

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: EJEMPLO DE UNA VISIÓN INTEGRAL Y MICROBIOLÓGICA EN EL MARCO “UNA SALUD”. EL CASO DE *ENTEROCOCCUS SPP*¹

Schell, Celia María²

Resumen

El objetivo fue analizar y caracterizar la estructura poblacional de enterococos que causaban infecciones invasivas en pacientes de un hospital público argentino, coincidiendo con un período de 5 años de mayor recuperación de enterococos resistentes a antimicrobianos (2010-2014). La identificación de especies (pruebas bioquímicas y MALDI TOF-MS), la susceptibilidad antimicrobiana (difusión por discos y CIM) y la relación clonal (PFGE/MLST/BAPS) se determinaron de acuerdo con protocolos validados. La producción de β -lactamasa se determinó mediante prueba fenotípica y se confirmó mediante PCR/secuenciación. Los aislamientos se identificaron como *E. faecalis* y *E. faecium* (proporción 2:1). *E. faecalis* se agruparon en

1 Parte de los resultados presentados en el seminario fueron publicados en: Schell, CM; Tedim, AP; Rodríguez-Baños, M; Sparo, MD; Lissarrague, S; Basualdo, JA; Coque, TM. Detection of β -Lactamase-Producing *Enterococcus faecalis* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates in Human Invasive Infections in the Public Hospital of Tandil, Argentina. *Pathogens* 2020, 9, 142.

2 Bioquímica. Universidad Nacional del Litoral. Dra. en Ciencias Médicas y Especialista en Docencia Universitaria. Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Diplomada en Dirección y Gestión Universitaria. Universidad de Granada, España. Profesora de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas (UNLP).

25 tipos clonales (ST9/ST179/ST236/ST281/ST388/ST604/ST720), y varios presentaron alto nivel de resistencia a gentamicina/estreptomicina (ANRGE). Se detectó un clon de secuencia tipo (ST): ST9 (bla+/alto nivel de resistencia a gentamicina) en pacientes de diferentes salas durante 2014. *E. faecium* se agrupó en 10 tipos clonales (ST25/ST18/ST19/ST52/ST792). Cinco *E. faecium* fueron resistentes a vancomicina (tres vanA y dos vanB). La recuperación de un bla+/ST9-*E. faecalis*, clon similar al descrito a fines de la década de 1980 en Argentina sugiere la posibilidad de un reservorio oculto local. Estos resultados reflejan la relevancia de la epidemiología local para comprender la estructura de la población de esta bacteria, así como la aparición y propagación de resistencia antimicrobiana en los linajes clonales predominantes de enterococos.

Introducción

Las bacterias que pertenecen al género *Enterococcus* son cocos Gram positivos (células esféricas), integrantes del microbioma gastrointestinal habitual del hombre y animales (Lebreton, Willems y Gimore, 2014). Fenotípicamente son anaerobios facultativos, catalasa negativos y pueden observarse al microscopio óptico generalmente agrupados de a pares, formando cortas cadenas o ubicados aisladamente. Por su versatilidad biológica y al ser eliminados por materia fecal, pueden habitar diversos nichos ecológicos de la naturaleza; como cursos de agua, plantas, insectos, vegetales, alimentos de origen animal y objetos inanimados intrahospitalarios.

Enterococcus faecalis (80-90 %) y *Enterococcus faecium* (10 %) son las especies aisladas con mayor frecuencia de muestras clínicas provenientes de infecciones humanas documentadas (Arias y Murray, 2012).

Enterococcus gallinarum, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus flavescens* y *Enterococcus durans*, también pueden

producir patología infecciosa en el ser humano. Sin embargo, su frecuencia de aislamiento a partir de muestras clínicas es mucho menor (Narciso-Schiavon *et al.*, 2015).

La ubicación de estas bacterias en el tracto gastrointestinal y genitourinario del hombre (cepas endógenas), es una condición que facilita la capacidad para colonizar, persistir y continuar con el mecanismo de patogénesis microbiana (Lebreton, Willems y Gilmore, 2014). Sin embargo, también puede producirse una infección por cepas exógenas adaptadas al nicho hospitalario, en algún lugar anatómico del paciente, como resultado de la colonización y la multiplicación excesiva de enterococos resistentes.

Los *Enterococcus* poseen resistencia intrínseca a diversos antimicrobianos (ATM) y esta particularidad, acota las opciones terapéuticas disponibles para su tratamiento y erradicación. El tratamiento de las infecciones graves por enterococos frecuentemente se ve perjudicado por la resistencia intrínseca y/o adquirida a los ATM de primera línea, es decir, los activos contra la pared celular (betalactámicos o glucopéptidos) y los aminoglucósidos, que se combinan para lograr un efecto bactericida (Moreira *et al.*, 2016; Mercurio *et al.*, 2018). La resistencia a estas opciones terapéuticas se ha informado ampliamente en los países occidentales, pero la información de otros lugares, incluida Argentina, aún es escasa y proviene de estudios centrados en la resistencia a los glucopéptidos (Guzman Prieto *et al.*, 2016; Werner *et al.*, 2008; Togneri *et al.*, 2005; Lopardo *et al.*, 2008); descripciones tempranas de mecanismos emergentes de resistencia (producción de β -lactamasa) (Murray y Mederski-Samaroj, 1983); o estudios transversales de vigilancia que solo incluyen algunos aislamientos de diferentes ubicaciones geográficas³ (Pfaller *et al.*, 2019).

Respecto a la resistencia intrínseca a algunos ATM β -lactámicos como las cefalosporinas y los carbapenémicos, la resistencia a penicilina se adquiere por mutaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBP) o, con menos frecuencia, por la producción de una β -lactamasa

³ Para acceder a más información, ingresar a <https://resistancemap.cddep.org/>

(Conceição *et al.*, 2014). La resistencia a las aminopenicilinas es muy común en *E. faecium* y se debe principalmente a mutaciones en la PBP5 (Novaris *et al.*, 2016) y, esporádicamente, a la producción de β -lactamasa (Sarti *et al.*, 2012). Aunque la mayoría de los aislamientos de *E. faecalis* son susceptibles a la penicilina, se han notificado *E. faecalis* resistentes a la penicilina y sensibles a ampicilina (PRASEF) desde finales de la década de 1980 en diferentes países, incluida Argentina (Sarti *et al.*, 2012; Gagetti *et al.*, 2019). Hasta la fecha, PRASEF puede resultar de la producción de β -lactamasa o mutaciones en la PBP4 (Conceição *et al.*, 2014). La resistencia a los glucopéptidos está mediada por una plétora de determinantes genéticos, siendo los genotipos *vanA* (Tn1546) y *vanB* (Tn5382/Tn1547) los más predominantes (Werner *et al.*, 2008). El primer enterococo resistente a vancomicina (ERV) reportado en América Latina fue aislado en Mendoza, Argentina, en 1996 de un paciente masculino de 7 años tratado con diferentes ATM y fue identificado como *E. faecium* (*vanA*) (Marín *et al.*, 1998). Luego de este caso esporádico, en varios hospitales argentinos se detectó *E. faecium* portador de *vanA* o *vanB* en pacientes colonizados o infectados (Togneri *et al.*, 2005; Lopardo *et al.*, 2008; Corso *et al.*, 2007). La mayoría de estos ERV fueron *E. faecium* (*vanA*) y, esporádicamente, *E. faecalis* y *Enterococcus gallinarum* (Corso *et al.*, 2007; Faccone *et al.*, 2010).

La resistencia de alto nivel a gentamicina (RANG) en enterococos se describió por primera vez en 1979 en Francia y, a fines de la década de 1980, en diferentes países, incluida Argentina, que a menudo se asocia con *E. faecalis* productores de β -lactamasa (Murray, 1992; Hodel-Christian y Murray, 1992). Datos recientes en el sitio del CDDEP⁴ revelaron que los aislamientos de *E. faecium* obtenidos a partir de infecciones invasivas (bacteriemia y meningitis) fueron comúnmente resistentes a ampicilina (>75 % - 80 %) y a vancomicina (60 % - 75 %), mientras que los aislamientos de *E. faecalis* aislados de las mismas

4 <https://resistancemap.cddep.org/>

infecciones, rara vez fueron resistentes a los ATM activos contra la pared celular en Argentina.

Adicionalmente, la caracterización de la estructura poblacional de enterococos en diferentes hospitales del mundo ha sido muy bien estudiada (Coque *et al.*, 2005; Tedim *et al.*, 2016; Kuo *et al.*, 2018). Sin embargo, en Argentina, la caracterización del ST de cepas de enterococos aislados de entornos hospitalarios no es muy conocida. Sólo escasos trabajos han comunicado la detección del ST17, confirmando la circulación de clones A y B pertenecientes al Complejo Clonal (CC) 17 para la especie *E. faecium*, lo cual indica que este CC es el principal responsable de la emergencia y diseminación de *E. faecium* vancomicina resistentes (EFMVR) en nuestro país (Faccone *et al.*, 2010).

Caracterizar las cepas y el resistoma de cada institución de salud, es de elevada importancia ya que permite modificar y/o adecuar medidas de Bioseguridad vinculadas al uso racional y prudente de los ATM en línea con los objetivos de la nueva Ley Nacional de Prevención y control de la Resistencia a los ATM (Ley N° 27680).

Además, géneros como el descripto sirven como puntos de recolección y distribución de elementos genéticos móviles, transmitiendo una variedad de resistencias a los ATM a especies grampositivas y gramnegativas, incluida la transmisión de resistencia a vancomicina de los enterococos a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Courvalin, 1994; Weigel *et al.*, 2003).

El Hospital Municipal Ramón Santamarina (HMRS) de la ciudad de Tandil, Buenos Aires, es un hospital público de tamaño mediano que cubre atenciones de patologías agudas y crónicas de poblaciones urbanas y rurales del partido de Tandil y alrededores. Durante el periodo comprendido entre 2010 a 2014, se elevó el aislamiento de cepas de *Enterococcus spp.* con resistencia antimicrobiana en dicho nosocomio.

Dada esta situación, se diseñó un estudio cuyo objetivo fue analizar y caracterizar la estructura poblacional de enterococos que causaban infecciones invasivas en pacientes internados en el HMRS,

coincidiendo con un período de 5 años de mayor recuperación de enterococos resistentes a ATM.

Hipótesis

Por el uso intensivo de ATM dentro y fuera del ambiente hospitalario, en el HMRS, perteneciente al Sistema Integrado de Salud Pública del Municipio de Tandil (SISPMT), Buenos Aires, se aíslan especies multirresistentes del género *Enterococcus* de muestras clínicas obtenidas por punción, provenientes de infecciones invasivas humanas.

Objetivo general

Analizar y caracterizar la estructura poblacional de cepas de *Enterococcus spp.* causantes de infecciones invasivas en pacientes de un hospital público argentino durante el período 2010-2014.

Materiales y Métodos

Área y período de estudio: El HMRS integra juntamente con el Hospital de Niños Dr. Debilio Blanco Villegas (DBV) y el Hospital Enrique Larreta de la localidad de María Ignacia Vela, el SISPMT, Buenos Aires, República Argentina. Se encuentra ubicado en el sudeste de la provincia homónima y depende de la Subsecretaría de Salud de la Municipalidad de Tandil. Es un organismo descentralizado, de mediana complejidad, incluido en el régimen de hospitales públicos de autogestión. El HMRS posee una gran zona de influencia que incluye pacientes provenientes de otras localidades de la provincia como Ayacucho, Rauch, Lobería, Necochea y zonas cercanas a 80 y 90 km a la redonda. En 2013 se realizaron un total de 19.899 consultas en todos sus servicios y se registraron 5.348 internaciones. En el 2014, fueron registradas 22.001 consultas.

Diseño del estudio: El período de estudio de este proyecto estuvo comprendido entre marzo de 2012 y diciembre de 2016. El diseño de

investigación fue observacional, descriptivo, retrospectivo y de corte transversal.

Unidad de observación: Las cepas de *Enterococcus spp.* en primera instancia fueron recuperadas y aisladas de manera retrospectiva, a partir de una colección de cepas de esta bacteria conservadas en freezer (-20 °C) en el Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMyP), FCM-UNLP. Todas estas cepas (n=16) pertenecían al cepario del CUDEMyP y correspondían a aislados provenientes de muestras clínicas obtenidas por punción (unidad de análisis) de pacientes internados en HMRS durante el año/cohorte 2010. Posteriormente, se recolectaron prospectivamente, durante 2013 y 2014, n=47 cepas de *Enterococcus spp.* (segunda cohorte) de muestras obtenidas por punción de pacientes internados por presentar diagnóstico de infección invasiva. La población total quedó conformada por N=63 cepas.

Identificación de cepas de *Enterococcus spp.* por pruebas bioquímicas y espectrometría de masas (MALDI TOF-MS): La caracterización fenotípica se realizó por pruebas bioquímicas convencionales a nivel de género y especie en cada colonia presuntiva de enterococos, que desarrolló en agar bilis esculina azida y en los demás medios de cultivos, a 35 °C por 24 h. La confirmación fue por MALDI TOF-MS Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

Determinación de la relación clonal de los aislamientos por electroforesis de campo pulsado (PFGE): La relación clonal para evaluar la vinculación epidemiológica de las cepas de enterococos, productoras de infecciones invasivas, fue determinada analizando los pulso-tipos obtenidos por PFGE (Electroforesis de Campo pulsado) según protocolo estandarizado.

Caracterización genética de cepas seleccionadas de *Enterococcus* spp. por Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci (MLST) y determinación de la estructura genética poblacional: Para este estudio se seleccionó estratégicamente a un subconjunto de aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium*, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por electroforesis de campo pulsado. También fueron seleccionadas cepas que presentaron patrones de resistencia diferentes, siendo del mismo clon, de modo tal de inferir conclusiones vinculadas con los resultados obtenidos por MLST y PFGE. Para determinar el Secuencia tipo (ST) de cada cepa seleccionada, se colocó el número obtenido de cada perfil alélico detectado por amplificación y secuenciación de los siete genes en el esquema de MLST de cada bacteria.

Determinación del perfil de resistencia in vitro frente a los ATM de importancia clínica mediante pruebas cualitativas y cuantitativas (CIM): El perfil de resistencia a los ATM se determinó de manera cualitativa utilizando el método de difusión por discos o Kirby Bauer, y de manera cuantitativa por método epsilométrico (E-test), según los instructivos de las guías establecidas por CLSI, 2016.

Detección fenotípica de producción de β -lactamasa y secuenciación del gen: La producción de β -lactamasa se investigó mediante el método del disco de nitrocefina (Cefinase discs) utilizando un kit comercial (Becton Dickinson, Argentina SRL.). Para la secuenciación se siguió el protocolo de McBride *et al.* (2007).

Determinación de la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos mediante técnicas de amplificación génica: Sobre la base de las secuencias de los genes de resistencia vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, etc.; fueron seleccionados cebadores específicos de cada gen para amplificar por PCR, los fragmentos internos, siguiendo protocolos estandarizados.

Análisis estadístico de los resultados: Medidas de estadística descriptiva, de verificación de diferencias (Chi (χ^2) cuadrado, pruebas no paramétricas, con un nivel de significancia del 95 %), fueron utilizadas para el análisis y la expresión de los resultados. Hallazgos de valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos para las pruebas estadísticas aplicadas.

Aprobación ética: Los registros de los pacientes se obtuvieron en cumplimiento de la Ley Nacional N° 25.326 art. 11 de “Protección de Datos Personales” y la Ley Nacional N° 26529/10 “Derechos del Paciente, Historia Clínica y Consentimiento Informado” de Argentina, en línea con la declaración de Helsinki. Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Investigación del HMRS.

Resultados

Antecedentes epidemiológicos de las cepas aisladas de infecciones invasivas humanas en el HMRS

En esta investigación, la población quedó conformada por N=63 cepas de *Enterococcus spp.* n=44 *E. faecalis* y n=19 *E. faecium* fueron detectadas.

Todas las cepas fueron identificadas con pruebas bioquímicas convencionales y confirmadas por MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Tanto *E. faecalis* como *E. faecium* se aislaron de siete muestras clínicas (tres fluidos peritoneales, dos abscesos hepáticos, un fluido abdominal, y un líquido sinovial). La edad de los pacientes osciló entre 16 y 92 años ($59 \pm 18,8$ años, 70% > 50 años), la mayoría con enfermedad de base (49%) y antecedentes de exposición a ATM (80%), principalmente a ciprofloxacina (23,6%), cefalexina (18,2%) y ceftriaxona (14,5%). La tasa de mortalidad fue del 27,3%.

E. faecalis: Aproximadamente la mitad de los aislamientos de *E. faecalis* (47,7%) fueron sensibles a todos los ATM probados. Se detectó

RANG (43,2%), a estreptomina (22,7%) a ambas (13,6%) y resistencia a fluoroquinolonas (20,4%, ciprofloxacina y levofloxacina), penicilina (11,4%) y cloranfenicol (2,3%). La producción de β -lactamasa se infirió para los cinco aislados de PRASEF en función del aumento de 5 mm en el diámetro de inhibición de ampicilina-sulbactam en comparación con ampicilina (27), prueba de nitrocefina positiva y la identificación del gen de β -lactamasa de clase A, que confiere resistencia a las aminopenicilinas (número de acceso de GenBank U43087.1). Los aislamientos PRASEF exhibieron el mismo tipo PFGE, EFC-2, y se clasificaron como ST9. El resto de las cepas *E. faecalis* se agrupó en 24 tipos diferentes de PFGE. Además de EFC-2, los tipos de PFGE más comunes fueron EFC-7, EFC-16 y EFC-3, que corresponden a ST179, ST281 y ST720, respectivamente. ST720 fue un nuevo ST de *E. faecalis* descrito aquí por primera vez.

***E. faecium*:** Los aislados de *E. faecium* fueron resistentes a penicilina (47,4%), ampicilina y ampicilina/sulbactam, vancomicina (26,3% cada uno), teicoplanina, levofloxacina y quinupristin-dalfopristin (15,8% cada uno), ciprofloxacina y presentaron RANG (10,5%). Todas las cepas de *E. faecium* fueron sensibles a linezolid, tigeciclina y cloranfenicol. Tres cepas fueron multirresistentes (Magiorakos *et al.*, 2012). Las cepas de *E. faecium* se agruparon en 10 tipos diferentes de PFGE, siendo predominantes: EFM-1, EFM-2 y EFM-4. EFM-1 y EFM-4 pertenecían a ST25-BAPS 2.3 y ST52-BAPS 7, respectivamente. En este estudio se detectaron cinco cepas EFMVR (tres vanA y dos vanB). Dos aislados de vanA tenían diferentes tipos de PFGE (EFM-7 y EFM-9), pero ambos pertenecían a BAPS 3.1-ST792. La otra cepa vanA y las dos cepas vanB mostraron el mismo tipo PFGE, EFM-1, y se identificaron como BAPS 2.3-ST25. Las dos cepas vanB se aislaron de muestras de sangre y fluidos abdominales de pacientes con infecciones del torrente sanguíneo e intraabdominales documentadas en las salas de cirugía y UTI (unidad terapia intensiva) en 2013 y 2014.

Discusión

Este informe documenta la presencia de complejos clonales relevantes de alto riesgo de *E. faecalis* y *E. faecium* (Guzmán Prieto *et al.*, 2016), capaces de adquirir y diseminar genes resistentes a los ATM de primera línea. El clon ST9-PRASEF (bla+, RANG) de *E. faecalis* identificado en este estudio, representa uno de los pocos bla+/*E. faecalis* descriptos hasta la fecha, la mayoría de ellos documentados a fines de la década de 1980 en EE. UU., Líbano, Canadá y Argentina (Nallapareddy *et al.*, 2002). La aparente relación entre los aislamientos de ST9-bla+ descriptos aquí y los reportados en otro hospital de Buenos Aires en 1989, ambos con RANG, sugieren que este clon podría haber estado circulando en nuestro medio desde fines de la década de 1980. Clones endémicos de *E. faecalis* con mecanismos de resistencia poco frecuentes, como la producción de β -lactamasa o resistencia a vancomicina, se han descrito previamente en regiones específicas de los EE. UU., ya sea debido a un clon epidémico (ST6-bla+) (Murray, 1992; Hayakawa *et al.*, 2011) o un plásmido epidémico (Inc18-vanA) (Teddim *et al.*, 2015). Hasta la fecha, no se comprende bien por qué estas cepas resistentes a los ATM permanecen aparentemente confinadas en regiones específicas. La presencia de otros ST de *E. faecalis* como ST179, ST388 y ST720 (con RANG) en más de un paciente en diferentes salas, refleja la transmisibilidad de varios clones en el hospital bajo estudio. Respecto a cepas de *E. faecium* caracterizadas en esta investigación, algunas de ellas, no pertenecían a los grupos clonales predominantes en la mayoría de los hospitales del mundo, pertenecían a subgrupos BAPS 3.3a (ST18 y ST17) o 2.1a (ST117, ST203 y ST80) (Gagetti *et al.*, 2019; Tedim *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2016). Llama la atención la detección de clones pertenecientes a otros grupos filogenéticos, a menudo asociados a animales y capaces de adquirir diferentes rasgos de resistencia como BAPS 3.1-ST792 (2 vanA) o BAPS 2.3-ST25 (2 vanB y 1 vanA) (Tedim *et al.*, 2016; Freitas *et al.*, 2016; Pourcel *et al.*, 2017). Esta diversidad clonal explica la baja ocurrencia de *E. faecium*

resistente a ampicilina encontrada en nuestro estudio en comparación con lo reportado en otras series (26,3% vs >85%)⁵ (Corso *et al.*, 2007; Faccone *et al.*, 2010; Osuka *et al.*, 2016). Por otro lado, la diversidad genética de *E. faecalis* y *E. faecium* capaces de adquirir genes que codifican ANRGE, detectada en este estudio, muestra algunos clones con potencial zoonótico, que podrían facilitar la propagación de estos genes entre diferentes huéspedes, como se ha informado en diferentes lugares geográficos (Pourcel *et al.*, 2017; Osuka *et al.*, 2016; Gawryszewska *et al.*, 2016).

A pesar de la limitada muestra analizada, datos epidemiológicos, como la diversidad de presentaciones clínicas la edad/sexo de los pacientes y los factores de riesgo para adquirir infecciones por enterococos, concuerdan con otros estudios (Guzman Prieto *et al.*, 2016, Pourcel *et al.*, 2017). En resumen, la epidemiología de los enterococos en un hospital de tamaño mediano de América del Sur, durante una situación sin brote arrojó información interesante para la salud pública. La persistencia de clones resistentes emblemáticos e inusuales como *E. faecalis* ST9 (bla+, RANG) sugiere la presencia de reservorios ocultos de *E. faecalis* resistentes, en diferentes áreas geográficas. Además, destaca la importancia de definir la estructura poblacional de los enterococos en diferentes lugares para comprender la influencia de los factores sociodemográficos en la diversidad clonal de éstos y, por tanto, en la aparición y transmisión de la resistencia a los ATM.

Conclusión

El interés del estudio radicó en el valor para describir la estructura poblacional de enterococos durante un período de recuperación creciente de aislamientos multirresistentes en un área geográfica con baja prevalencia de enterococos resistentes a ATM de primera línea, pero donde se encontraron/detectaron mecanismos emblemáticos de resistencia antimicrobiana.

5 <https://resistancemap.cddep.org/CountryPage.php?countryId=65&país=Argentina>

Referencias bibliográficas

- Arias, C. A.; Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278.
- Conceição, N.; Pinheiro da Silva, L. E. P.; da Costa Darini, A. L.; Pitondo-Silva, A.; Gonçalves de Oliveira, A. (2014). Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: pbp4 gene polymorphism and genetic diversity. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 289-295.
- Coque, T. M.; Willems, R. J.; Fortún, J.; Top, J.; Diz, S.; Loza, E.; Cantón, R.; Baquero, F. (2005). Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2693-2700.
- Corso, A. C.; Gagetti, P. S.; Rodríguez, M. M.; Melano, R.G.; Ceriana, P.G.; Faccone, D.F.; Galas, M.F.; VRE Argentinean Collaborative Group. (2007). Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(1), 69-75.
- Courvalin, P. (1994). Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(7), 1447-1451.
- Faccone, D.; Abel, F.; Lopez Ruiti, P.; Gagetti, P.; Corso, A. (2010). Diseminación de *Enterococcus faecium* con resistencia a glicopeptidos (VREFM) del complejo clonal 17 en Argentina. In Proceedings of the XII Congreso Argentino de Microbiología, VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica—SADEBAC, I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental, Buenos Aires, Argentina, 17-20 octubre 2010.
- Freitas, A. R.; Tedim, A. P.; Francia, M. V.; Jensen, L.B.; Novais, C.; Peixe, L.; Sánchez- Valenzuela, A.; Sundsfjord, A.; Hegstad, K.; Werner, G.; Sadowy, E.; Hammerum, A.M.; Garcia-Migura, L.; Willems, R.J.; Baquero, F.; Coque, T.M. (2016). Multilevel popula-

- tion genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12), 3351-3366.
- Gagetti, P.; Bonfiglio, L.; García Gabarrot, G.; Kaufman, S.; Molle-rach, M.; Vigliarolo, L.; von Specht, M.; Toresani, I.; Lopardo, H.A. (2019). Resistencia a los β -lactámicos en enterococos. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(2), 179-183.
- Gawryszewska, I.; Żabicka, D.; Bojarska, K.; Malinowska, K.; Hry-niewicz, W.; Sadowy, E. (2016). Invasive enterococcal infections in Poland: the current epidemiological situation. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(5), 847-856.
- Guzman Prieto, A. M.; van Schaik, W.; Rogers, M. R.; Coque, T.M.; Baquero, F.; Corander, J.; Willems, R.J.L. (2016). Global emergen-ce and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: at-tack of the clones?, *Frontiers in Microbiology*, 7, 788.
- Hayakawa, K.; Marchaim, D.; Vidailac, C.; Lephart, P.; Pogue, J.M.; Sunkara, B.; Kotra, H.; Hasan, A.; Shango, M.; Yerramalla, Y.; Osunlana, A.M.; Chopra, T.; Dhar, S.; Salimnia, H.; Rybak, M.J.; Kaye, K.S. (2011). Growing prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in the region with the highest prevalence of vancomycin-resistant. *Staphylococcus aureus. Infection Control & Hospital Epidemiology*, 32(9), 922-924.
- Hodel-Christian, S. L.; Murray, B. E. (1992). Comparison of the gen-tamicin resistance transposon Tn5281 with regions encoding gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* isolates from di-verse geographic locations. *Antimicrobial Agents and Chemothe-rapy*, 36(10), 2259-2264.
- Kuo, A- J.; Shu, J-C.; Liu, T- P.; Lu, J-J.; Lee, M-H.; Wu, T-S.; Su, L-H.; Wu, T-L. (2018). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at a university hospital in Taiwan, 2002-2015: fluctuation of ge-netic populations and emergence of a new structure type of the Tn1546-like element. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(6), 821-828.

- Lebreton, F.; Willems, R. J.; Gilmore, M. S. (2014). Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. [Internet].
- Lopardo, H.; Blanco, A.; Carbonaro, M.; Ruvinsky, S.; Andi3n, E.; Venuta, M.E.; Corso, A.; Gagetti, P.; Bologna, R. (2008). Impacto de 10 a3os de vigilancia de colonizaci3n con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en un hospital pedi3trico de alta complejidad. *Med. Infant*, 114-120.
- Magiorakos, A. P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D.L.; Rice, L.B.; Stelling, J.; Struelens, M.J.; Vatopoulos, A.; Weber, J.T.; Monnet, D.L. (2012). Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281.
- Mar3n, M. E.; Mera, J. R.; Arduino, R. C.; Correa, A.P.; Coque, T.M.; Stamboulian, D.; Murray, B.E. (1998). First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clinical Infectious Diseases*, 26(1), 235-236.
- McBride, S. M.; Fischetti, V. A.; LeBlanc, D. J.; Moellering, R.C.; Gilmore, M.S. (2007). *Genetic diversity among Enterococcus faecalis*. *PloS One*, 2(7), e582.
- Mercurio, N. J.; Davis, S. L.; Zervos, M. J.; Herc, E. S. (2018). Combating resistant enterococcal infections: a pharmacotherapy review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 19(9), 979-992.
- Moreira, N. B.; Nastro, M.; Vay, C.; Famiglietti, A.; Rodr3guez, C.H. (2016). Actividad in vitro de ampicilina-ceftriaxona frente a aislamientos de *Enterococcus faecalis* recuperados de infecciones invasivas. *Revista Argentina de Microbiolog3a*, 48(1), 57-61.
- Murray, B. E. (1992). Beta-lactamase-producing enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(11), 2355-2359.

- Murray, B. E.; Mederski-Samaroj, B. (1983). Transferable beta-lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *The Journal of clinical investigation*, 72(3), 1168-1171.
- Nallapareddy, S. R.; Duh, R-W; Singh, K. V.; Murray, B.E. (2002). Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), 868-876.
- Narciso-Schiavon, J. L.; Borgonovo, A.; Marques, P. C.; Tonon, D.; Tiemi Oshiro Bansho, E.; Maggi, D.C.; Buzaglo Dantas Corrêa, E.; de Lucca Schiavon, L. (2015). *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* as causative agents of spontaneous bacterial peritonitis. *Annals of Hepatology*, 14(2), 270-272.
- Novais, C.; Tedim, A. P.; Lanza, V. F.; Freitas, A.R.; Silveira, E.; Escada, R.; Roberts, A.P.; Al-Haroni, M.; Baquero, F.; Peixe, L.; Coque, T.M. (2016). Co-diversification of *Enterococcus faecium* core genomes and PBP5: evidence of pbp5 horizontal transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1581.
- Osuka, H.; Nakajima, J.; Oishi, T.; Funayama, Y.; Ebihara, T.; Ishikawa, H.; Sato, K.; Koganemaru, H.; Hitomi, S. (2016). High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* causing invasive infection: Twelve-year surveillance in the Minami Ibaraki Area. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22(1), 61-63.
- Pfaller, M. A.; Cormican, M.; Flamm, R. K.; Mendes, R.E.; Jones, R.N. (2019). Temporal and geographic variation in antimicrobial susceptibility and resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 6, No. Supplement_1, pp. S54-S62). US: Oxford University Press.
- Pourcel, N. G.; Sparo, M. D.; Corso, A.; Delpech, G.; Gagetti, P.S.; de Luca, M.M.; Bernstein, J. C.; Schell, C. M. B.; Lisarrague, S.; Basualdo Farjat, J. A. (2017). Molecular genetic profiling of clinical

- and foodborne strains of enterococci with high level resistance to gentamicin and vancomycin. *Clinical Microbiology: Open Access*, 6. Protocolo de trabajo Red WHONET Argentina.
- Sarti, M.; Campanile, F.; Sabia, C.; Santagati, M.; Gargiulo, R.; Stefani, S. (2012). Polyclonal diffusion of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(1), 169-172.
- Tedim, A. P.; Ruiz-Garbajosa, P.; Corander, J.; Rodríguez, C.M.; Cantón, R.; Willems, R.J.; Baquero, F.; Coque, T.M. (2015). Population biology of 13 intestinal *Enterococcus* isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1820-1831.
- Tedim, A. P.; Ruíz-Garbajosa, P.; Rodríguez, M. C.; Rodríguez- Baños, M.; Lanza, V.F.; Derdoy, L.; Cárdenas Zurita, G.; Loza, E.; Cantón, R.; Baquero, F.; Coque, T.M. (2016). Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995–2015) in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(1), 48-55.
- Togneri, A. M.; Corso, A.; González, J.; Lopardo, H.; Podestá, L.B.; Galletti, P.; Pérez, M.; Rodríguez, V.; Rodríguez, M.; Ríos, L.; Dinerstein, E. (2005). Análisis clínico-epidemiológico de la portación intestinal de enterococos resistentes a vancomicina en una unidad de terapia intensiva. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(1), 26-33.
- Weigel, L. M.; Clewell, D. B.; Gill, S. R.; Clark, N.C.; McDougal, L.K.; Flannagan, S.E.; Kolonay, J.F.; Shetty, J.; Killgore, G.E.; Tenover, F.C. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, 302(5650), 1569-1571.
- Werner, G.; Coque, T. M.; Hammerum, A. M.; Hope, R.; Hryniewicz, W.; Johnson, A.; Klare, I.; Kristinsson, K.G.; Leclercq, R.; Lester, C.H.; Lillie, M.; Novais, C.; Olsson-Liljequist, B.; Peixe, L.V.; Sadowy, E.; Simonsen, G.S.; Top, J.; Vuopio-Varkila, J.; Willems, R.J.; Witte, W.; Woodford, N. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro surveillance*, 13(47), 19046.