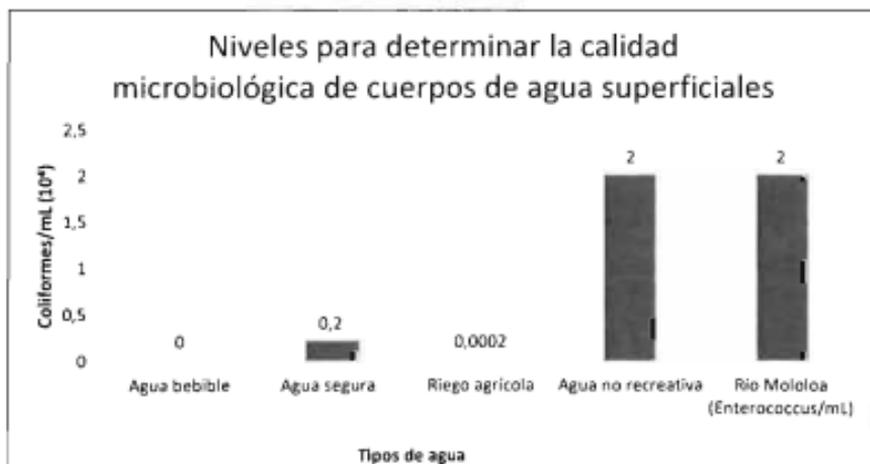


Figura 4. Comparativa de los niveles para determinar la calidad microbiológica en cuerpos de agua superficiales.

10 veces por encima del valor máximo para considerar al agua no segura para ningún tipo de actividad. En el caso de los niveles establecidos para considerar al agua segura para actividades recreativas o de riego, los niveles estimados superarían por 100 y 10,000 veces el límite establecido lo cual pone de manifiesto, sin duda, el gran problema que actualmente está presente en éste río.

### 7.2 Aislamiento de enterococos a partir de las muestras

Para la elaboración del cepario de enterococos con el que se trabajaría más tarde, se seleccionó una caja que contenía alguna de las diluciones y que nos permitiera tomar 100 colonias de forma aleatoria con la finalidad de aislarlas, esto para cada punto de muestreo, cada colonia fue incubada primeramente en caldo LB, a 37 °C por 24 h y posteriormente inoculada en una caja con agar KF con la finalidad de comprobar la ausencia de contaminaciones. Se lograron aislar sin problemas un total de 373 cepas, las 27 restantes presentaron problemas durante su cultivo por lo que se decidió trabajar solo con las 373 primeras, de las cuales 97 (26%) procedieron del Hospital General de la Zona 1 del IMSS, 91 (24%) aislados del Hospital General "Dr. Aquiles Calles Ramírez" del ISSSTE, 88 (23%) aislados del Hospital Civil "Dr. Antonio González Guevara" de SSA y 97 (26%) aislados procedentes de la muestra efluente del río Mololoa.

### 7.3 Ensayo de gelatinasa enterococcica

El primer paso para determinar las cepas de enterococo con actividad fenotípica de virulencia, fue el encontrar las positivas a la producción de gelatinasa enterococcica mediante el ensayo de licuefacción de gelatina. En un primer ensayo, se empleó el medio de gelatina nutritiva, siguiendo el método establecido por el fabricante y utilizando como control a *Pseudomonas sp*, los resultados obtenidos fueron negativos para los 373 aislados con un tiempo de incubación 14 días a 37 °C, el lapso para confirmar la presencia de la enzima en *Pseudomonas sp* fue de solo 24 h.

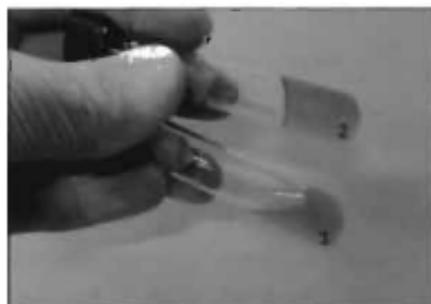
Al comparar la turbidez de los tubos inoculados, se observó un crecimiento muy bajo o el nulo crecimiento de las 373 cepas analizadas, efecto que no se observó en

nuestro control negativo (*E. coli*) ya que éste presentó la misma turbidez que el control positivo en el mismo lapso de tiempo, por lo que se decidió enriquecer el medio de gelatina con caldo nutritivo. Bajo esta modificación tanto el control positivo así como el control negativo no mostraron alteraciones en su tiempo de respuesta ni en los resultados arrojados.

Esta modificación a la metodología no solo mejoró el crecimiento de los aislados sobre el medio, sino que además en el 62% de estas presentó una licuefacción de la gelatina en un lapso no mayor a las 72 h a 37 °C (Figura 5). La adición del caldo nutritivo al medio de gelatina nutritiva, supone una concentración de 2 veces para los componentes de extracto de carne (de 3 g por litro, el medio enriquecido contenía 6 g por litro) y de peptona de gelatina (de tener 5 g, pasó a contener 10 g por litro), estas concentraciones permitieron el crecimiento de los enterococos sobre el medio y a la par, manifestar la actividad de la enzima gelatinasa para degradar la gelatina presente. En otros estudios con enterococos, no se hace mención a problemas relacionados con el crecimiento de la cepa, tal como lo sucedido en éste caso. Sin embargo, se utilizan principalmente medios de cultivo como agar tripticasa soja o agar Columbia inclusive agar de Infusión Cerebro-Corazón a los cuales se les suplementa gelatina (Caraffini *et al.*, 2009, Ledesma *et al.*, 2015, Padilla *et al.* 2012).

**Tabla 3. Número de cepas gelatinasa positivas sobre cada punto de muestreo.**

Punto de Muestreo	Cepas gelatinasa positiva	
IMSS	51/97	
ISSSTE	56/91	
SSA	67/88	
Río	58/97	
Total	232	62%



**Figura 5. Ensayo de licuefacción de gelatina. Tubo 1 resultado de prueba positiva, tubo 2 negativo**

Sin embargo, en algunos de los casos es necesario utilizar reactivos para revelar la actividad sobre la gelatina presente en el medio, éste hecho supondría una ventaja

de la técnica empleada en nuestro trabajo, ya que solo se requirió de enfriar el medio una vez pasado el lapso de tiempo para diferenciar aquellas pruebas positivas de las negativas, de igual modo, si contrastamos la técnica empleada con las técnicas que utilizan medio Infusión Cerebro-Corazón o agar Columbia, resulta nuestra prueba mucho más accesible y económica, además de poder utilizar volúmenes de medio muy inferiores.



Figura 6. % de cepas con actividad de gelatinasa obtenidas por cada punto de muestreo. La muestra procedente de Servicios de Salud mostró el mayor número de enterococos gelatinasa positivos le siguió la muestra del ISSSTE y por último la del IMSS, el porcentaje de enterococos gelatinasa positivos del Río se situó solo 2 puntos por debajo de la muestra del ISSSTE.

El resumen de las cepas con actividad de gelatinasa se encuentra en la tabla 3 y Figura 6. El 62% de las muestras positivas a la gelatinasa se distribuyó de la siguiente manera: de las muestras procedentes del hospital del IMSS 51 fueron positivas a la gelatinasa, lo que equivalen al 53%, del ISSSTE resultaron 56 positivas, lo que equivale al 62%, el mayor número de aislados con actividad fenotípica de gelatinasa lo encontramos en las muestras de Servicios de Salud con

67 muestras (76%) y de las cepas procedentes del río, el 60% resultaron positivas, es decir 58 cepas. En el caso de las muestras clínicas, la incidencia de gelatinasa en enterococos varía dependiendo su origen de aislado, ya que las procedentes de infecciones como endocarditis, los valores de gelatinasa encontrados se sitúan en un 80% aproximadamente, en cambio si hablamos de muestras hospitalarias como orinas o aisladas del propio ambiente hospitalario los valores se establecen por debajo del 30% de incidencia; en nuestro caso, los valores de gelatinasa en enterococos de agua residual se situaron en promedio un 64%, valores elevados para el tipo de muestra que se está empleando (Caraffini *et al.*, 2009, Ledesma *et al.*, 2015, Padilla *et al.* 2012). Para la muestra ambiental, las referencias nos ponen valores de incidencia desde el 30% al 80% para actividad fenotípica de gelatinasa en enterococos ambientales, lo cual se sitúa en una media que encuadra con estos puntos porcentuales (Lata *et al.*, 2009, Lata *et al.*, 2016, Daniel *et al.*, 2017).

#### 7.4 Ensayo de $\beta$ -hemólisis "Citolisina enterocócica"

De las 232 cepas que resultaron positivas a la prueba de gelatinasa, se buscaron cuales presentaban además actividad hemolítica, dicha actividad está mediada por la expresión de la citolisina. Para llevar a cabo el análisis de este factor, se empleó agar sangre, utilizando sangre de cordero al 5%. Una vez que fueron inoculadas por picadura e incubadas a 37 °C por 48 h fueron analizadas, se consideraron como cepas  $\beta$ -hemolíticas aquellas colonias que presentaron un halo transparente a su alrededor, en total se obtuvieron de éste ensayo 36 cepas  $\beta$ -hemolíticas de las 232 analizadas (Figura 7). La citolisina o hemolisina B es una toxina extracelular, es la única bacteriocina de este grupo capaz de lisar células eucarióticas. Por lo que representa un interés especial ya que su actividad incrementa la virulencia de los enterococos en diferentes modelos de infección (Ledesma *et al.*, 2015).



Figura 7. Resultado de la prueba de hemólisis. El halo transparente que rodea a la colonia, indica la  $\beta$ -hemólisis por parte de ésta.

Resalta de sobremanera el hecho de que ninguno de los enterococos  $\beta$ -hemolíticos procediera de la muestra recolectada del Hospital General de la Zona 1 del IMSS. Esto sugiere una menor virulencia en los enterococos que surgen de éste lugar, ya que la presencia de citolisina en enterococos es uno de los factores que contribuye a las infecciones de endocardio. Por último, los resultados de  $\beta$ -hemólisis se obtuvieron mediante sangre de cordero. Sin embargo, también se realizó la prueba de hemólisis con sangre humana al 5%, esta prueba fue negativa para los 232 enterococos gelatinasa positiva. Esto contrasta algunos estudios que han informado la actividad hemolítica utilizando como prueba la hemólisis de agar sangre con sangre humana (Cafini *et al.*, 2015; Tuhina *et al.*, 2016). Si bien, se establece la sangre de cordero como la óptima para esta prueba, no se le señala como la única que debe emplearse contra los enterococos por lo que el hecho de que las bacterias usadas en este trabajo no actuaran sobre la sangre humana deja una interrogante de momento.

Tabla 4. Relación de las cepas gelatinasa positivas con actividad hemolítica.

Punto de Muestreo	Cepas $\beta$ -Hemolíticas	No. de cepas
IMSS	Ninguna	0
ISSSTE	B5, B38, B50, B56, B61, B63, B68, B82, B89, B91	10
SSA	C13, C14, C15, C18, C20, C21, C23, C25, C26, C35, C42, C44, C56, C65	14
Rio	R1, R2, R28, R30, R39, R48, R49, R57, R60, R68, R72, R73	12
Total		36

El resumen de las cepas que resultaron positivas a la  $\beta$ -hemólisis se presenta en la tabla 4, en este caso 10 cepas de enterococo procedentes del ISSSTE expresaron actividad a gelatinasa enterocócica y citolisina, 14 cepas de la muestra de Servicios de Salud y por último 12 cepas de enterococo de la muestra obtenida del efluente del río Mololoa, de los enterococos con actividad de gelatinasa de la muestra del IMSS ninguno mostró actividad hemolítica. Los resultados obtenidos coinciden con la información relacionada a la prevalencia de esta característica en las especies de *E. faecalis* y *E. faecium* y con ello, su vinculación hacia infecciones enterocócicas. De los 373 aislados 36 resultaron positivos a citolisina lo cual representa un 14% de los aislados, esta proporción coincide con lo reportado en otras investigaciones. Sin embargo, se resalta nuevamente el hecho de que ninguno de los aislados procedentes de la muestra del IMSS presentara esta característica (Ledezma *et al.*, 2015, Caraffini *et al.*, 2009).

### 7.5 Confirmación de las especies de enterococos

Se extrajo el ADN de las 36 cepas de enterococo que mostraron actividad fenotípica a ambos ensayos, el ADN que se obtuvo de cada una de ellas fue analizado en gel de agarosa al 1.2% para observar integridad (Figura 8), se observó que además de la banda que contenía al ADN cromosomal, se mostraron 2 bandas más, de un menor tamaño, lo que corresponde a ARN, por lo que las muestras fueron tratadas con RNAsa, para eliminarlo, ya que la presencia del ARN durante la prueba de PCR para identificar la especie de enterococo no permitía la amplificación de la banda correspondiente a *E. faecalis*. Kariyama en su trabajo hace mención de problemas relacionados con la amplificación de las bandas, estos problemas se originan al utilizar una extracción de ADN por métodos físicos (calor), por lo que la presencia de componentes celulares durante la PCR, hacían que esta mostrara resultados no consistentes. Sin embargo, al realizar la extracción mediante Kit, los problemas no se presentaban. En nuestro caso, la simple presencia del ARN pareciera habernos ocasionado problemas similares.

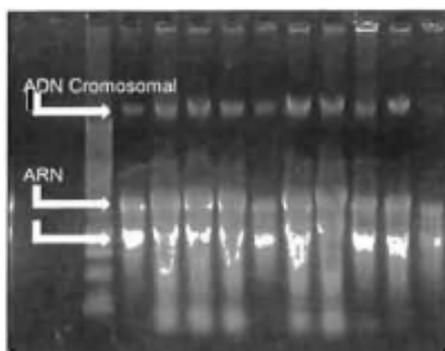


Figura 8. Gel de agarosa con muestras de ADN. Se observa la banda de mayor peso molecular correspondiente al ADN cromosomal y 2 bandas más correspondientes al ARN de la bacteria.

En la figura 9 se visualizan las amplificaciones mediante PCR para la identificación de las especies de *E. faecalis* y *E. faecium*. Los resultados del ensayo se resumen en la tabla 4, en donde observamos una fracción de *E. faecium* muy superior, con 33 de los aislados que resultaron positivos a ambas pruebas fenotípicas y solamente 2 aislados amplificaron para la especie *E. faecalis*, uno procedente de la muestra obtenida del hospital de servicios de salud y otro más presente en la muestra recolectada del efluente del Río. Una cepa adicional no amplificó para ninguna de las dos secuencias. Sin embargo, esta si amplificó el control para ADNr 16S por lo que la especie de este enterococo se encuentra entre las minorías del género, como pudiera ser *E. gallinarum*, *E. durans hira* o algún otra especie dentro del género.



Figura 9. Gel de agarosa con la amplificación de los fragmentos correspondientes a *ddl-E. faecalis*, *ddl-E. faecium* y 16S (*rrs*). El fragmento correspondiente a *E. faecalis* se encuentra del lado izquierdo del marcador de tamaños 1Kb, y corresponde a 941 pb, el fragmento para *E. faecium* ubicado a la derecha del marcador corresponde a un tamaño de 658 pb, por último, el fragmento del ADNr 16S (*rrs*) corresponde a un tamaño de 320 pb.

La alta incidencia de *E. faecium* contrasta definitivamente con las proporciones que se registran en los estudios sobre enterococos ya que esta especie reporta concentraciones mucho menores cuando se aíslan grupos de enterococos a nivel de género en diferentes muestras. En general, en algunos estudios muestran proporciones del 10% hasta el 40% de los aislados. No obstante, en nuestro estudio la incidencia de *E. faecium* bajo los criterios de selección empleados ascendió hasta el 91%.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos durante la PCR en la identificación de especie para los enterococos hemolíticos, gelatinasa positivos.

Punto de Muestreo	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	Sin identificar	Total
IMSS	0	0	0	0
ISSSTE	0	10	0	10
SSA	1	13	0	14
Rio	1	10	1	12
Total	2	33	1	36

Se debe resaltar el hecho que el 27 de febrero de 2017 la Organización mundial de la Salud público en Ginebra la primera "Lista de Patógenos Prioritarios" en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. En la lista se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias resistentes a múltiples antibióticos. Estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes.

Dentro de esta lista, aparece *E. faecium* en el grupo de bacterias con prioridad elevada en donde tiene la posición número 1, hecho que plantea la problemática que está generando esta especie de enterococo.

### 7.6 *Enterococcus faecium* gelatinasa positivos y $\beta$ -hemolíticos

Estudios enfocados en encontrar una relación entre la presencia de la gelatinasa enterocócica y su papel en el biofilm muestran resultados contrastantes, adicional a ello, el número de aislados que pertenecen a la especie de *E. faecium* también suele ser poco frecuente en los estudios de este enfoque, por lo que la presencia del gen *gelE* y cepas con actividad de gelatinasa es muy baja (Diani *et al.*, 2014, Soares *et al.*, 2014, Comerlato *et al.*, 2013). Sin embargo, hay que resaltar que la procedencia

de los aislados de *E. faecium* con estas características, se ha reportado que proceden en la mayoría de los casos de un origen infeccioso. Por lo tanto, el encontrar cepas de *E. faecium* en esta zona de estudio y más aún, que estos aislados expresaran fenotípicamente actividad de gelatinasa y a la par actividad hemolítica, ponen de manifiesto el peligro que representan ya que estas bacterias suponen un riesgo para la salud al tener las capacidades de generar un proceso infeccioso, que generalmente se asocia con endocarditis e infecciones de vejiga urinaria. Por otra parte, se han asociado este tipo de cepas con una alta resistencia a antibióticos, entre ellos vancomicina (Diani *et al.*, 2014, Soares *et al.*, 2014, Comerlato *et al.*, 2013).

Dentro de las características que definen a la especie de *E. faecium* la hemólisis es considerada de tipo gamma, es decir, no hemolítica. Sin embargo, la existencia de *E. faecium*  $\beta$ -hemolíticos se ha informado anteriormente (Channaiah *et al.*, 2010). En estos aislados se demostró que, de los determinantes de virulencia, la citolisina (*cylA*) es relativamente común. Sin embargo, el número de aislados con actividad  $\beta$ -hemolíticos fue mayor a la presencia del gen *CylA*, lo que indica la implicación de otros determinantes de citolisina (Channaiah *et al.*, 2010). En nuestro estudio, se determinaron a 33 *E. faecium*  $\beta$ -hemolíticos, por lo que, es oportuno considerar realizar estudios moleculares con la finalidad de confirmar la presencia de *CylA*. Esto complementaría la información si se conoce que éste es el principal determinante genético que está confiriendo las características de  $\beta$ -hemólisis y de no resultarlo, aunar más para conocer el origen de cepas de *E. faecium* con  $\beta$ -hemólisis en esta entidad.

### 7.7 Secuenciación de los fragmentos de PCR

Por último, se llevó a cabo la secuenciación de los fragmentos amplificados que correspondieron a *E. faecalis* y *E. faecium*, se consideró para la secuenciación, los cebadores Fw y Rv, con la finalidad de tener la identificación precisa.

El proceso de secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Morelos, México, el proceso fue mediante un secuenciador automático de ADN de 16 capilares (Applied Biosystems, modelo 3130x).

Las secuencias de los amplicones, se compararon con la base de datos del NCBI, a través de la herramienta de BLAST. Los resultados obtenidos de la secuenciación mostraron una identidad del 99% para la cadena codificante de ADN correspondiente al fragmento de *E. faecalis*, con un valor de *E* de 0.0 y una cobertura del 95%, para la cadena antisentido también se mostró una identidad del 99% con un valor de *E* de 0.0 y una cobertura del 96%. En el caso de la cadena codificante del fragmento que corresponde a *E. faecium* la identidad fue del 99% con un valor de *E* de 0.0 y una cobertura del 95%. Por último, la cadena antisentido de *E. faecium* mostró una identidad del 99% con un valor de *E*. 0.0 y una cobertura del 97%.

## 8. CONCLUSIONES

- El contraste encontrado entre las muestras recolectadas del río, manifiesta el problema de contaminación fecal que genera la ciudad sobre el cauce.
- El orden de magnitud de enterococos por mL encontrado en la muestra del efluente del río deja en claro la incapacidad de los sistemas de saneamiento de la ciudad, ya que estos valores se encontraron en el mismo orden de magnitud que las muestras de agua del hospital del IMSS y del hospital de Servicios de Salud.
- La modificación a la prueba de licuefacción de gelatina, supone una forma económica, simple y accesible para evidenciar la actividad de gelatinasa en enterococos y aporta ventajas sobre los métodos en caja.
- Se determinó un porcentaje de actividad de gelatinasa en los enterococos ambientales, similar a los reportados en otras investigaciones. Sin embargo, el porcentaje de actividad de la gelatinasa visto en las muestras hospitalarias supera los valores encontrados en muestras similares, esto representa un foco de atención al ser un mecanismo que puede emplear el enterococo para la generación de patologías.
- El porcentaje de enterococos con actividad hemolítica se encontró en los mismos valores reportados en otras investigaciones, ya que el 10% de los aislados de enterococo mostro actividad combinada de ambos factores. Sin embargo, la distribución de las especies *E. faecalis* y *E. faecium* resultante fue inversa a las proporciones en las que se encuentran comúnmente.
- Encontrar cepas de *E. faecium* con actividad de gelatinasa y  $\beta$ -hemólisis, suponen un riesgo para la salud pública, ya que el aislamiento de esta especie con dichas características es realizado principalmente de fuentes infecciosas.

## 9. PROSPECTIVAS

- La existencia de *E. faecium* gelatinasa positivos y  $\beta$ -hemolíticos entre las cepas estudiadas deja una interrogante sobre cuáles son los mecanismos que les están confiriendo dicha propiedad, por lo que hacer los estudios pertinentes nos permitirá conocer si es por la presencia de los genes *gelE* así como de la citolisina *CylA*, o si está conferida por alguno otro elemento de virulencia.
- Realizar pruebas de resistencia y susceptibilidad a los antibióticos con énfasis a vancomicina y metilmicina, será uno de los siguientes puntos en los cuales enfocarse en los aislados de *E. faecium*. Tal como hace mención la OMS, ya que la resistencia a vancomicina en *E. faecium* es lo que la ha posicionado en la lista de patógenos prioritarios.
- Complementar los datos recabados de los elementos de virulencia junto a estudios de clonalidad, nos permitirá establecer el impacto que están teniendo las descargas de aguas residuales de los hospitales sobre esta entidad y con ello, hacer aún más énfasis sobre la urgente necesidad de tomar medidas de corrección al respecto.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abrantes M.C. Kok J. Lopes M.F. 2013. EfaR Is a Major Regulator of *Enterococcus faecalis* Manganese Transporters and Influences Processes Involved in Host Colonization and Infection. Bäumler AJ, ed. *Infect Immun*. 81(3):935-944.
- Aldana C.J.L. 2007. Determinación de los perfiles de resistencia de *Enterococcus* ssp. en el hospital general San Juan de Dios y hospital Roosevelt. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala. pp 7-8.
- Amábile-Cuevas C.F. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries*. 4(3):126-131.
- Arias C.A. Murray B.E. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol*. 16:10 (4): 266-78.
- Arntzen M.Ø. Karliskås I.L. Skaugen M. Eijsink V.G.H. Mathiesen G. 2015. Proteomic Investigation of the Response of *Enterococcus faecalis* V583 when Cultivated in Urine. Hancock LE, ed. *PLoS ONE*. 10(4):e0126694.
- Agudelo Higueta N.I. Huycke M.M . 2014. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. Massachusetts eye and ear infirmary, Feb. 2014.
- Bearman. G.M.L. Wenzel R.P. 2005. Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res* 36, 646–659. Bradley DJ, Mark MH, Michael SG. 1994. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev*. Vol. 7, No. 4. 462 – 478.
- Byappanahalli M.N. Nevers M.B. Korajkic A. Staley Z.R. Harwood V.J. 2012. *Enterococci* in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev*. 76(4):685-705.
- Carraffini F.A. Nobile B.C. Figueroa L.M. Vargas C.M. Tacchini A.M. 2009. Factores de virulencia de *enterococcus* spp. y su relación con la resistencia a antibióticos. Asociación Bioquímica Argentina. Buenos Aires, Argentina. *Bioquímica y Patología Clínica*. vol. 73, núm. 3, 2009, pp. 34-39.

- Cafini F. Gómez-Aguado F. Corcuera M.T. Ramos C. Bas P. Collado L. Gómez-Lus M.L. Prieto J. 2015. Genotypic and phenotypic diversity in *Enterococcus faecalis*: is agar invasion a pathogenicity score?. *Rev Esp Quimioter.* Apr;28(2):101-8.
- Channaiah L.H. Subramanyam B. McKinney L.J. Zurek L. 2010. Stored-product insects carry antibiotic-resistant and potentially virulent enterococci. *FEMS Microbiol Ecol.* Nov;74(2):464-71.
- Chiara I. Stassi G. Bruno C.G. Di Leo R. Toscano A. Cascio A. 2005. Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. *BMC Infectious Diseases.* 5(1):3.
- Clewell D.B. 2007. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid.* 58(3):205-27.
- Coburns PS, Gilmore MS. 2003. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol.* 5:661- 669.
- Cohen A.L.V. Roh J.H. Nallapareddy S.R Hook M. Murray B.E. 2013. Expression of the Collagen Adhesin ace by *Enterococcus faecalis* Strain OG1RF is not Repressed by Ers but Requires the Ers box. *FEMS microbiology letters.* 344(1):18-24.
- Comerlato C.B. de Resende M.C.C. Caierão J. & d' Azevedo P.A. 2013. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz,* 108(5), 590–595.
- Cox R.C. Coburn S.P. Gilmore S.M. 2005. Enterococcal Cytolysin: A Novel Two Component Peptide System that Serves as a Bacterial Defense Against Eukaryotic and Prokaryotic Cells. *Curr Protein Pept Sci.* 6, 77-84.

- Deshpande L.M Fritsche T.R. Moet G.J. Biedenbach D.J. Jones R.N. 2007. 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.* 58(2):163–170.
- Diani M. Esiyok O.G. Ariafar M.N. Yuksel F.N. Altuntas E.G. & Akcelik N. 2014. The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and *pfge* analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8:129-137.
- Diane S.D. Sui M.L. Han M.G. Gary A.D. Sadequr R. 2017. Genetic diversity of *Enterococcus faecalis* isolated from environmental, animal and clinical sources in Malaysia. *J Infect Public Health.* pii: S1876-0341(17)30063-1. doi: 10.1016.
- Díaz-Pérez M. Rodríguez-Martínez C. & Zhurbenko R. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 48(2), 147-161.
- Dunny G.M. Hancock L.E. Shankar N. 2014. Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Eaton T.J. Gasson M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 67(4):1628-1635.
- Garza-Velazco R. Hernández-Acosta K. & Mejía-Chávez A. 2000. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. [Tesis] Departamento de biología, facultad de Química, UNAM, México.

- Giridhara U.P.M. Ravikumar K.L. Umapathy B.L.** 2009. Review of virulence factors of *enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol.* Oct-Dec,27(4):301-5. doi: 10.4103/0255-0857.55437.
- Golińska E. Tomusiak A. Gosiewski T. Więcek G. Machul A. Mikołajczyk D. Strus, M.** 2013. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 19(23), 3562–3572.
- Gutiérrez M.J.J.** 2013. Determinación de los genes de virulencia *asa1*, *gelE*, *hyl* y *esp* en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aislados del río Mololoa. Unidad Académica de Ciencias Químicas Biológicas y Farmacéuticas. Universidad Autónoma de Nayarit. Tesis.
- Hancock L.E. Gilmore M.S.** 1998. Pathogenicity of Enterococci. Department of Microbiology and Immunology. Oklahoma: University of Oklahoma Health Sciences Center. pp. 251-8.
- Hirt H. Manias D.A. Bryan E.M. Klein J.R. Marklund J.K. Staddon J.H. Dunny G.M.** 2005. Characterization of the Pheromone Response of the *Enterococcus faecalis* Conjugative Plasmid pCF10: Complete Sequence and Comparative Analysis of the Transcriptional and Phenotypic Responses of pCF10-Containing Cells to Pheromone Induction. *J Bacteriol.* 187(3), 1044–1054.
- Hidron A.I Edwards J.R. Patel J.** 2008. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety 86 Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Inf. Con. Hosp. Epidemiol.* 29:996-1011.
- weriebor B.C. Gaqavu S. Obi L.C. Nwodo U.U. & Okoh A.I.** 2015. Antibiotic susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from hospital and domestic

- wastewater effluents in Alice, Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Environ Res Public Health*, 12(4), 4231–4246.
- Jáuregui–Medina C. S. Ramírez–Hernández M.A. Espinoza–Rodríguez R. Tovar–Rodarte R. Quintero–Hernández B. & Rodríguez–Castañeda I. 2007. Impacto de la descarga de aguas residuales en la calidad del río Mololoa (Nayarit, México) y propuestas de solución. *Rev. Latin. Rec. Nat.* 3, 65–73.
- Kariyama R. Mitsuata R. Chow W.J. Clewell D.B. Kumon H. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 08 vol.38.
- Korzeniewska E. & Harnisz M. 2012. Culture-dependent and culture-independent methods in evaluation of emission of enterobacteriaceae from sewage to the air and surface water. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(7), 4039–4046.
- Lata P. Ram S. Agrawal M. & Shanker R. 2009. Enterococci in river Ganga surface waters: Propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. *BMC Microbiology* 9, 140.
- Lata P. Ram S. & Shanker R. 2016. Multiplex PCR based genotypic characterization of pathogenic vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* recovered from an Indian river along a city landscape. *SpringerPlus*. 5(1), 1199.
- Leavis H. Top J. Shankar N. Borgen K. Bonten M. van Embden J. Willems R.J.L. 2004. A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the *esp* Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Associated with Epidemicity. *J Bacteriol.* 186(3), 672–682.
- Lebreton F. Riboulet-Bisson E. Serror P. Sanguinetti M. Posteraro B. Torelli R. *et al.* 2009. *ace*, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence. *Infect Immun.* 77 (7): 2832-9.

- Leclercq R. Oberlé K. Galopin S. Cattoir V. Budzinski H. & Petit F. 2013. Los cambios en las poblaciones y *Enterococcal* relacionada resistencia a los antibióticos a lo largo de una Planta de Tratamiento de Río-Continuum. Medical Center-Aguas Residuales. *Appl Environ Microbiol.* 79(7), 2428-2434.
- Ledesma P. Parada R.B. Vallejo M. Marguet E.R. 2015. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia. Cátedra de Química Orgánica; Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB). Roca 115, (9100) Trelew. Argentina.
- Lendo-Hernández H.M. 2014. Identificación de los genes de virulencia *aceI*, *efaA*, *asa1*, *gelE*, *esp* y *hyl* en *Enterococcus spp.*, y *Aerococcus viridans* obtenidos del río Mololoa y su periferia por la zona conurbada de Tepic Nayarit. Tesis. Universidad Autónoma de Nayarit.
- Low Y.L. Jakubovics N.S. Flatman J.C. Jenkinson H.F. Smith A.W. 2003. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol.* Feb;52(Pt 2):113-9.
- Lowe A.M. Lambert P.A. Smith A.W. 1995. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun* 63, 703-706.
- Wehr M.H. Frank J.F. 2004. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association. Washington, DC 20001-3710. ISBN 0.87553-002-8.
- Mondragón V.A. Llamas D.F. González G.E. Márquez A.R. Padilla R. Durán M.J. Franco B. 2011. Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic Nayarit, Mexico. *Environ Monit Assess.* 183(1-4). 329-40.

- Mondragón-Jaimes V.A. García-Calzada A.Y. López-Gaytán S.B. Quintero-Castañeda A. Rodríguez-Aguilar D. 2012. Characterization of arsenic and mercury resistant bacteria from contaminated site in Nayarit, Mexico. In: Fernández-Luqueño F, López-Valdez F, Lozano-Muñiz S. (Eds.). *Biotechnology Summit*, Yucatán México. Pp 15-20.
- Mundy L.M. Sahm D.F. Gilmore M. 2000. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 13(4):513-522.
- Murdoch D.R. Corey G.R. Hoen B. Miró J.M. Fowler V.G. Jr. Bayer A.S. 2009. La presentación clínica, etiología, y el resultado de la endocarditis infecciosa en el siglo 21. La Colaboración Internacional de Estudio de Cohorte Endocarditis-prospectivo. *Archives of Internal Medicine* ;169 (5): 463-473.
- Norma Interna DIBICO, S.A. de C.V. Disponible en: <http://www.dibico.com/productos.php?t=med&m=d&ldCat=1>
- Olivas-Enriquez E. Flores-Margez J.P. Serrano-Alamillo M. Soto-Mejía E. Iglesias-Olivas J. Salazar-Sosa E. Fortis-Hernández M. 2011. Indicadores Fecales y Patógenos en Agua Descargada al Río Bravo. *Terra Latinoamericana*, vol. 29, núm 4. Mexico.
- Padilla E.C. Núñez A.M. Padilla G.A. Lobos G.O. 2012. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule. *Rev Chil Infect.* 29 (1): 55-61.
- Pacheco G.G. 2014. Genotipificación de proteobacterias resistentes a arsénico. [Tesis], Universidad Autónoma de Nayarit.
- Quiñones P.D. 2010. *Enterococcus* aislados en Cuba: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética. [Tesis] Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

- Rangel Arenas Maria Fernanda. 2010. Evaluación de la Implicación de *Enterococcus sp* Vancomicina Resistentes en Mastitis Bobina y su Detección en Queso Pera. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana; Facultad de Ciencias Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá, Colombia.
- Resnick M. Novick A.C. 2000. Secretos de la urología México. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 2ª ed. p. 264-272.
- Rice L.B. Carias L. Rudin S. Vael C. Goossens H. Konstabel C. Klare I. Nallapareddy S.R. Huang W. Murray B.E. 2003 A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis.* Feb 1;187(3):508-12.
- Roh J.H. Singh K.V. La Rosa S.L. Cohen A.L.V. Murray B.E. 2015. The Two-Component System GrvRS (EtaRS) Regulates ace Expression in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Infect Immun.* 83(1):389-395.
- Ronconi M.C. Merino L.A. 2004. *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a ampicilina (AMP) gentamicina (GEN), estreptomycin (EST) y vancomicina (VAN) aislados de materia fecal de pacientes pediátricos hospitalizados. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Las Heras 727 - 3500 Resistencia. Resumen M-022.
- Sánchez R.J. 2008. Aspectos higiénicos, seguridad y potencial biotecnológico de enterococos aislados de ánades reales ("*Anas platyrhynchos*"): caracterización bioquímica y genética de sus bacteriocinas y producción heteróloga en diversos hospedadores. [Tesis Doctoral]°. Universidad Complutense de Madrid.
- ambrook J. Russell W.D. 2003. Molecular Cloning a laboratory manual. Spring Harbor Laboratory Press. 3ª Edición. New York. Chapter 06.

- Semedo T. Almeida-Santos M. Martins P. Silva-Lopes M.F. Figueiredo-Marques J.J. Tenreiro R. Barreto-Crespo M.T. 2003. Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates to Examine Hemolytic Activity and Occurrence of the *cyl* Operon in Enterococci. *J Clin Microbiol.* 41(6). 2569–2576.
- SEPLAN. 2003. Secretaria de Planeación del Gobierno del estado de Nayarit. Agenda Económica de Nayarit, México, p. 131.
- Sinclair R.G. Rose J.B. Hasham S.A. Gerba C.P. Haas C.N. 2012. Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 1969–1977.
- Silva j. Rodriguez Y. Araya J. Gahona J. Valenzuela N. Guerrero K. Báez J. Baquero F. Campo R. 2012. Detección de genes de virulencia en cepas de *Enterococcus faecalis* susceptibles y resistentes a aminoglucósidos. Departamento de tecnología médica. Universidad Antofagasta. *Rev Chilena Infectol.* 30 (1): 17-22.
- Soares R.O. Fedi A.C. Reiter K.C. Caierão J. & d' Azevedo P.A. 2014. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus spp.* clinical isolates. *Virulence*, 5(5), 634–637.
- Tendolkar P.M. Baghdayan A.S. Gilmore M.S. Shankar N. 2004. Enterococcal Surface Protein, Esp, Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 72(10):6032-6039.
- Top J. Sinnige J.C. Majoor E. A. M. Bonten M.J.M. Willems R.J.L. van Schaik W. 2011. The Recombinase IntA Is Required for Excision of *esp*-containing ICEEfm1 in *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol.* 193(4), 1003–1006.
- Top J. Paganelli F.L. Zhang X. van Schaik W. Leavis H.L. van Luit-Asbroek M. Willems R.J.L. 2013. The *Enterococcus faecium* Enterococcal Biofilm

Regulator, EbrB, Regulates the *esp* Operon and Is Implicated in Biofilm Formation and Intestinal Colonization. *PLoS ONE*, 8(5), e65224.

**Tuhina B. Anupurba S. Karuna T.** 2016. Emergence of antimicrobial resistance and virulence factors among the unusual species of enterococci, from North India. *Indian J Pathol Microbiol.* Jan-Mar;59(1):50-5.

**Vankerckhoven V. Van Outgaerden T. Vael C. Lammens C. Chapelle S. Rossi R. Goossens H.** 2004. 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.* 42(10), 4473–4479.

**Vermont (Seal of Quality Vermont Agency of Agriculture).** 2009. Water quality criteria for agricultural water sources and microbial testing guidelines. USDA Good agricultural practices (GAP) audit verification program. Washington, DC, USA.

**Wamel W.J. Hendrickx A.P. Bonten M.J. Top J. Posthuma G. Willems R.J.** 2007. Growth condition-dependent *Esp* expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun.* Feb;75(2):924-31.

**Zhang Z. Schwartz S. Wagner L. Miller W.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 7(1-2):2003-14.

11. ANEXOS

Anexo 1. RESUMEN DEL CEPARIO

Tabla 6. Resumen general de la información obtenida del cepario.

A	IMSS			B	ISSSTE			C	SSA			R	Río Moklos efluente		
	Gelati- nasa	Hemol- sina	Especie		Gelati- nasa	Hemol- sina	Especie		Gelati- nasa	Hemol- sina	Especie		Gelati- nasa	Hemol- sina	Especie
A1	N	NE	NE	B1	N	NE	NE	C1	N	NE	NE	R1	P	P	E. faecium
A2	N	NE	NE	B2	N	NE	NE	C2	N	NE	NE	R2	P	P	E. faecium
A3	P	N	NE	B3	N	NE	NE	C3	N	NE	NE	R3	P	N	NE
A4	N	NE	NE	B4	N	NE	NE	C4	N	NE	NE	R4	P	N	NE
A5	N	NE	NE	B5	P	P	E. faecium	C5	N	NE	NE	R5	P	N	NE
A6	P	N	NE	B6	N	NE	NE	C6	N	NE	NE	R6	N	NE	NE
A7	P	N	NE	B7	N	NE	NE	C7	N	NE	NE	R7	N	NE	NE
A8	P	N	NE	B8	N	NE	NE	C8	N	NE	NE	R8	P	N	NE
A9	N	NE	NE	B9	P	N	NE	C9	P	N	NE	R9	P	N	NE
A10	N	NE	NE	B10	P	N	NE	C10	N	NE	NE	R10	P	N	NE
A11	P	N	NE	B11	P	N	NE	C11	N	NE	NE	R11	P	N	NE
A12	N	NE	NE	B12	P	N	NE	C12	N	NE	NE	R12	P	N	NE
A13	N	NE	NE	B13	N	NE	NE	C13	P	P	E. faecium	R13	P	N	NE
A14	P	N	NE	B14	N	NE	NE	C14	P	P	E. faecium	R14	P	N	NE
A15	N	NE	NE	B15	N	NE	NE	C15	P	P	E. faecium	R15	P	N	NE
A16	P	N	NE	B16	P	N	NE	C16	P	N	NE	R16	P	N	NE
A17	P	N	NE	B17	N	NE	NE	C17	N	NE	NE	R17	P	N	NE
A18	N	NE	NE	B18	N	NE	NE	C18	P	P	E. faecium	R18	N	NE	NE
A19	P	N	NE	B19	N	NE	NE	C19	N	NE	NE	R19	P	N	NE
A20	N	NE	NE	B20	P	N	NE	C20	P	P	E. faecium	R20	P	N	NE
A21	P	N	NE	B21	N	NE	NE	C21	P	P	E. faecium	R21	P	N	NE
A22	P	N	NE	B22	N	NE	NE	C22	P	N	NE	R22	P	N	NE
A23	P	N	NE	B23	P	N	NE	C23	P	P	E. faecium	R23	P	N	NE
A24	N	NE	NE	B24	P	N	NE	C24	P	N	NE	R24	P	N	NE
A25	N	NE	NE	B25	P	N	NE	C25	P	P	E. faecium	R25	P	N	NE
A26	P	N	NE	B26	P	N	NE	C26	P	P	E. faecium	R26	P	N	NE
A27	P	N	NE	B27	P	N	NE	C27	N	NE	NE	R27	P	N	NE
A28	P	N	NE	B28	P	N	NE	C28	P	N	NE	R28	P	P	E. faecium
A29	N	NE	NE	B29	P	N	NE	C29	P	N	NE	R29	P	N	NE

A30	N	NE	NE	B30	P	N	NE	C30	P	N	NE	R30	P	P	E. faecium
A31	N	NE	NE	B31	P	N	NE	C31	P	N	NE	R31	P	N	NE
A32	P	N	NE	B32	P	N	NE	C32	P	N	NE	R32	P	N	NE
A33	P	N	NE	B33	P	N	NE	C33	P	N	NE	R33	N	NE	NE
A34	P	N	NE	B34	P	N	NE	C34	P	N	NE	R34	P	N	NE
A35	N	NE	NE	B35	P	N	NE	C35	P	P	E. faecium	R35	N	NE	NE
A36	P	N	NE	B36	P	N	NE	C36	P	N	NE	R36	P	N	NE
A37	P	N	NE	B37	P	N	NE	C37	P	N	NE	R37	P	N	NE
A38	P	N	NE	B38	P	P	E. faecium	C38	P	N	NE	R38	P	N	NE
A39	P	N	NE	B39	N	NE	NE	C39	N	NE	NE	R39	P	P	N.F.
A40	P	N	NE	B40	N	NE	NE	C40	P	N	NE	R40	P	N	NE
A41	P	N	NE	B41	N	NE	NE	C41	P	N	NE	R41	P	N	NE
A42	P	N	NE	B42	N	NE	NE	C42	P	P	E. faecium	R42	P	N	NE
A43	N	NE	NE	B43	N	NE	NE	C43	P	N	NE	R43	P	N	NE
A44	N	NE	NE	B44	N	NE	NE	C44	P	P	E. faecium	R44	N	NE	NE
A45	P	N	NE	B45	N	NE	NE	C45	P	N	NE	R45	P	N	NE
A46	N	NE	NE	B46	P	N	NE	C46	P	N	NE	R46	P	N	NE
A47	P	N	NE	B47	P	N	NE	C47	P	N	NE	R47	P	N	NE
A48	N	NE	NE	B48	P	N	NE	C48	P	N	NE	R48	P	P	E. faecium
A49	N	NE	NE	B49	N	NE	NE	C49	P	N	NE	R49	P	P	E. faecium
A50	N	NE	NE	B50	P	P	E. faecium	C50	P	N	NE	R50	N	NE	NE
A51	N	NE	NE	B51	P	N	NE	C51	P	N	NE	R51	N	NE	NE
A52	N	NE	NE	B52	P	N	NE	C52	P	N	NE	R52	N	NE	NE
A53	N	NE	NE	B53	P	N	NE	C53	P	N	NE	R53	P	N	NE
A54	P	N	NE	B54	P	N	NE	C54	P	N	NE	R54	P	N	NE
A55	P	N	NE	B55	P	N	NE	C55	P	N	NE	R55	P	N	NE
A56	P	N	NE	B56	P	P	E. faecium	C56	P	P	E. faecium	R56	N	NE	NE
A57	N	NE	NE	B57	P	N	NE	C57	P	N	NE	R57	P	P	E. faecium
A58	N	NE	NE	B58	P	N	NE	C58	P	N	NE	R58	N	NE	NE
A59	N	NE	NE	B59	N	NE	NE	C59	N	NE	NE	R59	N	NE	NE
A60	N	NE	NE	B60	N	NE	NE	C60	P	N	NE	R60	P	P	E. faecium
A61	P	N	NE	B61	P	P	E. faecium	C61	P	N	NE	R61	N	NE	NE
A62	P	N	NE	B62	P	N	NE	C62	P	N	NE	R62	P	N	NE
A63	P	N	NE	B63	P	P	E. faecium	C63	P	N	NE	R63	P	N	NE
A64	P	N	NE	B64	P	N	NE	C64	P	N	NE	R64	N	NE	NE
A65	P	N	NE	B65	P	N	NE	C65	P	P	E. faecium	R65	N	NE	NE
A66	P	N	NE	B66	N	NE	NE	C66	P	N	NE	R66	N	NE	NE
A67	N	NE	NE	B67	N	NE	NE	C67	P	N	NE	R67	P	N	NE

A68	P	N	NE	B68	N	NE	E. faecium	C68	P	N	NE	R68	P	P	E. faecium
A69	P	N	NE	B69	N	NE	NE	C69	P	N	NE	R69	P	N	NE
A70	N	NE	NE	B70	P	N	NE	C70	P	N	NE	R70	N	NE	NE
A71	P	N	NE	B71	N	NE	NE	C71	P	N	NE	R71	P	N	NE
A72	P	N	NE	B72	N	NE	NE	C72	P	N	NE	R72	P	P	E. faecium
A73	P	N	NE	B73	P	N	NE	C73	N	NE	NE	R73	P	P	E. faecium
A74	N	NE	NE	B74	N	NE	NE	C74	N	NE	NE	R74	P	N	NE
A75	N	NE	NE	B75	N	NE	NE	C75	P	N	NE	R75	P	N	NE
A76	N	NE	NE	B76	N	NE	NE	C76	P	N	NE	R76	N	NE	NE
A77	P	N	NE	B77	P	N	NE	C77	P	N	NE	R77	N	NE	NE
A78	P	N	NE	B78	P	N	NE	C78	P	N	NE	R78	N	NE	NE
A79	P	N	NE	B79	P	N	NE	C79	P	N	NE	R79	N	NE	NE
A80	P	N	NE	B80	P	N	NE	C80	P	N	NE	R80	N	NE	NE
A81	N	NE	NE	B81	P	N	NE	C81	N	NE	NE	R81	N	NE	NE
A82	N	NE	NE	B82	P	P	E. faecium	C82	P	N	NE	R82	N	NE	NE
A83	N	NE	NE	B83	N	NE	NE	C83	P	N	NE	R83	N	NE	NE
A84	P	N	NE	B84	P	N	NE	C84	P	N	NE	R84	N	NE	NE
A85	N	NE	NE	B85	P	N	NE	C85	P	N	NE	R85	N	NE	NE
A86	N	NE	NE	B86	P	N	NE	C86	N	NE	NE	R86	N	NE	NE
A87	N	NE	NE	B87	P	N	NE	C87	N	NE	NE	R87	N	NE	NE
A88	N	NE	NE	B88	P	N	NE	C88	P	N	NE	R88	N	NE	NE
A89	N	NE	NE	B89	P	P	E. faecium					R89	N	NE	NE
A90	N	NE	NE	B90	P	N	NE					R90	N	NE	NE
A91	P	N	NE	B91	P	P	E. faecium					R91	N	NE	NE
A92	P	N	NE									R92	N	NE	NE
A93	P	N	NE									R93	N	NE	NE
A94	P	N	NE									R94	N	NE	NE
A95	N	NE	NE									R95	N	NE	NE
A96	P	N	NE									R96	N	NE	NE
A97	N	NE	NE									R97	N	NE	NE

P= Positivo

N= Negativo

NE= No estudiado

NLND= No faecium y No faecium

## Anexo 2. BASE DE AGAR KF

### USO

Para la demostración y recuento de Enterococos a partir de diversas muestras.

### PRINCIPIO

La peptona proteosa es una peptona mixta de alta calidad nutritiva y el extracto de levadura proporcionan la fuente de nutrientes necesarios para el crecimiento de los

microorganismos exigentes. La azida de sodio inhibe flora gram negativa. La maltosa y lactosa son utilizadas por la mayoría de los enterococos como fuente de energía con formación de ácido, éste se manifiesta por el vire a amarillo del indicador púrpura de bromocresol. Los enterococos reducen el TTC (2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio) produciendo un color rojo y por ello las colonias se observan de este color.

#### FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Agar 15.0 Lactosa 1.0

Azida de sodio 10.0 Maltosa 20.0

Cloruro de sodio 5.0 Peptona proteosa No. 3 10.0

Extracto de levadura 10.0

Glicerofosfato de sodio 10.0

Púrpura de bromocresol 0.015

pH  $7.2 \pm 0.2$

#### PREPARACIÓN

Rehidratar 71.5 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45 °C y en condiciones de esterilidad agregar por microfiltración 1 ml de solución al 1% de TTC. Homogeneizar y vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8 °C.

(Standard Methods for the examination of Dairy Products. 2004.)

#### Anexo 3. CALDO LURIA BERTANI ENRIQUECIDO

##### USO

Medio de enriquecimiento, especialmente para *Escherichia coli* a partir de diversas muestras.

## **PRINCIPIO**

La peptona de caseína y el extracto de levadura proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. El cloruro de sodio ayuda a mantener el equilibrio osmótico.

Inocular en el medio de cultivo la muestra de ensayo. Incubar 24 h a 35 °C. De los cultivos que muestran desarrollo, efectuar resiembras en medios de cultivo selectivos por estría cruzada.

## **FÓRMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA**

Cloruro de sodio 5.0

Extracto de levadura 5.0

Peptona de caseína 10.0

pH 7.2 ± 0.2

## **PREPARACIÓN**

Rehidratar 20 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta completa disolución. Distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Conservar en refrigeración de 2 a 8 °C.

\*Medio enriquecido con glucosa y NaCl; adicionar por cada litro de medio, 30 g de NaCl y 50 g de dextrosa anhidra junto al medio y seguir con las instrucciones del fabricante.

(Norma Interna DIBICO, S. A. de C. V.)

## **Anexo 4. GELATINA NUTRITIVA ENRIQUECIDA**

### **USO**

Para investigar la presencia de microorganismos proteolíticos en análisis bacteriológicos a partir de diversas muestras.

## **PRINCIPIO**

La peptona y el extracto de carne proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. La gelatina es el sustrato para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas), que licúan la gelatina. El empleo de este medio de cultivo va a depender del tipo de estudio a realizar. Incubar a 35 °C 48 h. Resultado: Revisar los tubos diario para registrar la hidrólisis de la molécula proteica por acción de la gelatinasa. La licuefacción se comprueba sumergiendo los tubos en agua helada o refrigeración, si hay licuefacción no se solidifica el medio. Evitar agitar los tubos en tanto su contenido permanezca líquido. Si la fluidificación de la gelatina procede lentamente como generalmente ocurre, la agitación puede mezclar la gelatina hidrolizada con la no hidrolizada, dando lugar a una mezcla que se solidifica y da una reacción falsa negativa.

## **PREPARACIÓN**

Rehidratar 128 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Distribuir en tubos de ensayo. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Enfriar en posición vertical. Conservar en refrigeración de 2 a 8 °C.

\*Para enriquecer el medio de Gelatina nutritiva con caldo nutritivo se emplearon 8 g de caldo nutritivo DIBICO® por cada litro de agua, estos se adicionaron al medio de gelatina nutritiva y se continuaron con las instrucciones del fabricante.

(Norma Interna DIBICO, S. A. de C. V.)

## **Anexo 5. AGAR SANGRE DE CORDERO AL 5%**

### **USO**

Este medio de cultivo adicionado de sangre de cordero o conejo desfibrinada estéril es adecuado para el aislamiento de bacterias a partir de diversas muestras e investigar su actividad hemolítica.

## PRINCIPIO

La base de agar sangre es un medio nutritivo en donde la infusión de músculo cardíaco y la peptona, proporcionan las fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento. El cloruro de sodio actúa manteniendo el equilibrio osmótico. Sembrar las placas sobre la superficie del medio de cultivo por estria cruzada y picadura sobre las estrias, lo que permite observar con mayor claridad la actividad hemolítica como resultado de la acción bacteriana. Incubar 24 – 48 h a 35 °C.

## PREPARACIÓN

Rehidratar 40 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 min. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 min para disolverlo por completo. Esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lbs de presión) durante 15 min. Enfriar aproximadamente a 45 °C y agregar 5% de sangre de cordero estéril desfibrinada girando suavemente el matraz para evitar la formación de burbujas, homogeneizar y vaciar en cajas de Petri estériles. Conservar en refrigeración de 2 a 8 °C.

(Norma Interna DIBICO, S. A. de C. V.)

## Anexo 6. SOLUCIONES UTILIZADAS EN PCR

### Buffer (TE) Tris:EDTA, pH 8.0

25 mM Tris-HCL: 25 mM EDTA, pH 8.0

25 mL 1 M Tris HCl, pH 8.0 + 50 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0

Llevar a un volumen final de 1000 mL con agua destilada libre de ADNasas.

### Lisozima

10 mg/mL; Pesar 10 mg de lisozima de huevo blanco de pollo liofilizada por cada mililitro de agua ultrapura, homogeneizar la suspensión y conservar a -20 °C hasta su uso.

### **Solución Salina de Citrato y Sodio SSC20X**

Pesar 175 g de NaCl y 88 g de Citrato de Sodio por cada litro de solución, utilizar agua destilada libre de ADNAs.

### **Dodecilsulfato de Sodio 10%**

Pesar 10 g de SDS y adicionarlos a 90 mL de agua estéril libre de ADNAs. Disolver y mezclar suavemente, calentar a 35 – 45 °C de ser necesario.

### **Buffer TAE 1X**

10 mL de Buffer TAE 50X BioRad® se adicionaron a 490 mL de agua destilada, la dilución se homogeneizó y quedó dispuesta para su uso inmediato

Nota: el agua utilizada para diluir el buffer TAE concentrado 50X a TAE 1X no tiene que ser estéril.

### **Agarosa 1.3% para gel de Electroforesis**

Se pesaron 0.390 g de Agarosa por cada 30 ml de Buffer TAE 1X, una vez incorporados, se calentó hasta llegar a ebullición y se mantuvo a esa temperatura hasta que se hubiera disuelto completamente la agarosa. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y cuando la temperatura de la agarosa fuese tolerable al tacto con la mano, por cada 30 mL de agarosa preparada se adicionaron 0.97 µL de Bromuro de Etidio (10 mg/mL), se homogeneizó y se depositó en el molde para el gel de electroforesis.

## **Anexo 7. OFICIOS APROBATORIOS DEL COMITÉ DE BIOÉTICA PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE AGUA RESIDUAL.**

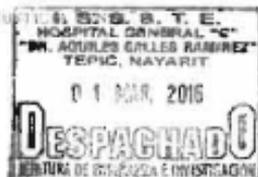


**ISSSTE**

INSTITUTO DE SEGURO SOCIAL  
SECRETARÍA DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL  
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

HOSPITAL GENERAL  
"Dr. Aquiles Calles Ramirez"  
Subdirección de Atención Atención Médica  
Jefatura de Enseñanza e Investigación

2016, AÑO DEL NUEVO SISTEMA DE JUSTICIA SOCIAL



Tepic, Nayarit, a 01 de Marzo 2016.

Oficio No. ISS/018.200.204/092/2016

**M. en C. RAQUEL MOYA GARCIA**  
**COORDINADORA DEL ÁREA DE LA SALUD**

Hospital General ISSSTE

"Dr. Aquiles Calles Ramirez"

Presente

Informo a usted que el Hospital General (B) "Dr. Aquiles Calles Ramirez" del ISSSTE en NAYARIT, no tiene inconveniente en participar en la operacionalización del Protocolo de Tesis de Investigación denominado: "Genotipificación de Enterococcus sp., en aislados del río Mololoa y Hospitalarios en Tepic, Nayarit".

A fin de que se alcancen los objetivos del proyecto, ruego a usted se coordine con El Dr. Ricardo Flores López, Coordinador de Enseñanza e Investigación; Dr. José Luis Flores García, Jefe de Medicina del Dolor y Cuidados y Secretario Técnico del Comité de Ética e Investigación

Sin más agradezco su atención.

Atentamente

**DR. JUAN JAVIER ELÍAS MARTÍNEZ**  
DIRECTOR DEL HOSPITAL GRAL. "B"  
"DR. AQUILES CALLES RAMIREZ"

c.c.p. Dr. Antonio Sandoval Pazos.- Delegado Estatal del ISSSTE en NAYARIT.  
c.c.p. Dr. Héctor Padilla García.- Subdelegado Médico del ISSSTE en NAYARIT.  
c.c.p. Dr. Rodolfo Topete Barrón.- Subdirector Médico Hospital  
c.c.p. C.P. Gilberto Ruiz Gutiérrez.- Subdirector de Administración Hospital.  
c.c.p. Dr. Ricardo Flores López.- Coordinador de Enseñanza e Investigación Hospital  
c.c.p. Dr. José Luis Flores García.- Secretario Técnico del Comité de ética e Investigación.

Archivo.

No. de Oficio: 4344

Asunto: Autorización de Protocolo.

Tepic, Nayarit, 01 de Marzo de 2016.

**C. Q.F.B. HÉCTOR MANUEL LENDO HERNÁNDEZ**  
**AUTOR DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente informo a usted que el Protocolo de Investigación titulado: "Genotipificación de *Enterococcus* spp en aislados del río mololoa y hospitalarios en Tepic, Nayarit", ha sido **APROBADO** por el Comité Hospitalario de Bioética y Ética en Investigación del Hospital Civil "Dr. Antonio González Guevara".

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

  
**DRA. CECILIA HERNANDEZ ROMAN**  
**JEFA DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION**



HOSPITAL CIVIL  
"DR. ANTONIO GONZÁLEZ GUEVARA"  
OPTO. DE ENSEÑANZA  
E INVESTIGACIÓN  
"TEPIC, NAYARIT"