



Facultad Ciencias De La Salud

Tema:

Detección de genes de virulencia en muestras de *Enterococcus faecalis* obtenidas de cepillos dentales. Estudio in vitro.

Trabajo de titulación para obtener el título de Odontóloga

Presentada por:

Tabata Alejandra Molina Romero

Tutor

PhD. María Cristina Rockenbach Binz

Cotutor

Ing. Estefany Jarrín

Quito, septiembre de 2024.

Resumen

Introducción: Las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* normalmente se encuentran alojadas en el tracto digestivo y genitourinario del ser humano. Cuando ocurre un desbalance orgánico, estas bacterias oportunistas pueden causar enfermedad en el hombre, cuya gravedad dependerá de los mecanismos de defensa del cuerpo humano y de las características del microorganismo, tales como la virulencia, resistencia, replicación y susceptibilidad. **Objetivos:** Determinar los genes de virulencia presentes en muestras de *Enterococcus faecalis* obtenidas de cepillos dentales donados. **Materiales y métodos:** Evaluamos la incidencia de factores de virulencia en 37 muestras obtenidas de cepillos dentales provenientes de una donación voluntaria. Los genes evaluados fueron *gelE*, *asa1* y *hyl*. Se realizó una PCR Multiplex y electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia de dichos genes. **Resultados:** Los resultados obtenidos arrojaron que los genes *gelE* y *asa1* tienen una mayor prevalencia en *Enterococcus faecalis*, mientras que el gen *hyl* estuvo ausente en todas las muestras analizadas. **Conclusión:** Se encontró los genes de virulencia *asa1* y *gelE* en muestras de *E. faecalis*, previamente aisladas de muestras de cepillos donados.

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*, genes de virulencia, PCR, bacteria.

DECLARACIÓN DE ACEPTACIÓN DE NORMA ÉTICA Y DERECHOS

El presente documento se ciñe a las normas éticas y reglamentarias de la Universidad Hemisferios. Así, declaro que lo contenido en este ha sido redactado con entera sujeción al respeto de los derechos de autor, citando adecuadamente las fuentes. Por tal motivo, autorizo a la Biblioteca a que haga pública su disponibilidad para lectura dentro de la institución, a la vez que autorizo el uso comercial de mi obra a la Universidad Hemisferios, siempre y cuando se me reconozca el cuarenta por ciento (40%) de los beneficios económicos resultantes de esta explotación.

Además, me comprometo a hacer constar, por todos los medios de publicación, difusión y distribución, que mi obra fue producida en el ámbito académico de la Universidad Hemisferios.

De comprobarse que no cumplí con las estipulaciones éticas, incurriendo en caso de plagio, me someto a las determinaciones que la propia Universidad plantee.

Nombre: Tabata Alejandra Molina Romero

C.I. 1724730948

Dedicatoria

Agradezco a mi familia por ser pilares fundamentales en cada paso de mi formación, cada uno aportando a su manera, con amor, ejemplo y un apoyo incondicional, en especial a mi abuelita Lulú, quien es una inspiración de fortaleza y sabiduría para todos en nuestro hogar.

A mis amigos, quienes siempre me motivaron en momentos en donde todo parecía desmoronarse, las risas compartidas, consejos y enseñanzas quedaran por siempre en mi corazón.

Por último, quiero dedicar mi triunfo a mi pequeña compañera de cuatro patas, Lola, quien fue mi compañía en las largas noches de estudio durante los primeros años de la carrera, a quien prometí acabarla a pesar de las adversidades, te dedico esto mandándote un beso al cielo.

Índice

Resumen.....	2
Declaración de aceptación de norma ética y derechos.....	3
Dedicatoria.....	4
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Materiales y métodos.....	10
Resultados.....	12
Discusión.....	17
Limitaciones y aplicaciones.....	17
Conclusión.....	18
Referencias.....	19

Índice de figuras

Figura 1. Revelado de la PCR Multiplex para genes de virulencia.....14

Figura 2. Genes de virulencia detectados en cada muestra analizada.....16

Índice de tablas

Tabla 1. Genes de virulencia analizados para este estudio.....12

Tabla 2. *Resultados de muestras positivas para gen gelE y asa1*.....15

Detección de genes de virulencia en muestras de *Enterococcus faecalis* obtenidas de cepillos dentales. Estudio in vitro

Tabata Alejandra Molina Romero

Correo electrónico: tabytaleja@hotmail.com

Resumen

Introducción: Las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* normalmente se encuentran alojadas en el tracto digestivo y genitourinario del ser humano. Cuando ocurre un desbalance orgánico, estas bacterias oportunistas pueden causar enfermedad en el hombre, cuya gravedad dependerá de los mecanismos de defensa del cuerpo humano y de las características del microorganismo, tales como la virulencia, resistencia, replicación y susceptibilidad. **Objetivos:** Determinar los genes de virulencia presentes en muestras de *Enterococcus faecalis* obtenidas de cepillos dentales donados. **Materiales y métodos:** Evaluamos la incidencia de factores de virulencia en 37 muestras obtenidas de cepillos dentales provenientes de una donación voluntaria. Los genes evaluados fueron *gelE*, *asa1* y *hyl*. Se realizó una PCR Multiplex y electroforesis en gel de agarosa para verificar la presencia de dichos genes. **Resultados:** Los resultados obtenidos arrojaron que los genes *gelE* y *asa1* tienen una mayor prevalencia en *Enterococcus faecalis*, mientras que el gen *hyl* estuvo ausente en todas las muestras analizadas. **Conclusión:** Se encontró los genes de virulencia *asa1* y *gelE* en muestras de *E. faecalis*, previamente aisladas de muestras de cepillos donados.

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*, genes de virulencia, PCR, bacteria

Abstract

Introduction: Bacteria belonging to the genus *Enterococcus* are normally found lodged in the human digestive and genitourinary tract. When an organic imbalance occurs, these opportunistic bacteria can cause disease in humans, the severity of which depends on the defense mechanisms of the human body and the characteristics of the microorganism, such as virulence, resistance, replication and susceptibility.

Objectives: To determine the virulence genes present in *Enterococcus faecalis* samples obtained from donated toothbrushes.

Materials and methods: We evaluated the incidence of virulence factors in 37 samples obtained from toothbrushes from a voluntary donation. The genes evaluated were *gelE*, *asa1* and *hyl*. Multiplex PCR and agarose gel electrophoresis were performed to verify the presence of these genes.

Results: The results obtained showed that the *gelE* and *asa1* genes are more prevalent in *Enterococcus faecalis*, while the *hyl* gene was absent in all the samples analyzed.

Conclusion: The virulence genes *asa1* and *gelE* were found in *E. faecalis* samples previously isolated from donated brush samples.

Key words: *Enterococcus faecalis*, virulence genes, PCR, bacteria.

Introducción

Las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* normalmente se encuentran alojadas en el tracto digestivo y genitourinario del ser humano y al presentarse un desbalance en el sistema inmune, pueden ocasionar los principales tipos de infecciones nosocomiales (Kiruthiga, et al., 2020). Su presencia también se ha encontrado en infecciones de cavidad oral tales como necrosis pulpar, conductos expuestos a cavidad oral y periodontitis apicales persistentes (Carrero Martínez, et al., 2015).

El género *Enterococcus* ha adquirido importancia en el ámbito clínico debido al aumento en su frecuencia como causa de infecciones y a la creciente diseminación de cepas que presentan resistencia a múltiples fármacos. (Caraffini., Nobile., Figueroa., Vargas, & Tacchini, 2009). En el caso de *Enterococcus faecalis* su capacidad patógena se relaciona con diversos factores de virulencia, tales como la sustancia de agregación (*asaI*), la gelatinasa (*gelE*), y la hialuronidasa (*hyl*) (Kiruthiga, et al., 2020). La mayoría de los factores de virulencia específicos de los *Enterococcus* están codificados en plásmidos que permiten una rápida propagación horizontal entre aislados según Gök ŞM., et al. (2020).

La sustancia de agregación es expresada a partir del gen *asaI* y es responsable de conferir a la bacteria, una mayor capacidad de adhesión a las células tubulares renales, a las células endocárdicas del corazón, y permite la internalización de la bacteria en las células epiteliales intestinales. Esta sustancia también facilita la transferencia genética en las bacterias, favoreciendo su supervivencia y propagación en diferentes entornos biológicos (Vankerckhoven, et al., 2004).

La gelatinasa, codificada por *gelE*, es una endopeptidasa/proteasa de zinc extracelular producida por *E. faecalis*. Es responsable de dañar el tejido del hospedador, facilitando así la migración y la propagación de bacterias. Además, contribuye a la colonización y persistencia bacteriana al promover la formación de biopelículas (Kiruthiga, et al., 2020). La gelatinasa puede hidrolizar gelatina, colágeno, caseína y otros péptidos bioactivos, lo que sugiere que podría participar en procesos inflamatorios. (Archimbaud, et al., 2002).

La hialuronidasa, cuya codificación proviene del cromosoma *hyl*, es una enzima característica de *E. faecium* y comparte similitudes con las hialuronidasas encontradas en otros cocos Gram positivos. Así, el gen de virulencia *hyl* es encontrado en *E. faecium*, y *E. faecalis*, lo que nos sugiere una adaptación especializada de esta bacteria (Kiruthiga, et al., 2020). Frente a lo expuesto, este estudio pretende determinar la frecuencia de presencia o ausencia de los genes de virulencia aislados de *E. faecalis*, detectados en cepillos dentales mediante una PCR Multiplex, para establecer las afecciones que se podrían ocasionar en la cavidad bucal e identificar su presencia en infecciones específicas como la periodontitis apical.

Materiales y Métodos

Se plantea un estudio descriptivo, experimental *in vitro*, donde fueron analizados 37 aislados puros de *E. faecalis*, provenientes de diferentes muestras clínicas obtenidas de cepillos dentales donados, con un tiempo mínimo de uso de dos meses. Los tres pares de primers usados para la amplificación de los genes *asaI*, *gelE* y *hyl*, así como el tamaño esperado, se enlistan en la Tabla 1. Los primers estuvieron basados en las parejas de primers publicados por Vankerckhoven et al. (2004). Todas las muestras fueron cultivadas en agar nutritivo e incubadas a 37.5 °C por 24 horas.

La PCR multiplex fue efectuada en un termociclador MiniAmp™ Plus. Se modificó el protocolo de PCR descrito por Vankerckhoven et al. (2004) para la polimerasa GoTaq. La reacción de amplificación se realizó en microtubos de 200 µL con una concentración de primers de 0.1 µM, 1mM de cloruro de magnesio, 25 µL de GoTaq® Green Master Mix, y 1 colonia pura de *E. faecalis* para el molde de ADN, en un volumen total de 50 µL. Las condiciones de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, seguido por una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Los amplicones fueron evaluados mediante una electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1.5 %.

Tabla 1. Genes de virulencia analizados para este estudio.

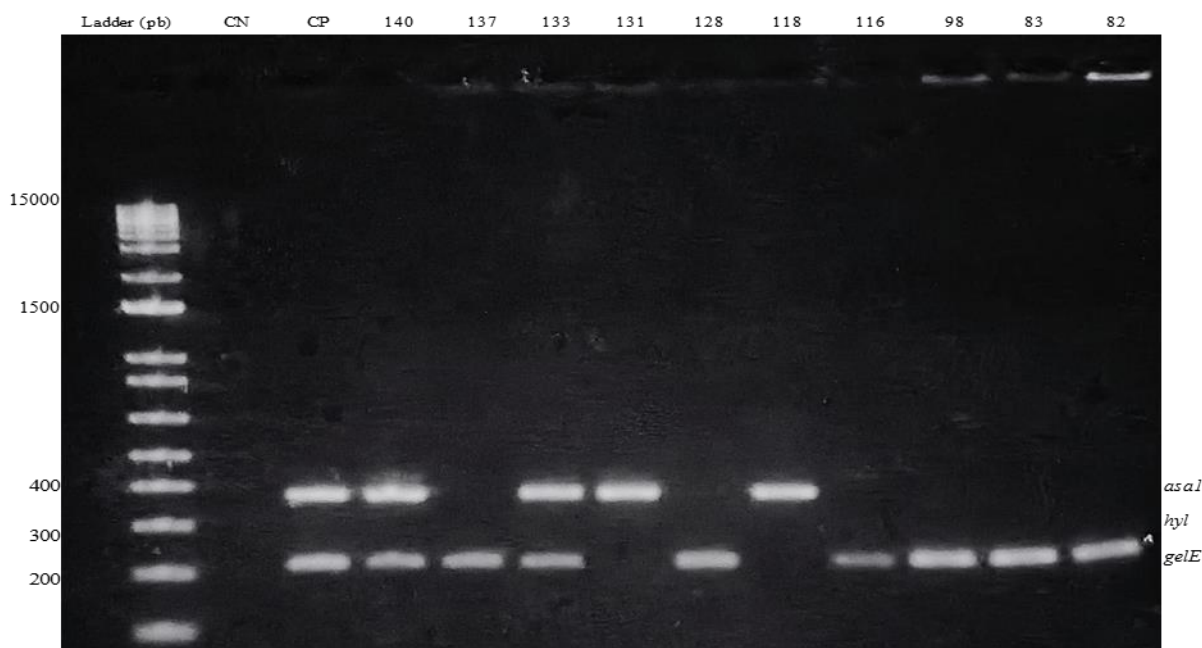
Gen	Factor de virulencia	Nombre del primer	Secuencia de oligonucleótidos 5' a 3'	Pares de base
<i>asaI</i>	Sustancia de agregación	ASA 11	GCACGCTATTACGAACTATGA	375
		ASA 12	TAAGAAAGAACATCACCACGA	
<i>gelE</i>	Gelatinasa	GEL 11	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	213
		GEL 12	AGATGCACCCGAAATAATATA	
<i>hyl</i>	Hialuronidasa	HYL 1	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276
		HYL 2	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	

Nota: Los datos de la Tabla 1, fueron extraídos de (Vankerckhoven V. V., 2004)

Resultados

De un total de 37 muestras de *E. faecalis* analizadas, se observó que el 81.08% (30/37) presentaron el gen *gelE*; y el 21,62% (8/37), el gen *asa1* (Tabla 2). El gen *hyl* estuvo ausente en todas las muestras examinadas (Figura 1).

Figura 1. Revelado de la PCR Multiplex para genes de virulencia.



Nota de imagen: Resultados obtenidos de electroforesis analizados en el trasiluminador, mostrando el TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder en la izquierda, teniendo en orden las muestras del control negativo (CN), control positivo (CP), las muestras analizadas en la imagen fueron (140) positivo para *asa1* y *gelE*, (137) positivo para *gelE*, (133) positivo para *asa1* y *gelE*, (131) positivo para *asa1*, (128) positivo para *gelE*, (118) positivo para *asa1*, (116) positivo para *gelE*, (98) positivo para *gelE*, (83) positivo para *gelE* y (82) positivo para *gelE*.

Como se observa en la Figura 1, algunas muestras de *E. faecalis* presentaron más de un gen de virulencia, correspondiendo al 8.10% (3/37).

Tabla 2. Resultados de muestras positivas para gen *gelE* y *asaI*

Genes de virulencia	Número de muestras positivas	Número de muestras analizadas	Porcentajes obtenidos
<i>asaI</i>	8	37	21,62%
<i>gelE</i>	30	37	81.08%

Al final se obtuvo un 24.32% (9/37) de muestras que no presentaron ninguno de los genes de virulencia analizados en el estudio (Figura 2).

Figura 2.

Genes de virulencia detectados en cada muestra analizada.

Registro individual de muestras analizadas de E.faecalis	Gen de virulencia gelE	Gen de virulencia asa1	Gen de virulencia hyl
6	-	-	-
9	+	-	-
10	-	-	-
16	+	-	-
18	+	-	-
19	+	-	-
24	+	-	-
25	-	-	-
29	+	-	-
30	-	-	-
32	-	-	-
38	+	-	-
43	+	-	-
46	+	-	-
47	+	-	-
48	-	-	-
49	+	-	-
50	-	+	-
51	+	-	-
54	-	-	-
55	+	-	-
64	-	-	-
65	+	-	-
73	+	+	-
74	-	+	-
75	+	-	-
77	+	-	-
78	+	-	-
82	+	-	-
83	+	-	-
86	+	-	-
87	+	-	-
98	+	-	-
105	-	-	-
116	+	-	-
118	-	+	-
122	+	-	-
128	+	-	-
131	-	+	-
133	+	+	-
137	+	-	-
140	+	+	-
142	+	-	-
153	-	+	-

Fuente: Elaboración propia

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que los genes analizados, tanto *gelE* como *asal*, efectivamente se encontraban en las muestras previamente recolectadas de *E. faecalis*; sin embargo, estudios como el de Gök ŞM, et al. (2020), mencionan que, a más de los genes determinados, pueden presentarse otros. Según Vankerckhoven (2004), el gen *hyl* también puede encontrarse en muestras de *E. faecalis*. Esto concuerda con la variedad de factores de virulencia que se han encontrado en muestras obtenidas para distintos estudios como el de Madsen, Skov, Gill, & Kemp, (2017), y Gök ŞM, et al. (2020).

Al comparar con otros estudios como el de Ali, et al. (2017), Laskin, Soltys, Berg, Riley., (1994) y McBride, et al. (2007), corroboramos que esta especie de bacteria, debido a su resistencia intrínseca, es capaz de sobrevivir en el ambiente, por ello se comprende la presencia de esta especie en las muestras obtenidas de cepillos dentales, sin embargo, al ser oportunistas, primero deben adherirse y colonizar la mucosa oral para producir infecciones durante un desequilibrio en el organismo (Kiruthiga, et al., 2020). Para evitar este riesgo de infección bacteriana, se debe recomendar a los pacientes, cambiar el sitio de almacenamiento expuesto de sus cepillos dentales a un ambiente cerrado y libre de humedad.

En cuanto al gen *asal*, entendemos según Rakita et al. (1999), que es el encargado de promover la adherencia, lo cual permite que se exprese al momento en que el organismo presenta un desequilibrio. Dado a sus características este gen es resistente a la fagocitosis por parte del hospedador, a más de evitar la activación de neutrófilos para de esta manera pasar desapercibidos, según, Rakita et al. (1999). El gen *gelE* al ser uno de los más observados en gran parte de nuestras muestras, nos permite comprender de una mejor manera los resultados obtenidos en este estudio, ya que dado a su virulencia como lo menciona Postlethwaite. & Kang.

(1976), tiene la capacidad de degradar las células de su hospedador, lo cual justifica su participación en procesos inflamatorios en la cavidad oral, tales como pulpas inflamadas y lesiones periapicales en tejidos sanos (Shin et al., 2002). A pesar de que en ninguna muestra se observó el gen *hyl*, estudios como el de, Abou-Rass y Bogen, (1998) y Sunde et al. (2002), nos indican que este puede facilitar el camino para la expresión de otros genes de virulencia, aumentando así la magnitud del daño al hospedador.

El estudio de la virulencia de *E. faecalis* tiene como objetivos, impactar positivamente en la prevención, diagnóstico y tratamiento de infecciones bacterianas, así como también, avanzar en el conocimiento científico de la microbiología y patogénesis bacteriana, factores que trabajan en conjunto para permitir su supervivencia en diferentes entornos y para causar infecciones persistentes de difícil tratamiento, como es el caso de la colonización por biofilm de los conductos radiculares por el *E. faecalis*, como se menciona en Kayaoglu G. & Ørstavik D, (2004). El conocimiento de estos factores es crucial para el desarrollo de estrategias efectivas de prevención y tratamiento de las infecciones causadas por *E. faecalis*, cuyos mecanismos de virulencia, que comprenden desde la adhesión a las células hospedadoras, hasta la producción de toxinas, la resistencia a los antibióticos y la formación de biofilms, demuestran su versatilidad y capacidad para evadir los tratamientos convencionales.

Conclusión

En el análisis de muestras de *E. faecalis*, previamente aisladas de cepillos dentales donados, se encontraron los genes de virulencia *asa1* y *gelE*.

Referencias

- Abou-Rass M, Bogen G (1998). Microorganisms in closed periapical lesions. *International endodontic journal*, 31:39–47.
- Ali, L., Goraya, M., Ullah, M., Ajmal, M., Chen, J., & Yu, D. (2017). Molecular Mechanism of Quorum-Sensing in *Enterococcus faecalis*: Its Role in Virulence and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 960.
- Archimbaud, C., Shankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M., Charbonné, F., & Joly, B. (2002). In vitro adhesive properties and virulence factors. *Research in Microbiology*, 153(2), 75–80.
- Caraffini , A., Nobile , C., Figueroa , M., Vargas, M., & Tacchini , M. (2009). Factores de virulencia de enterococcus spp. y su relación con la resistencia a antibióticos. *Bioquímica y Patología Clínica*, 73(3), 34-39.
- Carrero Martínez, C., González, M., Martínez, M., Serna, F., Diez, H., & Rodríguez, A. (2015). Baja frecuencia de *Enterococcus faecalis* en mucosa oral de sujetos que acuden a consulta odontológica. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*, 26(2), 261-270.
- Gök ŞM, Türk Dağı H, Kara F, Arslan U, Fındık D. (2020). Klinik örneklerden izole edilen *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* izolatlarının antibiyotik direnci ve virülans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol*, 54(1):26-39.
- Kayaoglu G. & Ørstavik D. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endodontic Disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2004;15(5):308-320.

- Kiruthiga, A., Padmavathy, K., Shabana, P., Naveenkumar, V., Gnanadesikan, S., & Malaiyan, J. (2020). Improved detection of esp, hyl, asa1, gelE, cylA virulence genes among clinical isolates of Enterococci. *BMC Research Notes*, 13(170), 1-7.
- Laskin DL, Soltys RA, Berg RA, Riley DJ (1994). Activation of alveolar macrophages by native and synthetic collagen-like polypeptides. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 10:58–64.
- McBride SM., Fischetti VA., LeBlanc DJ., Moellering RC Jr. & Gilmore MS. (2007). Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. *Plos One*. 2(7): e582.
- Madsen, K., Skov, M., Gill, S., & Kemp, M. (2017). Virulence Factors Associated with *Enterococcus Faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review. *The Open Microbiology Journal*, 11, 1–11.
- Postlethwaite, A. E., Snyderman, R. A. L. P. H., & Kang, A. H. (1976). The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor. *The Journal of experimental medicine*, 144(5), 1188-1203.
- Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, Mee M, Mariscalco MM, Dunny GM, et al. (1999). *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infection and immunity*, 67:6067–6075.
- Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS (2002). Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 28:313–315.

Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L (2002). Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *Journal of endodontics*, 28:304–310.

Vankerckhoven, V., Autgaerden, 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*. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42(10), 4473–4479.