UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL
GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR/A
EN CIENCIAS MÉDICAS

**CARACTERIZACION FENOTIPICA
Y GENOTIPICA DE CEPAS DE ENTEROCOCCUS
SPP. AISLADAS DE LIQUIDOS OBTENIDOS POR
PUNCION PROVENIENTES DE INFECCIONES
INVASIVAS HUMANAS**

BIOQ. CELIA MARÍA B. SCHELL

Director: Prof. Dr. Juan Ángel Basualdo Farjat

Co-directora: Prof. Dra. Mónica Delfina Sparo

Lugar de Trabajo: Centro Universitario de Estudios Microbiológicos
y Parasitológicos (CUDEMyP). Centro Asociado CIC-UNLP. Argentina.

2018 . LA PLATA
BUENOS AIRES . ARGENTINA

Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata

Autoridades

Decano

Prof. Dr. Juan Angel Basualdo Farjat

Vicedecana

Prof. Méd. María Alicia MARINI

Secretarías

Secretaría General

Prof. Dra. Adriana MOISO

Secretaría de Ciencia y Técnica

Prof. Dra. María Virginia CROCE

Secretario en Redes en Salud

Méd. Sebastián Nicolás MURUA

***Director de la Escuela Universitaria de
Recursos Humanos del Equipo de Salud***

Mg. Méd. Nery Orlando FURES

Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd. Gonzalo Lucas MARTINEZ WALTER

Prosecretario Legal y Técnico

Abog. Fernando Germán MATSCHKE

Directora de Género y Salud

Méd. Gisela Paola LEIVA

Secretario de Supervisión Administrativa

Lic. Mario ALMANZA

Secretario de Asuntos Académicos

Prof. Dr. Mario Pedro SAN MAURO

Secretario de Extensión Universitaria

Méd. Joaquín Ignacio CARA

Secretario Docente Asistencial

Prof. Med. Mónica FERRERAS

***Director Ejecutivo del Departamento de
Post-Grado***

Prof. Dr. Vicente Roque PRIMERANO

***Directora Ejecutiva del Hospital
Universitario Integrado***

Dra. Liliana Elizabeth FISHKEL

Prosecretaria de Derechos Humanos

Abog. Valeria Romina SEGURA

Secretaria Administrativa

Sra. Elsa Lidia ANTONINI

**A mis padres, Nino y Petty por apoyarme con alegría desde la distancia
en mis decisiones personales y profesionales.
A mi hermano Martín por su compañía incondicional.
A mis tíos y primos por simplemente, estar.
A la memoria de mis nonos...*Berta y Pin.***

AGRADECIMIENTOS

Quizás éste sea para mí, el apartado más conmovedor y gratificante para el corazón en el proceso de desarrollo y escritura de la tesis. Para algunas personas, la tesis es un camino largo y arduo, muchas alegrías e imprevistos suceden, y aparecen esas manos amigas y esas almas compasivas que nos ayudan a transitarlos. Es por este motivo que no quisiera olvidar a nadie en este pequeño relato.

En primer lugar, agradezco a mi director Prof. Dr. Juan Angel Basualdo Farjat, quien en 2006 me alentó y entusiasmó para ingresar al ambiente científico con el fin de formarme en un campo de mi carrera profesional que siempre añoré: la investigación clínica al servicio del paciente. Gracias Dr.!! confié en mí y apostó, ayudándome a potenciar habilidades y destrezas para crecer gradualmente, tanto en la carrera científica, como en la profesión de docencia universitaria.

En segundo lugar gracias a mi familia!!, mamá, papá y Martín que al recibir la noticia que tenía que radicarme en La Plata, a pesar de esas lágrimas dijeron: "...si te hace feliz, tenés que ir." Mi familia mas grande, tíos: Maru mi colega, Edith, Polaco, Adrián, Chiquito, Rossana, Juancho y Nora. A mis primos!, que se alegraron y alegran conmigo cuando de logros personales y profesionales se trata. Gracias al cielo por estar!!. Los amo!.

A la Prof. Dra. Mónica Sparo, mi co-directora, quien fuera mi apoyo profesional cuando las cosas no salían (...*el arte de lo posible*...) y muchas veces personal cuando la inseguridad invadía y no encontraba el camino. Gracias por compartir la pasión y tu entusiasmo por la microbiología clínica y la resistencia antimicrobiana, gracias Mónica por permitir escucharte cuando de conocimiento científico se trata.

A la Facultad de Ciencias Médicas y a la Universidad Nacional de La Plata por brindarme un espacio para realizar el doctorado. Gracias por las ayudas económicas otorgadas mediante subsidios que permitieron avanzar en todo este proceso. Al CUDEMyP por permitirme trabajar y desarrollar la tesis en sus laboratorios. A la Cátedra de Microbiología y Parasitología por permitirme ejercer y conocer otro camino que genera muchas alegrías y da grandes satisfacciones, la docencia universitaria.

A mis compañeras de cátedras Vero y Ale, con quienes he construído lindos vínculos y nos toleramos a veces más que en nuestra propia casa, son muchas horas compartidas entre lunes y viernes!. Gracias chicas!. A Vale por brindar su compañerismo fuera y dentro del trabajo, especialmente en ese primer tiempo, cuando llegue a trabajar a esta ciudad. A María Marta, con quien empecé los primeros pasos de trabajo docente y científico en la Cátedra... allá por un abril de 2007, gracias por tenerme paciencia y bancar mis días a veces en este proceso de tesis!.

Al grupo de investigación de Tandil con el cual comencé a transitar y realizar estudios con enterococos en 2008. Gracias Sabina, Gisela y Gastón.

Al grupo de Biología y Evolución de los Microorganismos, Area de Microbiología, Inmunología e Infección del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria de Madrid. Gracias por recibirme y por enseñarme desinteresadamente!. A Ana Sofía, a Merche, a Ricardo, a Esther, a Concepción. A mi tutora, Dra. Teresa Coque, al Dr. Rafael Cantón Moreno y al Dr. Fernando Baquero Mochales por permitirme realizar la estancia en dicho lugar y aprender de ellos. A todos, gracias por hacer que mi aprendizaje en biología molecular y enterococos, en esos 5 meses, no solo haya sido con trabajo sino también con mucha alegría.

A las demás compañeras de Cátedra que con una visita y una palabra de aliento ayudaban a transitar este camino, gracias Pauli, Evangelina y Judith. A Silvia Grenóvero por su ayuda, tiempo y sugerencias en el análisis estadístico. A Josefina!! muchas gracias por tu ayuda desinteresada!.

Gracias especial para cada una de mis amigas y amigos, que han estado para escuchar cuando de ciencia se trataba y cuando invadían los “miedos”...esos que a veces crecen más de lo que son por estar lejos de la familia. Gracias coterráneo doc Germán!, también adaptado platense, gracias Romil!, y gracias Mariel. CaroRod amiga querida y extrañada, para vos también va dedicado este trabajo, un abrazo al cielo !!.

A mis amigas incondicionales de mi Paraná, Gime, Marie, Alfon, Morty y Ro, que hemos crecido juntas con diferencias y coincidencias, gracias por estar!.

Al programa de Internalización de la Educación Superior y Cooperación Internacional (SPU) y al Ministerio de Salud de la Nación por las becas otorgadas en 2014 y 2015. A la Fundación Alberto J. Roemmers por los subsidios otorgados.

A todo el personal de la Cátedra de Microbiología y Parasitología, alumnos pasantes, becarios, personal de maestranza Víctor y Maxi, quienes ayudaron en la tarea de preparación del material del laboratorio.

A Dios, por escuchar incondicionalmente en los momentos más difíciles...

GRACIAS!! a todos los que en menor o mayor medida contribuyeron a este proceso, aunque sea con un saludo o regalando una sonrisa...y pido disculpas si cometí el error, de no mencionar a alguna persona que me tendió la mano para poder concluir este trabajo.

“No es el conocimiento, sino el acto de aprendizaje, y no la posesión, sino el acto de llegar allí, lo que concede el mayor disfrute.”

Carl Friedrich Gauss

1777- 1855

INDICE GENERAL

RESUMEN	11
ABSTRACT	15
I. INTRODUCCION	19
I.1. ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO <i>Enterococcus</i> spp.	20
I.2. TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Enterococcus</i> spp.	26
I.3. HÁBITAT Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	30
I.3.1. <i>Enterococcus</i> como colonizante de alimentos, animales y vegetales	30
I.3.2. <i>Enterococcus</i> y su presencia en el hábitat intrahospitalario	31
I.3.3. <i>Enterococcus</i> como microbiota del tracto gastrointestinal humano	33
I.3.3.a) Reservorio endógeno	34
I.3.3.b) Reservorio exógeno	36
I.4. INFECCIONES INVASIVAS HUMANAS PRODUCIDAS POR <i>Enterococcus</i> spp.	37
I.4.1. Infecciones enterocócicas intra-abdominales y pélvicas	39
I.4.2. Endocarditis infecciosa enterocócica	40
I.4.3. Bacteriemia y sepsis por <i>Enterococcus</i> spp.	43
I.4.4. Meningitis	45
I.4.5. <i>Enterococcus</i> en osteomielitis, infecciones osteoarticulares o asociadas a implantes ortopédicos	46
I.4.6. Infecciones de piel y partes blandas producidas por enterococos	47
I.4.7. <i>Enterococcus</i> e infecciones asociadas a la atención de la salud	47
I.5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE <i>Enterococcus</i> spp.	49
I.5.1. Caracterización fenotípica	49
I.5.1.a) Variantes morfológicas de colonias: otro desafío en la caracterización fenotípica de <i>Enterococcus</i> spp.	53
I.5.2. Caracterización de <i>Enterococcus</i> spp. por espectrometría de masas	53
I.5.3. Caracterización genotípica	55
I.5.3.a) Macrorrestricción de ADN utilizando electroforesis de campo pulsado	55
I.5.3.b) <i>MultiLocus Sequence Typing</i> (MLST) y su aplicabilidad en la identificación de linajes genéticos para <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	56
I.6. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN EL GENERO <i>Enterococcus</i>: UN PROBLEMA IMPORTANTE PARA LA SALUD PÚBLICA	59
I.6.1. Resistencia intrínseca o natural	62
I.6.2. Resistencia adquirida	64
I.6.2.a) Resistencia de <i>Enterococcus</i> spp. a glucopéptidos	64
I.6.2.b) Resistencia de <i>Enterococcus</i> spp. a los aminoglucósidos	67
I.6.2.c) Resistencia de <i>Enterococcus</i> spp. a betalactámicos	68
I.6.2.d) Resistencia de <i>Enterococcus</i> spp. a quinolonas	69
I.6.2.e) Resistencia de <i>Enterococcus</i> spp. a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B)	70
I.6.2.f) Resistencia de <i>Enterococcus</i> spp. a tetraciclinas	71

I.6.2.g) Resistencia de <i>Enterococcus</i> spp. a linezolid	72
I.7. CURVAS DE CINÉTICA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA LA BÚSQUEDA DE ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS	72
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	74
II.1. HIPÓTESIS	75
II.2. OBJETIVOS GENERALES	76
II.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	76
III. MATERIALES Y MÉTODOS	77
III.1. Aislar cepas de <i>Enterococcus</i> spp. de líquidos obtenidos por punción provenientes de infecciones invasivas humanas	78
III.1.1. Área y período de estudio	78
III.1.2. Diseño del estudio	79
III.1.3. Unidad de observación	80
III.1.3.1. Criterios de inclusión de la unidad de observación	81
III.1.3.2. Criterios de exclusión	82
III.1.4. Consideraciones éticas	82
III.1.5. Análisis estadístico de los resultados	82
III.2. Identificar cepas de <i>Enterococcus</i> spp. por pruebas bioquímicas y espectrometría de masas (MALDI TOF-MS)	83
III.2.1. Operacionalización de la/las variables	83
III.2.2. Caracterización fenotípica	83
III.2.2.1. Detección de hemolisinas	84
III.2.3. Caracterización por espectrometría de masas: MALDI TOF-MS	84
III.2.3.1. Obtención de cultivos puros	84
III.3. Establecer relación entre especie de enterococo aislada y variables clínicas y demográficas de los pacientes con infección invasiva	86
III.3.1. Operacionalización de la/las variables	86
III.4. Determinar la relación clonal de los aislamientos analizando pulsotipos obtenidos por electroforesis de campo pulsado (PFGE)	88
III.4.1. Operacionalización de la/las variables	88
III.4.2. Estudio del tipaje molecular mediante macrorrestricción por electroforesis de campo pulsado: obtención de cultivos puros	88
III.4.3. Preparación de los <i>plugs</i> o tacos (insertos)	89
III.4.4. Preparación de las soluciones de lisis y de Proteinasa K	89
III.4.5. Digestión con enzima <i>Sma</i>I de baja frecuencia de corte	91
III.4.6. Electroforesis de campo pulsado	91
III.4.7. Tinción del gel y visualización	91
III.4.8. Análisis de los patrones de PFGE	92
III.5. Caracterizar genéticamente cepas seleccionadas de <i>Enterococcus</i> spp. por Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci (MLST) y establecer la estructura genética poblacional	92
III.5.1. Operacionalización de la/las variables	92
III.5.2. Análisis de polimorfismos genéticos de genes constitutivos (<i>housekeeping</i>) en cepas seleccionadas de <i>E. faecium</i> y <i>E. faecalis</i> por MLST	93
III.5.3. Obtención de cultivos puros y extracción de ADN genómico	93

III.5.4. PCR para amplificar genes del esquema de MLST en cepas de <i>Enterococcus</i> spp.	93
III.5.5. Visualización de geles	94
III.5.6. Purificación de los productos de PCR y posterior secuenciación	97
III.5.7. Envío de las muestras	97
III.5.8. Recepción de resultados, análisis y alineamiento de las secuencias	97
III.5.9. Determinación del <i>Sequence Type</i> (ST)	99
III.5.10. Aplicación de herramientas bioinformáticas para establecer la estructura genética poblacional e inferir relaciones evolutivas	101
III.6. Determinar el perfil de resistencia <i>in vitro</i> frente a los antimicrobianos de importancia clínica mediante pruebas cualitativas y cuantitativas (CIM)	102
III.6.1. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> cualitativo	102
III.6.1.1. Operacionalización de la/las variables	102
III.6.2. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> cuantitativo (CIM)	105
III.6.2.1. Operacionalización de la/las variables	105
III.6.3. Detección fenotípica de producción de β -lactamasa	108
III.7. Determinar la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos mediante técnicas de amplificación génica	108
III.7.1. Operacionalización de la/las variables	108
III.7.2. Detección fenotípica de resistencia a vancomicina	108
III.7.3. Detección genotípica de resistencia a vancomicina	109
III.7.3.1. Extracción de ADN genómico	109
III.7.3.2. Tipificación molecular de la resistencia a vancomicina por PCR	109
III.8. Evaluar <i>in vitro</i> antimicrobianos frente a cepas multirresistentes utilizando curvas de letalidad	110
III.8.1. Operacionalización de la/las variables	110
III.8.2. Preparación del inóculo bacteriano de trabajo	112
III.8.3. Tipos de antimicrobianos y concentraciones seleccionadas en estudios de curvas de letalidad para evaluar la cinética bactericida	114
IV. RESULTADOS	116
IV.1. Aislamiento e identificación fenotípica y por espectrometría de masas de cepas de <i>Enterococcus</i> spp., recuperadas de líquidos obtenidos por punción, provenientes de infecciones invasivas humanas	117
IV.1.1. Caracterización fenotípica a nivel de género y especie	117
IV.1.1.1. Confirmación por MALDI TOF-MS	118
IV.1.1.2. Identificación por proteómica de colonias de diferente tamaño observadas en una misma placa de Petri	121
IV.1.1.3. Detección de hemolisinas	123
IV.2. Estudio de la relación entre especie de enterococo aislada y variables clínicas y demográficas de los pacientes con infección invasiva	124
IV.2.1. Tipo de especie aislada y datos demográficos de los pacientes: edad y género	125
IV.2.2. Especies de enterococos recuperadas según Servicio de internación del paciente	129

IV.2.3. Tipos de muestras clínicas, tipos de infecciones diagnosticadas y patologías de base crónica en pacientes internados con diagnóstico presuntivo de infección invasiva. HMRS: cohorte 2010, 2013 y 2014	130
IV.3. Determinación de la relación clonal de los aislamientos analizando pulsotipos obtenidos por electroforesis de campo pulsado (PFGE)	132
IV.4. Caracterización genética de cepas seleccionadas de <i>Enterococcus</i> spp. por Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci (MLST) y determinación de la estructura genética poblacional	139
IV.4.1. Análisis de la variabilidad genética de clones de <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	139
IV.4.2. Corridas electroforéticas de los productos amplificados correspondientes a genes constitutivos de los esquemas de MLST para <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	140
IV.4.3. Resultados de MLST para <i>E. faecalis</i>	143
IV.4.4. Resultados de MLST para <i>E. faecium</i>	148
IV.5. Determinación del perfil de resistencia <i>in vitro</i> frente a los antimicrobianos de importancia clínica mediante pruebas cualitativas y cuantitativas (CIM)	152
IV.5.1. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> cualitativo	152
IV.5.2. Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> cuantitativo (CIM)	159
IV.5.3. Detección fenotípica de producción de β -lactamasa	161
IV.6. Determinación de la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos mediante técnicas de amplificación génica	164
IV.7. Evaluación <i>in vitro</i> de antimicrobianos frente a cepas multirresistentes utilizando curvas de letalidad	164
IV.7.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad bactericida de LVX e IMP frente a cepas de <i>E. faecium</i> vancomicina resistentes y/o MDR	167
IV.7.1.1. <u>ETAPA I:</u> Combinación β -lactámico con quinolona	168
IV.7.1.2. Análisis de las curvas de letalidad	168
IV.7.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad bactericida de TGC y GEH frente a cepas de <i>E. faecium</i> vancomicina resistentes y/o MDR	172
IV.7.2.1. <u>ETAPA II:</u> combinación de una glicilciclina con un aminoglucósido	173
IV.7.2.2. Análisis de las curvas de letalidad	174
IV.7.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad bactericida de IMP y VAN frente a cepas de <i>E. faecium</i> vancomicina resistentes y/o MDR	177
IV.7.3.1. <u>ETAPA III:</u> combinación de β -lactámico con glucopéptido	178
IV.7.3.2. Análisis de las curvas de letalidad	178
IV.7.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad bactericida de LZD y GEH frente a cepas de <i>E. faecium</i> vancomicina resistentes y/o MDR	182
IV.7.4.1. <u>ETAPA IV:</u> combinación de una oxazolidinona con aminoglucósido	183
IV.7.4.2. Análisis de las curvas de letalidad	183
V. DISCUSION	187
VI. CONCLUSIONES	245

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	252
VIII. LISTA DE ABREVIATURAS	287
IX. LISTA DE TABLAS	290
X. LISTA DE FIGURAS	293
XI. LISTA DE FOTOGRAFIAS	297

RESUMEN

Enterococcus spp. es flora habitual de la microbiota intestinal de humanos y animales, así como importantes patógenos nosocomiales. Desde principios del siglo XX, se conoce que causan infecciones en humanos. *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son las especies más relevantes clínicamente, particularmente en infecciones invasivas humanas (por ejemplo, infecciones del torrente sanguíneo y peritoneales, abscesos, endocarditis, etc.). Estas especies se consideran patógenas oportunistas, ya que las infecciones graves se han asociado principalmente a pacientes inmunocomprometidos. Las infecciones invasivas causadas por enterococos pueden tener un origen alóctono o endógeno. Además, los enterococos presentan resistencia intrínseca a varios antibióticos, como los β -lactámicos, trimetoprima-sulfametoxazol y los aminoglicósidos que podrían mejorar su selección en el tracto gastrointestinal humano.

E. faecium y *E. faecalis* han adquirido resistencia a la mayoría de las familias de antibióticos utilizados en terapia humana, en las últimas tres décadas. Esto llevó a la selección de clones enterocócicos resistentes a múltiples fármacos, lo que complica enormemente el tratamiento antimicrobiano, particularmente en el caso de infecciones graves. La adquisición de resistencia a vancomicina, una de las opciones terapéuticas de primera línea para las infecciones por enterococos, es uno de los problemas más preocupantes para la salud humana. El primer enterococo vancomicina resistente (EVR) reportado en América Latina fue una cepa de *E. faecium* de Argentina en 1998. Posteriormente, se realizaron estudios epidemiológicos para detectar EVR en diferentes hospitales de Argentina. El linaje clonal más frecuente de *E. faecium* vancomicina resistente (EFMVR) que circula en los hospitales argentinos parece ser el ST17. Se han realizado varios estudios de vigilancia epidemiológica aplicando técnicas moleculares en nuestro país, sin embargo se limitan principalmente a cepas EVR. No hay documentación de los perfiles de resistencia a los antimicrobianos y de la estructura poblacional de *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de infecciones invasivas humanas en el Hospital Público de Tandil, Argentina hasta la fecha.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue caracterizar fenotípicamente y genotípicamente *Enterococcus spp.* aislados de líquidos obtenidos por punción, de infecciones invasivas humanas, de pacientes ingresados en el Hospital Municipal Ramón Santamarina

(HMRS) de Tandil. Además, el segundo objetivo general fue detectar la resistencia a los antimicrobianos y evaluar *in vitro* varias opciones terapéuticas en enterococos resistentes a múltiples fármacos (MDR).

Las cepas de *Enterococcus* spp. (N = 63) se recuperaron de forma retro-prospectiva a través de un estudio transversal a partir de infecciones invasivas de pacientes hospitalizados en el HMRS entre 2010 y 2014. *Enterococcus* spp. fueron aisladas de diferentes tipos de muestras clínicas como sangre (n=22; 40 %), líquido abdominal (n=6; 10,9 %), líquido peritoneal (n=6; 10,9 %), líquido intravesicular (n=1; 1,8 %), absceso (n=12; 21,9 %), líquido sinovial (n=7; 12,7 %) y líquido pericárdico (n=1; 1,8%). Se seleccionó una colonia por cultivo de muestra de paciente para estudios adicionales. Todas las cepas fueron identificadas con métodos convencionales fenotípicos y confirmadas por MALDI TOF-MS. Cuarenta y cuatro fueron identificadas como *E. faecalis* (69,8 %) y 19 como *E. faecium* (30,2 %).

Las cepas de enterococos se aislaron de 55 pacientes. El rango de edad fue de 16 a 92 años (promedio $59 \pm 18,8$) y la tasa de mortalidad fue de 27,3% (n=15). La mayoría de los pacientes eran hombres (n=40; 72,7%). Además, el 50,9 % (n=28) de estos pacientes tenía una enfermedad subyacente y el 80 % (n=44) había recibido tratamiento antimicrobiano previo. Ciprofloxacina (n=13; 23,6 %), cefalexina (n=10; 18,2 %) y ceftriaxona (n=8; 14,5 %) fueron los fármacos más utilizados. Se observó que *Enterococcus* spp. fueron más prevalentes en pacientes masculinos que habían recibido tratamiento antimicrobiano previo.

La caracterización molecular y la relación clonal se determinaron mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y tipificación de secuencias multilocus (MLST). Se encontró una alta diversidad clonal entre cepas *E. faecalis*, aunque se identificaron algunos clones prevalentes asociados previamente con infecciones hospitalarias. Veinticinco tipos de pulsotipos fueron detectados en 44 cepas de *E. faecalis*, el clon más prevalente fue EFC-2 (n=5; 11,4 %), seguido de EFC-3, EFC-7, EFC-12 y EFC-16 (n=4; 9,1 %). Se detectaron siete grupos de ST diferentes en 3 grupos BAPS. El principal clon de *E. faecalis* EFC-2 perteneció a ST9, agrupándose en CC9 y BAPS 1. Por primera vez se describe un nuevo ST, ST720 (EFC-3) con esta investigación.

Se observó la prevalencia de clones MDR de *E. faecium* no asociados con el entorno hospitalario. Las cepas de *E. faecium* se agruparon en 10 tipos clonales diferentes por PFGE.

El clon de *E. faecium* más prevalente fue EFM-1 ($n=4$; 21,0 %), seguido de EFM-2 y EFM-4 ($n=3$, 15,8 %). Para *E. faecium* se seleccionaron 6 tipos de clones para el análisis de MLST y BAPS, incluidos los 5 aislamientos EFMVR. Se determinaron cinco ST. Los principales clones de *E. faecium* EFM-1 y EFM-4 se asignaron a ST25-BAPS 2.3 y ST52-BAPS 7, respectivamente.

La susceptibilidad a 15 antimicrobianos ampicilina, penicilina, ampicilina/sulbactam, cloranfenicol, vancomicina, teicoplanina, estreptomicina (resistencia de alto nivel: RAN), gentamicina (RAN), ciprofloxacina, levofloxacina, quinupristin-dalfopristin, clindamicina, eritromicina, linezolid y tigeciclina fue determinada por el método de difusión de disco y por concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) según lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

Alrededor de la mitad de los aislamientos de *E. faecalis* encontrados en este estudio (21/44; 47,7%) fueron susceptibles a todos los antimicrobianos probados. Diecinueve cepas mostraron RAN a gentamicina 43,2% y 10 cepas mostraron RAN a estreptomicina 22,7%. Algunas de estas cepas ($n=7$) presentaron RAN a ambos aminoglucósidos. Ninguna de las cepas de *E. faecalis* fue resistente a ampicilina, ampicilina/sulbactam, vancomicina, teicoplanina, linezolid y tigeciclina por pruebas cualitativas y cuantitativas. Cinco cepas de *E. faecalis* (11,4%) resistentes a penicilina pero susceptibles a la ampicilina, ampicilina/sulbactam fueron productoras de β -lactamasa a través de la prueba de nitrocefín.

La mayoría de las cepas de *E. faecium* fueron resistentes a penicilina (10/19; 52,6 %) seguidas de ampicilina y ampicilina/sulbactam (5/19; 26,3 %). La resistencia a vancomicina y teicoplanina fue 26,3 % (5/19) y 15,8 % (3/19), respectivamente. Se detectaron tres genotipos *vanA* y 2 *vanB*. Se aislaron dos cepas *vanA* en 2014 de la misma unidad de cuidados intensivos y fueron resistentes a la mayoría de los antimicrobianos probados: ampicilina ($\geq 256 \mu\text{g/mL}$); ampicilina/sulbactam ($> 256 \mu\text{g/mL}$); penicilina ($> 256 \mu\text{g/mL}$); gentamicina ($\geq 1024 \mu\text{g mL}$); levofloxacina y ciprofloxacina ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$). La resistencia a levofloxacina y quinupristin-dalfopristin se encontró en un 15,8 % (3/19), mientras que resistencia a ciprofloxacina y RAN a gentamicina fue encontrada en un 10,5 % (2/19). RAN a estreptomicina solo se encontró en 1 aislado *E. faecium* (5.3 %). Todas las cepas *E. faecium* fueron susceptibles a linezolid, tigeciclina y cloranfenicol. Un 15,8 % de las cepas se consideraron MDR.

Finalmente, la actividad antimicrobiana se evaluó in vitro mediante estudios de cinética de muerte utilizando curvas de letalidad. Se utilizaron solos o combinados, vancomicina, levofloxacina, gentamicina, linezolid, tigeciclina e imipenem sobre cepas MDR y EFMVR. Se observó un efecto sinérgico con levofloxacina e imipenem en las cepas EFMVR genotipo vanB. Además, se detectó efecto bactericida en EFMVR resistente a ampicilina, penicilina y productores de β -lactamasas. El mayor efecto bactericida in vitro se observó con levofloxacina 8 μ g/mL.

La tigeciclina combinada con gentamicina produjo sinergia con algunas concentraciones probadas contra los clones EFMVR y MDR: C53-IR y C44-IRE2. Se observó sinergia antimicrobiana con las 3 combinaciones diseñadas en diferentes tiempos de incubación, con respecto a la tigeciclina. Se observó que el efecto sinérgico comenzó temprano, 8 h después de la incubación en C48-IR y C47-IRE2, productores de β -lactamasa y EFMVR.

En esta tesis, imipenem más vancomicina fue el par con menos efectividad en comparación con los otros antimicrobianos contra los EFMVR. Imipenem solo a 64 μ g/mL produjo actividad bactericida a las 24 h, en solo 2 cepas, C30-IR y C48-IR.

*Linezolid más gentamicina produjeron actividad inhibitoria contra EFMVR con MDR asociada. En 3 aislados, el efecto sinérgico in vitro se observó a las 4 h después de la incubación, lo que indica que la administración combinada fue eficaz. La sinergia se observó en relación a linezolid no a gentamicina. Linezolid solo no mostró actividad bactericida a lo largo del tiempo en las 5 cepas analizadas, el inóculo a las 24 h aumentó $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL en todas los EFMVR. Estos resultados obtenidos con curvas de letalidad, pueden ser el punto de partida para comenzar con estudios más profundos, validados in vivo, en especies EFMVR MDR del género *Enterococcus* spp. con características microbiológicas similares.*

Con este trabajo de tesis se reconoce que, la detección y el control epidemiológico de los enterococos MDR es necesario realizarlo tanto en reservorios humanos como no humanos, para evitar su diseminación e impacto en salud pública

ABSTRACT

Enterococcus spp. are normal inhabitants of the gut microbiota of human and animals as well as important nosocomial pathogens and were first known to cause human infections in the early 1900s. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the most clinically relevant species, particularly in human invasive infections (e. g. bloodstream and peritoneal infections, abscess, endocarditis, etc.). These species are considered opportunist pathogens as severe infections have been mostly associated with immunocompromised patients. Invasive infections caused by *Enterococci* can have either an indigenous or allochthonous origin. Furthermore, *Enterococci* are intrinsic resistance to several antibiotics, such as β -lactams, trimethoprim-sulfamethoxazole and aminoglycosides that might enhance their selection in the human gastrointestinal tract.

E. faecium and *E. faecalis* have acquired resistance to the majority of antibiotics families used in human therapy, in the last three decades. This led to the selection of multidrug resistant enterococcal clones, greatly complicating antimicrobial treatment, particularly in the case of severe infections. Acquisition of vancomycin resistance, one of the first line therapeutic options for enterococcal infections, is one of the most worrisome problems in human health. The first vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE) reported in Latin America was an *E. faecium* strain from Argentina in 1998. After that, epidemiological studies to detect VRE in different hospitals in Argentina have been performed. The most frequent clonal lineage of vancomycin-resistant *E. faecium* (VRE_{fm}) in Argentinean hospitals appears to be Sequence Type (ST) 17. Even though, several surveillance molecular epidemiology studies have been performed in our country, those associated with *Enterococcus* spp. are mostly limited to VRE strains. There is no documentation of antibiotic resistance profiles and population structure of *E. faecalis* and *E. faecium* isolated of human invasive infections in the Public Hospital from Tandil, Argentina.

The objective of this thesis work was to characterize phenotypically and genotypically *Enterococcus* spp. isolated from fluids obtained by puncture, from human invasive infections, of patients admitted to the Hospital Municipal Ramón Santamarina of Tandil (HMRS). Additionally, the second general objective was to detect antimicrobial resistance and to evaluate in vitro several therapeutic options in multi-drug resistant (MDR) strains.

All Enterococcus spp. strains (N=63) were recovered retro-prospectively and consecutively through a cross-sectional study from invasive infections of hospitalized patients in the HMRS between 2010 and 2014. Enterococcus spp. were recovered from different type of clinical samples as blood (n=22; 40 %), abdominal fluid (n=6; 10.9 %), peritoneal fluid (n=6; 10.9 %), intravesicular fluid (n=1; 1.8 %), abscess (n=12; 21.9 %), synovial fluid (n=7; 12.7 %) and pericardial fluid (n=1; 1.8 %). One colony per morphology per patients was selected for further studies. All strains were identified with phenotypic conventional methods and confirmed by MALDI-TOF MS. Forty-four were identified as E. faecalis (69.8 %) and 19 as E. faecium (30.2 %).

Enterococcus spp. invasive infection isolates were recovered from 55 patients. The age range was 16 to 92 years old, (average 59 ± 18.8) and the mortality rate was 27.3 %, (n=15). The majority of patients were males (n=40; 72.7 %). Moreover, 50.9 % (n=28) of these patients had an underlying disease and 80 % (n=44) had had previous antimicrobial therapy. Ciprofloxacin (n=13; 23.6 %), cephalexin (n=10; 18.2 %) and ceftriaxone (n=8; 14.5 %) were the most commonly used drugs. It was observed that Enterococcus spp. strains were more prevalent in male patients and patients with previous antibiotic therapy.

Molecular characterization and clonal relatedness were realized by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST). High clonal diversity was found among E. faecalis even though some prevalent clones previously associated with hospital infections were identified. E. faecalis strains grouped in 25 different PFGE-types. The most prevalent clone was EFC-2 (n=5; 11.4 %), followed by EFC-3, EFC-7, EFC-12 and EFC-16 (n=4; 9.1 %). Seven different STs grouping in 3 BAPS groups were detected. The major E. faecalis clone EFC-2 belonged to ST9, grouping in CC9 and BAPS 1. A new ST, ST720 (EFC-3) is described here for the first time.

Prevalence of MDR E. faecium clones non-associated with the hospital setting was observed. E. faecium strains were grouped in 10 different PFGE-type. The most prevalent E. faecium clone was EFM-1 (n=4; 21.0 %), followed by EFM-2 and EFM-4 (n=3, 15.8 %). For E. faecium 6 PFGE-types were selected for MLST and BAPS analysis, including the 5 VREfm isolates. Five ST were determined. The major E. faecium clones EFM-1 and EFM-4 were assigned to ST25-BAPS 2.3 and ST52-BAPS 7, respectively.

Susceptibility to 15 antibiotics ampicillin, penicillin, ampicillin/sulbactam, chloramphenicol, vancomycin, teicoplanin, streptomycin (high level resistance: HLR), gentamicin (high level resistance), ciprofloxacin, levofloxacin, quinupristin-dalfopristin, clindamycin, erythromycin, linezolid and tigecycline was determined by the disc diffusion method and minimal inhibitory concentrations (MICs) according to Clinical and Laboratory Standards Institute.

About half of the *E. faecalis* isolates found in this study (21/44; 47.7 %) were susceptible to all antibiotics tested. Nineteen strains showed HLR to gentamicin 43.2 % and 10 strains showed HLR to streptomycin 22.7 %. Some of these strains (n=7) presented HLR to both aminoglycosides tested. None of the *E. faecalis* strains were resistant to ampicillin, ampicillin/sulbactam, vancomycin, teicoplanin, linezolid and tigecycline. Five (11.4 %) *E. faecalis* strains resistant to penicillin but susceptible to ampicillin, ampicillin/sulbactam were found to be β -lactamase producers through the nitrocefin test.

Most *E. faecium* strains were resistant to penicillin (10/19; 52.6 %) followed by ampicillin and ampicillin/sulbactam (5/19; 26.3 % each). Vancomycin and teicoplanin resistance were found in 26.3 % (5/19) and 15.8 % (3/19) of *E. faecium* strains, respectively. Three *vanA* and 2 *vanB* genotypes were detected for the VREfm isolated in this study. Two *vanA* strains were isolated in 2014 from the same intensive care unit and were resistant to the majority of antimicrobial tested: ampicillin ($\geq 256 \mu\text{g/mL}$); ampicillin/sulbactam ($> 256 \mu\text{g/mL}$); penicillin ($> 256 \mu\text{g/mL}$); gentamicin ($\geq 1024 \mu\text{g/mL}$); levofloxacin and ciprofloxacin ($\geq 32 \mu\text{g/mL}$). Levofloxacin and quinupristin-dalfopristin resistance were found in 15.8 % (3/19) while ciprofloxacin and HLR to gentamicin were found in 10.5 % of them (2/19). HLR to streptomycin was only found in 1 *E. faecium* isolate (5.3 %). All *E. faecium* strains were susceptible to linezolid, tigecycline and chloramphenicol. A 15.8 % of *E. faecium* strains were considered MDR.

Finally, the *in vitro* antimicrobial activity was assessed by time-kill studies used vancomycin, levofloxacin, gentamicin, linezolid, tigecycline and imipenem in MDR and VREfm strains.

Synergistic effect was observed with levofloxacin and imipenem in *vanB* genotype VREfm strains. Furthermore, bactericidal effect was detected on VREfm resistant to ampicillin,

penicillin and producers of β -lactamases. The greatest in vitro bactericidal effect was observed with levofloxacin 8 μ g/mL.

Tigecycline plus gentamicin produced synergy with some concentrations tested against VREfm and MDR clones: C53-IR and C44-IRE2. Antimicrobial synergy was observed with the 3 combinations designed at different incubation times, with respect to tigecycline. It was observed that the synergistic effect started early, at 8 h post incubation on C48-IR and C47-IRE2, producers of β -lactamase and VREfm.

In this thesis, imipenem plus vancomycin was the pair with less effectiveness compared to the others antimicrobials against VREfm. Imipenem alone at 64 μ g/mL produced bactericidal activity at 24 h, in only 2 strains, C30-IR and C48-IR.

Linezolid plus gentamicin produced inhibitory activity against VREfm with MDR associated. In 3 isolated the in vitro synergistic effect was observed at 4 h post-incubation, indicating that combined administration was effective. The synergy was observed in relation to linezolid not to gentamicin. Linezolid alone showed no bactericidal activity over time in the 5 strains tested, the inoculum at 24 h was increased $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL in all the VREfm.

These results obtained with lethality curves, can be the starting point to start with deeper studies, validated in vivo, in MDR and VREfm species of the genus *Enterococcus* spp. with similar microbiologist characteristic.

This thesis work recognizes that, the detection and epidemiological control of the MDR enterococci strains is necessary in both human and non-human reservoirs, to avoid their dissemination and impact in Public Health.

I. INTRODUCCION

Una vida sin desafíos no vale la pena ser vivida

SOCRATES

I. 1. ASPECTOS GENERALES DEL GÉNERO *Enterococcus* spp.

Las bacterias que pertenecen al género *Enterococcus* son morfológicamente cocos gram positivos (células esféricas), integrantes del microbioma gastrointestinal normal del hombre y de animales como aves, reptiles e insectos (Lebreton *et al.*, 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 (Figura N° 1) y objetos inanimados intrahospitalarios.

Enterococcus spp. pertenece a la división *Firmicutes*, dentro del grupo de bacterias que presentan bajo porcentaje de GC (guanina + citosina) en su cromosoma (37,5 %) (Paulsen *et al.*, 2003). Posee un genoma plástico, característica que le permite adquirir y diseminar material genético extracromosómico mediante transferencia genética horizontal (TGH), permitiendo optimizar su mecanismo de patogénesis bacteriana. Las cepas de este género utilizan un “sistema de feromonas sexuales” que les posibilita realizar conjugación plasmídica de manera mas eficiente (Christie *et al.*, 1994). Esta particularidad permite a los enterococos responder y adaptarse rápidamente a nichos ecológicos adversos y competitivos, con condiciones de pH, temperatura y salinidad extremas, bajo presión antimicrobiana y con elevada concentración de moléculas biocidas como desinfectantes, antisépticos y metales pesados (Bischoff *et al.*, 2012).

Por recombinación genética, algunas especies, han pasado de ser consideradas comensales de baja patogenicidad para convertirse en los últimos años en clones evolucionados oportunistas refractarios al tratamiento con antimicrobianos (ATM) (Guzman Prieto *et al.*, 2016). Datos reportados por el *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) evidencian que los enterococos se ubican en tercer lugar de frecuencia de aislamiento como agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), luego de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en Europa (Gawryszewska, 2016).

Figura N° 1. Dendrograma de relación filogenética entre especies del género *Enterococcus* spp. Gráfico cedido con permiso del Dr. Michael S. Gilmore. Lebreton *et al.*, 2014.

Dentro del género *Enterococcus*, *Enterococcus faecalis* es el responsable aproximadamente del 60 % de las IAAS, según el *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARS-Net) (Kraker *et al.*, 2013). En hospitales de EE. UU., estas bacterias se ubican en segundo lugar en la lista de microorganismos recuperados a partir de muestras clínicas, obtenidas de pacientes con bacteriemias e infecciones urinarias asociadas a uso de catéteres (ECDC, 2013).

E. faecalis (80-90 %) y *Enterococcus faecium* (10 %) son las especies aisladas con mayor frecuencia de muestras clínicas provenientes de infecciones humanas documentadas (Tedim *et al.*, 2015). *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; Britt & Potter, 2016).

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 *et al.*, 2014). Sin embargo, también puede producirse una infección por cepas exógenas adaptadas al hospital, en algún lugar anatómico del paciente, como resultado de la colonización y el crecimiento excesivo de enterococos resistentes.

Los *Enterococcus* poseen resistencia intrínseca a diversos ATM y esta particularidad, acota las opciones terapéuticas disponibles para su erradicación. Ciertas cepas, adicionalmente, expresan diversos genes que codifican para factores de virulencia (FV). Sin embargo, en medicina humana aún existe controversia si, el aumento de la patogenicidad de estas bacterias está relacionado con la mayor expresión de FV (Mundy *et al.*, 2000; Lindenstrau *et al.*, 2011; Johansson & Rasmussen, 2013; Baldisserotto Comerlato *et al.*, 2013; Gulhan *et al.*, 2015). En tal sentido, Ruiz Garbajosa *et al.*, realizaron un estudio comparativo para evaluar diferencias genéticas y fenotípicas entre *E. faecalis* aislados de voluntarios, *E. faecalis* recuperados de pacientes internados en unidad de terapia intensiva (UTI) y de *E. faecalis* aislados de muestras

de sangre provenientes de infecciones invasivas. Este estudio demostró que la presencia de genes que expresaban para FV, no estaban necesariamente ligados a la patogenicidad. Así mismo, ciertos genes de virulencia fueron detectados con mayor frecuencia en aislados provenientes de UTI y no de infecciones invasivas. Los FV que se conocen en la actualidad son: producción de sustancia de agregación (SA), adhesinas, proteína enterocócica superficial extracelular (Esp), hemolisina-citolisina (Hem), producción de *biofilm*, gelatinasa (Gel), serinas proteasas (SprE) y antígeno A (*Efa A*) (Anderson *et al.*, 2016). Los FV varían intra e interespecie y su expresión depende del nicho ecológico donde se encuentren estos microorganismos.

Enterococcus spp. son patógenos de infecciones urinarias, infecciones intraabdominales, peritonitis, bacteriemias, sepsis neonatal, endocarditis, abscesos pélvicos, infecciones periodontales y ocasionalmente meningitis o neumonía (Reuken *et al.*, 2012; Agudelo Higueta & Huyck, 2014). Estas infecciones se observan con mayor frecuencia en pacientes seniles que presentan otras condiciones mórbidas, en pacientes inmunocomprometidos, como también en individuos hospitalizados que son sometidos a procedimientos invasivos o tratados por largos períodos de tiempo con diversos esquemas terapéuticos de ATM (Cardoso *et al.*, 2012; Lagnf *et al.*, 2016; Dahl *et al.*, 2016).

El incremento en la resistencia a ampicilina (AMP), aminoglucósidos, glucopéptidos y a otros ATM empleados en el tratamiento de infecciones por cepas de *Enterococcus*, en especial para *E. faecium*, ha originado en las últimas décadas, una reducción preocupante de alternativas terapéuticas (Gagetti *et al.*, 2018). Por este motivo, aún hoy en día, continúan investigándose duplas sinérgicas bactericidas para intentar encontrar una posible combinación de ATM, que puedan erradicar las bacterias productoras del proceso infeccioso. Sin embargo, la mayoría de los estudios son realizados *in vitro* basados en observaciones empíricas o *in vivo* utilizando modelos animales, por lo que no son concluyentes (Arias *et al.*, 2010).

E. faecium es intrínsecamente más resistente a los ATM que *E. faecalis* e integra linajes clonales específicos como los secuencio-tipo ST17, ST18 y ST78 determinados por Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST: *Multi Locus Sequence Typing*), que portan en su mobiloma genes que confieren resistencia a muchos ATM (Mikalsen *et al.*, 2016). Algunos linajes se

asocian a grupos particulares BAPS (de la sigla en inglés *Bayesian Analysis of genetic Population Structure*). Los linajes 17-BAPS 3.3a2, 18-BAPS 3.3a1 y 78-BAPS 2.1a, se han inferido como la causa del aumento de infecciones por *E. faecium* multirresistentes en todo el mundo (Tedim *et al.*, 2017). En *E. faecalis*, las IAAS se asocian principalmente a los complejos clonales (CC) CC2-ST6 y CC87. Ambos CC presentan fenotipos multirresistentes y CC2 se asocia significativamente con infecciones invasivas en Europa y EE. UU. (Kuch *et al.*, 2012).

La resistencia a glucopéptidos es un problema de preocupación en Salud Pública. Cepas de enterococos vancomicina (VAN) resistentes (EVR) comenzaron a aislarse a nivel mundial a partir de 1988. En ese año se publicó el primer aislamiento de *E. faecalis* y de *E. faecium* resistentes a VAN en Inglaterra (Uttley *et al.*, 1988). A partir de este hecho comenzaron a aislarse más EVR y en 1993, *The Lancet* publicó la emergencia de estas cepas en EE. UU. (Friden *et al.*, 1993). A partir del suceso descrito anteriormente, numerosos estudios de corte epidemiológico fueron realizados en Argentina, para monitorear la RA en enterococos (Togneri *et al.*, 2005; Ponessa *et al.*, 2006; Zárate *et al.*, 2007; Reale *et al.*, 2009). El primer aislamiento de *E. faecium* resistente a VAN en nuestro país y en Latinoamérica fue publicado en 1998 (Marín *et al.*, 1998). En 2003, fue comunicado otro aislamiento de *E. faecium* resistente a VAN, con fenotipo VanB (Miranda *et al.*, 2003). En Buenos Aires se aisló la primera cepa de *E. gallinarum* fenotipo VanA, a partir de una muestra tomada de un paciente diabético, hospitalizado, el cual había sido tratado con lincosamidas, glucopéptidos y cefalosporinas (Corso *et al.*, 2005).

La detección y el aislamiento de cepas *E. faecalis* productoras de β -lactamasas es un hallazgo científico raro. Sin embargo, la presencia de tres cepas de *E. faecalis* productoras de esta enzima fue comunicada en 1990 en nuestro país. Este suceso determinó otro hecho importante para la comunidad científica, debido a que ciertos β -lactámicos, como AMP, son utilizados para realizar sinergia con aminoglucósidos en infecciones graves, como endocarditis enterocócica (Lopardo *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1992).

El alto nivel de resistencia de enterococos a los aminoglucósidos (ANRAG) es otra problemática que demanda vigilancia epidemiológica constante. Estos ATM son utilizados para realizar sinergia con ATM inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana en meningitis,

septicemia y endocarditis (Osuka *et al.*, 2016). Detectar cepas clínicas con ANRAG se convierte en un serio problema para el microbiólogo e infectólogo, debido a que se suprime el efecto sinérgico antimicrobiano (Chow, 2000).

El incremento de aislamientos de clones de *Enterococcus* que presentan multirresistencia antimicrobiana y virulencia asociada a partir de muestras clínicas humanas, demanda una correcta identificación y la búsqueda de esquemas terapéuticos alternativos, para tratar las infecciones graves producidas por sus especies. En diversas oportunidades, ha sido necesario recurrir al sinergismo de ATM utilizando antiguas drogas, con el fin de erradicar enterococos multirresistentes de una infección invasiva. Ultimamente, dado que la industria farmacéutica no está desarrollando nuevas moléculas antimicrobianas a gran escala, es que la técnica *in vitro* de curva de letalidad, se continúa ensayando para investigar sinergia bactericida sobretodo en bacterias que presentan varios mecanismos de resistencia, que afectan a distintas familias de ATM (Hindler *et al.*, 2015; Desai *et al.*, 2016; Burguer Moreira *et al.*, 2016).

La barrera que separa a los enterococos como microorganismos procariotas colonizantes de aquellos agentes que se comportan como patógenos oportunistas, parece ser cada vez más frágil. Su naturaleza promiscua permite una evolución genética para perfeccionar su mobiloma mediante TGH. En la actualidad no existe una terapéutica uniforme y validada para tratar enterococos multirresistentes. A su vez, los avances en genómica y proteómica han permitido comprender que el entorno hospitalario no es un nicho ecológico aislado, sino que, los microorganismos que habitan en él, están en constante flujo de intercambio genético con los del medio ambiente extra hospitalario. Esta situación demanda la realización de estudios de corte epidemiológico descriptivos en instituciones de salud, para conocer la epidemiología bacteriana local y para caracterizar fenotípicamente y genotípicamente cepas aisladas de muestras clínicas humanas. La vigilancia epidemiológica contribuye y colabora para indicar un tratamiento antimicrobiano más acertado, para disminuir la morbimortalidad de los pacientes y para permitir reducir los costos monetarios en un Sistema de Salud.

I. 2. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Enterococcus* spp.

El género *Enterococcus* (Gr. n. *enteron* intestino; Gr. n. *coccus* grano) cuyo nombre hace referencia a la ubicación del mismo (cocos saprofitos de origen intestinal), fue descrito por Thiercelin en 1899, quien propuso como nombre “enterocoque”, debido al origen intestinal de los mismos y a su morfología (Kalina, 1970). Taxonómicamente, se ubica dentro del Reino Bacteria, Phylum *Firmicutes*, con bajo contenido de GC en su ADN (37 a 40 mol %), Clase *Bacilli*, Orden *Lactobacillales*. Pertenece a la Familia *Enterococcaceae* junto con *Bavariicoccus*, *Catelliococcus*, *Melisococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* (Lebreton *et al.*, 2014).

Este género ha pasado por diversas variaciones taxonómicas a lo largo del tiempo (Clarridge, 2004). Rebecca Lancefield, en 1930, describió una forma de clasificar a los *Enterococcus*, cuya denominación del género era en ese tiempo *Streptococcus*. La misma se fundamentaba en un sistema de tipificación serológica sobre la base de la estructura y ubicación de ciertos antígenos (hidratos de carbono de la pared celular bacteriana). Con este sistema de tipado *Enterococcus* integró el grupo D de Rebecca Lancefield, junto a *Streptococcus sensu stricto* y *Lactococcus* (Lancefield, 1933; Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984; Devriese *et al.*, 1993; Devriese & Pot, 1995). Sin embargo, esta nomenclatura fue revisada y reemplazada. En 1970, Kalina publicó “*The Taxonomy and nomenclature of enterococci*”, demostrando que los enterococos poseían propiedades morfológicas y fisiológicas que lo alejaban del género *Streptococcus*. Posteriormente en 1903, Thiercelin y Jouhaud proponen el nombre genérico *Enterococcus* cuya especie tipo del género fue *Enterococcus proteiformis*. Finalmente, y luego de varios estudios se aprueba por recomendación de una Comisión Judicial en Moscú, Rusia que, la especie tipo del género *Enterococcus* Thiercelin and Jouhaud 1903 sea designada como *E. faecalis* (Kalina, 1970).

En 1984, estudios genéticos realizados por Schleifer & Kilpper-Bälz demostraron diferencias de hibridación del ácido desoxirribonucleico ADN-ADN y del ácido ribonucleico ribosomal ADN-ARNr. Sobre la base de estas investigaciones, proponen que *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* sean transferidos del género *Enterococcus* (ex Thiercelin and Jouhaud) y se renombren como *E. faecalis* y *E. faecium*.

Adicionalmente, otros estudios realizados con técnicas de biología molecular demostraron que, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Carnobacterium*, formaban un *cluster* diferente y que filogenéticamente eran los géneros más cercanos a *Enterococcus*.

Los análisis de la secuenciación génica de la transcriptasa reversa 16S ARNr permitieron conocer y describir más especies, al igual que reflejar la relación evolutiva. Hasta el presente, el género se encuentra compuesto por 58 especies (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>) (Euzéby, 1997). Estudios moleculares realizados en la fracción 16S del ARNr demostraron que *E. faecalis* y *E. faecium* son filogenéticamente diferentes (Figura N° 2).

Los nombres de las nuevas especies identificadas en los últimos 11 años (Tabla N° 1), pone en evidencia la diversidad que presenta este género, así como la capacidad evolutiva del mismo, debido a la amplitud de reservorios que habita. Se observa en los últimos años gran variedad de cepas descubiertas en el nicho ecológico extra-humano. Este hallazgo se contrapone con la realidad observada en nichos ecológicos humanos, donde no han sido descubiertas nuevas cepas pero sí se observa, en las que están descriptas, mayor evolución genética de sus mobilomas (Guzman Prieto *et al.*, 2016). Este último hecho es lo que justifica la realización, no solo de estudios fenotípicos, sino también moleculares en instituciones de salud. Esto permite, reconocer la presencia y la distribución relativa de linajes genéticos de *Enterococcus*, con relevancia en medicina humana, adaptados al ambiente intra-hospitalario y que están en constante evolución por el intercambio de elementos genéticos móviles (Mikalsen *et al.*, 2015).

Figura N° 2. Relaciones filogenéticas establecidas entre especies del género *Enterococcus* spp. realizada sobre la base de las secuencias del ADN ribosomal 16S. Gráfico cedido con permiso del Dr. Michael S. Gilmore. Gilmore *et al.*, 2013.

Tabla N° 1. Especies que forman parte del género *Enterococcus* descubiertas en los últimos 11 años. Adaptado de <http://www.bacterio.net/enterococcus.html#r>, 2017.

Especie nueva (sp. nov.)	Referencia Bibliográfica	Reservorio
<i>Enterococcus caccae</i>	Carvalho <i>et al.</i> , 2006	Heces humanas
<i>Enterococcus silesiacus</i>	Švec <i>et al.</i> , 2006	Agua Potable (Región de República Checa)
<i>Enterococcus termitis</i>	Švec <i>et al.</i> , 2006	Agua Potable (Región de República Checa)
<i>Enterococcus camelliae</i>	Sukontasing <i>et al.</i> , 2007	Hojas de té fermentadas de <i>Camellia sinensis</i>
<i>Enterococcus thailandicus</i>	Tanasupawat <i>et al.</i> , 2008	Embutidos fermentados (Región de Tailandia)
<i>Enterococcus viikkiensis</i>	Rahkila <i>et al.</i> , 2011	Planta de procesamiento y de productos de pollos (Región de Finlandia)
<i>Enterococcus plantarum</i>	Švec <i>et al.</i> , 2012	Plantas
<i>Enterococcus rivorum</i>	Niemi <i>et al.</i> , 2012	Aguas cristalinas
<i>Enterococcus lactis</i>	Morandi <i>et al.</i> , 2012	Queso italiano
<i>Enterococcus quebecensis</i>	Sistek <i>et al.</i> , 2012	Agua (Región de Canadá)
<i>Enterococcus ureasiticus</i>	Sistek <i>et al.</i> , 2012	Agua
<i>Enterococcus eurekaensis</i>	Cotta <i>et al.</i> , 2013	Medioambiental (Región de EE. UU.)
<i>Enterococcus rotai</i>	Sedláček <i>et al.</i> , 2013	Medioambiental
<i>Enterococcus ureilyticus</i>	Sedláček <i>et al.</i> , 2013	Medioambiental
<i>Enterococcus alcedinis</i>	Frolkov <i>et al.</i> , 2013	Ave: “Martín Pescador” (<i>Alcedo atthis</i>)
<i>Enterococcus lemanii</i>	Cotta <i>et al.</i> , 2013	Medioambiental
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> subsp. <i>Saccharolyticus</i>	Chen <i>et al.</i> , 2013	Animal
<i>Enterococcus diestrammenae</i>	Kim <i>et al.</i> , 2013	Intestino de <i>Diestrammena</i> <i>coreana</i>
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> subsp. <i>Taiwanensis</i>	Chen <i>et al.</i> , 2013	Brócolis
<i>Enterococcus olivae</i>	Lucena-Adrós <i>et al.</i> , 2014	Aceitunas
<i>Enterococcus xiangfangensis</i>	Li <i>et al.</i> , 2014	Alimentos (China)
<i>Enterococcus bulliens</i>	Kadri <i>et al.</i> , 2016	Animal
<i>Enterococcus saigonensis</i>	Harada <i>et al.</i> , 2016	Alimento origen animal y bebida
<i>Enterococcus crotali</i>	Mc Laughlin <i>et al.</i> , 2017	Animal
<i>Enterococcus wangshanyuanii</i>	Jin <i>et al.</i> , 2017	Animal

I. 3. HÁBITAT Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

I.3.1. *Enterococcus* como colonizante de alimentos, animales y vegetales

Los enterococos, como integrantes de la microbiota del tracto gastrointestinal (TGI), son eliminados no solo por materia fecal del ser humano, sino también por animales. Contaminan diversos nichos ecológicos del medio ambiente, por este motivo, en algunos países, son utilizados también como indicadores de contaminación fecal, sobre todo en ambientes acuáticos (*The Council of the European Union*, 1998 y *United States Environmental Protection Agency*, 2006).

Estas bacterias se recuperan de alimentos fabricados con materia prima de origen animal, como quesos, salames, leche de cabra, etc. (Delpech, 2014; Gaglio *et al.*, 2016). Debido a su elevada resistencia a las condiciones ambientales adversas (variaciones de pH, temperatura, salinidad) están presentes en este tipo de alimentos que actúan como reservorios de un *pool* de cepas con mecanismos de RA asociada (Delpech, 2014). *E. faecalis* y *E. faecium* constituyen las especies más frecuentemente recuperadas de alimentos origen animal, coincidiendo con medicina humana.

La presencia de cepas de enterococos con expresión de genes de resistencia en nichos ecológicos extra-humanos (enterococos exógenos), podría tener una implicancia directa en la salud humana. En nuestro país, se realizaron estudios de búsqueda de enterococos en reservorios no humanos, los cuales alertaron sobre la detección de cepas circulantes, con perfiles de RA en ambientes extra hospitalarios (Baldini & Selzer, 2008; Marguet *et al.*, 2008; Delpech *et al.*, 2012; Delpech *et al.*, 2013; Pourcel *et al.*, 2017). En el partido de Tandil se inició un estudio epidemiológico en 2008, con el fin de recuperar especies de enterococos de diversos reservorios: animal, medioambiental, alimentos provenientes de origen animal y humanos (Delpech *et al.*, 2012; Delpech *et al.*, 2013, Schell *et al.*, 2014). Dichas investigaciones permitieron reconocer la presencia de enterococos en estos nichos ecológicos e incluso detectar cepas con multirresistencia así como también, EVR (Delpech *et al.*, 2013; Pourcel *et al.*, 2017). Estos genes integran el

resistoma ambiental y pueden transmitirse hacia otras bacterias por TGH y luego entrar en contacto directo o indirecto con el hombre.

La naturaleza ubicua de este género permite utilizar estos microorganismos en la industria alimenticia con fines biotecnológicos. En relación a este punto han sido descubiertas y patentadas cepas probióticas como *E. faecalis* CECT7121 y *E. faecalis* MR99 (Sparo *et al.*, 2006; Sparo *et al.*, 2008).

1.3.2. *Enterococcus* y su presencia en el hábitat intrahospitalario

La habilidad de las especies de *Enterococcus* para sobrevivir en diversos nichos ambientales, implica que las mismas puedan ingresar al ser humano por diferentes vías para causar una enfermedad infecciosa. Está demostrado que habitan alimentos de origen animal, cursos de agua, vegetales y se han adaptado exitosamente al ambiente intrahospitalario (Fisher & Phillips, 2009; Guzman Prieto *et al.*, 2016). Pueden colonizar superficies inanimadas como barrales y ropa de cama, jabones, equipamiento de terapia intensiva y otros. Ciertos procedimientos invasivos en individuos internados pueden predisponer a una infección con posterior diseminación bacteriana y producir una patología infecciosa exógena grave, por clones epidemiológicamente adaptados al ambiente nosocomial. Este hecho implica en muchas situaciones, morbilidad alta, sobre todo si la cepa aislada es un EVR (Willems & van Schaik, 2009). Se entiende por “colonización” la entrada y la persistencia de bacterias sin provocar una enfermedad en el huésped. Infección microbiana es la colonización más la multiplicación del microorganismo en un huésped, que puede evolucionar o no a una enfermedad infecciosa. Ambos caminos son factibles para especies oportunistas de este género como parte de su proceso de patogénesis bacteriana.

Algunos clones de *E. faecium* vancomicina resistentes (EFMVR) y/o multirresistentes, se han adaptado y han evolucionado en ambientes nosocomiales (Guzman Prieto *et al.*, 2016). La transmisión horizontal de EVR intrahospitalarios es muy factible de realizarse entre pacientes a través de las manos del personal de salud, de allí que si un paciente se infecta con estas cepas, debe ser aislado según protocolo de cada institución de salud. Los brotes intrahospitalarios producidos por bacterias oportunistas y multirresistentes, generan costos elevados para el sistema

de Salud Pública de un país. Implican mayores días de internación y consumo de ATM de mayor espectro y de costo mas elevado. Si esto ocurre, se presentan dos situaciones que motivan el rápido accionar del comité de control de infecciones: una, la toma de medidas de rápido aislamiento y otra, la decisión de realizar cultivos de vigilancia epidemiológica utilizando hisopados rectales, para detectar paciente portador de EVR, en caso que éste ingrese a la institución de salud y sea internado (Lopardo *et al.*, 2008).

La presencia y la adaptación de estas cepas en ambientes con mucha presión antimicrobiana y biocida, genera un impacto negativo. Los enterococos con su plasticidad genómica, responden rápidamente para permanecer y sobrevivir en estos ambientes. Pueden adquirir determinantes genéticos de resistencia y/o virulencia, así como también expresar genes como el *qacZ*, que permiten aumentar su tolerancia y resistir a compuestos biocidas como el cloruro de benzalconio (Rizzotti *et al.*, 2016). Todo esto incrementa su habilidad para colonizar o infectar un huésped.

En instituciones de salud del mundo entero se ha producido un aumento gradual de clones nosocomiales de EVR en los últimos años, hecho que genera elevada preocupación en el personal de salud. Se observa actualmente un crecimiento policlonal y endémico de clones genéticamente adaptados que circulan en diversos hospitales de todos los continentes, así como alta prevalencia de cepas de *E. faecium* resistentes a AMP y VAN (Valdezate *et al.*, 2009; Panesso *et al.*, 2010; Fallico *et al.*, 2011; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2012).

E. faecium con resistencia a AMP pertenece a un *cluster* policlonal denominado Complejo Clonal CC17 (CC17) que es prevalente alrededor del mundo y produce IAAS. Estudios moleculares utilizando análisis por MLST, revelaron la presencia de otras subpoblaciones de cepas de *E. faecium* genotípicamente distintas al previamente denominado CC17, que poseían un origen ancestral común (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2012). Estas cepas, que actualmente circulan en instituciones de salud, se caracterizan por presentar resistencia no solo a AMP sino también a ciprofloxacina (CIP) u otra quinolona. Además, poseen algunos genes de virulencia y son responsables de la mayoría de las IAAS y de brotes hospitalarios en el mundo. El CC17 está integrado por aislamientos con diversos ST que poseen dos características principales: a- el gen *purK* es alelo 1 del esquema básico de identificación genética por MLST y, b- expresan el gen *esp* (que codifica para proteína de superficie).

El análisis genético poblacional realizado en España, en cepas de *E. faecium* genotipos *vanA* y *vanB*, que causaron brotes nosocomiales en 27 países durante el período 1986-2012, demostró que los EFMVR fueron asociados principalmente a ST17, ST18 y ST78 los cuales causan hoy IAAS y/o brotes intrahospitalarios (Freitas *et al.*, 2016). Otro estudio para evaluar la epidemiología molecular de EFMVR productores de bacteriemias realizado en Irlanda, reveló la circulación de ST17, ST18, ST78 y ST203 (Ryan *et al.*, 2015). En México, se demostró la presencia de cepas de *E. faecium* diseminadas en un hospital pediátrico, siendo la mayoría genéticamente relacionada al CC17 (Ochoa *et al.*, 2013). Faccone *et al.*, demostraron en 2012 que, CC17 es el principal responsable de la emergencia y diseminación de EFMVR en Argentina.

Las conductas recomendadas para disminuir la colonización de fomites con EVR son: limpieza/desinfección, cultivos de vigilancia, educación al personal de salud, uso racional de ATM, lavados de mano riguroso y aislamiento de barrera en caso de detección de paciente portador/infectado (Huycke *et al.*, 1998).

I.3.3. *Enterococcus* como microbiota del tracto gastrointestinal humano

El TGI humano está compuesto por cinco regiones diferentes: la cavidad oral, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o colon. La cavidad oral y el colon son las regiones distales del mismo y las que presentan mayor número de microorganismos. *Enterococcus* spp., están presentes en el colon en una concentración aproximada de 1×10^8 UFC por gramo de materia fecal, en los seres humanos (Tendolkar *et al.*, 2003). Componen el 1 % (10^9 a 10^{12} UFC) de la microbiota intestinal del hombre. El pH ácido del estómago limita la presencia de sus especies por lo que se ubican en mayor proporción en el íleon y en el colon (Figura N° 3). Diversos estudios han demostrado que, donde el potencial redox es bajo y existen aproximadamente entre 1×10^{11} y 1×10^{12} bacterias de diversos géneros microbianos, es la ubicación preferencial para enterococos (Del Coco, 2012; Mowat & Agace, 2014; Ocvirk *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que en el duodeno y en el yeyuno pueden encontrarse en muy baja proporción (Thadepalli *et al.*, 1979; Hayashi *et al.*, 2005). Como miembros de la microbiota intestinal del hombre, éstos microorganismos están expuestos a variaciones de pH, sales biliares y fluctuaciones de osmolaridad, que se dan en el TGI, hecho que demuestra la versatilidad metabólica de los mismos (Mowat & Agace, 2014; Lebreton *et al.*, 2014). Los

enterococos se encuentran en menor cantidad en: secreciones oro-faríngeas, vaginales, en la piel y en la región perianal.

I.3.3.a) Reservorio endógeno

Los *Enterococcus* presentan capacidad para habitar contextos ecológicos adversos tal como se mencionó anteriormente y resisten a mecanismos de células del sistema de defensa como linfocitos y macrófagos. Cepas endógenas de enterococos integrantes del microbioma del intestino grueso, pueden adherirse por medio de adhesinas a células epiteliales y traslocar, luego circular por sangre y posteriormente producir infecciones graves en el huésped, como bacteriemia, endocarditis y/o sepsis. También pueden producir patología infecciosa por invasión accidental hacia otros lugares anatómicos del cuerpo, debido a la acción de un traumatismo, por ejemplo, en pacientes accidentados (Rajkumari *et al.*, 2014).

La traslocación intestinal enterocócica es más factible en personas inmunosuprimidas, que presentan traumatismos en zona abdominal, multitratados con ATM, internados por períodos amplios, enfermos sometidos a diálisis ó a procedimientos invasivos. En pacientes que reciben terapéutica antimicrobiana prolongada, a su vez, se facilita la selección de bacterias con alta tasa de mutación y/o de recombinación, que poseen elevada capacidad para capturar ADN exógeno. Esto genera: 1) la posibilidad que el microbioma de los enterococos intestinales adquiera mayores determinantes de resistencia, debido al *stress* por presión antimicrobiana sumado a la posibilidad de traslocar y 2) la probabilidad de producir una patología infecciosa grave por cepas de enterococos endógenas y resistentes. Si un paciente es politratado con ATM por un período de tiempo prolongado según prescripción médica, estas moléculas serían capaces de ir seleccionando mutantes resistentes que podrían pasar genes de resistencia hacia la microbiota endógena sensible. Por ejemplo, se conoce que ATM con nula acción antienterocócica, como cefalosporinas ó ATM contra gram negativos, colaboran y predisponen a infecciones por esta bacteria (Kristich *et al.*, 2011).

Estudios científicos realizados *in vivo* en animales de laboratorio han demostrado la traslocación de cepas de enterococos a través del tracto intestinal distal, incluso atravesando

células del epitelio columnar, lámina propia y submucosa (Zeng *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2013). Por otro lado, también ha sido demostrado el intercambio de genes plasmídicos que expresan FV y/o RA entre cepas de este género y cepas de otros géneros que habitan e integran el microbioma intestinal distal (Wells *et al.*, 1990; Berg, 1995; Sparo *et al.*, 2012). Aunque las conclusiones de estos trabajos se basaron utilizando modelos *in vivo* con animales o membranas biológicas (*ex vivo*), estos hallazgos permiten afirmar que la traslocación e invasión de estas bacterias a sitios anatómicos estériles, es posible.

Figura N° 3. Ubicación del género *Enterococcus* spp. como integrante de la microbiota habitual del sistema gastrointestinal humano.

Las infecciones producidas por *Enterococcus* son habitualmente desencadenadas por cepas no autóctonas, que expresan FV e inclusive resistencia a ATM (Kayser, 2003). Enterococos que habitan porciones del intestino grueso humano pueden poseer o adquirir desde otras bacterias, genes por TGH y complicar el tratamiento antiinfeccioso en el paciente. Al mismo tiempo pueden diseminar rápidamente el determinante genético que expresa resistencia para ATM. Si bien se conoce poco acerca del origen de los genes *van*, su expresión confiere

resistencia a VAN y a teicoplanina (TEC), dependiendo del tipo de gen que se exprese, dicha resistencia a estos ATM será diferente. Por ejemplo, estudios han indicado que el genotipo *vanB*, que confiere resistencia moderada a VAN (concentración inhibitoria mínima: CIM 4-32 µg/mL) y sensibilidad a TEC, podría tener un origen endógeno y provenir desde la microbiota humana intestinal (Stinear *et al.*, 2001; Ballard *et al.*, 2005; Lanza *et al.*, 2015). A su vez, los diversos genotipos expresan diferentes fenotipos, como el fenotipo VanA y VanB, que son de carácter inducible por lo que se puede inferir que pacientes tratados con VAN, podrían colonizarse con cepas EVR en el TGI (Singh-naz *et al.*, 1999; Tambyah *et al.*, 2004).

Los reservorios biológicos con alta concentración bacteriana, como el intestino, pueden considerarse nichos óptimos para el intercambio génico. Aproximadamente 1×10^{12} bacterias habitan el TGI humano, por lo que la circulación/recirculación, así como el intercambio del *pool* de genes de resistencia, transportados en elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, islas genómicas y otros) es posible y fue demostrado (Sparo *et al.*, 2012).

I.3.3.b) Reservorio exógeno

Las infecciones por enterococos que habitan reservorios exógenos, se dan por la vía paciente – paciente, por transmisión cruzada a través de las manos del personal de salud (inoculación directa) o a partir del contacto con reservorio inanimado (inoculación indirecta). Clones multirresistentes de enterococos intrahospitalarios se diseminan también por el instrumental médico contaminado, cuando se introducen catéteres urinarios o intravenosos en los enfermos (Donskey, 2004). Esta diseminación también ocurre por la derivación entre hospitales, de pacientes con colonización intestinal que actúan como reservorios de cepas provenientes de otra estructura epidemiológica poblacional hospitalaria.

La colonización por EVR en zona rectal de pacientes que ingresan a un nosocomio, aumenta la posibilidad de diseminar el mismo en el hospital, contaminando posteriormente fomites o material animado (Lopardo *et al.*, 2008, Pourcel *et al.*, 2017).

La presencia de cepas enterocócicas en el ambiente hospitalario puede demostrarse por medio de vigilancia epidemiológica. Esta se realiza mediante hisopados rectales en pacientes que ingresan al nosocomio y también en superficies inanimadas. Lopardo *et al.*, (2005) realizaron

hisopados rectales con fines de vigilancia epidemiológica, en un período de 5 meses, demostrando que el 28 % de pacientes admitidos en UTI fueron portadores de EVR con genotipo *vanA* (35 pacientes de 124). Este hecho pone en relevancia la presencia de cepas con características epidemiológicas particulares. Las mismas poseen impacto en Salud Pública, ya que pueden generar un riesgo mayor, debido a la capacidad de diseminación horizontal de éste mecanismo de resistencia de ubicación plasmídica. Utilizando TGH, algunos clones integrantes de linajes genéticos específicos del ambiente hospitalario, mejoran su adaptabilidad y su condición física, lo que permite posteriormente seguir adquiriendo otros elementos, concepto denominado “capitalismo genético” (Baquero, 2004). Así, una bacteria resistente tiende a ser más resistente y se seleccionan mejor, bajo nichos ecológicos con presión antimicrobiana. Esta capacidad permite sobrevivir, subsistir y diseminar bajo condiciones adversas, ya que al facilitarse la adquisición de genes de resistencia, se eleva la persistencia clonal (clones de alto riesgo) en el nicho hospitalario.

El microbioma medioambiental intrahospitalario alberga bacterias con diversos genes que componen el resistoma hospitalario, los cuales pueden transferirse a bacterias colonizantes del ser humano (Buelow *et al.*, 2017). Factores de riesgo como los ya descritos más hospitalización en unidad oncohematológica, internación con cuidados paliativos, tratamiento con antianaeróbicos y tipo de enfermedad de base, aumentan la probabilidad de adquirir una infección exógena por enterococos resistentes.

I.4. INFECCIONES INVASIVAS HUMANAS PRODUCIDAS POR *Enterococcus* spp.

Las infecciones invasivas bacterianas se definen como el aislamiento de bacterias (cultivo monomicrobiano o polimicrobiano) a partir de sitios normalmente estériles que pueden propagarse hacia tejidos subyacentes y pueden ocasionar elevada morbilidad y mortalidad en los pacientes (Lee *et al.*, 2011). Debido al crecimiento exponencial en la prevalencia de ciertas enfermedades como cánceres, desnutrición, IAAS, Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), etc., se observa actualmente mayor cantidad de ingresos de personas que demandan

atención en instituciones de salud. Es por este motivo que se avanzó de manera creciente en metodología diagnóstica que utiliza tanto procedimientos invasivos como no invasivos y que requieren a veces internación, así como en nuevas estrategias de tratamientos para otras enfermedades. En este contexto, se producen mayores ingresos y mayores internaciones de pacientes, que pueden debutar con una IAAS por enterococos multirresistentes y elevar su morbimortalidad (Frakking *et al.*, 2018). La patología infecciosa puede producirse por enterococos autóctonos (provenientes de la microbiota intestinal endógena) o por enterococos alóctonos (infección exógena). Las infecciones enterocócicas pueden variar desde ambulatorias y no complicadas, a modo de ejemplo se nombra una infección urinaria baja, hasta graves/invasivas como endocarditis. Al adquirir genes de resistencia ciertas bacterias pueden sobrevivir, colonizar, multiplicarse y traslocar para luego producir la patología infecciosa grave (Figura N° 4). En un estudio realizado en 2007, fueron encontrados enterococos en el TGI de un alto número de individuos de edad avanzada, que habían sido tratados con ATM y estaban ausentes en el TGI de individuos sanos no tratados del mismo rango etario (Woodmansey, 2007).

La terapéutica antimicrobiana para infecciones invasivas es generalmente sinérgica, bactericida y con utilización de altas dosis de moléculas antimicrobianas. En un grupo de este tipo de infecciones, aún no hay consensos que determinen un tratamiento exitoso, sobretudo si la especie de enterococos aislada es multirresistente. Como se mencionó oportunamente, en éste tipo de infecciones se continúan probando combinaciones de drogas nuevas y viejas, sobretudo porque la industria farmacéutica no invierte demasiado en la generación de moléculas antiinfecciosas en las últimas décadas (Burguer Moreira *et al.*, 2016).

Las bacterias que integran el género *Enterococcus* poseen dos tipos de RA que reducen las posibilidades de seleccionar antimicrobianos para el tratamiento antiinfeccioso: RA intrínseca y adquirida. La RA intrínseca o natural está codificada por su genoma y se expresa en todas las especies. La RA adquirida se obtiene por mecanismos de TGH o por mutación bajo presión selectiva de ATM (Cercenado, 2011).

Figura N° 4. La invasión de la microbiota habitual por cepas resistentes.
 Figura adaptada con autorización del Dr. Fernando Baquero disponible en <http://www.jpiaimr.eu/wp-content/uploads/2016/03/Fernando-Baquero.pdf>

I.4.1. Infecciones enterocócicas intra-abdominales y pélvicas

Las infecciones intraabdominales como peritonitis y abscesos, pueden producirse por perforación e inoculación del contenido del TGI y generalmente son polimicrobianas. Se las clasifica en infecciones abdominales complicadas y no complicadas (Lopez *et al.*, 2011). Los géneros bacterianos que integran un porcentaje elevado del contenido microbiano intestinal, pueden actuar como patógenos oportunistas e invadir sitios anatómicamente estériles cuando se produce la ruptura anatómica de una viscera abdominal. En el intestino grueso las bacterias constituyen el 55 % del peso sólido de la materia fecal y enterococos, como integrante de la misma, puede colonizar, multiplicar e invadir. Una bacteriemia enterocócica desde un foco intraabdominal produce una mortalidad alta con tasas por encima del 40 %. Algunos estudios demuestran que, cuando *Enterococcus* se aísla de cultivos polimicrobianos obtenidos a partir de muestras de líquidos peritoneales u abdominales, es difícil determinar si es agente causal primario. Sin embargo, Scapellato *et al.*, (2017) realizaron un estudio multicéntrico para determinar las etiologías aeróbicas de las apendicitis agudas en adultos y demostraron la recuperación de *Enterococcus* spp. en un 8,7 % (16/184 microorganismos bacterianos).

Cuando se decide la profilaxis antibiótica en este tipo de patología infecciosa, muchas veces no se tiene en cuenta la cobertura para enterococos (Burnett *et al.*, 1995; Sartelli *et al.*, 2015). Sin embargo, se han redactado consensos que proponen cuando y en que momento es

conveniente incluir cobertura anti enterococos en el tratamiento empírico inicial, hasta tanto se reciban los resultados del cultivo. La tasa de fracaso en la terapéutica se eleva significativamente en aquel paciente con infección intraabdominal, que presenta otros factores de riesgos y que no recibe cobertura específica inicial para este género (Burnett *et al.*, 1995; López *et al.*, 2011; Kaffarnik *et al.*, 2012, Narciso-Schiavon *et al.*, 2015). Esto último cobra importancia ya que está documentado su rol como patógeno productor de peritonitis, apendicitis, abscesos y otras infecciones abdominales.

La peritonitis de causa infecciosa puede ser primaria o secundaria, así como aguda ó crónica. La primaria se genera cuando no existe otra fuente intraabdominal de infección y generalmente es monomicrobiana. La peritonitis secundaria es la forma de presentación mas común, se produce después de una fuga de contenido gastrointestinal, eleva el porcentaje de morbimortalidad y muchas veces es polimicrobiana (Suarez, 2004). Especies de este género (*E. faecalis*, *E. faecium* y *E. avium*) pueden causar peritonitis como complicación de una diálisis peritoneal (Yip *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2013) y generar abscesos intraperitoneales dentro de vísceras intraabdominales como abscesos hepáticos, pancreáticos, esplénicos, tuboováricos o renales.

Los factores de riesgo que llevan a debutar con este tipo de enfermedad enterocócica son, uso previo de esteroides, terapia antimicrobiana de amplio espectro, colonización con bacterias multirresistentes hospitalarias (EVR), diálisis, cirrosis hepática, diabetes (DBT) e inmunosupresores que pueden modificar el microbioma intestinal. Los pacientes que presentan patologías de base como cirrosis alcohólica, pueden presentar quimiotaxis de neutrófilos alterada, lo cual influiría negativamente para una rápida resolución. Se ha demostrado asociación estadísticamente significativa con factores de riesgo como: uso de cefalosporinas previas como cefalexina, que seleccionan y aumentan la concentración de enterococos en el intestino, la colonización previa con EVR, inmunocompromiso y la infección intraabdominal nosocomial para adquirir estas infecciones.

I.4.2. Endocarditis infecciosa enterocócica

La endocarditis infecciosa (EI) es una entidad compleja que se define como una infección de la superficie endocárdica del corazón, en la cual intervienen factores del huésped, como así

también del microorganismo (Fowler *et al.*, 2012). La misma puede ser producida por bacterias y en menor medida, por hongos, virus y otros microorganismos (*Chlamydia* sp. y *Mycoplasma* spp.). Las estructuras afectadas son generalmente las válvulas cardíacas. La incidencia de EI, si bien es baja, su morbilidad es alta. En Argentina se calcula que se producen entre 700 y 1.700 casos por año (Barisani & Benchetrit, 2001).

En EI se han producido en las últimas décadas cambios clínicos y epidemiológicos, debido a los grandes avances en el tratamiento, en los métodos de diagnóstico y en cirugías cardiovasculares. En este contexto se hace necesario revisar y actualizar ciertas conductas, sobre todo la que hace al manejo de la terapéutica empírica, dependiendo de las características microbiológicas del agente causal.

MacCallum y Hastings, en 1899, reportaron un caso de endocarditis aguda seguida de una septicemia, en un paciente masculino que posteriormente falleció. En su momento consideraron que el cuadro clínico infeccioso fue producido por *Micrococcus zymogenes*, mas tarde clasificado como *S. faecalis* y hoy conocido como *E. faecalis* (MacCallum WG & Hastings TW, 1899). Actualmente, *Enterococcus* es el tercer patógeno recuperado con mayor frecuencia de casos de endocarditis documentadas, luego de estreptococos y estafilococos (Ausina Ruiz & Moreno Guillén, 2006). Especies diferentes del género pueden producir EI. Trabajos publicados demuestran que *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum* son agentes etiológicos de endocarditis (Dargere *et al.*, 2012; Fallavollita *et al.*, 2016; Tracy *et al.*, 2016). La EI por enterococos ha sido observada predominantemente en hombres, con un promedio de edad entre 56-59 años.

Publicaciones relacionadas a esta temática se describen desde 1947. La búsqueda de una alternativa terapéutica sinérgica, utilizando penicilina (PEN) para tratar endocarditis bacteriana subaguda por “*S. faecalis*” (Leaman *et al.*, 1949) se reportó en 1949 por *Annals of Internal Medicine*. Paralelamente surgieron publicaciones que comunicaban el fracaso y la falla terapéutica en el tratamiento para esta enfermedad infecciosa (Sirota *et al.*, 1947; Dreher, 1950; Franco *et al.*, 1959; Dormer, 1963). La resistencia natural de estas bacterias a algunos betalactámicos como PEN, se da por expresión de proteínas de unión a penicilinas (*pbp*: *penicillin-binding proteins*) de baja afinidad ó por expresión de β -lactamasas. Evidentemente, la

expresión de este mecanismo en la era “no molecular” resultaba ser un serio problema para los médicos de la época (Cercenado, 2011).

La colonización de una válvula cardíaca, ya sea nativa o protésica, puede producirse posteriormente a una bacteriemia o no. Los enterococos que forman *biofilm* y expresan proteína de superficie enterocócica, que promueve la colonización y la adhesión, al multiplicarse, desarrollan una masa importante de bacterias adherentes en la vegetación (10^8 - 10^{10} organismos por gramo de tejido). En algunas oportunidades se logra la cura clínica, pero se requiere administrar por períodos prolongados dosis relativamente altas de agentes bactericidas, para lograr la esterilización de la vegetación cardíaca. Por este motivo, la terapia antimicrobiana de elección, no solamente debe ser bactericida, sino también efectiva y estratégicamente dirigida. La concentración bacteriana inmersa entre depósitos de fibrina y agregados plaquetarios en las vegetaciones cardíacas, podría erradicarse siguiendo directrices antes mencionadas (Fowler *et al.*, 2012). En la actualidad se utilizan y optimizan combinaciones sinérgicas para erradicar enterococos virulentos productores de endocarditis.

La terapia antimicrobiana más reconocida y aceptada por años para lograr sinergismo, consiste en combinar un aminoglucósido y un inhibidor de la síntesis de la pared celular bacteriana, como un β -lactámico o VAN (en caso de alergias a penicilinas y otros). Lamentablemente, cepas de este género son cada vez más resistentes a betalactámicos y expresan ANRAG como STH y GEH (CIM > 2.000 $\mu\text{g/mL}$), perdiéndose una posibilidad terapéutica. Adicionalmente, si la cepa es productora de β -lactamasas, se recomienda utilizar para esterilizar vegetaciones, SAM (ampicilina + sulbactam), AMC (amoxicilina/ácido clavulánico), VAN o imipenem (IMP) asociados a un aminoglucósido (Ausina Ruiz & Moreno Guillén, 2006; Baddour *et al.*, 2015).

En un proceso infeccioso complicado como EI, uno de los desafíos dentro de los pasos del diagnóstico bacteriológico es identificar correctamente la cepa aislada, cuya sensibilidad antimicrobiana varía intra e interespecie, para poder comenzar un tratamiento lo más rápido y dirigido posible (Liesman *et al.*, 2017). Generalmente, la identificación de la bacteria conlleva más de 24 a 48 h si es de fácil crecimiento. La introducción de la metodología de espectrometría de masas o desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo

(proteómica), a disminuído los tiempos del diagnóstico bacteriológico y ha permitido la identificación precisa de la bacteria a nivel de especie en escasos minutos (min) (Singhal *et al.*, 2015). La rápida detección del agente causal del proceso infeccioso grave, posibilita comenzar con una terapéutica antimicrobiana optimizada y quizás más acertada.

En EI se producen contextos microbiológicos diferentes según la cepa de enterococos aislada: a) enterococos resistente a PEN, aminoglucósidos y VAN; b) *E. faecalis* resistentes a PEN; c) *E. faecalis* sensible a PEN, resistente a los aminoglucósidos, o resistente a GEH y sensible a STH y d) enterococos sensibles a PEN, VAN y aminoglucósidos (Baddour *et al.*, 2015). Por este motivo, se continúan realizando hasta el día de hoy, investigaciones usando combinaciones de drogas antimicrobianas para detectar sinergia. Si bien proveen valiosa información para el equipo médico, si no se dispone de equipamiento automatizado, su realización demanda muchas horas/hombres (Johnson *et al.*, 2015; Hussain *et al.*, 2016; Leone *et al.*, 2016). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) recomienda consultar las directrices que expresan las guías nacionales o internacionales para interpretar los puntos de corte de ATM utilizados en el tratamiento de EI por *Enterococcus* spp.

I.4.3. Bacteriemia y sepsis por *Enterococcus* spp.

Bacteriemia es definida como presencia de bacterias en sangre. Puede ser transitoria y sin consecuencias o intermitente; incluso debutar como monomicrobiana o polimicrobiana. Diversos países han realizado consensos para clasificar la bacteriemia según el lugar de adquisición: 1. bacteriemia de adquisición comunitaria; 2. bacteriemia asociada a los cuidados de la salud y 3. bacteriemia nosocomial (Cisneros-Herrerosa *et al.*, 2007; Manassero *et al.*, 2016).

Las bacteriemias por *Enterococcus* ocurren en pacientes con factores de riesgo. Cepas de este género se aíslan con mayor prevalencia de hemocultivos obtenidos de bacteriemias nosocomiales documentadas, que generalmente no están asociadas a endocarditis. En las bacteriemias sin endocarditis, el tracto urinario es el origen/foco más común, aproximadamente en el 19 % al 43 % de los casos. La incidencia de bacteriemia nosocomial, debido a microorganismos altamente resistentes, aumentó 8,7 veces más rápido que las producidas por los microorganismos sensibles durante el período (1996-2005) de acuerdo con un estudio realizado

en Países Bajos (Ammerlaan *et al.*, 2009). Conde-Estevez *et al.*, (2010), estudiaron un total de 4.172 episodios de bacteriemia, de los cuales 261 (6,3 %) fueron causados por *Enterococcus* spp. y adicionalmente demostraron que el uso previo de cefalosporinas y carbapenémicos se asoció de manera significativa al desarrollo de bacteriemia por *E. faecium*. Así mismo el uso de penicilinas previo a procedimientos invasivos, aumentó la posibilidad de debutar con esta infección.

Enterococcus spp. se ubica en cuarto lugar de frecuencia como causa de infección nosocomial y la tercera causa de bacteriemia en EE.UU. (Conde-Estevez *et al.*, 2010). En Argentina, en 2012, se mostraron resultados de los principales patógenos causantes de bacteriemia y su resistencia a los ATM (Biondi *et al.*, 2012). En dicho estudio fueron analizados los resultados de hemocultivos de 11.863 pacientes (adultos y pediátricos). Los enterococos constituyeron el 4,7 % y se encontraron entre los principales cinco agentes etiológicos productores de bacteriemia en nuestro país. En otro trabajo publicado recientemente en Argentina, se analizaron 117 episodios de bacteriemia por enterococos y se demostró, al igual que otras investigaciones realizadas a nivel mundial, que los focos de origen mas prevalentes fueron el intraabdominal y el urinario. Los enterococos ocuparon el sexto lugar siendo el patógeno más frecuentemente aislado de bacteriemia intrahospitalaria (Manassero *et al.*, 2016). Otros como, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* también pueden producir infecciones del torrente sanguíneo (Britt & Potter, 2016).

La mayoría de los estudios publicados de bacteriemias por enterococos no son concluyentes a la hora de proponer una terapéutica antimicrobiana. En cuanto a RA no existe un consenso debido a la variabilidad genética que presenta este género tanto intraespecie como interespecie.

Los enterococos pueden producir también un cuadro de sepsis: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS o más conocido como SIRS, por sus siglas en inglés de *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) aunque generalmente lo hacen en pacientes con factores de riesgo graves como los oncohematológicos (Kumar *et al.*, 2015; Ceci *et al.*, 2015; Tedim *et al.*, 2016). La mortalidad de pacientes con sepsis producida por enterococos varía desde un 4 a un 50 % (Huycke *et al.*, 1996). Las cepas que pueden desencadenar este síndrome presentan características fenotípicas y genotípicas relevantes como: resistencia a AMP, linezolid (LZD) y

aminoglucósidos, son genotipos *vanA* o *vanB* y la mayoría son especie *E. faecium*, aunque también se describen sepsis por *E. faecalis*. Tedim *et al.*, (2017) demostraron la presencia de diferentes linajes clonales de *E. faecium* AMP resistentes investigando la dinámica clonal a largo plazo (años 1995-2015), en aislados provenientes de infecciones del torrente sanguíneo de un hospital español. La densa colonización por clones de enterococos de alto riesgo, particularmente en pacientes oncológicos y en pacientes ancianos se eleva por la exposición prolongada a los ATM.

I.4.4. Meningitis

La meningitis por enterococos es una patología infecciosa que no es frecuente (Knoll *et al.*, 2013). Se relaciona con factores predisponentes como el uso de inmunosupresores, alteraciones del sistema nervioso central (SNC), uso de catéteres, cirugía, traumatismo, etc. Los trabajos de investigación publicados sobre meningitis por enterococos son escasos y no existen indicaciones terapéuticas antimicrobianas de consenso (Pintado *et al.*, 2003). Por este motivo en estos pacientes se observa alta mortalidad (Kurup *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2006). Antonello *et al.* (2010) describieron un caso de meningitis por *E. gallinarum* en un paciente sin inmunosupresión. En la literatura existen escasos reportes publicados de meningitis por esta especie. En 2005, en Italia (Iaria *et al.*, 2005), se reportó el primer caso de meningitis por *E. casseliflavus* integrante de la microbiota habitual del TGI humano.

Meningitis neonatal por *Enterococcus* se estima que solo representa el 2 % del total de las meningitis neonatales y generalmente provienen post-bacteriemia (Bretón *et al.*, 2002). La meningitis neonatal está asociada a defectos anatómicos del SNC, a intervenciones neurológicas e infecciones del tracto urinario. Se observa mayormente en bebés de bajo peso al nacer. La ineficiencia en las prácticas del manejo del control de infecciones (lavado incorrecto de manos, etc.) elevan la tasa de IAAS en neonatos pudiendo luego iniciar el paciente con una meningitis post-bacteriemia, lo cual ha sido demostrado en hospitales pediátricos y unidades de neonatología (Fernández Jonusas *et al.*, 2011).

I.4.5. *Enterococcus* en osteomielitis, infecciones osteoarticulares o asociadas a implantes ortopédicos

Osteomielitis se define como inflamación del hueso por resultado de una infección (Descriptores en Ciencias de la Salud-Biblioteca virtual en Salud). Las osteomielitis y otras infecciones articulares producidas por especies de este género, han sido escasamente comunicadas. Están consideradas, históricamente, dentro del grupo de infecciones de difícil manejo, que a menudo su tratamiento se asocia a efectos secundarios graves (Graham *et al.*, 2004). Casos puntuales de osteomielitis por enterococos han sido observados en pacientes con patologías de base crónicas como DBT, artritis séptica en Lupus Eritematoso Sistémico o SIDA (De Benedictis & Gorecki, 1986; Holtom *et al.*, 2002). A su vez, muchos de los casos reportados son producidos por EVR. Generalmente esta patología se produce por complicación de una bacteriemia enterocócica y/o endocarditis (Mulleman *et al.*, 2006). Los reportes de casos clínicos de osteomielitis e infecciones osteoarticulares documentadas demuestran un denominador común: los pacientes afectados generalmente son adultos mayores, con enfermedades de base crónicas. La entidad infecciosa que se observa con mayor prevalencia es osteomielitis vertebral (Murillo *et al.*, 2015). Otras especies de *Enterococcus*, tal como *E. raffinosus*, de difícil identificación por métodos fenotípicos convencionales, pueden producir osteomielitis vertebral (Sandoe *et al.*, 2001).

Enterococos son agentes etiológicos productores de infecciones asociadas a implantes ortopédicos, una de las complicaciones mas desafiantes en traumatología y cirugía ortopédica. Entre 2000 y 2004, 43 cepas de *E. faecalis* fueron aisladas de infecciones de diferentes tipos de implantes ortopédicos de pacientes internados en el mayor Instituto de Ortopedia de Italia (*Rizzoli Orthopaedic Institute*) (Arciola *et al.*, 2007). Dichas cepas presentaron diferentes patrones de resistencia y se detectaron clones resistentes capaz de diseminarse para producir otras infecciones. *Enterococcus* spp. produce polisacárido capsular y *biofilm* que le permiten mejorar la colonización y la adherencia a superficies inertes como prótesis, catéteres e implantes ortopédicos (Teng *et al.*, 2002). El *biofilm* permite aumentar la hidrofobicidad celular (Fabretti & Huebner, 2005). La expresión de RA junto a la formación de *biofilm*, son dos características que acotan aún más las posibilidades de seleccionar ATM para erradicar enterococos de implantes ortopédicos y resolver la infección.

I.4.6. Infecciones de piel y partes blandas producidas por enterococos

Las infecciones de piel y partes blandas (IPPB) constituyen un conjunto de cuadros clínicos de distinta expresividad y gravedad que afectan la piel, el tejido celular subcutáneo y el músculo. Comprometen epidermis, dermis y tejidos subyacentes, incluyendo a la grasa subcutánea, fascias aponeuróticas y tejido muscular (White & Seaton, 2011). Integran un grupo de infecciones de mayor prevalencia en nuestro medio y son un problema importante para la Salud Pública. El microorganismo implicado en cada caso estará en relación con la localización de la lesión y la microbiota habitual del lugar, que en condiciones normales actúa como un inhibidor competitivo con los patógenos.

Las IPPB debido a *Enterococcus* spp. están aumentando a nivel mundial (Rajkumari *et al.*, 2014). Mendes *et al.*, (2015), realizaron un estudio multicéntrico donde participaron hospitales de países de Europa y de EE. UU. para probar la acción de oritavancin (ATM glicopéptido semisintético), en aislamientos clínicos de Gram (+) provenientes de IPPB. Se evaluaron 13.262 cepas patógenas gram positivas. En Europa, el porcentaje de enterococos aislados fue 5,6 % y en EE. UU. 2,7 %, demostrándose la presencia de bacterias del género en estudio como agente etiológico de IPPB. La emergencia de resistencia particularmente en *S. aureus* y enterococos, genera el cambio en la elección del tratamiento en IPPB y crea muchas veces escenarios en donde la decisión de la terapia antimicrobiana es, particularmente, un constante desafío (Siami *et al.*, 2001; Dhawan *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2015).

I.4.7. *Enterococcus* e infecciones asociadas a la atención de la salud

Infección nosocomial hoy denominada IAAS es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como: *“una infección que tiene lugar en un paciente durante su atención en un hospital u otro establecimiento de atención sanitaria, que no estaba presente o no se estaba incubando al momento de la admisión. Incluye las infecciones adquiridas en lugar de atención sanitaria que se presentan luego del alta, y las infecciones ocupacionales entre los trabajadores de la salud del establecimiento”* (<http://www.who.int>).

En el contexto hospitalario, bacterias de este género son patógenos microbiológicamente evolucionados que afectan generalmente a pacientes con co-morbilidades. Hace casi 20 años que

emergieron como patógenos nosocomiales a nivel mundial. Hoy se reportan publicaciones que demuestran la circulación de linajes de clones evolucionados y mejor adaptados al ambiente hospitalario. Analizando los diagramas de las estructuras poblacionales en *Enterococcus* y, aplicando programas bioinformáticos, se ha demostrado que cepas emergentes de *E. faecium* productoras de IAAS, integran 3 linajes de origen independiente (Willems *et al.*, 2012; Tedim *et al.*, 2015). En *E. faecalis*, cepas que integran los CC2 y CC9 son potencialmente las patógenas hospitalarias más importantes (Freitas *et al.*, 2016). Todos son clones de alto riesgo asociados a brotes intrahospitalarios en todo el mundo. Este escenario es posible por la naturaleza promiscua de cepas de este género y por la adquisición y/o recombinación de material genético por TGH (Top *et al.*, 2008; Faccone *et al.*, 2012; Mikalsen *et al.*, 2015; Gawryszewska *et al.*, 2016; Guzman Prieto *et al.*, 2016). En EE. UU. estas bacterias son la segunda causa de IAAS adquirida a través de infecciones del tracto urinario o bacteriemias asociadas a catéteres, seguida de abscesos pélvicos, intrabdominales ó de heridas post-quirúrgicas. En Europa, según datos del ECDC, enterococos ocupa el tercer lugar (9,6 %), luego de *E. coli* (15,9 %) y *S. aureus* (12,3 %), como agente productor de IAAS.

En nuestro país, son escasos los estudios de vigilancia epidemiológica en IAAS, solo existen datos parciales de estudios presentados en forma aislada e intermitente, sin embargo es posible describir un escenario de situación. Las IAAS más prevalentes en Argentina son neumonía nosocomial, infección del tracto urinario y del sitio quirúrgico (Rosenthal *et al.*, 2003; Rosenthal *et al.*, 2004; Durlach *et al.*, 2012). Quinteros *et al.*, comunicaron que *Enterococcus* spp. se ubica en sexto lugar como agente productor de IAAS con un 7 % de frecuencia de aislamiento determinado por estudios nacionales (Sistema Informático de Resistencia-Asociación Argentina de Microbiología). El Programa Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias de Argentina (VIHDA), con sede en el Instituto Nacional de Epidemiología “Dr. Juan H. Jara” de Mar del Plata, trabaja con una gran base de datos, que se conforma con registros de episodios de IAAS enviados por instituciones de salud, que integran esta red. En 2008, se publicaron los datos analizados de 53 hospitales. Enterococos no se encontró entre los tres microorganismos más prevalentes (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*) (Lossa *et al.*, 2008). Sin embargo, entre el 8-10 % de las IAAS documentadas en pacientes internados en el Hospital de

Clínicas José de San Martín, de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, fueron causadas por *Enterococcus* spp., durante el período 1996-2010 (Rodríguez *et al.*, 2013).

A nivel mundial, IAAS producidas por enterococos, se encuentran entre las 10 primeras y la mayoría de los aislamientos provenientes de muestras clínicas, corresponden a la especie *E. faecium*. Los EVR nosocomiales son, al igual que las bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y carbapenemasas, un problema de primer nivel para unidades hospitalarias y para el sistema de Salud Pública de un país. Las IAAS no solo son una causa importante de morbilidad sino que, en muchas ocasiones, aumentan la estancia hospitalaria de los pacientes y elevan los gastos en el sistema de salud (Cardona & Wilson, 2015).

I. 5. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE *Enterococcus* spp.

I.5.1. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de *Enterococcus* a nivel de género es simple y se realiza por tests bacteriológicos convencionales siguiendo, con algunas modificaciones, la metodología del esquema propuesto por Facklam, Carvalho & Teixeira (2002), entre otros. Sin embargo, en el diagnóstico bacteriológico de rutina la caracterización fenotípica, sobretudo de especies no *faecalis*, es controversial y se ha demostrado que puede dar resultados erróneos. Esto es debido a la diversidad de este género y a la heterogeneidad de sus características fenotípicas (Devriese *et al.*, 1993; Kirschner *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2016). Utilizando incluso kits comerciales (API 20 strep) o sistema Vitek versión VTK-R 9.01, han sido descritos errores de identificación (Blanco *et al.*, 2010). Morfológicamente los enterococos son células esféricas u ovoides, de tamaño $0,6-2,0 \times 0,6-2,5 \mu\text{m}$, que pueden presentarse bajo la observación microscópica de a pares (diplococos) o sueltos. Se pueden observar formando cortas cadenas, sobre todo cuando se los cultiva en medio líquido (Fotografía N° 1.A). En su pared poseen antígenos del grupo D de Rebecca Lancefield (ácido lipoteicoico) (Devriese *et al.*, 1993). Son anaeróbicos facultativos, no forman endosporas y algunas especies son móviles como *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*

(Koneman *et al.*, 2006), ó muestran una pigmentación amarilla (*E. mundtii*, *Enterococcus sulfureus*). La temperatura óptima de crecimiento es 35 °C, aunque pueden crecer dentro de un rango comprendido entre 10 y 45 °C. La literatura demuestra que muchas cepas pueden sobrevivir a 60 °C por 30 min o crecer en presencia de 6,5 % de NaCl y pH 9,6 (Devriese *et al.*, 2006). En placas de agar sangre se observan colonias cremosas de 1 mm a 2 mm de tamaño (Fotografía N° 1.B) que pueden producir hemólisis. La prueba de la catalasa resulta negativa para este género, aunque está descrito que algunas cepas pueden poseer una “pseudocatalasa”. La prueba de hidrólisis es positiva para L-pirrolidonil β -naftil-amida (PYR). La producción de gas, el crecimiento en agar con bilis esculina al 40 %, la actividad de leucina arilamidasa, la presencia de hemólisis en agar base Columbia con 5 % de sangre de carnero y la producción de acetoína, son otras pruebas bioquímicas que están dentro del esquema de su identificación.

Fotografía N° 1. A: Coloración de Gram. Se observa la morfología y la agrupación de *E. gallinarum*.

1.B: Placa con Agar Sangre Ovina (5 %) sembrada con técnica de 4^{ta} estría donde se observan colonias de *E. faecium* productoras de β -hemólisis (Foto de autora). Foto 1.A: Tomado de:

<http://microbe-canvas.com/index.php>. ERASMUS MC.

Otras pruebas que se realizan son: hidrólisis de LAP (leucina-amino-peptidasa), la observación de producción de pigmento, la utilización de piruvato, el estudio de tolerancia al telurito 0,04 %, hidrólisis de arginina y la formación de ácido en caldo con metil- α -D-glucopiranosido. Para la caracterización de especies de enterococos son necesarios estudios más complejos (Figura N° 5). Los mismos implican investigar la fermentación de hidratos de carbono, como: glucosa, melibiosa, adonitol, D-rafinosa, lactosa, melezitosa, ramnosa, manitol, sorbitol, L-arabinosa, L-sorbosa, rafinosa, trehalosa, D-xilosa, ribosa, sacarosa y D-arabitol (Facklam, Carvalho & Teixeira, 2002). Sobre la base del esquema propuesto de la Figura N° 5 se ubica a las

especies en diferentes grupos. *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies más aisladas de muestras clínicas humanas, pertenecen al Grupo II, que se compone de especies que forman ácido en caldo manitol, hidrolizan la arginina, pero no forman ácido en caldo sorbosa. Debido a la resistencia que presentan ciertas especies de enterococos frente a VAN y al impacto que produce el hallazgo de cepas EVR en instituciones de salud, la prueba de *screening* para la rápida detección de resistencia a este antibiótico, completa el diagnóstico fenotípico. La misma se realiza por sembrado de la bacteria en placas de agar cerebro corazón con el agregado de 6,0 mg/L del ATM.

La problemática de la identificación precisa de las especies de este género, lleva a desarrollar, investigar y comparar otras metodologías diagnósticas (Fang *et al.*, 2012). Existe evidencia científica que muchas especies no se incluyen dentro de algunos esquemas de identificación fenotípica, como el observado en la Figura N° 5 (Facklam & Collins, 1989; Kirschner *et al.*, 2001). *Enterococcus cecorum* es parte de la microbiota intestinal de cerdos, aves, perros, gatos y otros (Devriese *et al.*, 1991). Sin embargo, esta descripto su participación como agente etiológico en infecciones humanas graves como sepsis, donde el tratamiento antimicrobiano debe ser rápido y eficaz (Delaunay *et al.*, 2015; Warnke *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2016). Por otra parte, se observa que *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* así como *E. cecorum*, especies que también necesitan metodología diagnóstica complementaria (análisis de secuencias comparativas de 16S ARNr y ADN-ADN hibridación) han incrementado significativamente su incidencia en aislados clínicos (Prakash *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2012). Otras investigaciones han demostrado también, que existen dificultades en la identificación, especialmente utilizando kits comerciales como el sistema API 20 S system (Biomérieux), sobretodo para discriminar especies diferentes a *E. faecalis* y a *E. faecium* (Ruoff *et al.*, 1990; Buschelman *et al.*, 1993; Sader *et al.*, 1995; Ke *et al.*, 1999). Fang *et al.*, (2012), mostraron escasa eficiencia del sistema VITEK 2 en la detección de otras especies del género, dicha metodología diagnóstica es fiable para *E. faecalis* y *E. faecium*. Han pasado casi más de 20 años y los errores en la identificación precisa de especies de este género siguen reportándose. Es por ello que hoy se utilizan combinaciones de test fenotípicos con proteómica y genómica, para elevar la sensibilidad y la especificidad en la identificación en laboratorios de mediana y alta complejidad.

Figura N° 5. Esquema básico de identificación fenotípica para el género *Enterococcus* spp.
Adaptado de: Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schrenkenberger P, Woods G. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6^{ta} ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2008.

I.5.1.a) Variantes morfológicas de colonias: otro desafío en la caracterización fenotípica de *Enterococcus* spp.

Las variantes de colonias pequeñas fueron descritas hace años atrás para especies como *S. aureus*, *E. coli* o *P. aeruginosa* (Abele-Horn *et al.*, 2000; Evans, 2015). En el género *Enterococcus* es muy raro que se presente tal situación. Sin embargo, un número mayor de investigadores han comenzado a reportar la presencia de estas colonias (Proctor *et al.*, 2006; Wellingshausen *et al.*, 2009; Aspiroz *et al.*, 2013; Freitas *et al.*, 2016; Ogihara *et al.*, 2016).

Recientemente Ogihara *et al.*, (2016) reportaron el primer caso de endocarditis infecciosa debida a variantes de colonias pequeñas de *E. faecalis* en Japón, la cepa no pudo ser identificada usando métodos bioquímicos convencionales, solo la secuenciación del gen 16S ARNr indicó que en el cultivo, había desarrollado una variante de colonia pequeña correspondiente a esta especie.

Las variantes de colonias pequeñas son subpoblaciones de bacterias con fenotipo inestable, que crecen lento y poseen fermentación reducida de azúcares. Estas características bioquímicas conllevan a que muchas veces sean identificadas de manera incorrecta. Estas cepas pequeñas están asociadas con infecciones graves recurrentes y persistentes como osteomielitis, artritis, abscesos y endocarditis infecciosa y se ha observado que son capaces de persistir de forma intracelular en la células del huésped (Proctor *et al.*, 2006). Estas particularidades hacen que su hallazgo, deba ser confirmado con metodologías moleculares y test bioquímicos específicos ya que su presencia en el paciente puede generar fracasos terapéuticos.

I.5.2. Caracterización de *Enterococcus* spp. por espectrometría de masas

La tecnología MALDI TOF-MS traducida al español como “desorción láser asistida por la matriz con detección de masas por tiempo de vuelo” es utilizada en microbiología general hace más de 20 años en países desarrollados (Legarraga *et al.*, 2013). Es una técnica de alta sensibilidad, aplicada para identificar microorganismos mediante proteómica. Se fundamenta en el análisis de patrones de proteínas ribosomales, de amplio rango de pesos moleculares, que pertenecen a colonias bacterianas aisladas de una muestra. Dos a tres colonias se mezclan en pequeñas proporciones con 1 µL de *matrix* (solución saturada de ácido α -ciano-4-

hidroxicinámico: HCCA) en una pequeña placa de metal que corresponde a la tarjeta de análisis. La composición de la matriz varía de acuerdo al bioanalito que se quiere detectar. Esta absorbe luz láser y vaporiza iones que son separados de acuerdo con su carga/masa (m/z), la cantidad de cada ión es determinada posteriormente por su tiempo de vuelo TOF (*time of flight*). De esta manera se obtiene un espectro de masas que es específico de cada especie y género bacteriano, denominado “huella peptídica”. La ionización se conoce como “*soft-ionization*” porque permite ionizar biomoléculas (péptidos y proteínas). El equipo compara el espectro obtenido de cada aislamiento microbiano con los de su base de datos (MALDI *Biotyper software*). Un *score* o puntos son utilizados para realizar la identificación.

La necesidad de una rápida y precisa identificación de microorganismos resistentes y productores de infecciones graves, ha llevado a desarrollar otras metodologías diagnósticas que puedan ofrecer resultados confiables, rápidos, con bajo consumo de muestra y de insumos. *Enterococcus* spp. es agente etiológico de patologías infecciosas graves descritas en el punto 1.4 (Kristich *et al.*, 2014). Con la utilización de espectrometría de masas se disminuye en horas el resultado, a diferencia de la identificación realizada por pruebas bioquímicas convencionales. Una identificación a nivel de especie por metodologías analíticas rápidas, permite orientar una terapéutica y comenzarla en menor tiempo, sobre todo en infecciones invasivas. Está demostrado que el retraso en el inicio de una terapéutica antimicrobiana efectiva es una variable clínica determinante para la sobrevida en pacientes con shock séptico (Kumar *et al.*, 2006).

El sistema MALDI TOF-MS permite también llevar a cabo la identificación rápida de microorganismos directamente a partir de diferentes muestras clínicas (por ej. orina, hemocultivos), siempre y cuando en la muestra no existan otros bioanalitos que puedan interferir en la lectura. Esta metodología puede discriminar cepas EVR de cepas sensibles a VAN y permite tomar medidas rápidas para evitar su diseminación intrahospitalaria (Griffin *et al.*, 2012). La metodología láser por espectrometría de masas, para detectar bioanalitos en una muestra biológica, se utiliza desde los años 70 (Beavis & Chait, 1996). Sin embargo, su uso en laboratorios de microbiología clínica comenzó hace muy poco tiempo atrás en Argentina.

I.5.3. Caracterización genotípica

I.5.3.a) Macrorrestricción de ADN utilizando electroforesis de campo pulsado

Electroforesis de Campo Pulsado en inglés ***P**ulsed **F**ield **G**el **E**lectrophoresis* (PFGE) es otra técnica genética que permite caracterizar aislamientos microbianos sobre la base del perfil de pulsotipos o “huella genética”, obtenidos por macrorrestricción del ADN total de la bacteria. Fue desarrollada por David C. Schwartz y Charles R. Cantor en 1984 quienes probaron dicha técnica utilizando cromosomas de levaduras (Schwartz & Cantor, 1984). PFGE permite evaluar cepas que se encuentran asociadas en tiempo y espacio, aunque a diferencia de MLST, no es muy útil para hacer seguimiento de las mismas en estudios ancestrales evolutivos. Para digerir el ADN la técnica utiliza enzimas (endonucleasas) de corte específico y de baja frecuencia de corte. El uso combinado de PFGE con endonucleasas de restricción, permite la obtención de patrones de restricción cromosómico que son característicos de cada género y especie bacteriana.

Por acción de la corriente eléctrica multidireccional, los fragmentos de ADN migran a través de un gel de agarosa de acuerdo a su peso molecular, que oscilan entre 10 Kb a 10 Mb y forman los pulsotipos correspondientes. PFGE puede ser utilizada para estudios de brotes, para investigar la relación filogenética ó para vigilancia epidemiológica. Tiene ventajas y desventajas, dentro de las primeras se puede expresar que es una técnica que posee alto poder de discriminación entre aislados cuando los pulsotipos son bien analizados (Tenover *et al.*, 1995). También permite la comparación de geles intra e inter-laboratorios y trabajar conjuntamente hasta con 30 muestras a la vez. Su reproducibilidad es muy buena así como su alto poder de discriminación. Sin embargo, algunos reportes sugieren que la variación en la intensidad de las bandas puede producir resultados ambiguos cuando se interpretan grupos clonales y se comparan con otros laboratorios. Como desventajas se puede enumerar el alto costo de su equipamiento, el cual se compone de una cuba electroforética, una unidad de control de pulsos-generator de corriente, una bomba de recirculación del tampón/buffer y el módulo de enfriamiento ó *cooling module*. El funcionamiento del equipo de PFGE, normalmente requiere voltajes elevados por muchas horas (≥ 20 h), lo cual hace necesaria la recirculación y refrigeración del tampón de electroforesis. PFGE es una técnica muy laboriosa; la preparación de muestras y la colocación de *plugs* o tacos en los bloques de agarosa son de realización manual y la técnica completa demanda

aproximadamente una semana de trabajo. La reproducibilidad es óptima, si se logran controlar algunas variables críticas como por ejemplo, comenzar con un aislamiento de ADN cromosómico íntegro, puro y sin fracturas. De esta manera las enzimas de restricción pueden cortar correctamente el ADN. La elección de la enzima es otra variable independiente a tener en cuenta. En general, las enzimas con un lugar de restricción rico en GC son adecuadas para tratar el ADN de especies con genoma rico en AT y a la inversa (Coll *et al.*, 2005).

Para el análisis del patrón de bandas que se resuelven con PFGE, se han establecidos categorías de relación entre cepas. Los conceptos a describir son: cepas “idénticas”, “probablemente relacionadas”, “posiblemente relacionadas” o “distintas”. Tenover *et al.*, en 1995 describió los criterios de interpretación de patrones obtenidos por PFGE: **a.** “idénticas” es cuando el número de diferencias genéticas comparado con la cepa del brote es igual a cero, así como cuando no hay diferencia en los fragmentos de los pulsotipos; **b.** “probablemente relacionadas” es cuando el aislamiento es probablemente parte del brote y cuando el número de diferencias genéticas es 1; **c.** “posiblemente relacionadas” es cuando el aislamiento es posiblemente parte del brote, es decir el número de diferencias genéticas es 2 y la diferencia de los fragmentos del pulsotipo es entre 4 y 6; y **d.** “distintas” o “no relacionadas” cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6. Por lo que las cepas con estas últimas características pertenecerán a clones distintos, sin relación epidemiológica.

I.5.3.b) *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) y su aplicabilidad en la identificación de linajes genéticos para *E. faecalis* y *E. faecium*

Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci o *Multilocus sequence typing* (MLST) es una metodología de tipado de alta sensibilidad y especificidad, que utiliza técnicas moleculares para caracterizar y discriminar inequívocamente aislamientos bacterianos. Fue desarrollada por Martin Maiden (Departamento de Zoología, Universidad de Oxford), Dominique Caugant, Ian Feavers, Mark Achtman y Brian Spratt en 1998 (Maiden *et al.*, 1998; Spratt, 1999). Se fundamenta en la detección de fragmentos internos de 7 genes *house-keeping* o constitutivos, amplificados por PCR (reacción en cadena de polimerasa), que luego son secuenciados y posteriormente analizados comparativamente. Cada gen ubicado en el ADN microbiano posee

aproximadamente 350 a 600 pb (Ruiz Garbajosa *et al.*, 2006). Estos genes son aquellos que siempre se expresan, ya que participan del metabolismo básico de la célula procariota bacteriana. El estudio del polimorfismo en estos 7 genes, permite trazar líneas genéticas epidémicas, integradas por complejos clonales de alto riesgo y a su vez permite establecer estructuras poblacionales y determinar la relación epidemiológica entre cepas bacterianas de una misma especie.

Aquellas bacterias que tienen su esquema de MLST desarrollado y validado, se publican en una base de datos *on-line* y gratuita: <http://pubmlst.org/>. Las secuencias de cada gen son incorporadas a dicha base de datos (www.mlst.net) y posteriormente comparadas con los demás alelos del mismo gen, según el microorganismo analizado. Para cada uno de los siete genes existen diferencias en la secuencia dentro de una especie bacteriana que se asignan como alelos distintos y por cada aislamiento, los alelos de cada gen en cada *loci*, definen el tipo de secuencia (ST) o perfil alélico único. El conjunto de ST de una determinada especie bacteriana forma los CC, definidos como grupos de ST relacionadas entre sí, que comparten al menos cinco de siete alelos con otros ST del mismo grupo (Ruiz Garbajosa *et al.*, 2007). Aquellos ST que no se pueden asignar a ningún grupo se denominan *singletons* y hace referencia a los aislamientos que no pertenecen a ningún CC en una muestra.

Los datos generados por MLST se utilizan para identificación microbiana, para estudios de evolución y diversidad biológica de poblaciones de un amplio rango de bacterias y hongos. También permiten revelar información genética que interesan para el análisis de filogenia y evolución bacteriana. MLST permite ampliar las conclusiones obtenidas por otra técnica de identificación genética como el campo pulsado, debido a que si bien esta última metodología brinda información respecto a la relación clonal entre brotes inter o intra-hospitalarios, no muestra la evolución clonal de los mismos a nivel local y global. MLST es una tecnología de punta para investigar y comparar la epidemiología bacteriana global o local de regiones geográficas diferentes, que sirve para detectar y para observar el movimiento o diseminación de clones. Tal es el ejemplo de la identificación del CC17 de *E. faecium* ó el CC2 y CC9 de *E. faecalis*. Dichos CC se encuentran integrados por clones intrahospitalarios emergentes con resistencia a VAN y han sido definidos como CC de alto riesgo, por su adaptación nosocomial y su dispersión en diferentes países y continentes (Guzman Prieto *et al.*, 2016). El análisis

bayesiano (BAPS), que permite inferir con el uso de *software* bioinformáticos las variabilidades genéticas determinadas por MLST de una determinada población bacteriana, confirmó que para *E. faecium* existen dos grandes grupos filogenéticos, designados clado A y clado B. Clado A comprende aislamientos provenientes de humanos y animales, siendo A1 enriquecido con aislados de pacientes hospitalizados (Lebreton *et al.*, 2013; Tedim *et al.*, 2015). Clado B, incluye aislados humanos de base comunitaria. Los linajes del tipo de secuencia ST17, ST18 y ST78 se encuentran dentro del clado A1, integrado por cepas resistentes a los ATM y asociadas al entorno hospitalario. Una mutación, duplicación, delección o cambio de base nucleotídica, son variaciones genéticas que pueden ser detectadas secuenciando cada gen del esquema de MLST (Maiden, 2006). Los datos de PubMLST.org se actualizan constantemente y son de acceso libre y gratuito. A medida que nuevas combinaciones de alelos se detectan debido a alguna variación genotípica, son asignados nuevos ST. Esto permite la comparación de datos entre diversos laboratorios en tiempo real y a nivel mundial, así como también permite conocer la distribución de linajes genéticos según reservorio en estudio.

Para el género *Enterococcus* se han desarrollado esquemas de MLST para *E. faecalis* y *E. faecium* (Homan *et al.*, 2002; Ruiz Garbajosa *et al.*, 2006). Los genes específicos para detectar el perfil alélico en *E. faecalis* son: *gdh* (codifica para enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gyd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *pstS* (transportador del casete de unión de ATP-fosfato), *gki* (glucoquinasa), *aroE* (shikimato 5-deshidrogenasa), *xpt* (xantina fosforribosiltransferasa) y *yiqL* (acetil-CoA acetiltransferasa). Para *E. faecium*: *adk* (adenilato quinasa), *atpA* (ATP sintetasa, subunidad alfa), *ddl* (D-alanina: D-alanina ligasa), *gyd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *purK* (codifica la subunidad fosforibosilaminoimidazol carboxilasa adenosintrifosfatasa) y *pstS* (transportador del casete de unión de ATP-fosfato).

Actualmente existen muchos alelos de cada gen, lo que permite que hasta la fecha se conozcan 895 ST o perfiles alélicos para *E. faecalis* y 1485 ST para *E. faecium*. Estos números van en aumento exponencial a medida que se secuencian más genes de cepas aisladas de diversos nichos ecológicos. Con la información que procede del análisis bioinformático realizado según datos obtenidos por MLST, es posible conocer los ST y los CC circulantes en una institución

determinada, compararlos a nivel local, regional y global, así como determinar que tipo de clon infecto/enfermó a un paciente. Así mismo, permite conocer las características que hacen a la virulencia de una cepa enterocócica determinada. Aquellos aislados con el mismo perfil alélico, se asignan como miembros del mismo clon. MLST presenta un valor agregado, no solo porque permite observar la evolución de clones bacterianos dependiendo de la carga genética del nicho ecológico en el que se encuentran, sino también, porque permite detección de CC de alto riesgo epidemiológico y la observación de la evolución de la virulencia. Esto podría predecir resistencias emergentes futuras para ajustar conductas desde el comité de control de infecciones.

La tipificación microbiana realizada con la combinación criteriosa y precisa de técnicas proteómicas y genómicas permite la diferenciación de aislados relacionados epidemiológicamente dentro de una misma especie bacteriana. Su correcta utilización muestra la posible fuente y la vía de transmisión de microorganismos que causan brotes de enfermedades infecciosas. Por este motivo, son aplicadas sobre aislados microbianos en investigación básica que incluyen estudios de estructuras de poblaciones bacterianas y diversidad genética microbiana en diversos ecosistemas (van Belkum *et al.*, 2007).

1.6. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN EL GÉNERO *Enterococcus*: UN PROBLEMA IMPORTANTE PARA LA SALUD PÚBLICA

La RA en el género *Enterococcus* es motivo de constantes investigaciones en la comunidad científica. Esta problemática es multifactorial y junto a la multirresistencia de otros géneros bacterianos, continúan siendo temas de primer orden en la agenda de la OMS. Las infecciones enterocócicas hoy constituyen desafíos para la Salud Pública del siglo XXI, debido al incremento en la prevalencia de cepas resistentes a concentraciones terapéuticas de la mayoría de los ATM bactericidas utilizados para su tratamiento (Guzman Prieto *et al.*, 2016; Tedim *et al.*, 2017).

En este contexto, Argentina, decidió a través del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, formar parte de EXEDRA por sus siglas en inglés “*Expansion of the European Joint Programming Initiative on Drug Resistance to Antimicrobials*”, el cual es un

proyecto global de investigación y desarrollo de herramientas para combatir la RA. Nuestro país es el primero de latinoamérica en participar de este programa. Por otra parte, los EVR integran el grupo de patógenos ESKAPE: *E. faecium* resistente a VAN, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEEs, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y especies de *Enterobacter*. Este grupo está formado por microorganismos que representan problemas clínicos relevantes, se asocian a infecciones graves, presentan mecanismos de resistencia e incrementan la morbimortalidad de los pacientes (Santajit S & Indrawattana, 2016; 27 DE FEBRERO DE 2017 | GINEBRA - OMS - Comunicado de Prensa). Adicionalmente, la OMS diseñó una lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos ATM. Esta lista se divide en tres tipos de prioridad: bacterias con prioridad crítica; bacterias con prioridad elevada y bacterias con prioridad media. EFMVR se ubican en primer lugar en la lista de prioridad elevada.

Los aislamientos clínicos de enterobacterias productoras de carbapenemasas (enzimas que inactivan ATM como IMP, meropenem, doripenem y ertapenem) provenientes de hospitales de Argentina, es otro problema de RA preocupante en nuestro país (Lazovski *et al.*, 2017). Los primeros hallazgos de su presencia, se detectaron a partir de 2006 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, con el correr de los años, su diseminación ha ido en aumento (De Belder *et al.*, 2017).

Bacterias del género *Enterococcus* son patógenas oportunistas que utilizan “capitalismo genético” para mejorar su adaptabilidad, adquiriendo nuevos determinantes genéticos que expresan para un mecanismo de resistencia o virulencia particular (Baquero *et al.*, 2003; Willems *et al.*, 2005). La modificación de su genoma accesorio, permite optimizar la colonización y la multiplicación en superficies bióticas y abióticas. Por medio del capitalismo genético, la bacteria más resistente tiende a ser aún más resistente y el microorganismo adaptado, tiende a adaptarse mejor.

La transferencia y diseminación de genes de resistencia desde los enterococos hacia otras bacterias, es posible entre los diferentes ecosistemas como se ilustra en la Figura N° 6. El denominado microbioma medioambiental con su resistoma, puede diseminar genes hacia organismos humanos o animales y de ellos hacia bacterias patógenas (Perry *et al.*, 2014). Si bien el proceso de transferencia desde el medioambiente al entorno humano es azaroso, cuanta más

presión antimicrobiana exista en ciertos nichos ecológicos, mayor será la probabilidad que un determinante genético sea expresado, transferido y/o diseminado. Un ejemplo lo constituye el uso masivo de ATM glucopéptidos como la avoparcina, utilizada como promotor de crecimiento en sistemas *feedlots* animales, hecho que desencadenó en Europa la resistencia a VAN en enterococos. El ingreso de bacterias resistentes desde la comunidad hacia el ámbito hospitalario es posible y se postula como hipótesis. Lo mismo ocurre con el ingreso de enterococos resistentes vía cadena alimenticia, a través de la ingesta de alimentos de origen animal hacia el tracto digestivo humano (Delpech *et al.*, 2013; Delpech *et al.*, 2016). La circulación/recirculación de enterococos que habitan diversos nichos (Figura N° 6), permitiría el intercambio del *pool* de genes de resistencia por TGH hacia sus mismas especies o, hacia otros géneros bacterianos (Sparo *et al.*, 2012).

La resistencia en *Enterococcus* spp. es de dos tipos: intrínseca, la cual es cromosómica y se transmite de generación en generación y adquirida, dada por el mecanismo de TGH mediante adquisición de elementos genéticos móviles como plásmidos conjugativos y/o transposones. Otra manera de disminuir la sensibilidad a los agentes terapéuticos es por mutaciones puntuales, las que pueden producirse en determinantes genéticos que expresarán posteriormente mecanismos de resistencia. La primera línea de ataque con antiinfecciosos para cepas clínicas de enterococos está dada por betalactámicos, aminoglucósidos y glucopéptidos; combinados o solos, es el tratamiento de elección para infecciones graves. La tasa de resistencia a estos grupos de ATM se elevó y continúa creciendo exponencialmente en la última década. Esta situación va acotando drásticamente las opciones terapéuticas utilizadas para lograr la esterilización de sitios anatómicos infectados con cepas resistentes o multirresistentes. La resistencia es variable intraespecie e interespecie, por lo que para un tratamiento antimicrobiano efectivo se necesitará identificar correctamente la especie involucrada, detectar los perfiles de resistencia presentes en cada aislado y conocer la localización y la severidad del proceso infeccioso.

El ECDC y CDC, estandarizaron la terminología internacional para definir bacterias con resistencia multidroga (MDR), extremadamente resistentes (XDR) y pan-resistentes (PDR) (Magiorakos *et al.*, 2012). En particular para *Enterococcus* spp. el criterio de definición establecido para MDR es: cepa aislada no susceptible a uno o más ATM en tres o más categorías (familias) de ATM, para XDR: cepa aislada no susceptible a uno o más ATM en todas las

categorías, excepto en dos o menos de dos categorías y para PDR: cepa resistente a todos los ATM disponibles.

Figura N° 6. Esquemización de las posibles vías de diseminación de bacterias resistentes (BR) entre el ecosistema humano, animal y la microbiota ambiental. Diagrama realizado con imágenes libres de derechos de autor.

I.6.1. Resistencia intrínseca o natural

Los enterococos son intrínsecamente resistente a cefalosporinas, a trimetoprima/sulfametoxazol o cotrimoxazol y a concentraciones clínicas-terapéuticas de aminoglucósidos y CLI (lincosamida) (Kristich *et al.*, 2014). *E. faecalis* es naturalmente resistente a Q/D (estreptogramina de tipo B y de tipo A), debido a que son resistentes a la estreptogramina A.

La AMP o PEN son los ATM betalactámicos más utilizados para infecciones por esta bacteria. Sin embargo, especies *E. faecium* y *E. faecalis* poseen cierta resistencia natural intrínseca ó “*resistoma intrínseco*” que difiere, según los diferentes betalactámicos (Cercenado, 2011; Gagettti *et al.*, 2018). Mientras que ésta resistencia es ocasionalmente observada en *E. faecalis*, principalmente por producción de una β -lactamasa, en *E. faecium* la resistencia es muy frecuente sobretodo en cepas asociadas al ambiente hospitalario, y se debe principalmente a alteraciones en las proteínas ligadoras de PEN (mutación gen *pbp5*). La resistencia intrínseca de bajo nivel a los aminoglucósidos se observa con CIM entre 4-64 $\mu\text{g/mL}$ para GEH y 16-256 $\mu\text{g/mL}$ para STH. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* tienen resistencia intrínseca de bajo nivel a VAN (CIM=2-32 $\mu\text{g/mL}$), dado por la presencia de operones *van* en sus genomas: *vanC1*, *vanC2* y *vanC3*. El fenotipo VanC es natural (constitutivo), sus genes se encuentran localizados en el cromosoma de las tres especies antes mencionadas. Si bien antes se pensaba que, por su ubicación, no eran transferibles, hoy existe evidencia científica que demuestra su TGH desde *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* hacia *E. faecalis* (Schwaiger *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2013). Esto se debe a que, se demostró la localización del operon *vanC* en ADN plasmídico, así como en una región transferible del cromosoma, como por ejemplo un transposón (Schwaiger *et al.*, 2012; de Garnica *et al.*, 2013). Adicionalmente, Sun *et al.*, (2014) publicaron el primer reporte de la presencia del gen *vanC₁* en un *E. faecium* aislado de hemocultivo.

La tolerancia de una bacteria es otro concepto importante desde el punto de vista microbiológico, se define cuando la relación CBM/CIM de la misma resulta mayor o igual a 32. Sin embargo, utilizando métodos de cinética de muerte o *killing curve* se puede observar tolerancia resultando ésta un parámetro clínicamente importante (Sader *et al.*, 2006). Un ejemplo lo constituye *E. faecalis*, que se inhibe con concentraciones muy bajas de AMP y no se logra bactericidia ni siquiera frente a concentraciones 200 veces mayores de este ATM, es decir, es "tolerante". Para detectar *in vitro* bactericidia, es necesario utilizar curvas de muerte microbianas, las cuales tienen por finalidad evaluar en función del tiempo, la eficacia de diferentes concentraciones fijas de un ATM o combinación de ATM, a fin de poder seleccionar aquellas que muestren capacidad de reducir UFC en $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL respecto al inóculo inicial a tiempo cero. Para definir la presencia de sinergia bactericidia la disminución del inóculo deberá ser $\geq 2 \log_{10}$ UFC/24 h en la curva de asociación, respecto a la del ATM más activo (Pankey & Sabath, 2004).

I.6.2. Resistencia adquirida

Enterococcus puede adquirir resistencia a muchas familias de ATM como β -lactámicos, glucopéptidos, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, oxazolidinonas, lipopéptidos, estreptograminas y glicilciclina (Hollenbeck & Rice, 2012). La resistencia adquirida se da por TGH que permite obtener material genético extracromosómico, utilizando mecanismos de conjugación, optimizados por el sistema de feromonas sexuales. TGH tiene un papel crucial en la adaptación bacteriana a nichos ecológicos específicos, ya que permite la modificación del genoma accesorio de la bacteria. *Enterococcus* posee un genoma plástico, capaz de recibir, transmitir y diseminar RA, tanto a especies de su mismo género como de otros géneros bacterianos, tal es el caso de *S. aureus*.

La RA a través de mutaciones puntuales en objetivos diana es otro modo de resistencia adquirida. Este mecanismo se observa generalmente en cepas que se encuentran bajo presión antimicrobiana o bajo concentraciones intermitentes, pero constantes, de detergentes/antisépticos/desinfectantes, como las que existen en el medioambiente hospitalario. Especies de enterococos pueden mutar *in vivo* bajo tratamiento antimicrobiano (Massa *et al.*, 1998). La selección de mutantes resistentes es factible clínicamente en pacientes que reciben terapéutica antimicrobiana por períodos prolongados (Ver Figura N° 4), y se conoce que moléculas como rifampicina o ciertas quinolonas pueden generar poblaciones mutantes de enterococos.

I.6.2.a) Resistencia de *Enterococcus* spp. a glucopéptidos

La resistencia a esta familia tiene un gran impacto clínico y epidemiológico en salud humana a nivel mundial. VAN se descubrió en los años 50 cuando se intentaba buscar otras opciones terapéuticas frente a la emergencia de *S. aureus* resistentes a PEN. La molécula se aisló a partir de *Streptomyces orientalis* y fue denominada en 1952 “compound 05865” (Levine, 2006). Posteriormente, al ser introducida al mercado farmacéutico y por su uso masivo en la era de los 80, surgieron en 1986 cepas EVR que produjeron un brote de IAAS, en una Unidad de Nefrología de un Hospital del Reino Unido (Uttley *et al.*, 1989) y luego se reportaron en Francia

y en EE. UU. (Leclercq *et al.*, 1988; Murray, 2000). Hoy, a casi más de 60 años, EVR continúa siendo un desafío clínico-terapéutico en microbiología (Miller *et al.*, 2016).

Sobre la base del perfil bioquímico de resistencia a VAN y TEC, se designaron fenotipos denominados Van. El “alfabeto Van” actualmente se compone de nueve fenotipos: VanA, VanB, VanC1 (*E. gallinarum*), VanC2/C3 (*E. casseliflavus*/*E. flavescentis*), VanD, VanE, VanG, VanL, VanM y VanN (Teo *et al.*, 2011; Cattoir & Leclercq, 2013; Chen *et al.*, 2015). Los fenotipos VanA y VanB son los detectados con más prevalencia en muestras clínicas humanas. VanA produce resistencia inducible de alto nivel a VAN (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) y a TEC (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$). VanB se observa fenotípicamente con resistencia a VAN inducible de alto o bajo nivel (CIM = 4-1024 $\mu\text{g/mL}$) y sensible a TEC (Tabla N° 2). Desde el punto de vista genético, ambos operones son epidemiológicamente importantes ya que su ubicación en elementos genéticos móviles, como transposones (*vanA* en el Tn1546 y *vanB* en el Tn1549 y Tn5382), que a su vez se localizan en plásmidos transferibles, permiten su transferencia horizontal y su rápida diseminación (Garnier *et al.*, 2000). El mecanismo bioquímico de resistencia para glucopéptidos se produce por modificación del sitio diana. VAN actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse al extremo D-alanina-D-alanina del pentapéptido precursor del peptidoglicano. Cepas resistentes de enterococos modifican este aminoácido terminal, insertando lactato (D-Ala-D-lactato) o bien serina (D-Ala-D-serina) y la bacteria continúa normalmente con la síntesis de pared celular (Figura N° 7). La emergencia de EVR y su epidemiología global mundial fue diferente según el continente Europeo y Americano. EVR surgió desde el ambiente intrahospitalario en EE. UU. y actualmente más del 60 % de *E. faecium* provenientes de pacientes de UTI, son resistentes a glucopéptidos (Cercenado, 2011). *E. faecium* AMP resistente son endémicos en hospitales de EE. UU., con prevalencias actualmente cercanas al 90 % (Hidron *et al.*, 2008). En Europa, el uso indiscriminado de avoparcina (hoy prohibido) como promotor de crecimiento animal, provocó la emergencia de EVR en animales de granja, en el medio ambiente y en alimentos y no era un hecho frecuente aislarlos de pacientes hospitalizados. El primer aislamiento de EFMVR fenotipo VanA fue aislado en nuestro país y en Latinoamérica en 1996 (Marín *et al.*, 1998). Posteriormente, se reportan dos aislados con otro genotipo (operón *vanB*) en 2 pacientes sin internación previa, ni tratamiento prolongado con ATM, complicando el perfil epidemiológico de EVR en Argentina (Miranda *et al.*, 2003). Los genotipos *vanA* y *vanB* son hoy

los que circulan en nuestro país en mayor porcentaje y el complejo clonal de alto riesgo CC17 es el que se encuentra diseminado en hospitales de Argentina (Corso *et al.*, 2007).

Tabla N° 2. Fenotipos de resistencia a glucopéptidos en el género *Enterococcus*.

Adaptado de Cercenado, 2011.

Fenotipo	Ubicación gen	VAN [*] CIM µg/mL	TEC [†] CIM µg/mL	Tipo de Resistencia	Transferible
VanA	Plásmido	16 - $\geq$ 1000	16 - 512	Adquirida	Si
VanB	Plásmido	4 - $\geq$ 1000	0,25 - 2	Adquirida	Si
VanC	Cromosoma	2 - 32	$\leq$ 0,5	Intrínseca	Si ^{**}
VanD	Plásmido	16 - 128	2 - 4	Adquirida	No
VanE	Cromosoma	8 - 32	0,5	Adquirida	No
VanG	Cromosoma	$\leq$ 16	$\leq$ 0,5	Adquirida	No
VanL	Cromosoma	8	0,5	Adquirida	No
VanM	Plásmido	$>$ 256	96	Adquirida	Si
VanN	Plásmido	16	0,5	Adquirida	Si

*: vancomicina; †: teicoplanina; **: Schwaiger *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2013.

Figura N° 7. Mecanismo de acción de vancomicina inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Figura adaptada con permiso cedido por la Dra. Bárbara Murray. Murray, 2000.

I.6.2.b) Resistencia de *Enterococcus* spp. a los aminoglucósidos

La resistencia intrínseca de estas bacterias, a concentraciones clínicas terapéuticas de ATM bactericidas, se da como consecuencia de una permeabilidad disminuída a los aminoglucósidos hacia el interior bacteriano, sobretudo en *E. faecalis* (Hollenbeck & Rice, 2012). Sin embargo, el mecanismo de resistencia adquirida que más se detecta tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium* es por medio de la expresión de enzimas modificantes de aminoglucósidos (Tabla N° 3). Las enzimas pueden ser tipo acetilasas, nucleotidasas ó fosforilasas (Kobayashi *et al.*, 2001). El ANRAG, que se debe a la adquisición de elementos genéticos móviles, da como resultado aislamientos de cepas con CIM ≥ 2000 $\mu\text{g/mL}$. Cepas que expresan el gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* codifican para una enzima bifuncional con capacidad acetilasa y fosforilasa. Esta enzima confiere resistencia a todos los aminoglucósidos, excepto a STH y es la que se detecta en mayor cantidad (Chow, 2000). En *E. faecalis* el gen se encuentra en un transposón compuesto denominado Tn5281. Este mecanismo es el que se expresa en mayor proporción en aislados clínicos de enterococos. Otros genes como *aph(2'')-Id*, *aph(2'')-Ie* y *aph(2'')-Ib* median alto nivel de resistencia a GEH, tobramicina, kanamicina, netilmicina y dibecacina (Cercenado, 2011).

Tabla N° 3. Fenotipos de resistencia y enzimas modificadoras de aminoglucósidos en el género *Enterococcus*. Adaptado de Morosini *et al.*, 2012.

STH (Estreptomycinina)	GEH (Gentamicina)	AMK (Amikacina)	KAN (Kanamycinina)	Enzima
R	S	S	S	ANT(6), ANT(3'')
S	S	S/R*	R	APH(3')-III
S	S	S/R*	R	ANT(4')-(4'')
R	S	S/R*	R	ANT(6')+APH(3')-III
S	R	S/R*	R	ACC(6')-APH(2'')
R	R	S/R*	R	Varias
S	S	S	R	ACC(6')-Ii

*: La resistencia a amikacina es variable pero la sinergia de este compuesto con betalactámicos en ningún caso es factible.

El alto nivel de resistencia a STH ocurre por modificación enzimática del ATM (enzima ANT(6')-Ia) o por mutaciones puntuales en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Este

último, es otro mecanismo observado en enterococos que también confiere ANRAG. Para kanamicina, amikacina y neomicina, la resistencia se da por expresión del gen que codifica para la enzima APH(3')-IIIa (Trieu-Cuot & Courvalin, 1983). Desde 1971 el tratamiento de infecciones enterocócicas se realiza con la combinación de un aminoglucósido con agentes que actúan sobre la pared celular (Zimmermann *et al.*, 1971; Dadfarma *et al.*, 2013). Las cepas con ANRAG suprimen el efecto sinérgico bactericida antes mencionado disminuyendo las posibilidades terapéuticas (Zimmermann *et al.*, 1971; Dadfarma *et al.*, 2013; Sparo *et al.*, 2013).

I.6.2.c) Resistencia de *Enterococcus* spp. a betalactámicos

Penicilinas, cefalosporinas, carbapénemicos y monobactámicos son ATM bacteriolíticos que se caracterizan por la presencia de un anillo β -lactámico en su estructura. Su mecanismo de acción es inhibir la transpeptidasa bacteriana ó PBP (*penicillin binding protein*) que participa en la reacción de los enlaces cruzados que confieren integridad al peptidoglicano, el cual es necesario para la formación de la pared celular bacteriana (Thakuria & Lahon, 2013). Aunque el descubrimiento del primer ATM PEN se produjo en 1928, a partir de un hecho observacional que sucedió al azar, la misma fue introducida en 1940 para empezar a tratar infecciones humanas. Posteriormente, debido a su masiva utilización, cepas resistentes comenzaron a emerger a nivel mundial. En el mismo año, Abraham & Chain (1940) publicaron “Una enzima bacteriana capaz de destruir penicilina” del inglés *An enzyme from bacteria able to destroy penicillin*.

Los ATM betalactámicos como AMP y PEN son los más utilizados para tratar infecciones por esta bacteria. Todos los enterococos sensibles a AMP, lo son también al resto de las penicilinas y a los carbapenems. Aunque reportes realizados por Metzidie *et al.*, (2006); Guardabassi *et al.*, (2010) y Conceição *et al.*, (2014) mostraron la detección de fenotipos inusuales en aislados clínicos de *E. faecalis*. Estas cepas presentaban resistencia a PEN y sensibilidad a AMP. Especies de este género hiperexpresan proteínas ligando de penicilinas de baja afinidad (PBP5 en *E. faecium* y PBP4 en *E. faecalis*), generalmente por mutación del gen *pbp*. *E. faecium* es mas resistente que *E. faecalis*, hecho que se observa con más frecuencia en cepas nosocomiales, donde *E. faecium* ampicilina resistentes (AmpR) se presenta con otras resistencias asociadas. La Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana

(ReLAVRA) reportó en 2015, 1,8 % de resistencia a AMP para la especie *E. faecalis* y 84,9 % para la especie *E. faecium* aisladas de hospitales de Argentina.

La producción de enzimas del tipo penicilinasas es otra manera de alterar la molécula de estos ATM. Bárbara Murray describe por primera vez en 1983 un aislamiento de *E. faecalis* productor de una penicilinasas. Luego de casi 10 años se reportaron nuevos aislamientos de esta especie, con expresión de β -lactamasa en países como EE. UU., Canadá, Líbano, India y Argentina (Murray & Mederski-Samaroj, 1983; Murray *et al.*, 1992). Solo en Italia y en EE.UU. se han reportado escasas cepas productoras de β -lactamasas para la especie *E. faecium* (Murray, 1992; Coudron *et al.*, 1992; Sarti *et al.*, 2012). La producción de esta enzima provoca resistencia a penicilinas, aminopenicilinas y ureídopenicilinas y presentan bajo nivel de resistencia a IMP. Su detección se realiza por una prueba rápida fenotípica, aunque se deben tomar ciertos recaudos, debido a que en enterococos se produce en pequeñas cantidades y con inóculos bajos pueden no detectarse. Pruebas para evaluar la sensibilidad antimicrobiana pueden mostrar falsos halos con categoría sensible para PEN o AMP, debido a la escasa producción de esta enzima por ciertas cepas de enterococos. Por este motivo y sobretodo en cepas clínicas aisladas de líquidos obtenidos por punción, como sangre o LCR, siempre debe utilizarse una prueba rápida para detectar la enzima (Lopardo & Blanco, 2007). Los genes *bla* que codifican para β -lactamasa, son de ubicación plasmídica, por lo que pueden transferirse por conjugación a otras bacterias que causan infecciones humanas o a otros *Firmicutes* (Murray & Mederski-Samaroj, 1983).

Las cefalosporinas son completamente inefectivas para tratar una infección por enterococos. Esta resistencia intrínseca es producida por determinantes cromosómicos ubicados en el genoma *core* e incluso, predisponen a infecciones por enterococos en pacientes que han recibido estas drogas, para tratar otras infecciones (Shepard & Gilmore, 2002).

I.6.2.d) Resistencia de *Enterococcus* spp. a quinolonas

Las fluorquinolonas comprenden drogas sintéticas derivadas del ácido nalidíxico. Fueron desarrolladas en 1960 para uso clínico en el tratamiento de infecciones del tracto urinario ocasionadas por bacterias Gram (-). La resistencia adquirida a quinolonas se da por expresión de

regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR: *quinolone-resistance-determining regions*) como *gyrA/gyrB* y *parC/parE*, que actúan por la inhibición de ADN girasa (en Gram -) o topoisomerasa IV (en Gram +). Su inhibición conduce a una muerte celular ya que ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN (Oyamada *et al.*, 2006). Mutaciones puntuales, en aminoácidos que expresan para los genes *gyr*, alteran la girasa y mutaciones puntuales, en los genes *par*, modifican la topoisomerasa. Se ha observado que, según se modifique un nucleótido en *parC* o en *gyrA*, la CIM a fluorquinolonas varía mientras que si cambia *parC* ó *gyrA*, la CIM se eleva moderadamente. Cambios en *parC* con mutaciones adicionales en *gyrA*, producen alto nivel de resistencia a estos ATM (Oyamada *et al.*, 2006). Otra forma de resistencia observada en este género, es la expulsión de fluorquinolonas hacia el ambiente extracelular a través de bombas de eflujo (gen mutado *emeA*: *enterococcal multidrug resistance efflux*) (Jonas *et al.*, 2001).

Con este grupo de ATM se observa moderada resistencia en aislados clínicos y la susceptibilidad de enterococos depende de la molécula de quinolona involucrada y del tipo de infección a tratar (Ekelund *et al.*, 2014). EUCAST definió como inapropiado el uso de quinolonas para tratar infecciones sistémicas causadas por enterococos. Actualmente, se han definido nuevos puntos de corte para levofloxacina (LVX) y CIP las cuales solo están recomendadas para el tratamiento de infecciones del tracto urinario no complicadas y básicamente producidas por *E. faecalis* (EUCAST *Clinical Breakpoint Tables* v. 6.0).

1.6.2.e) Resistencia de *Enterococcus* spp. a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (MLS_B)

Al compartir un mecanismo de acción similar (inhibición de síntesis proteica) y presentar un patrón de resistencia común, este grupo de ATM se describe en conjunto. MLS afectan la subunidad mayor 50S del ribosoma bacteriano. Sin embargo, el sitio de unión a la misma es diferente. Los macrólidos y las lincosamidas no se utilizan para tratar infecciones enterocócicas, aunque se hará referencia a su mecanismo de resistencia debido a la presencia de determinantes genéticos que poseen cepas clínicas de este género y por integrar el mobiloma de enterococos con capacidad de transmisión y diseminación. En enterococos el mecanismo de resistencia que se detecta con mayor frecuencia en este grupo de ATM es inducible, y se da por producción de una

enzima que metila un residuo adenina en la subunidad 23S del ARNr. Esto produce menor afinidad de unión al ribosoma, no solo de eritromicina (ERI), sino también de azitromicina y claritromicina, lincosamidas y estreptograminas B, resultando en CIM elevadas. Dicha enzima es codificada por el gen *ermB* (*erythromycin resistance methylase*) y el fenotipo se conoce como MLS_B (Cercenado, 2011). En enterococos este gen se ubica en un transposón conjugativo denominado Tn917.

La lincosamida se puede utilizar en *Enterococcus* spp. como parte de pruebas para su tipificación, por la resistencia intrínseca a dicho ATM, no así para *E. faecium* y *E. durans* (Devriese *et al.*, 2002).

Quinupristín/dalfopristín (Q/D) se compone de una estreptogramina A y una B, que separadamente son bacteriostáticas pero combinadas actúan sinérgicamente y es recomendada para el tratamiento de infecciones por EFMVR. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis proteica por interacción con la subunidad ribosomal 50S. *E. faecalis* y *E. faecium* exhiben diferentes patrones de susceptibilidad frente a estreptograminas. *E. faecalis* es intrínsecamente más resistente por lo que no se puede utilizar Q/D, mientras que *E. faecium* es generalmente susceptible. Sin embargo, cepas de *E. faecium* resistentes a Q/D ya fueron reportadas a nivel mundial y generalmente el mecanismo de resistencia observado es por modificación enzimática del ATM por acetiltransferas (Donabedian *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2016).

I.6.2.f) Resistencia de *Enterococcus* spp. a tetraciclinas

Las tetraciclinas son ATM naturales y semisintéticos derivados de cultivos de *Streptomyces* spp. Están formados por una molécula con núcleo tetracíclico y a dosis habituales actúan fundamentalmente como bacteriostáticos inhibiendo la síntesis proteica por unión reversible a la unidad ribosomal 30S, bloqueando la unión del aminoacil-ARNt al sitio aceptor en el complejo ribosoma-ARN (Chopra & Roberts, 2001). Son utilizados generalmente en medicina veterinaria, sobre todo, para tratar infecciones en aves, por este motivo se han reportado muchos aislamientos de enterococos tetraciclinas resistentes en reservorios no humanos, que pueden diseminar sus genes por conjugación. Los determinantes genéticos de resistencia a este ATM, se ubican en transposones conjugativos promiscuos como el Tn916, el cual fue el primer transposón descrito en *E. faecalis* (Franke & Clewell, 1981).

TGC es una glicilciclina derivada de minociclina de uso endovenoso. Su molécula ha sido mejorada para tener un espectro de acción mucho mejor que otras tetraciclinas. Su actividad antimicrobiana incluye EVR, *S. aureus* resistente a meticilina, bacterias atípicas y otras. Hasta la fecha, EUCAST solo reporta en sus distribuciones de CIM y ECOFF (valores de corte epidemiológicos “ECOFF” del inglés *Epidemiological Cut-Off*), escasos aislamientos resistentes, correspondientes a *E. faecalis* y *E. faecium* (Werner *et al.*, 2008). Si bien no se recomienda esta droga en infecciones enterocócicas invasivas, existen reportes que combinada con ATM bactericidas, podría resultar ser una opción viable para el infectólogo, aunque debe evaluarse caso por caso, según cepa aislada y según el sitio de infección (Jenkins, 2007).

I.6.2.g) Resistencia de *Enterococcus* spp. a linezolid

LZD es una oxazolidinona que también actúa inhibiendo la síntesis proteica. Puede utilizarse tanto para *E. faecalis* como para *E. faecium*, independientemente si poseen ambos resistencia a AMP y glucopéptidos (Pigrau & Almirante, 2009). El mecanismo de resistencia se debe a una mutación en la subunidad 23S del ARNr. Evidencia científica demuestra que la CIM puede elevarse aún más a medida que mayor número de alelos experimentan mutación (Cercenado, 2011). La detección de cepas clínicas resistentes a LZD es infrecuente. Sin embargo, existen reportes de resistencia a LZD en EE. UU., Grecia, Italia e Irlanda, en aislados provenientes de pacientes transplantados, oncohematológicos, internados en UTI y de pacientes con tratamiento con este ATM por largos períodos de tiempo (Krull *et al.*, 2016).

I.7. CURVAS DE CINETICA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PARA LA BÚSQUEDA DE ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

En infecciones invasivas o graves es necesario generar una terapéutica antimicrobiana bactericida, rápida y bien dirigida, sobre todo para aquellos pacientes que presentan un sistema inmunológico comprometido y debilitado. En la mayoría de las infecciones invasivas producidas por *Enterococcus* spp., no existe en la actualidad un consenso estandarizado para tratar infecciones, sobretudo por cepas enterocócicas multirresistentes (Arias *et al.*, 2010). Cada

paciente con el debut de la enfermedad infecciosa, es un caso puntual en medicina humana. En pacientes críticos por ejemplo, las condiciones fisiológicas están alteradas como consecuencia de disfunción orgánica, intervenciones terapéuticas agresivas o interacciones entre fármacos, entre otras cosas. Debido a esta situación, los parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos deben considerarse a la hora de aplicar tratamientos antiinfecciosos, ya que los mismos no son iguales en un paciente internado en UTI que en un paciente afectado por una infección ambulatoria (Udy *et al.*, 2013).

Las curvas de cinética fueron diseñadas hace más de 4 décadas, para intentar encontrar un efecto sinérgico antimicrobiano frente a bacterias resistentes que poseían limitadas o ninguna opción terapéutica (bacterias PDR) ó para ensayar nuevas moléculas antimicrobianas (MacGowan *et al.*, 1996). Actualmente, se siguen evaluando drogas antiguas y nuevas, solas o combinadas, con la metodología de curvas de letalidad (*killing curves*) para enterococos (Mercurio *et al.*, 2018).

La realización de la curva de letalidad es una metodología que demanda muchas horas/hombre. Sin embargo, es de referencia para evaluar la acción de los ATM sobre una cepa bacteriana a través del tiempo. Las gráficas se construyen colocando en el eje de las abscisas o eje X, los diferentes períodos de tiempo (h), en el que se tomarán las muestras del cultivo bacteriano líquido, incubado con el agregado de un solo ATM o en combinación. El eje de ordenadas o eje Y corresponde al logaritmo del inóculo bacteriano que se detectará en un determinado tiempo (bacterias sobrevivientes) y se expresa en $\log_{10}$ UFC/mL. La definición microbiológica considera sinergia cuando la muerte microbiana producida por la mezcla de ATM resulta 100 veces más pronunciada que la producida por el ATM más activo de la mezcla en forma individual. Bactericidia se define como reducción del inóculo inicial en $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL ($\geq 99,9\%$) y bacteriostásis cuando existe una reducción de $< 3 \log_{10}$ UFC/mL (Pankey & Sabath, 2004). Un estudio realizado en nuestro país demostró que ninguno de los ATM, ni de las combinaciones ensayadas, fueron bactericidas frente a cepas de EFMVR, aisladas de pacientes con diagnóstico de IAAS (Rodríguez *et al.*, 2013).

Los estudios de cinética de muerte microbiana si bien no se utilizan de forma rutinaria, son recomendados en infecciones invasivas, donde no existe consenso en “la mejor terapia antimicrobiana” a utilizar o se observan en muchos casos, fracaso terapéutico.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El aprendizaje es experiencia, todo lo demás es información.

ALBERT EINSTEIN

II. 1. HIPOTESIS

Sobre la base de las siguientes premisas:

Que la resolución exitosa de una enfermedad invasiva bacteriana depende de una correcta caracterización microbiológica del agente causal, para instaurar un tratamiento antimicrobiano dirigido, rápido, eficaz, en lo posible combinado y con espectro de acción bactericida.

Que la epidemiología molecular de cada institución de salud, así como el resistoma del ambiente nosocomial, depende de diversos factores como características ecológicas del lugar geográfico, tratamientos ATM realizados, patologías tratadas con mayor prevalencia, manejo ambulatorio y/o internado del paciente, con enfermedades agudas o crónicas o un conjunto de todo.

Que el género *Enterococcus* y dentro de él está la especie EFMVR que integra el grupo ESKAPE, grupo formado por microorganismos que representan hoy problemas clínicos relevantes.

Que cepas de enterococos integran complejos clonales hospitalarios de alto riesgo y emergentes, que presentan características invasivas y que poseen elementos genéticos móviles que capturan y dispersan genes de resistencia y/o virulencia por TGH y que a su vez, interaccionan con otros clones epidémicos de su mismo género o mismo Phylum para evolucionar su genoma.

La hipótesis de trabajo es: Por el uso intensivo de ATM dentro y fuera del ambiente hospitalario, en el Hospital Municipal Ramón Santamarina, 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. La caracterización fenotípica junto a la utilización de técnicas fundamentadas en proteómica y genómica junto a la determinación de la RA en *Enterococcus* spp. productores de infecciones invasivas, muestra la diversidad genética poblacional, la presencia de tipos clonales con características microbiológicas particulares y el perfil de resistencia a ATM de uso clínico.

II. 2. OBJETIVOS GENERALES**OBJETIVO GENERAL N° 1**

Caracterizar fenotípicamente y genotípicamente cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de líquidos obtenidos por punción, provenientes de infecciones invasivas humanas, de pacientes internados en el Hospital Municipal Ramón Santamarina de Tandil.

OBJETIVO GENERAL N° 2

Detectar resistencia antimicrobiana y evaluar *in vitro* opciones antimicrobianas en cepas de enterococos multirresistentes.

II. 3. OBJETIVOS ESPECIFICOS***Para cumplimentar el Objetivo General N° 1:***

- 1.** Aislar cepas de *Enterococcus* spp. de líquidos obtenidos por punción provenientes de infecciones invasivas humanas.
- 2.** Identificar cepas de *Enterococcus* spp. por pruebas bioquímicas y espectrometría de masas (MALDI TOF-MS).
- 3.** Establecer relación entre especie de enterococo aislada y variables clínicas y demográficas de los pacientes con infección invasiva.
- 4.** Determinar la relación clonal de los aislamientos analizando pulsotipos obtenidos por electroforesis de campo pulsado (PFGE).
- 5.** Caracterizar genéticamente cepas seleccionadas de *Enterococcus* spp. por Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci (MLST) y establecer la estructura genética poblacional.

Para cumplimentar el Objetivo General N° 2:

- 6.** Determinar el perfil de resistencia *in vitro* frente a los antimicrobianos de importancia clínica, mediante pruebas cualitativas y cuantitativas (CIM).
- 7.** Determinar la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos mediante técnicas de amplificación génica.
- 8.** Evaluar *in vitro* antimicrobianos frente a cepas multirresistentes utilizando curvas de letalidad.

III. MATERIALES Y METODOS

Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo, involúcrame y lo aprendo.

BENJAMIN FRANKLIN

OBJETIVO GENERAL N° 1

Caracterizar fenotípicamente y genotípicamente cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de líquidos obtenidos por punción, provenientes de infecciones invasivas humanas, de pacientes internados en el Hospital Municipal Ramón Santamarina de Tandil

OBJETIVO ESPECIFICO N° 1

III.1. Aislar cepas de *Enterococcus* spp. de líquidos obtenidos por punción provenientes de infecciones invasivas humanas.

III.1.1. Area y período de estudio

El Hospital Municipal Ramón Santamarina (HMRS) integra conjuntamente con el Hospital de Niños Dr. Debilio Blanco Villegas (DBV) y el Hospital Enrique Larreta de la localidad de María Ignacia Vela, el Sistema Integrado de Salud Pública del Municipio de Tandil (SISPMT), Buenos Aires, República Argentina. El HMRS (Fotografía N° 2) se encuentra ubicado en el sudeste de la provincia homónima y depende de la Subsecretaría de Salud de la Municipalidad de Tandil (Figura N° 8). Dista a 349 km de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Es un organismo descentralizado, de mediana complejidad, con Servicio de emergentología, que está incluído 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 la actualidad, cuenta con 120 camas y se atienden aproximadamente 130.000 personas. 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. Las estadísticas a su vez demuestran que, por el período 2001-2009, las consultas por consultorio externo y emergencia aumentaron considerablemente en el HMRS y el DBV, sobrepasando los 118.000 pacientes/año en 2009. En dicho nosocomio funcionan 11 servicios: cirugía general, clínica médica, emergencias

médicas, obstetricia y ginecología, ortopedia y traumatología, terapia intensiva, cardiología, infectología, oncología, diagnóstico por imágenes, salud mental y laboratorio de análisis clínicos y microbiológicos.

Fotografía N° 2. Hospital Municipal Ramón Santamarina (HMRS), Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://www.hrsantamarina.org.ar/galeria.php>

En el HMRS funciona la sub-sede de la cátedra de Microbiología y Parasitología de la carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM-UNLP), en el marco del convenio realizado entre Municipalidad de Tandil-Facultad de Ciencias Médicas. El funcionamiento de la sede está a cargo de la Prof. Dra. Mónica D. Sparo.

El período de estudio de esta tesis, estuvo comprendido entre marzo de 2012 y diciembre de 2016.

III.1.2. Diseño del estudio

El diseño de investigación de esta tesis doctoral fue observacional, descriptivo, retrospectivo y de corte transversal para llevar a cabo el objetivo general N° 1 y 2. Para dar cumplimiento con el objetivo específico N° 8 se diseñó un protocolo experimental de eficacia *in vitro* para investigar opciones antimicrobianas por metodología de curvas de muerte microbianas.

Figura N° 8. Ubicación geográfica del HMRS en el partido de Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Coordenadas GMS, Latitud: 37°19'18'' S, Longitud: 59°07'59'' O. Diagrama realizado con imágenes libres de derechos de autor.

III.1.3. 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 *Enterococcus* spp. 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 del género *Enterococcus* spp.

Las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología Clínica del HMRS (**una por paciente**) fueron: líquidos abdominales, líquidos peritoneales, hemocultivos, líquidos obtenidos por punción de abscesos (abscesos renales, abscesos de piel y partes blandas producto de accidentes de tránsito, abscesos hepáticos, absceso subfrénico, absceso tubo-ovárico, absceso de tejido celular y absceso abdominal), líquidos articulares: de cadera, de la articulación de la rodilla, por infección de articulación de un dedo del pie y líquido obtenido concomitantemente a la realización de una biopsia de útero. Cada muestra clínica fue sembrada en medios de cultivos adecuados según sospecha del microorganismo productor y según diagnóstico presuntivo dado por el médico. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: agar sangre y agar cerebro-corazón, agar bilis esculina azida con el agregado de 6 µg/mL de VAN para aislar enterococos resistentes a este ATM. Cada cepa identificada, fue inoculada en tubos *ependorf* que contenía caldo cerebro-corazón con glicerol al 20 % (v/v). Estos tubos fueron conservados por duplicado a -20 °C y -50 °C para realizar estudios posteriores.

Para realizar un mejor análisis de datos, las muestras clínicas fueron agrupadas como: *líquidos articulares*: los provenientes de cadera y rodilla, ya sea por resultado de una infección en prótesis o en pacientes que debutaron con infecciones en una articulación, porque poseían como factor predisponente una patología de base crónica. Los líquidos peritoneales e intravesicular se agruparon como *líquidos abdominales* en general. Los abscesos hepáticos, abscesos abdominales, abscesos ováricos, abscesos cutáneos, absceso renal, absceso subfrénico, fueron agrupados en *abscesos*.

III.1.3.1. Criterios de inclusión de la unidad de observación

- Cepa identificada microbiológicamente como perteneciente al género *Enterococcus* spp.
- Aislada de una muestra obtenida por punción.
- Cepas de *Enterococcus* spp. conservadas en el cepario del CUDEMyP, FCM (UNLP), provenientes de muestras clínicas obtenidas por punción en pacientes internados en el HMRS, durante 2010.
- Cepas provenientes de pacientes de ambos géneros, internados en el HMRS con diagnóstico presuntivo de infección invasiva, por el período 2013-2014, con rango etario comprendido entre 0 y 100 años.

III.1.3.2. Criterios de exclusión

- Cepas recuperadas de hisopados rectales obtenidos de pacientes ingresados al HMRS, para estudios de portación intestinal de EVR.
- Cepas de enterococos recuperadas de pacientes que ingresaron al HMRS por el Servicio de Emergencias y no poseían historia clínica, cuya alta se les otorgó por pedido del propio paciente o fue derivado a otra institución de salud.

III.1.4. Consideraciones éticas

Para el acceso a datos de la historia clínica se aplicó la Ley 25.326 de Protección de Datos Personales, art.11, inciso 3, punto d (https://www.oas.org/juridico/PDFs/arg_ley25326.pdf). Las notas para la realización de este proyecto de tesis, fueron autorizadas y aprobadas con el aval del Comité de Docencia e Investigación del HMRS (<http://www.hrsantamarina.org.ar/docenciaInvestigacion.php>) (Anexo I).

III.1.5. Análisis estadístico de los resultados

La carga de datos y el análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando planillas de *software* electrónicos como instrumentos de carga. Medidas de estadística descriptiva, de verificación de diferencias (Chi (χ^2) cuadrado, prueba no paramétricas, con un nivel de significancia del 95 %), estudios de regresión lineal simple y correlación, fueron utilizados 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.

OBJETIVO ESPECIFICO N° 2

III.2. Identificar cepas de *Enterococcus* spp. por pruebas bioquímicas y espectrometría de masas (MALDI TOF-MS).

III.2.1. Operacionalización de la/las variables

Identificación: variable cualitativa: Cepas de *Enterococcus* spp.

Definición conceptual (Dimensión): género de bacterias cocoides Gram (+), constituidas por organismos que producen hemólisis variable, que forman parte de la microbiota del tracto intestinal. Fuente: Biblioteca virtual de salud DeCS: Descriptores en Ciencias de la Salud (<http://www.paho.org/bireme/>).

Indicador/es: -Pruebas bioquímicas: variables cualitativas dicotómicas (presencia o ausencia; positivo o negativo).

-MALDI TOF-MS: metodología altamente específica y sensible para identificación de ciertos géneros bacterianos, con interpretación a partir de un *score* o puntos obtenidos por medición mediante un *software* bioinformático.

III.2.2. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica a nivel de género y especie se realizó 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.

Las pruebas bioquímicas convencionales realizadas fueron: coloración de Gram, crecimiento en caldo BHI con el agregado de NaCl al 6,5 % (*p/v*), prueba de la catalasa y la detección de la actividad enzimática de l-pirrolidonil arilamidasa, utilizando discos incoloros impregnados con el sustrato enzimático (PYR-A-ENTEROCOCOS, Britania, Argentina). La prueba PYR-A fue positiva cuando el disco incoloro viró a color rosado fuerte. Otras pruebas

realizadas fueron: desarrollo a 10 °C y a 45 °C, determinación de la actividad de leucina arilamidasa, presencia de hemólisis y producción de acetoina. La observación de producción de pigmento, la utilización de piruvato de sodio 10 % (p/v), el estudio de tolerancia al telurito 0,04 %, la hidrólisis de arginina, la formación de ácido en caldo con metil- α -D-glucopiranosido y el estudio de la fermentación de hidratos de carbono, como glucosa, melibiosa, adonitol, rafinosa, lactosa, melezitosa, ramnosa, manitol, sorbitol, arabinosa, sorbosa, trehalosa, xilosa y sacarosa, completaron la caracterización fenotípica. Todas las pruebas bioquímicas fueron realizadas con sus respectivos controles negativos y positivos utilizando cepas ATCC.

III.2.2.1. Detección de hemolisinas

Se realizó la detección fenotípica de hemolisina sembrando las cepas en placas con agar base Columbia, con el agregado de 5 % (v/v) de sangre humana desfibrinada, que contenía los cuatro grupos sanguíneos. La sangre empleada fue serológicamente negativa para agentes infectocontagiosos de transmisión sanguínea, determinada por Banco de Sangre (La Plata, Buenos Aires). Las placas se incubaron a 35 °C, por 48 h, en atmósfera ordinaria. Se observó la presencia de hemólisis (completa o β , parcial o α y ausencia o γ alrededor de las colonias bacterianas).

III.2.3. Caracterización por espectrometría de masas: MALDI TOF-MS

III.2.3.1. Obtención de cultivos puros

Todas las cepas identificadas fenotípicamente y conservadas a -50 °C fueron sembradas en agar m-*Enterococcus* (Difco™) e incubadas a 35 °C, por toda la noche, con el fin de obtener el aislamiento microbiano del cultivo puro. Para la obtención de los espectros de masa, a partir de extractos celulares, se procedió a tomar con una varilla de madera, una masa pequeña de una única colonia aislada y se aplicó en forma circular en la placa diana de acero inoxidable (tarjeta de análisis). Se siguieron las indicaciones del fabricante respetando el protocolo MALDI *Biotyper* (procedimiento de extracción, matriz, muestra) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Luego de unos minutos de secado de la colonia a temperatura ambiente, fue agregado en cada pocillo 1 μ l de una solución saturada de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxycinámico (HCCA; Bruker Daltonics) en

50 % de acetonitrilo y 2,5 % de ácido trifluoroacético. Controles positivos y negativos fueron utilizados. Cada colonia fue procesada por duplicado. Los espectros de masas fueron analizados por el *software* MALDI *Biotyper FlexControl* versión 3.3 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Los puntos obtenidos por duplicado se utilizaron como criterio de identificación. Puntos obtenidos $\geq 2,0$ se utilizaron para identificación precisa a nivel de especie, puntajes obtenidos entre $> 1,7$ y $\leq 1,9$ se utilizaron para identificación de género y puntajes obtenidos $< 1,7$ no permitieron realizar identificación bacteriana.

La utilización de tecnología MALDI TOF-MS se realizó en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS), en el grupo de investigación correspondiente al Área 2: Microbiología, Inmunología e Infección del Servicio de Microbiología Molecular, ubicado en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, España (Figura N° 9).

Figura N° 9. Procedimiento de identificación por metodología MALDI TOF-MS. Fotos de autor: placa metálica y equipo MALDI TOF-MS utilizado (IRyCIS, Madrid, España).

OBJETIVO ESPECIFICO N° 3

III.3. Establecer relación entre especie de enterococo aislada y variables clínicas y demográficas de los pacientes con infección invasiva.

III.3.1. Operacionalización de la/las variables

Para el desarrollo de este objetivo, datos clínicos y demográficos relevantes para esta investigación, fueron obtenidos de las historias clínicas de cada paciente como: edad, género, comorbilidades, tipo de infección diagnosticada, tipo de muestra obtenida para estudio microbiológico y el año de obtención de la misma, terapia antimicrobiana administrada previamente y evolución del paciente. Respecto a la variable “Servicio de internación del paciente en el HMRS” no se dispuso de este dato para algunos aislados debido a que la confección de las historias clínicas en principio era realizada de manera manual. Ciertos antecedentes estaban incompletos, sobre todo para pacientes fallecidos. A partir de 2011 se implementó el sistema informático para optimizar la gestión de la información mediante el Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentino (SISA).

Las *variables clínicas* estudiadas para este objetivo fueron:

Identificación: variables cualitativas: variables clínicas.

Definición conceptual (Dimensión): eventos clínicos que pueden presentarse en los pacientes, como comorbilidades (antecedentes patológicos personales), tipo de infección diagnosticada, tipo de muestra clínica obtenida por punción, tratamiento antimicrobiano empírico y evolución.

Comorbilidades (antecedentes patológicos personales): coexistencia en el mismo individuo de una o más enfermedades. Variable nominal politómica.

Tipo de infección diagnosticada: nombre de la infección según sitio anatómico infectado. Variable nominal politómica.

Tipo de muestra clínica obtenida por punción: es la unidad de análisis a partir de la cual será recuperada la unidad de observación: especie de enterococos. Es el tipo de muestra solicitada por el médico, que se extrae por punción en condiciones aeróbicas o anaeróbicas de acuerdo al sitio de infección. Variable nominal politómica.

Tratamiento antimicrobiano empírico: aquel que se inicia antes de disponer de información completa y/o definitiva sobre la infección que se desea tratar y es, por tanto, un tratamiento de probabilidad. Variable nominal dicotómica.

Evolución: la manera en que el paciente finaliza su enfermedad. Por gravedad y posterior fallecimiento o por resolución de la misma con el aval del médico para dar el alta de internación. Variable nominal dicotómica.

Indicador/es: análisis de muestras clínicas, pruebas específicas de laboratorio y el examen clínico de los pacientes.

Las categorías de la variable “comorbilidades” fueron: **presencia/ausencia; número de comorbilidades y tipo de comorbilidad**. Para “tipo de infección diagnosticada”: nombre de la infección según sitio anatómico afectado y, para tipo de muestra clínica: nombre que adquiere según sitio anatómico infectado. Para la variable “tratamiento antimicrobiano previo” las categorías fueron: **si/no**. Para la variable nominal cualitativa “evolución” fueron: **alta/fallecimiento**.

Las *variables demográficas* estudiadas para este objetivo fueron: género, edad.

Identificación: género, variable nominal cualitativa dicotómica.

Definición conceptual (Dimensión): se establece como la condición biológica de varón o mujer.

Indicador/es: masculino y femenino.

Identificación: edad, variable cuantitativa con nivel de medición de intervalo.

Definición conceptual (Dimensión): años de vida que posee la persona.

Indicador/es: fecha de nacimiento, su medición es en números de años.

Fue analizada también la variable “Servicio de internación del paciente” en el HMRS.

Identificación: variable nominal politómica: Servicio de internación del paciente.

Definición conceptual (Dimensión): Servicio según especialidad medicinal de atención al paciente.

Indicador/es: Servicio de cirugía, guardia/emergencias, traumatología, clínica y UTI.

OBJETIVO ESPECIFICO N° 4**III.4. Determinar la relación clonal de los aislamientos analizando pulsotipos obtenidos 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 pulsotipos obtenidos por PFGE, utilizando una endonucleasa de baja frecuencia de corte (*Sma*I, Takara Bio INC, 2,000 U), sugerida para el género *Enterococcus*.

III.4.1. Operacionalización de la/las variables

Identificación: Variable cualitativa: Pulsotipos o patrones de banda.

Definición conceptual (Dimensión): Perfiles de restricción de ADN cromosómico obtenidos por digestión con una enzima de corte, que genera un número variable de fragmentos de diferentes tamaños, que se separan en geles de agarosa mediante electroforesis en campo pulsado.

Indicador/es: Determinación de pulsotipos o clones obtenidos según criterio de interpretación de conceptos (Tenover *et al.*, 1995) punto I.5.3.a.), sección Introducción para establecer la relación clonal:

- cepas “idénticas”,
- “probablemente relacionadas”,
- “posiblemente relacionadas” o “distintas”

III.4.2. Estudio del tipaje molecular mediante macrorrestricción por electroforesis de campo pulsado: obtención de cultivos puros

Las cepas conservadas en caldo BHI (Difco) y glicerol al 20 % a -50 °C, fueron sembradas en agar sangre (BD Columbia CNA Agar con 5 % sangre de carnero) e incubadas a 35 °C, por 24 h. Posteriormente, se tomaron 4 a 5 colonias aisladas y se colocaron en tubos *ependorf* para microcentrífuga, que contenían 1 mL de BHI (Difco). Se incubó nuevamente por 24 h. Para obtener el sedimento celular se procedió a centrifugar los tubos por 10 min, a 6.000 r.p.m.

Seguidamente, en cada tubo se inocularon 1000 µl de TBE al 0,5X (Tris-HCl pH 8,3; ácido bórico; 0,5 M EDTA pH 8), con el fin de resuspender el *pellets* sedimentado y se volvió a centrifugar.

III.4.3. Preparación de los *plugs* o tacos (insertos)

Para obtener los tacos de agarosa con el ADN bacteriano inserto se preparó una solución al 2 % de agarosa de alta pureza (Pronadisa D5, Conda), disolviendo la misma en *buffer* TBE 0,5X. Para evitar su solidificación el frasco que contenía agarosa, se mantuvo en un baño termostatzado con agitación. Se tomaron tubos *ependorf* a los que se agregó 500 µl de la solución de agarosa al 2 % y se mantuvieron en un termobloque a 60 °C. Se agregó al *ependorf* 500 µl de la mezcla compuesta por el *pellets* bacteriano resuspendido en TBE al 0,5X (este paso se realizó con cada cepa). En moldes de plástico adecuados fueron inoculados 300 µl de la mezcla agarosa mas *pellets* y se dejó solidificar a temperatura ambiente, por 20 min, para la formación de los *plugs* o tacos. El objetivo que se persiguió aplicando esta metodología fue inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa de manera que el ADN permaneciera íntegro y no se fracturase accidentalmente.

III.4.4. Preparación de las soluciones de lisis y de Proteinasa K

Ambas soluciones fueron preparadas en el día de su uso. La Tabla N° 4 y N° 5 muestran los reactivos utilizados para su preparación. Tres tacos-*plugs* fueron colocados por cada tubo y se adicionó 3 mL de solución de lisis. Todos los tubos fueron incubados en un baño a 37 °C con agitación por 4 a 5 h.

La solución de lisis se descartó y a cada tubo que contenía 3 tacos se les agregó posteriormente 3 mL de solución para proteólisis (Proteinasa K). Estos tubos fueron incubados toda la noche en un baño a 56 °C con agitación, con el fin de observar los tacos transparentes. Antes de proceder a la digestión con la enzima de restricción, fue necesario proceder a inactivar la proteinasa K, así como eliminar los detergentes utilizados para realizar la lisis celular, ya que los mismos podrían inactivar las enzimas de restricción. Esto se realizó con soluciones de lavado

(Tabla N° 6). Se procedió a realizar 3 lavados, con 3 mL de esta solución, para cada tubo por 15 min, a 56 °C y en agitación.

Finalmente, los insertos fueron conservados en 1 mL de solución de lavado, a 4 °C, hasta ser utilizados. Con esta metodología los insertos tienen una duración de aproximadamente un año.

Tabla N° 4. Reactivos componentes de la solución de Proteinasa K.

Reactivo	Stock	Concentración Final
EDTA pH 9	0,5 M	0,5 M
Proteinasa K	25 mg/mL	50 µg/mL
Sarcosyl	20 % 20 X	1 %

Tabla N° 5. Reactivos componentes de la solución de lisis.

Reactivo	Stock	Concentración Final
Tris-HCl pH 7,6	1 M	6 mM 0,006 M
NaCl	5 M	1 M
Brij-58	10 %	0,5 %
EDTA pH 7,6	0,5 M	100 mM 0,1 M
Deoxicolato	10 %	0,2 %
Sarcosyl	20 %	0,5 %
RNasa	10 mg/mL	20 µg/mL
Lisozima		1 mg/mL
H ₂ O destilada		c.n.*

*: Cantidad necesaria.

Tabla N° 6. Reactivos componentes de la solución de lavado.

Reactivo	Volumen Final
TRIS pH 7,6	5 mL
EDTA 1 mM pH 8	1 mL
H ₂ O destilada	hasta 500 mL

III.4.5. Digestión con enzima *Sma*I de baja frecuencia de corte

Para llevar a cabo la digestión enzimática, cada inserto fue cortado en pequeños trozos, de 1 mm de ancho por 2,5 mm de largo y colocado uno de ellos en cada tubo *epENDORF*/cepa. Posteriormente, se les agregó 100 µl de *Sma*I (5 U) disuelta en una mezcla de agua de alta pureza, albumina sérica bovina y un tampón especial para la enzima, diluido a concentración 10X. Luego, se procedió a incubar los tubos a 30 °C durante todo un día.

III.4.6. Electroforesis de campo pulsado

El campo pulsado fue preparado agregando 2 L de TBE 5X, diluido 1:5 en agua destilada. Se procedió a encender el equipo CHEF-DR III *System* (BIO RAD) y controlar que decaiga la temperatura a 14 °C. Seguidamente, se pesaron 1,2 o 1,8 gr de agarosa de alta pureza y se disolvieron con TBE al 0,5X a 100 o 150 mL respectivamente, según tamaño de la cama. Un fragmento de cada inserto fue colocado en peines de plástico, la cama fue nivelada y en los extremos de cada peine, se colocaron marcadores de peso molecular *Lambda Ladder Marker* (New England Biolabs), que generaron fragmentos entre 50 y 500 kb. La cama fue sellada con agarosa a 50 °C. Se dejó solidificar y luego se colocó el gel en el equipo. Las condiciones de corrida fueron diferentes según se trabajó con *E. faecalis* o *E. faecium*. Para *E. faecalis* se utilizó 6 V/cm², amperaje < a 200, pulso inicial 0,5 s, pulsos finales 40 s, temperatura 14 °C, por 22 h. Para *E. faecium* 6 V/cm², amperaje < a 200, pulso inicial 5 s, pulsos finales 35 s, temperatura 14 °C, por 25 h. La electroforesis de campo pulsado se realizó en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS) ubicado en el Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, España.

III.4.7. Tinción del gel y visualización

Los geles fueron colocados por 15 min, en un recipiente con suave agitación, que contenía 300 mL de agua destilada, con el agregado de 90 µl de GelRed como revelador. El equipo utilizado para fotografiar los geles con luz ultravioleta fue ChemiDoc MP (BIO RAD) con utilización del *Software Image Lab*TM (Imaging System ChemiDocTM MP) para observar y analizar las fotografías de cada gel.

III.4.8. Análisis de los patrones de PFGE

Los perfiles electroforéticos obtenidos fueron analizados según los criterios de Tenover *et al.*, (1995). La aplicación de estos criterios determinó si las cepas eran indistinguibles, si se encontraban estrechamente relacionadas, posiblemente relacionadas o si eran diferentes. A cada clon, se le asignó un código según especie EFC: *E. faecalis* y EFM: *E. faecium* y un número (Ej. EFC-1). Por subtipo, se consideró aquellos patrones que se distinguieron por 2 o menos bandas y en ese caso se identificaron por ejemplo como EFC-2.1, etc.

OBJETIVO ESPECIFICO N° 5

III.5. Caracterizar genéticamente cepas seleccionadas de *Enterococcus* spp. por Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci (MLST) y establecer la estructura genética poblacional.

III.5.1. Operacionalización de la/las variables

Identificación: Variable cuantitativa: Perfil alélico o secuencia tipo (ST).

Definición conceptual (Dimensión): Número obtenido mediante el análisis genético de 7 genes *house-keeping* o constitutivos. Este análisis asigna un número a cada alelo de cada gen de los 7 loci. La combinación de estos números, define un perfil alélico o ST único. La asignación del ST se realiza mediante el ingreso de datos, a una aplicación vía *on line* <http://www.mlst.net/> que contiene una gran base de datos con información genética de muchos géneros y especies bacterianas.

Indicador/es: La caracterización genética se realiza mediante una metodología de tipado de alta sensibilidad y especificidad, que utiliza técnicas moleculares y de secuenciación, para caracterizar y discriminar inequívocamente aislamientos bacterianos. Se evalúa la secuencia nucleotídica de cada gen.

III.5.2. Análisis de polimorfismos genéticos de genes constitutivos (*housekeeping*) en cepas seleccionadas de *E. faecium* y *E. faecalis* por MLST

Para este estudio un subconjunto de aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium* fueron seleccionados estratégicamente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por electroforesis de campo pulsado. Cepas que presentaron patrones de resistencia diferentes, siendo del mismo clon, también fueron seleccionadas, de modo tal de inferir conclusiones relacionadas con los resultados obtenidos por MLST y PFGE. Si bien se tuvieron en cuenta los criterios descriptos anteriormente, al ser MLST una técnica muy costosa y laboriosa, limitó el número de aislamientos para caracterizar.

III.5.3. Obtención de cultivos puros y extracción de ADN genómico

Las cepas conservadas en BHI (Difco) y glicerol al 20 % a -50 °C fueron sembradas en agar sangre (BD Columbia CNA Agar con 5 % sangre de carnero) e incubadas a 35 °C, por 24 h. El ADN fue extraído por método de ebullición utilizando 6 a 8 colonias aisladas y colocando las mismas en un tubo *ependorf*, con 300 µl de agua estéril. Posteriormente, los tubos fueron colocados en un baño de agua a 100 °C, por 15 min. Luego, se procedió a realizar una centrifugación por 10-15 min, a 13.000 r.p.m. El ADN bacteriano ubicado en el sobrenadante obtenido, se transfirió a un tubo estéril y se conservó a 4 °C para su posterior utilización.

III.5.4. PCR para amplificar genes del esquema de MLST en cepas de *Enterococcus* spp.

Los 7 genes constitutivos del esquema de MLST, que fueron amplificados por PCR, en cepas seleccionadas de enterococos, fueron publicados por Ruiz Garbajosa *et al.*, (2006) para *E. faecalis* y por Homan *et al.*, (2002), para *E. faecium*. El protocolo básico aplicado para las 120 PCR (Promega), realizadas en grupos de 10, se muestra en la Tabla N° 7. Los termocicladores utilizados para realizar las reacciones fueron modelos PRIME (Techne), T100 Thermal Cycler (BIO RAD), MJ Research PTC-100 Thermal Cycler. El volumen final de la reacción por cada tubo *ependorf*/muestra fue 24 µl, correspondiendo a 23 µl de *master mix* más 1 µl de ADN. En

cada experimento se realizó un control negativo que contenía todos los reactivos, excepto el ADN y en éste tubo el volumen final fue ajustado con agua ultra-pura estéril.

Las Tablas N° 8 y N° 9 muestran las condiciones de PCR y los cebadores utilizados para la detección y amplificación de los genes en ambas especies.

Tabla N° 7. Reactivos utilizados para la amplificación de los genes de MLST para grupo de 10 muestras. Años 2016-2017.

Reactivos	Volumen final
dNTPs (Promega)	4 µl
MgCl ₂ (Promega)	20 µl
Flexi <i>Buffer</i> 5X (Promega)	40 µl
Cebador <i>forward</i> (SIGMA)	2 µl
Cebador <i>reverse</i> (SIGMA)	2 µl
GoTaq polimerasa (1,5 U) (Promega)	1 µl
H ₂ O ultra-pura	161 µl
Volumen final	230 µl

III.5.5. Visualización de geles

La amplificación de los productos de PCR fue evidenciada mediante electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa D1, Conda) que posteriormente, fueron teñidos con GelRed. Se sembraron 5 µL del producto de PCR y como marcador de peso molecular se utilizó ADN *Ladder* de 100 pb (Takara Bio INC) y un buffer de carga concentración 6X (Takara Bio INC). Las condiciones de corrida fueron 100V (máximo); 300 w y 45 min (BIORAD). El equipo utilizado para fotografiar los geles con luz ultravioleta fue ChemiDoc MP (BIO RAD) y se usó el *Software Image Lab*TM (Imaging System ChemiDocTM MP) para observar y analizar las fotografías de cada gel.

Tabla N° 8. Condiciones de PCR y cebadores utilizados para amplificar los siete genes del esquema de MLST en cepas de *E. faecalis* aisladas de infecciones invasivas humanas. Años 2016-2017.

Gen	Cebador (5' a 3')	Proteína Codificada	Tamaño del amplicón	Condiciones de PCR	Referencia
<i>gdh</i>	<i>F*</i> : GGCGCACTAAAAGATATGGT <i>R**</i> : CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	660 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 56 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Ruiz Garbajosa <i>et al.</i> , 2006
<i>gyd</i>	<i>F</i> : CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC <i>R</i> : CATTCGTTGTCATACCAAGC	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	494 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 56 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Ruiz Garbajosa <i>et al.</i> , 2006
<i>pstS</i>	<i>F</i> : CGGAACAGGACTTTTCGC <i>R</i> : ATTTACATCACGTTCTACTTGC	Transportador del cassete de unión de ATP-fosfato	643 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 52 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Ruiz Garbajosa <i>et al.</i> , 2006
<i>gki</i>	<i>F</i> : GATTTTGTGGGAATTGGTATGG <i>R</i> : ACCATTAAAGCAAATGATCGC	Glucoquinasa	527 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 58 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Ruiz Garbajosa <i>et al.</i> , 2006
<i>aroE</i>	<i>F</i> : GGAAACTTTACGGAGACAGC <i>R</i> : GTCCTGTCCATTGTTCAAAGC	Shikimato 5- deshidrogenasa	524 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 62 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Ruiz Garbajosa <i>et al.</i> , 2006
<i>xpt</i>	<i>F</i> : AAAATGATGGCCGTGTATTAGC <i>R</i> : AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	Xantina fosforribosiltransferasa	538 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Ruiz Garbajosa <i>et al.</i> , 2006
<i>yiql</i>	<i>F</i> : CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG <i>R</i> : GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	Acetil-CoA acetiltransferasa	523 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 62 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Ruiz Garbajosa <i>et al.</i> , 2006

*: forward; **: reverse.

Tabla N° 9. Condiciones de PCR y cebadores utilizados para amplificar los siete genes del esquema de MLST en cepas de *E. faecium* aisladas de infecciones invasivas humanas. Años 2016-2017.

Gen	Cebador (5' a 3')	Proteína Codificada	Tamaño del amplicón	Condiciones de PCR	Referencia
<i>adk</i>	<i>F</i> *: TATGAACCTCATTTTAATGGG <i>R</i> ** : GTTGACTGCCAAACGATTTT	Adenilato quinasa	529 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 54 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Homan <i>et al.</i> , 2002
<i>atpA</i>	<i>F</i> : TTCAAATGGCTCATACGG <i>R</i> : AGTTCACGATAAGCAACAGC	Subunidad alfa- ATP sintetasa	654 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 50 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Homan <i>et al.</i> , 2002
<i>pstS</i>	<i>F</i> : TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG <i>R</i> : CGTGATCACGTTCTACTTCC	Transportador del cassete de unión de ATP-fosfato	631 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 58 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Homan <i>et al.</i> , 2002
<i>gyd</i>	<i>F</i> : CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC <i>R</i> : CATTTTCGTTGTCATACCAAGC	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa	494 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 56 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Homan <i>et al.</i> , 2002
<i>ddl</i>	<i>F</i> : GAGACATTGAATATGCCTTATG <i>R</i> : AAAAAGAAATCGCACCG	Ligasa D-alanina:D-alanina	560 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 50 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Homan <i>et al.</i> , 2002
<i>gdh</i>	<i>F</i> : GGC GCACTAAAAGATATGGT <i>R</i> : CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	660 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 56 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Homan <i>et al.</i> , 2002
<i>purK</i>	<i>F</i> : GCAGATTGGCACATTGAAAGT <i>R</i> : TACATAAATCCCGCCTGTTTC/T	Subunidad ATPasa fosforibosilaminoimi dazol carboxilasa	654 pb	1 ciclo de 10 min a 94 °C; 35 ciclos de 30 s a 94 °C; 30 s a 58 °C, 30 s a 72 °C; 1 ciclo de 10 min a 72 °C	Homan <i>et al.</i> , 2002

*: forward; **: reverse.

III.5.6. Purificación de los productos de PCR y posterior secuenciación

Para la secuenciación de los productos obtenidos por PCR se procedió a realizar previamente una purificación del amplicon obtenido. Pequeñas columnas cromatográficas de un kit comercial (*UltraClean* PCR MO BIO, Laboratories, Inc.) fueron utilizadas para asegurar un mejor rendimiento. Para obtener el producto purificado se aplicó el siguiente protocolo: dentro de un tubo *ependorf* que contenía una columna cromatográfica se colocó un volumen de cada producto de PCR y se adicionó reactivo Spin Bind, Ultra clean PCR, en una cantidad equivalente a 5 veces al volumen inicial de muestra, de modo tal de obtener un volumen final de 100 μ l. Posteriormente, se procedió a centrifugar cada tubo *ependorf* a 13.000 r.p.m, durante 30 segundos. Se agregó 300 μ l de reactivo Spin Clean Buffer y rápidamente se repitió la centrifugación, mismo tiempo y mismas r.p.m. Finalmente, se extrajo la columna para ser colocada en un tubo *ependorf* estéril y se procedió a agregar 50 μ l de Buffer Elution, dejando reposar 1 min. Luego del reposo, se centrifugó la muestra a 13.000 r.p.m, durante 1 min y el producto purificado fue conservado en la heladera, a 4 °C, hasta su posterior envío.

III.5.7. Envío de las muestras

Las muestras fueron enviadas a la empresa Macrogen Inc. (Sede Seúl, Corea del Sur) para realizar la secuenciación (Equipo 3730XL DNA Analyzer, Thermo Fisher Scientific). Los productos de PCR purificados fueron enviados junto con los mismos oligonucleótidos empleados en las reacciones de amplificación, ya que éstos son requeridos por la reacción de secuenciación. Se estableció una concentración mínima del producto purificado (50 ng/ μ L) a secuenciar, en función de lo requerido por el prestador del servicio de secuenciación. Los archivos de las secuencias obtenidas se recibieron en formato .ab1, de modo tal de observar el cromatograma con el *software* de trabajo utilizado: Chromas.Ink 2.6.4 (*Technelysium*).

III.5.8. Recepción de resultados, análisis y alineamiento de las secuencias

Los productos secuenciados fueron analizados con diversas herramientas bioinformáticas, de acuerdo con los siguientes pasos:

1. Cada secuencia se editó utilizando el *software* Chromas.Ink 2.6.4.
2. Cada secuencia, una vez editada, se comparó con las depositadas en la base de datos, según se tratase de especie *E. faecalis* (<https://pubmlst.org/data/alleles/efaecalis/gdh.tfa>) (Figura N° 10) o *E. faecium* (<https://pubmlst.org/data/alleles/efaecium/atpA.tfa>). Las direcciones web anteriormente mencionadas ejemplifican el ingreso para obtener los alelos de los genes *gdh* y *atpA*. El alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas ya procesadas se realizó utilizando el programa Clustal Omega, que permitió analizar las secuencias, por comparación, con las depositadas en la base de datos. Una vez obtenido el análisis se cortaron los extremos de las secuencias, obteniéndose un archivo formato fasta (formato de fichero informático basado en texto) para cada locus en estudio.

Figura N° 10. Captura de pantalla del cromatograma del gen *gdh* del esquema de MLST para *E. faecalis* emitido por el Software Chromas.Ink utilizado para editar las secuencias obtenidas. Años 2016-2017.

3. La Figura N° 11, muestra el lugar de ingreso de cada secuencia limpia y alineada en la base de datos PubMLST para *E. faecalis*. El sistema realiza la comparación con los alelos de su base de datos y posteriormente asigna un número.

Figura N° 11. Captura de pantalla que ejemplifica la comparación de secuencias obtenidas de genes del esquema de MLST para cepas *E. faecalis* analizadas, con las secuencias de los alelos depositados en la base de datos. Fuente: https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_efaecalis_seQ/Def&page=batchSequenceQuery. Año 2016-2017.

III.5.9. Determinación del *Sequence Type* (ST)

Para determinar el ST de cada cepa seleccionada se colocó el número de cada perfil alélico obtenido en los casilleros correspondientes, según el esquema MLST de cada bacteria. Se muestra este análisis en la siguiente captura de pantalla (Figura N° 12).

Figura N° 12. Captura de pantalla que ejemplifica la asignación de ST para *E. faecalis* por combinación de los números obtenidos de cada loci según la secuencia de cada alelo. Fuente: https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_efaecalis_seQ/Def&page=profiles&scheme_id=1. Años 2016-2017.

Las secuencias de los alelos de los 7 genes del esquema de MLST pueden también descargarse en formato mega o fasta desde <http://efaecalis.mlst.net> o <http://efaecium.mlst.net> como se muestra en las Figuras N° 13 y N° 14.

MLST Multi Locus Sequence Typing

mlst.net | efaecalis.mlst.net Wednesday 2nd August 2017

DATA ANALYSIS

DATABASES

- ☐ *B.burgdorferi*
- ☐ *B.cereus*
- ☐ *B.henselae*
- ☐ *B.pseudomallei*
- ☐ *C.albicans*
- ☐ *C.glabrata*
- ☐ *C.krusei*
- ☐ *C.tropicalis*
- ☐ *C.jejuni*
- ☐ *C.neoformans var grubii*
- ☐ *E.coli*
- ☐ *E.faecalis*
- ☐ *E.faecium*
- ☐ *H.influenzae*
- ☐ *H.pylori*
- ☐ *Leptospira spp.*
- ☐ *M.catarrhalis*
- ☐ *N.meningitidis*
- ☐ *S.agalactiae*
- ☐ *S.aureus*
- ☐ *S.dysgalactiae*
- ☐ *S.enterica*
- ☐ *S.epidermidis*
- ☐ *S.pneumoniae*
- ☐ *S.pyogenes*
- ☐ *S.suis*
- ☐ *V.vulnificus*

SUBMISSIONS

Enterococcus faecalis

Due to the retirement of Brian Spratt it has been agreed to transfer the MLST databases hosted at mlst.net from Imperial College London to Oxford, where Keith Jolley and Martin Maiden have kindly agreed to host them at PubMLST.org.

The *E. faecalis* site has now transferred - other species databases will be migrating to PubMLST.org in due course. This agreement will provide the security of these MLST databases for the benefit of the international microbiology community.

David Aanensen and Brian Spratt

To access the database please visit: <http://pubmlst.org/efaecalis/>

N.B. This site will no longer be up-to-date as all new strains are now only being added to the PubMLST site

Enterococcus faecalis

- ☐ Organism Specific Information
- ☐ Concatenate Sequences
- ☐ Download Alleles
- ☐ Download ST's
- ☐ Compare profile to refset
- ☐ Draw tree using own MLST data
- ☐ download as MS Excel
- ☐ download as MS Access
- ☐ *E.faecalis* Links
- ☐ eBURST V3
- ☐ Contact Curator

Figura N° 13. Captura de pantalla de la página principal del sitio <http://efaecalis.mlst.net>. Años 2016-2017.

MLST Multi Locus Sequence Typing

mlst.net | efaecium.mlst.net Wednesday 2nd August 2017

DATA ANALYSIS

DATABASES

- ☐ *B.burgdorferi*
- ☐ *B.cereus*
- ☐ *B.henselae*
- ☐ *B.pseudomallei*
- ☐ *C.albicans*
- ☐ *C.glabrata*
- ☐ *C.krusei*
- ☐ *C.tropicalis*
- ☐ *C.jejuni*
- ☐ *C.neoformans var grubii*
- ☐ *E.coli*
- ☐ *E.faecalis*
- ☐ *E.faecium*
- ☐ *H.influenzae*
- ☐ *H.pylori*
- ☐ *Leptospira spp.*
- ☐ *M.catarrhalis*
- ☐ *N.meningitidis*
- ☐ *S.agalactiae*
- ☐ *S.aureus*
- ☐ *S.dysgalactiae*
- ☐ *S.enterica*
- ☐ *S.epidermidis*
- ☐ *S.pneumoniae*
- ☐ *S.pyogenes*
- ☐ *S.suis*
- ☐ *V.vulnificus*

SUBMISSIONS

Enterococcus faecium

Due to the retirement of Brian Spratt it has been agreed to transfer the MLST databases hosted at mlst.net from Imperial College London to Oxford, where Keith Jolley and Martin Maiden have kindly agreed to host them at PubMLST.org.

The *E. faecium* site has now transferred - other species databases will be migrating to PubMLST.org in due course. This agreement will provide the security of these MLST databases for the benefit of the international microbiology community.

David Aanensen and Brian Spratt

To access the database please visit: <http://pubmlst.org/efaecium/>

N.B. This site will no longer be up-to-date as all new strains are now only being added to the PubMLST site

Enterococcus faecium

- ☐ Organism Specific Information
- ☐ Concatenate Sequences
- ☐ Download Alleles
- ☐ Download ST's
- ☐ Compare profile to refset
- ☐ Draw tree using own MLST data
- ☐ download as MS Excel
- ☐ download as MS Access
- ☐ *E.faecium* Links
- ☐ eBURST V3
- ☐ Contact Curator

Figura N° 14. Captura de pantalla de la página principal del sitio <http://efaecium.mlst.net>. Años 2016-2017.

En la Figura N° 15 se muestra el flujograma de trabajo final para obtención del ST.

Figura N° 15. Flujograma final de trabajo para obtención del secuencio tipo. Adaptado de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>. Años 2016-2017.

La identificación microbiológica, utilizando metodología MLST, también se realizó en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRyCIS), España.

III.5.10. Aplicación de herramientas bioinformáticas para establecer la estructura genética poblacional e inferir relaciones evolutivas

El programa MEGA7 y Clustal Omega así como el programa *Phyloviz* 2.0 (<http://www.phyloviz.net/>) fueron utilizados. *Phyloviz* fue aplicado también para asociar el análisis de las secuencias genéticas obtenidas, para cada perfil alélico, con los datos epidemiológicos de cada aislado.

OBJETIVO GENERAL N° 2

Detectar resistencia antimicrobiana y evaluar *in vitro* opciones antimicrobianas en cepas de enterococos multirresistentes

OBJETIVO ESPECIFICO N° 6

III.6. Determinar el perfil de resistencia *in vitro* frente a los antimicrobianos de importancia clínica mediante pruebas cualitativas y cuantitativas (CIM).

III.6.1. Estudio de sensibilidad *in vitro* cualitativo**III.6.1.1. Operacionalización de la/las variables**

Identificación: Variable cualitativa categórica: Perfil de resistencia antimicrobiana cualitativo (R, I o S).

Definición conceptual (Dimensión): Resistencia (R): capacidad de un microorganismo para resistir la acción de un ATM. Resistencia intermedia (I): capacidad intermedia de un microorganismo para resistir la acción de un ATM o incierta, donde puede haber éxito en sitios donde el ATM se concentre más que en suero, pero no en infecciones "complicadas". Sensibilidad (S): categoría que sugiere un 90 % de probabilidades de éxito en la terapia antimicrobiana.

Indicador/es: El perfil de RA de una bacteria se evalúa cualitativamente por método estandarizado Kirby-Bauer o prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar (CLSI). La asignación de la categoría R, I o S viene dada por la medición en mm, del halo de inhibición detectado alrededor del disco de papel, impregnado con un ATM.

El perfil de resistencia a los ATM se determinó de manera cualitativa utilizando el método de difusión por discos o Kirby Bauer, según los instructivos de las guías establecidas por CLSI, 2015. Se partió de cultivos conservados a -50 °C. Cada cepa fue sembrada en agar m-

Enterococcus (Difco™) e incubadas a 35 °C, durante 24 h, con el fin de obtener el aislamiento microbiano del cultivo puro.

La densidad de cada suspensión bacteriana se ajustó con un densitómetro para lograr un inóculo final de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, correspondiendo al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Un hisopo estéril fue embebido en cada suspensión bacteriana para inocular placas de Petri que contenían Agar Müller-Hinton (Difco™). Trece monodiscos de ATM fueron colocados con un dispenser aplicador (BIO RAD) y fueron depositados en placas de Petri cuadradas, de 120 x 120 mm, sobre la superficie del agar. Todas las placas fueron incubadas a 35 °C, durante 18 h y posteriormente se realizó la medición de los diámetros de los halos de inhibición utilizando el equipo ADAGIO™ Automated System y corroborando los diámetros dudosos de manera manual.

Los resultados fueron interpretados según categoría de sensible (S), intermedio (I) o resistente (R), siguiendo las recomendaciones del CLSI, 2015. Se consideraron las definiciones dadas por este comité según categoría: “*sensible*” que implica que los aislamientos son inhibidos a concentraciones de ATM que usualmente se obtienen en el sitio de la infección, a la dosis recomendada. Categoría “*intermedia*”, es la que incluye aquellos aislamientos con CIM que se aproximan a niveles alcanzables en sangre y tejidos, para las que la respuesta puede ser menor que para los microorganismos sensibles. Esta categoría implica eficacia clínica en sitios donde las drogas se concentran fisiológicamente o cuando se usa una dosis mayor. Categoría “*resistente*”, para aquellos aislamientos que no son inhibidos a las concentraciones que se logran con dosis normales y/o que poseen CIM que caen en el intervalo donde existen mecanismos de resistencia probables y que no se ha demostrado la eficacia clínica en estudios de tratamientos.

Como control de proceso se utilizaron las cepas de referencia: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 51299 y *S. aureus* ATCC 25923. Cabe aclarar que, aunque ADAGIO™ Automated System interpreta los antibiogramas de acuerdo con los puntos de corte clínicos de EUCAST, éste fue utilizado para leer la medida de los halos de inhibición, pero su interpretación en las diferentes categorías se realizó según los puntos de cortes clínicos, para enterococos, de acuerdo con CLSI, 2015. En aquellos ATM que por CLSI no figuraban sus puntos de corte se utilizó EUCAST.

Los 13 discos de ATM que se ensayaron, utilizando sistema ADAGIO fueron: Quinupristín/Dalfopristín (Q/D) 15 µg, Clindamicina (CLI) 2 µg, Linezolid (LZD) 30 µg, Tigeciclina (TGC) 15 µg, Cloranfenicol (CHL) 30 µg, Eritromicina (ERI) 15 µg, Levofloxacin (LVX) 5 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Vancomicina (VAN) 30 µg, Teicoplanina (TEC) 30 µg, Penicilina G (PEN) 6 µg, Ampicilina (AMP) 10 µg y, Ampicilina + sulbactam (SAM) 20 µg, todos de potencia certificada (BIO RAD).

CLI se utilizó como parte de pruebas para la tipificación, por la resistencia intrínseca a dicho ATM de especies *E. faecalis* y *E. faecium* (Devriese *et al.*, 2002).

Para los aminoglucósidos se realizó el test de *screening* para detectar ANRAG. Se utilizaron discos de estreptomicina (STH) 300 µg (Laboratorios Britania) y gentamicina (GEH) 120 µg (OXOID) y la interpretación se realizó según CLSI, 2015:

- Halo de STH y/o GEH 6 mm: **resistente**. Indica alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos. Predice ausencia de sinergia cuando se asocian con agentes activos sobre la pared celular.
- Halo de STH y/o GEH 7 - 9 mm: **indeterminado**. Precisa confirmación con CIM en diluciones en agar o caldo.
- Halo de STH y/o GEH ≥ 10 mm: **sensible**. Excluye alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos. Predice sinergia cuando se asocian con agentes activos sobre la pared celular.

Los puntos de cortes utilizados para los 15 ATM se muestran en la Tabla N° 10.

Tabla N° 10. Puntos de cortes de los antimicrobianos utilizados en el test de Kirby Bauer.

Antimicrobiano [§]	Categorías (mm)		
	SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
	(S)	(I)	(R)
Q/D	≥ 19	16 – 18	≤ 15
CLI	**	**	**
LZD	≥ 23	21 – 22	≤ 20
TGC	≥ 18	-----	≤ 18*
CHL	≥ 18	13 – 17	≤ 12
ERI	≥ 23	14 – 22	≤ 13
LVX	≥ 17	14 – 16	≤ 13
CIP	≥ 21	16 – 20	≤ 15
VAN	≥ 17	15 – 16	≤ 14
TEC	≥ 14	11 – 13	≤ 10
SAM	A	A	A
AMP	≥ 17	-----	≤ 16
PEN	≥ 15	-----	≤ 14
STH (alta carga)	≥ 10	7 – 9	6
GEH (alta carga)	≥ 10	7 – 9	6

*: Todo aislamiento con halo ≤ 18 mm debe confirmarse en medio MH Difco y de mantenerse el resultado, derivar al Servicio Antimicrobianos, ANLIS C. Malbrán. Red WHONET-ARGENTINA. **: Los enterococos son intrínsecamente resistentes a la clindamicina, utilizado solo como control. A: *Enterococcus* sensibles a PEN son a AMP, SAM, AMC, AMX, piperacilina y piperacilina-tazobactam en cepas no productoras de β-lactamasas. §: Siglas de antibióticos, según WHONET.

III.6.2. Estudio de sensibilidad *in vitro* cuantitativo (CIM)

III.6.2.1. Operacionalización de la/las variables

Identificación: Variable cuantitativa discreta: Concentración inhibitoria mínima (CIM).

Definición conceptual de categorías: Sensible (S): los aislamientos son inhibidos a concentraciones de ATM que usualmente se obtienen en el sitio de la infección, a la dosis recomendada. Intermedia (I): incluye aislamientos con CIM que se aproximan a niveles alcanzables en sangre y tejidos, para las que la respuesta puede ser menor que para los

microorganismos sensibles. Resistente (R): aislamientos que no son inhibidos a las concentraciones que se logran con dosis normales y/o que poseen CIM que caen en el intervalo donde existen mecanismos de resistencia probables y que no se ha demostrado la eficacia clínica en estudios de tratamientos. La asignación de la categoría R, I o S viene dada por el valor obtenido en $\mu\text{g/mL}$ cuando se realiza la detección de CIM. Dicho valor se compara con los puntos de cortes estandarizados para cada género y especie bacteriana según el ATM evaluado.

Indicador/es: Utilizando kit comercial (método epsilométrico) o realizando diluciones al medio en medio sólido o líquido a partir de la droga sólida (principio activo). Ambas metodologías están estandarizadas por CLSI.

La CIM fue realizada siguiendo las recomendaciones del CLSI. Esta se realizó en toda cepa que presentó un perfil de sensibilidad intermedia y/o RA, según los puntos de corte obtenidos por método Kirby Bauer. Cuando no fue posible conseguir el principio activo de la droga antimicrobiana en estado puro, se trabajó con kit comercial utilizando tiras E-test (método epsilométrico) y en ciertos casos para corroborar resultados dudosos. En aquellos casos donde se dispuso de la droga sólida de pureza analítica certificada, se pesaron 0,05 g de la misma y se realizaron diluciones seriadas del ATM, partiendo de una solución madre de concentración 5.000 $\mu\text{g/mL}$. Dichas diluciones fueron vertidas (1 mL) a frascos que contenían 9 mL de Agar Müeller-Hinton (DifcoTM), fundido a 45 °C. El inóculo de cada bacteria se preparó resuspendiendo colonias puras de un cultivo fresco en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. La concentración final bacteriana utilizada por cada aguja-spot del multiinoculador, fue de 1×10^4 UFC/mL (Fotografía N° 3). Los *spot* fueron inoculados en placas de Petri que tenían diluciones decrecientes de los ATM. Las placas se incubaron en atmósfera ordinaria y luego de 24 h se procedió a leer la CIM, que correspondió a la placa con menor concentración de ATM en la cual se observó inhibición completa de crecimiento bacteriano. *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299 fueron utilizadas como cepas controles. Los puntos de cortes para los ATM se muestran en la Tabla N° 11. Una placa sin ATM fue colocada como control de proceso.

Fotografía N° 3. Multiinoculador (replicador Steers) similar al utilizado para determinar la CIM en medio sólido. Fuente: Foto de autora.

Tabla N° 11. Puntos de cortes utilizados para los antimicrobianos en la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima.

Antimicrobiano	Concentración Inhibitoria Mínima (µg/mL)		
	SENSIBLE (S)	INTERMEDIO (I)	RESISTENTE (R)
GEH	≤ 500	--	> 500**
STH	≤ 1000	--	> 2000**
VAN	≤ 4	8 – 16	≥ 32
TEC	≤ 8	16	≥ 32
LVX	≤ 2	4	≥ 8
CIP	≤ 1	2	≥ 4
CHL	≤ 8	16	≥ 32
PEN	≤ 8§	--	≥ 16
AMP	≤ 8	--	≥ 16
SAM*	≤ 4	--	≥ 8

**> 1 colonia = resistente, CLSI 2015. *: puntos de cortes obtenidos de EUCAST 2015. §: *Enterococcus* sensibles a PEN son a AMP, SAM, AMC, AMX, piperacilina y piperacilina-tazobactam en cepas no productoras de β-lactamasas.

III.6.3. Detección fenotípica de producción de β -lactamasa

La producción de β -lactamasa se investigó mediante el método del disco de nitrocefín (Cefinase discs) utilizando un kit comercial (Becton Dickinson, Argentina SRL.).

Para la detección de producción de esta enzima se colocó el disco de nitrocefín en un portaobjetos y se hidrató con una gota de agua destilada estéril. Se tomaron colonias con ansa estéril de un cultivo puro aislado en agar cerebro-corazón (Laboratorios Britania) y se depositó un inóculo en el disco. La prueba se consideró positiva cuando al depositar dicho inóculo se observó la aparición de color rojo sobre el disco color amarillo. Como control positivo del proceso se utilizó la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 y como control negativo la cepa *E. faecalis* CECT 7121.

OBJETIVO ESPECIFICO N ° 7

III.7. Determinar la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos mediante técnicas de amplificación génica.

III.7.1. Operacionalización de la/las variables

Identificación: Variable cualitativa dicotómica: Presencia o no de genes *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*.

Definición conceptual (Dimensión): Tipos de genes *van* que confieren resistencia a glucopéptidos.

Indicador/es: La detección se realiza aplicando una PCR estandarizada, con cebadores específicos de cada gen para amplificar los fragmentos internos, utilizando controles positivos y negativos. SI: presencia del gen. NO: ausencia del gen.

III.7.2. Detección fenotípica de resistencia a vancomicina

La detección de resistencia a VAN se realizó fenotípicamente por método de cribado. El CLSI recomienda el uso de una placa de agar BHI con 6 $\mu\text{g/mL}$ de VAN, un inóculo de 10^5 - 10^6

UFC/depósito (1-10 μ l de un inóculo equivalente al 0,5 Escala de Mc Farland) y una incubación de 24 h a 35 ± 2 °C. La detección de más de 1 colonia, de un ligero o de un claro crecimiento, son indicativos de resistencia a VAN. Como controles se utilizaron las cepas de referencia *E. casseliflavus* ATCC 25788 (control positivo) y *E. faecalis* ATCC 29212 (control negativo).

III.7.3. Detección genotípica de resistencia a vancomicina

Las PCR para detectar el tipo de operón, que confirió resistencia a VAN, fue realizada en toda cepa que presentó categoría resistente, con las pruebas fenotípicas. 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 los fragmentos internos, siguiendo los protocolos de Aarestrup *et al.*, (2000) y Depardieu *et al.*, (2004) (Tabla N° 12).

III.7.3.1. Extracción de ADN genómico

El ADN bacteriano se extrajo por ebullición. Las cepas se sembraron en agar sangre y las placas fueron incubadas a 35 °C, durante 24 h. Seguidamente, se colocaron 300 mL de agua estéril en tubos *ependorf*, uno por cepa, y fue inoculado cada tubo con una masa densa de bacterias aisladas. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 100 °C, durante 15 min. Luego, se centrifugaron a 13.000 r.p.m durante 10 a 15 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril y se lo conservó a 4 °C para su posterior utilización.

III.7.3.2. Tipificación molecular de la resistencia a vancomicina por PCR

Para la detección genotípica del gen *van* por PCR la *master mix* fue preparada utilizando una cantidad de agua ultra-pura, *Flexi Buffer 5X* (Promega), $MgCl_2$ (2mM) (Promega), dNTPs, cebadores *forward* y *reverse* y *GoTaq* polimerasa (1,5 U) (Promega). Los μ L de cada reactivo utilizado dependieron del número de muestras a procesar. Las PCR fueron realizadas en un termociclador modelo MJ Research PTC-100 Thermal Cycler. El volumen final de la reacción fue 23 μ l y la amplificación fue realizada como se describe: 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 54 °C y 1 min a 72 °C, con 7 min a 72 °C, para la extensión final. Los productos

obtenidos se resolvieron en geles de agarosa por electroforesis a 100 V, 300 w, por 45 min (BIO RAD), sembrando 5 µL del producto de PCR. Para la visualización de los geles, los mismos fueron teñidos con GelRed. Como marcador de peso molecular fue utilizado *Lambda Ladder Marker* (New Englad Biolabs). En cada experimento se realizó un control negativo que contenía todos los reactivos, excepto el ADN.

Tabla N° 12. Secuencias de oligonucleótidos empleados como cebadores en la PCR.

Gen	Cebador (5'a 3')	Tamaño del amplicón	Referencia
<i>vanA</i>	A1(F): GGGAAAACGACAATTGC	732 pb	Depardieu <i>et al.</i> , 2004
	A2(R): GTACAATGCGGCCGTTA		
<i>vanB</i>	B3(F): ACGGAATGGGAAGCCGA	647 pb	Depardieu <i>et al.</i> , 2004
	B4(R): TGCACCCGATTTTCGTT		
<i>vanC1/2</i>	C5(F): ATGGATTGGTAYTKGTAT ^c	815/827 pb	Depardieu <i>et al.</i> , 2004
	C8(R): TAGCGGGAGTGM CYMGTA A ^c		

^c: K = G o T; M = A o C; Y = C o T.

OBJETIVO ESPECIFICO N° 8

III.8. Evaluar *in vitro* antimicrobianos frente a cepas multirresistentes utilizando curvas de letalidad.

III.8.1. Operacionalización de la/las variables

Identificación: Variable dependiente cuantitativa: Log₁₀ UFC/mL de cepas MDR sobrevivientes.

Definición conceptual (Dimensión): Logaritmo de las unidades formadoras de colonias por mL sobrevivientes a través del tiempo, luego de la exposición a una concentración fija de ATM en un medio de cultivo líquido.

Indicador/es: La detección de células viables (sobrevivientes) se realiza por método estandarizado, sembrando diluciones del cultivo (bacteria + ATM) en medio sólido, a la hora estipulada por el investigador con el fin de contar las colonias sobrevivientes.

La técnica de curva de muerte o letalidad microbiana constituye el método de referencia que permite evaluar y estimar *in vitro*, la velocidad bactericida y el sinergismo entre dos ATM entre otras cosas. Con las curvas de letalidad se puede observar la dinámica de la actividad bactericida de concentraciones elegidas de ATM y detectar la concentración que posee la mayor actividad microbicida. Para cumplimentar este objetivo, fueron seleccionadas solo aquellas cepas que presentaron MDR y/o fueron EVR. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las recomendaciones del documento M26-A “Métodos para determinar la actividad bactericida de agentes antimicrobianos” (CLSI, 1999).

Las definiciones microbiológicas que se consideraron para este objetivo fueron: **efecto bactericida** a la “disminución de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL, en relación al recuento de las colonias del inóculo inicial a las 24 h ó cuando murió el 99,9 %”. Antagonismo como “aumento en el crecimiento de más de $1 \log_{10}$ UFC/mL a las 24 h, en la curva de asociación de ATM frente a la del ATM más activo en solitario”; **sinergia antimicrobiana** como “disminución del recuento $\geq 2 \log_{10}$ UFC/24 h en la curva de asociación, respecto a la del ATM más activo”. En cada curva realizada *in vitro* con cada cepa, aparte del control de crecimiento realizado con *E. faecalis* ATCC 29212, se preparó otro tubo, con el fin de validar el crecimiento de cada cepa analizada (curva de vida), colocando 9 mL de caldo Müeller-Hinton más 1 mL del inóculo bacteriano, sin el agregado de ATM.

Para el aislamiento de cepas se trabajó con cultivos puros, inoculados en placas de Petri, que contenían agar cerebro-corazón. Las placas se incubaron por 24 h, en atmósfera ordinaria. Los ATM utilizados fueron adquiridos como principios activos de pureza analítica certificada, pesados en balanza analítica correctamente calibrada y diluidos según las especificaciones del CLSI, 2015 (Table 6A. *Solvents and Diluents for Preparation of Stock Solutions of Antimicrobial Agents*). Las diferentes concentraciones de ATM fueron obtenidas a partir de diluciones de una solución madre *stock* de trabajo de 5.000 µg/mL.

Cada microorganismo (una cepa por cada curva de letalidad) fue puesto en contacto con distintas concentraciones fijas de ATM, ya sea solo o combinados, en caldo Müeller-Hinton utilizando un volumen final de 10 mL. Posteriormente, los tubos con caldo fueron sembrados, para realizar el recuento de células bacterianas sobrevivientes, a distintos tiempos de incubación

(0 h, 4 h, 8 h y 24 h) en placas que contenían agar cerebro-corazón. Tubos inoculados con el microorganismo pero sin ATM se utilizaron como controles.

Los recuentos “a ojo desnudo” de las células sobrevivientes se realizaron en placa mediante 3 diluciones al 1:10 (D_1 , D_2 y D_3): 0,1 mL de muestra en 0,9 mL de solución salina estéril. Se construyó una gráfica de células sobrevivientes en función del tiempo para apreciar la cinética bactericida. El límite de detección fue de 100 UFC/mL. Cualquier recuento mayor al inóculo inicial se consideró sobrecrecimiento. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para construir las curvas fueron los siguientes:

1. La CIM del microorganismo que fue evaluado a los ATM ensayados.
2. Las concentraciones de ATM que se ensayaron fueron aquellas cercanas a la media alcanzada en sangre y también según la CIM de cada microorganismo. Se utilizaron también concentraciones antimicrobianas equivalentes a $CIM \times 2$; $CIM \times 3$ y $CIM \times 4$.
3. El tiempo en que la concentración fue bactericida, evaluada por estudios pilotos, es decir el tiempo en el que el descenso de UFC fue de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL con respecto al tiempo inicial.

La curva de letalidad fue construida graficando el log de las UFC/mL en función del tiempo (h). Los puntos de las curvas para cada aislamiento se sometieron a regresión lineal simple. Como medida de bondad de ajuste del modelo, se consideraron los coeficientes de determinación $R^2 > 0,7$ (expresado en %), siendo R^2 el cuadrado del coeficiente de correlación lineal de Pearson: r . Pendientes de la recta resultantes con signos negativos, fueron asumidas como bactericidia.

III.8.2. Preparación del inóculo bacteriano de trabajo

Cinco colonias aisladas provenientes de un cultivo puro fueron seleccionadas y colocadas en solución fisiológica estéril, hasta lograr una densidad correspondiente al 0,5 de la escala de Mc Farland, la cual fue medida en un densitómetro digital. Seguidamente, la muestra se diluyó 1:20 para disminuir la concentración a 5×10^6 UFC/mL. Sin embargo, la concentración final del inóculo de trabajo fue aproximadamente 5×10^5 UFC/mL, el cual fue agregado (1 mL), en cada

tubo, con diferentes concentraciones de ATM utilizados para evaluar la actividad bactericida (Figura N° 16).

Figura N° 16. Esquematización del sembrado de las diluciones en una placa de Petri, a fin de realizar el conteo de bacterias sobrevivientes a diferentes tiempos de incubación.

El cálculo realizado para obtener el recuento de sobrevivientes fue el siguiente:

$$\text{Bacterias (colonias) sobrevivientes (UFC/mL)} = \text{Número de colonias} \times 200 \times D \text{ (dilución)}$$

III.8.3. Tipos de antimicrobianos y concentraciones seleccionadas en estudios de curvas de letalidad para evaluar la cinética bactericida

Los ATM utilizados fueron: LVX (Laboratorios Roemmers), IMP (Northia), VAN (Laboratorios Drawer S.A.), GEH (Laboratorios Bagó), TGC (Wyeth) y LZD (P. L. Rivero y CIA SA.).

Todos los medios de cultivos tanto fueran utilizados en estado sólido como líquido, fueron preparados en cada semana de trabajo (duración del experimento). Todas las soluciones de ATM fueron preparadas en el día de su uso.

En la Tabla N° 13 se muestran las características químicas y concentraciones de los antimicrobianos utilizados en las curvas de letalidad. Las concentraciones de ATM que se ensayaron fueron aquellas cercanas a la media alcanzada en sangre y también según la CIM de cada microorganismo. Se utilizaron también concentraciones antimicrobianas equivalentes a CIM x 2; CIM x 3 y CIM x 4.

$$\text{Cantidad de ATM a pesar (mg)} = \frac{\text{Concentración (}\mu\text{g/mL)} \times \text{Volumen (mL)}}{\text{Potencia (}\mu\text{g/mg)}}$$

Donde:

Potencia ($\mu\text{g/mg}$): potencia del principio activo dada por el fabricante.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$): concentración madre stock del ATM.

Volumen (mL): volumen final de la solución según concentración deseada.

Tabla N° 13. Características químicas y concentraciones de los antimicrobianos utilizados en las curvas de letalidad. Años 2014-2016.

ANTIMICROBIANO	Características (certificado analítico)	Laboratorio	Concentraciones (µg/mL)
Levofloxacin	Levofloxacin hemihidrato Origen: China Titulo: 96,6 % Valoración por HPLC*: 99,3 % sda Lote: 00133227	Roemmers	8 µg/mL 32 µg/mL 64 µg/mL
Imipenem	Imipenem® (nombre comercial) Polvo estéril inyectable I.V. Lote: 27243	Northia	8 µg/mL 16 µg/mL 32 µg/mL 64 µg/mL
Gentamicina	Gentamicina como sulfato Valoración: 664 mg/g Criterio de aceptación: > 590 mg/g Lote: 54979	Bagó	16 µg/mL 32 µg/mL 64 µg/mL
Tigeciclina	Tygacil® (nombre comercial) Polvo liofilizado para solución inyectable I.V. Lote: G06087	Wyeth	0,2 µg/mL 0,8 µg/mL 1 µg/mL
Vancomicina	Vancomicina genérica Drawer Polvo inyectable I.V. Lote: 67076	Drawer	16 µg/mL 32 µg/mL
Linezolid	Litrecran (nombre comercial) Polvo Codigo: C0043 MP1 Lote: 2114969 Droga genérica	Rivero	0,5 µg/mL

*: *High performance liquid chromatography* (inglés) o cromatografía líquida de alta eficacia.

IV. RESULTADOS

OBJETIVO GENERAL N° 1

Caracterizar fenotípicamente y genotípicamente cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de líquidos obtenidos por punción, provenientes de infecciones invasivas humanas de pacientes internados en el Hospital Municipal Ramón Santamarina de Tandil

OBJETIVOS ESPECIFICOS N° 1 y 2

IV.1. Aislamiento e identificación fenotípica y por espectrometría de masas de cepas de *Enterococcus* spp., recuperadas de líquidos obtenidos por punción, provenientes de infecciones invasivas humanas.

IV.1.1. Caracterización fenotípica a nivel de género y especie

Por pruebas bioquímicas (sección I.5.1. del capítulo I) y MALDI TOF-MS se identificaron N=63 cepas pertenecientes al género *Enterococcus*, de las cuales $n=44$ (69,8 %) correspondieron a la especie *E. faecalis* y $n=19$ (30,2 %) a la especie *E. faecium* (Figura N° 17).

Figura N° 17. Frecuencia y porcentaje de especies del género *Enterococcus* spp. aisladas e identificadas a partir de muestras clínicas provenientes de infecciones invasivas. Los valores graficados representan el total de microorganismos aislados con su respectiva barra de error y desviación estándar.

IV.1.1.1. Confirmación por MALDI TOF-MS

Para la identificación de *E. faecalis* y *E. faecium* los indicadores estadísticos de los puntajes obtenidos para los espectros de masas de cada cepa, se muestran en la Tabla N° 14. El puntaje para *E. faecalis* que se presentó con mayor frecuencia fue de 2,20, mientras que para *E. faecium* fueron 2,24; 2,27 y 2,36.

Tabla N° 14. Puntajes promedios obtenidos según especie de *Enterococcus* identificadas por espectrometría de masas. Año 2015.

Especie	Promedio de los puntajes obtenidos por MALDI TOF-MS	
	$\bar{X} \pm S$	Máximo-Mínimo
<i>E. faecalis</i>	2,16 $\pm$,10498	2,34 - 2,00
<i>E. faecium</i>	2,34 $\pm$,12911	2,51 - 2,00

Las Tablas N° 15 y N° 16 muestran las especies de *Enterococcus* identificadas a partir de muestras clínicas obtenidas de infecciones invasivas. A cada cepa se le asignó un código alfanumérico. Se indica además el año correspondiente de su aislamiento y el tipo de muestra clínica analizada.

Tabla N° 15. Especies de *E. faecium* identificadas, año de aislamiento y muestra clínica obtenida por punción. HMRS cohortes 2010, 2013 y 2014.

Especie	Código cepa	Año	Muestra
<i>E. faecium</i>	C16-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecium</i>	C20-IRE2	2013	Absceso hepático
<i>E. faecium</i>	C35-IR	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecium</i>	C47-IRE2	2014	Líquido abdominal
<i>E. faecium</i>	C48-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecium</i>	C38-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecium</i>	C30-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecium</i>	C31-IR	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecium</i>	C32-IR	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecium</i>	C34-IR	2013	Líquido articular
<i>E. faecium</i>	C45-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecium</i>	C52-IRE2	2014	Líquido articular
<i>E. faecium</i>	C3-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecium</i>	C7-IRE2	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecium</i>	C14-IRE2	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecium</i>	C53-IR	2014	Absceso abdominal
<i>E. faecium</i>	C40-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecium</i>	C44-IRE2	2014	Absceso hepático
<i>E. faecium</i>	C51-IRE2	2014	Líquido abdominal

Tabla N° 16. Especies de *E. faecalis* identificadas, año de aislamiento y muestra clínica obtenida por punción. HMRS cohortes 2010, 2013 y 2014.

Especie	Código cepa	Año	Muestra
<i>E. faecalis</i>	C41-IR	2014	Líquido articular
<i>E. faecalis</i>	C42-IR	2014	Absceso tisular
<i>E. faecalis</i>	C43-IR	2014	Absceso renal
<i>E. faecalis</i>	C46-IR	2014	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C47-IRE1	2014	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C50-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C51-IRE1	2014	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C11-IR	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C13-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C54-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C55-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C12-IRE1	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C12-IRE1.1	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C15-IR	2013	Líquido articular
<i>E. faecalis</i>	C6-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C7-IRE1	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C19-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C28-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C29-IR	2010	Absceso hepático
<i>E. faecalis</i>	C39-IR	2014	Líquido pericárdico
<i>E. faecalis</i>	C44-IRE1	2014	Absceso hepático
<i>E. faecalis</i>	C52-IRE1	2014	Líquido articular
<i>E. faecalis</i>	C9-IR	2013	Absceso en útero
<i>E. faecalis</i>	C1-IR	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C2-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C4-IR	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C37-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C49-IR	2014	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C8-IR	2010	Absceso subfrénico
<i>E. faecalis</i>	C10-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C14-IRE1	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C22-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C33-IR	2013	Absceso tejido celular
<i>E. faecalis</i>	C23-IR	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C24-IR	2013	Absceso ovárico
<i>E. faecalis</i>	C27-IR	2013	Líquido articular
<i>E. faecalis</i>	C25-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C26-IR	2013	Hemocultivo
<i>E. faecalis</i>	C20-IRE1	2010	Absceso hepático
<i>E. faecalis</i>	C21-IR	2013	Líquido articular
<i>E. faecalis</i>	C17-IR	2013	Líquido articular
<i>E. faecalis</i>	C18-IR	2010	Líquido abdominal
<i>E. faecalis</i>	C36-IR	2013	Líquido articular
<i>E. faecalis</i>	C5-IR	2010	Absceso hepático

El año donde se reportaron mayores aislamientos para el género *Enterococcus* spp., provenientes de infecciones invasivas fue 2014, con un $n=24$ (38,1 %).

La mayor cantidad de aislados correspondientes a especie *E. faecalis* se observó en el 2013 ($n=18$; 40,9 %) y para *E. faecium* la mayor cantidad de aislamientos sucedió en 2014 ($n=9$; 47,4 %).

La Figura N° 18 muestra una tendencia ascendente en el aislamiento para ambas especies de enterococos en relación a los años. El valor obtenido del coeficiente de determinación R^2 para *E. faecalis* fue de 0,3 (30 %) y para *E. faecium* de $R^2 = 0,7$ (70 %).

Figura N° 18. Líneas de tendencia lineal con su ecuación correspondiente para *E. faecalis* y *E. faecium* aislados según años 2010, 2013 y 2014. Los valores graficados representan el total de microorganismos aislados con su respectiva barra de error.

IV.1.1.2. Identificación por proteómica de colonias de diferente tamaño observadas en una misma placa de Petri.

Se realizó una observación exhaustiva en cada placa de Petri donde fue sembrada cada muestra clínica con el propósito de observar presencia o ausencia de diferentes morfotipos de colonias.

En la siguiente fotografía se observan 2 tipos de colonias que, a simple vista, poseen diferente tamaño. Cuando fueron identificadas por MALDI TOF-MS y pruebas fenotípicas, las mismas correspondieron a la especie *E. faecalis* y se codificaron como C12-IRE1 y C12-IRE1.1.

Fotografía N° 4. Morfotipo presuntivo de colonia pequeña de *E. faecalis* aislada de un hemocultivo proveniente de un paciente con diagnóstico de endocarditis. Cultivo de 24 h.

Por otra parte, se observó que, en el sembrado de 7 muestras clínicas se obtuvo desarrollo de 2 tipos de colonias morfológicamente diferentes (Fotografía N° 5). Ambas colonias correspondieron a las especies *E. faecalis* y *E. faecium*. Las mismas se codificaron de la siguiente manera (Tabla N° 17): cuando la especie correspondió a *E. faecalis* se le asignó código E1 (C20-IRE1) y cuando la especie correspondió a *E. faecium* se asignó código E2 (C20-IRE2).

Fotografía N° 5. Aislamiento de 2 especies de *Enterococcus* con tamaño de colonia diferente, provenientes de una misma muestra clínica. **A:** crecimiento a las 24 h; **B:** crecimiento a las 48 h.

En la siguiente Tabla se observan las muestras clínicas donde se obtuvo desarrollo de ambas colonias post-siembra.

Tabla N° 17. Muestras clínicas donde se obtuvo desarrollo de ambas especies de *Enterococcus*: *E. faecalis* (E1) + *E. faecium* (E2). HMRS, cohorte 2010, 2013 y 2014.

Especies	Código cepa	Muestra clínica	Año aislamiento
<i>E. faecalis</i> (E1) + <i>E. faecium</i> (E2)	C7-IRE1	Líquido abdominal	2010
	C7-IRE2		
	C14-IRE1	Líquido abdominal	2010
	C14-IRE2		
	C20-IRE1	Absceso	2010
	C20-IRE2		
	C44-IRE1	Absceso	2014
	C44-IRE2		
	C47-IRE1	Líquido abdominal	2014
	C47-IRE2		
	C51-IRE1	Líquido abdominal	2014
	C51-IRE2		
	C52-IRE1	Líquido articular	2014
	C52-IRE2		

IV.1.1.3. Detección de hemolisinas

Cada cepa fue sembrada en agar sangre para observar la producción del tipo de hemólisis. La Fotografía N° 6.A muestra la producción de hemólisis tipo β y γ y la 6.B la β -hemólisis del control (+). En la Tabla N° 18 se muestra el tipo y porcentaje de hemólisis detectada según especie de enterococos aislada.

Fotografía N° 6. Hemólisis β obtenida con cepa *E. faecium* C3-IR y hemólisis tipo γ obtenida con cepa *E. faecalis* C9-IR (Fig. A). Cepa control (+) hemólisis β de *S. aureus* ATCC 25923 (Fig. B).

Tabla N° 18. Tipo y porcentaje de hemólisis detectada según especie de enterococos aislada. HMRS cohortes 2010, 2013 y 2014.

Especies		Frecuencia aislamiento <i>n</i> (%)
<i>E. faecalis</i>	α -hemólisis	2 (4,5)
	β -hemólisis	--
	γ -hemólisis	42 (95,5)
	Total (N)	44 (100)
<i>E. faecium</i>	α -hemólisis	6 (31,6)
	β -hemólisis	13 (68,4)
	γ -hemólisis	--
	Total (N)	19 (100)

Existen diferencias significativas entre tipo de hemólisis y tipo de especie de enterococos aislada ($p=0,000$), para un nivel de significancia del 95 % según prueba estadística no paramétrica aplicada. Ambas variables presentaron una fuerte asociación evidenciado por coeficiente de correlación de Spearman ($\rho=0,941$).

OBJETIVO ESPECIFICO N° 3

IV.2. Estudio de la relación entre especie de enterococo aislada y variables clínicas y demográficas de los pacientes con infección invasiva.

El tipo de especies de enterococos según muestra clínica provenientes de infecciones invasivas humanas obtenidas por punción (**una por paciente**) se distribuyeron según lo muestra la Tabla N° 19. Se observa mayor porcentaje de detección en hemocultivos (36,4 %) y en abscesos (25 %) para la especie *E. faecalis*, seguido en orden decreciente por una menor cantidad de detección en líquidos abdominales (22,7 %) y articulares (13,6 %). *E. faecium* se aisló en hemocultivos y en líquidos abdominales en un mismo porcentaje (36,8 %), seguido en orden decreciente, de abscesos (15,9 %) y finalmente de líquidos articulares (10,5 %).

Tabla N° 19. Especies de enterococos aisladas según muestra clínica provenientes de infecciones invasivas humanas.

Muestra clínica (n)		<i>E. faecalis</i>		<i>E. faecium</i>	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Hemocultivos (n=22)		16	36,4	7	36,8
Líquidos articulares	Cadera (n=5)	4		2	
	Rodilla (n=2)	2		--	
TOTAL		6	13,6	2	10,5
Líquidos abdominales	Peritoneales (n=6)	5		4	
	Intravesiculares (n=1)	--		1	
	Abdominales (n=6)	5		2	
TOTAL		10	22,7	7	36,8
Abscesos	Hepáticos (n=4)	4		2	
	Renales (n=1)	1		--	
	Cutáneos (n=3)	3		--	
	Subfrénico (n=1)	1		--	
	Abdominal (n=1)	--		1	
	Tubo-ovárico (n=1)	1		--	
	En útero (n=1)	1		--	
TOTAL		11	25	3	15,9
Líquido pericárdico (n=1)		1	2,3	--	--

IV.2.1. Tipo de especie aislada y datos demográficos de los pacientes: edad y género

Los rangos etarios de los pacientes diagnosticados con infecciones invasivas en el HMRS se muestran en la Tabla N° 20. La edad promedio fue $59 \pm 18,8$ años con un mínimo de 16 y un máximo de 92 años. Se observa mayor porcentaje de pacientes en el rango etario V, comprendido entre 64 y 75 años.

Tabla N° 20. Frecuencia de pacientes con infecciones invasivas en relación al rango etario.

Rangos etarios*	n (%)
I. 16 - 27	4 (7,3)
II. 28 - 39	4 (7,3)
III. 40 - 51	11 (20)
IV. 52 - 63	12 (21,8)
V. 64 - 75	14 (25,5)
VI. 79 - 87	8 (14,5)
VII. 88 - 99	2 (3,6)
Total (N)	55 (100)

*Regla de Sturges, para cálculos de intervalos de clase. Daniel W, 1993.

En este trabajo $n=15$ (27,3 %) pacientes correspondieron al género femenino y $n=40$ (72,7 %) al género masculino. La distribución de aislamientos de *Enterococcus* spp. según género del paciente fue la siguiente: *E. faecalis* se recuperó en $n=14$ (31,8 %) pacientes de género femenino y $n=30$ (68,2 %) pacientes del género masculino. La recuperación de *E. faecium* fue de $n=3$ (15,8 %) para pacientes del género femenino y de $n=16$ (84,2 %) para pacientes del género masculino.

La Tabla N° 21 muestra la frecuencia de aislamiento de las especies identificadas según género del paciente. En la misma se observa, para ambas especies mayores porcentajes de aislamientos en pacientes de género masculino. Con respecto al rango etario, se observó mayor porcentaje de aislamientos de *E. faecalis* 13/44 (29,5 %), en el rango V comprendido entre 64 - 75 años. Para *E. faecium* el mayor porcentaje de aislamiento 5/19 (26,3 %), se observó en el rango IV de 52 - 63 años.

Tabla N° 21. Frecuencia y porcentaje de aislamientos de especies de enterococos según género del paciente y año. HMRS, 2010, 2013 y 2014.

Especie <i>Enterococcus</i>	Género paciente	Año	Frecuencia y porcentaje n (%)
EFC*	Femenino	2010	1 (7,2)
		2013	8 (57,1)
		2014	5 (35,7)
		Total	14 (100)
		Cv	75,2 %
	Masculino	2010	10 (33,3)
		2013	10 (33,3)
		2014	10 (33,3)
		Total	30 (100)
		Cv	0 %
EFM**	Femenino	2013	1 (33,3)
		2014	2 (66,7)
		Total	3 (100)
		Cv	70,7 %
	Masculino	2010	5 (31,3)
		2013	4 (25)
		2014	7 (43,7)
		Total	16 (100)
		Cv	28,6 %

*: *E. faecalis*; **: *E. faecium*.

Se observa mayor dispersión de enterococos en el género femenino ($Cv \geq 70 \%$) en comparación con género masculino ($Cv \leq 29 \%$). No existió relación estadísticamente significativa entre aislamientos de especies de enterococos según género del paciente ($p=0,192$) para un ρ de Spearman igual a 0,166.

En relación al **tipo de especie y uso de terapia antimicrobiana previa**: no se encontró asociación estadística entre aislamiento de especies de enterococos y consumo de ATM previos ($p=0,196$), al igual que para especie de enterococos y evolución del paciente: alta o fallecimiento ($p=0,873$) con escasa correlación según Spearman ($p=0,020$). Se observó que cepas de enterococos fueron aisladas con mayor prevalencia de pacientes masculinos que habían recibido terapia antimicrobiana previa. Se observó también que, pacientes que habían recibido ATM

previos y presentaban comorbilidades (como enfermedades crónicas), presentaron mayor aislamiento de *E. faecalis* ($n=20$) y de *E. faecium* ($n=12$) en comparación con aquellos pacientes que habían recibido ATM y no tenían comorbilidades, a saber para *E. faecalis* solo $n=13$ y para *E. faecium* solo $n=5$ pacientes. El aislamiento de especies de este género fue un factor independiente de la terapia antimicrobiana previa y de la evolución del paciente.

Cuarenta y cuatro pacientes $n=44$ (80 %) habían recibido terapia antimicrobiana empírica, siendo CIP y ceftriaxona, seguido de cefalexina, los ATM más utilizados como monoterapia empírica, y la dupla mayormente utilizada, metronidazol/CIP. En todos los años, donde fueron tomadas transversalmente las muestras clínicas (2010, 2013 y 2014), se observó consumo de ATM previos. En 2010, se observó mayor consumo de ATM respecto de los años anteriores, como terapia antimicrobiana previa (Figura N° 19). Respecto a *E. faecium*, en solo 2 pacientes no se observó utilización de ATM como terapia empírica previa.

Figura N° 19. Porcentajes del consumo de antimicrobianos utilizados en profilaxis antibiótica en el HMRS en relación al año. Los valores graficados representan el porcentaje de ATM con su respectiva barra de error.

En relación a la **evolución de los pacientes**, $n=15$ (27,3 %) fallecieron y a $n=40$ (72,7 %) se les otorgó el alta médica.

IV.2.2. Especies de enterococos recuperadas según Servicio de internación del paciente

E. faecium fue aislado con mayor frecuencia en los servicios de cirugía y traumatología. Para la especie *E. faecalis*, la mayoría de las veces no pudo ser identificado el Servicio de internación. Sin embargo, la mayor frecuencia de aislamientos se observó en los servicios de cirugía y traumatología, coincidiendo con *E. faecium* (Tabla N° 22). No se observó diferencias estadísticamente significativas entre distribución de especies de enterococos y Servicio de internación del paciente ($p=0,282$).

Tabla N° 22. Especies de enterococos aisladas según Servicio del HMRS en relación al consumo de antimicrobianos.

Especie <i>Enterococcus</i>	ATM previos	Servicio	Frecuencia y porcentaje <i>n</i> (%)
<i>E. faecalis</i>	No	Clínica	2 (18,2)
		Guardia/Emergencias	1 (9,1)
		s/d	6 (54,5)
		Traumatología	1 (9,1)
		UTI	1 (9,1)
		Total	11 (100)
	Si	Cirugía	7 (21,2)
		Guardia/Emergencias	3 (9,1)
		s/d	15 (45,5)
		Traumatología	5 (15,2)
		UTI	3 (9,1)
		Total	33 (100)
<i>E. faecium</i>	No	Clínica	1 (50)
		UTI	1 (50)
		Total	2 (100)
	Si	Cirugía	4 (23,5)
		Guardia/Emergencias	3 (17,6)
		s/d	3 (17,6)
		Traumatología	4 (23,5)
		UTI	3 (17,6)
		Total	17 (100)

IV.2.3. Tipos de muestras clínicas, tipos de infecciones diagnosticadas y patologías de base crónica en pacientes internados con diagnóstico presuntivo de infección invasiva. HMRS: cohorte 2010, 2013 y 2014

Ambas especies se aislaron en diferentes proporciones de todos los tipos de líquidos.

Hemocultivos, fue la muestra más prevalente con un 40 % ($n=22$); seguida de líquidos abdominales con 23,7 % ($n=13$) y abscesos con 21,9 % ($n=12$). Líquidos articulares fue la cuarta muestra clínica más solicitada, con un 12,7 % ($n=7$). Líquido pericárdico fue tomado en una oportunidad correspondiendo a un 1,8 % ($n=1$) (Figura N° 20). El total de muestras clínicas tomadas correspondió a $n=55$.

Figura N° 20. Frecuencias (n) de muestras clínicas obtenidas por punción provenientes de infecciones invasivas según año. HMRS, cohorte 2010, 2013 y 2014. Los valores graficados representan el total de muestras clínicas con su respectiva barra de error. *L. abd.*: líquido abdominal; *Hem*: hemocultivo; *L. art.*: líquido articular.

Se observa una mayor frecuencia de obtención de muestras por punción en 2013, coincidiendo esto con el año en el cual mayor cantidad de pacientes fueron atendidos en el HMRS con diagnóstico de infección invasiva. En el 2014, al igual que 2013, hemocultivos fue la muestra más frecuentemente tomada.

Los **tipos de infecciones diagnosticadas** en pacientes del HMRS, durante las cohortes 2010, 2013 y 2014, fueron en primer lugar infecciones osteoarticulares o asociadas a implantes ortopédicos ($n=11$). En segundo lugar, se ubicaron las infecciones graves post-traumatismos, producidas como consecuencia de un accidente de auto/moto ($n=6$). El tercer lugar fue ocupado por las infecciones post-quirúrgicas ($n=5$), muchas de ellas producto de cirugías realizadas en pacientes con cáncer (CA) de colon y esófago como enfermedad de base. Las infecciones intraabdominales como peritonitis ($n=2$), apendicitis ($n=2$) y litiasis vesicular ($n=1$), registraron un menor porcentaje de frecuencia, al igual que las infecciones invasivas como osteomielitis ($n=1$); sepsis ($n=1$); bacteriemia con foco urinario ($n=1$); bacteriemia sin foco ($n=1$), endocarditis ($n=1$) y pericarditis ($n=1$). No se observó asociación entre tipo de infecciones y especie de enterococos aislados ($p=0,205$).

Patologías de base crónica o antecedentes patológicos personales (comorbilidades) explicitadas en las historias clínicas de los pacientes, se presentaron con la siguiente frecuencia: DBT tipo I ($n=5$; 18,5 %) y DBT tipo II ($n=1$; 3,7 %); insuficiencia renal crónica ($n=4$; 14,8 %); alcoholismo ($n=3$; 11,1 %); artrosis ($n=1$; 3,7 %); artritis reumatoidea ($n=1$; 3,7 %) y CA de ovario ($n=1$; 3,7 %), CA de hígado ($n=2$; 7,4 %), CA de páncreas ($n=1$; 3,7 %), CA de próstata ($n=1$; 3,7 %), CA de esófago ($n=1$; 3,7 %) y CA de colon ($n=3$; 11,1 %). Accidente cerebrovascular (ACV) y enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) se presentaron en una oportunidad ($n=1$; 3,7 %) al igual que VIH ($n=1$; 3,7 %). Como medida de frecuencia, la razón de pacientes internados en el HMRS con comorbilidades presentes durante el periodo de estudio fue 49 % (27/55 pacientes). No se encontró asociación entre ambas variables, especies de enterococos aislada y presencia de comorbilidad ($p=0,561$) con asociación negativa determinada por coeficiente de Spearman ($\rho=-0,078$).

OBJETIVO ESPECIFICO N° 4

IV.3. Determinación de la relación clonal de los aislamientos analizando pulsotipos obtenidos por electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Con electroforesis de campo pulsado se determinó la presencia de 10 tipos clonales para la especie *E. faecium* y 25 para la especie *E. faecalis*, aplicando los criterios de Tenover *et al.*, (1995). Las Fotografías N° 7, 8, 9, 10 y 11 (geles de agarosa teñidos) muestran los clones encontrados en este estudio para *E. faecium* y *E. faecalis*. El clon mas prevalente fue EFC-2 para *E. faecalis* ($n=5$; 11,4 %) y EFM-1 para *E. faecium* ($n=4$; 21 %). Otros pulsotipos se detectaron más de una vez para ambas especies (Tabla N° 23 y N° 24).

Fotografía N° 7. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecium* productores de infecciones invasivas digeridos con *Sma*I y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1 y 21: λ , *lambda ladder marker*. Línea 2: C30-IR *vanB*⁺; línea 3: C38-IR; línea 4: C47-IRE2 *vanB*⁺; línea 5: C48-IR *vanA*⁺; línea 6: C31-IR; línea 7: C32-IR; línea 8: C34-IR; línea 9: C45-IR; línea 10: C52-IRE2; línea 11: C16-IR; línea 12: C20-IRE2; línea 13: C35-IR; línea 14: C7-IRE2; línea 15: C14-IRE2; línea 16: C40-IR; línea 17: C44-IRE2 *vanA*⁺; línea 18: C51-IRE2; línea 19: C53-IR *vanA*⁺ y línea 20: C3-IR.

La Tabla N° 23 muestra el clon más prevalente (EFM-1) aislado mayormente de la muestra mas solicitada (hemocultivos).

Tabla N° 23. Clones de *E. faecium* detectados por electroforesis de campo pulsado.

Año 2015.

Cepa	Servicio	Muestra	Año	Pulsotipo	Frecuencia n (%)
C30-IR	UTI	Hemocultivo	2013	EFM ^{**} -1	
C38-IR	Traumatología	Hemocultivo	2014	EFM-1	
C48-IR	Cirugía	Hemocultivo	2014	EFM-1	4 (21)
C47-IRE2	Cirugía	Líquido abdominal	2014	EFM-1	
C31-IR	Guardia	Líquido abdominal	2010	EFM-2	
C32-IR	s/d*	Líquido abdominal	2010	EFM-2.1	3 (15,8)
C34-IR	s/d	Líquido articular	2013	EFM-2	
C45-IR	Traumatología	Hemocultivo	2014	EFM-3	
C52-IRE2	Traumatología	Líquido articular	2014	EFM-3	2 (10,4)
C16-IR	UTI	Hemocultivo	2013	EFM-4	
C20-IRE2	Cirugía	Absceso	2013	EFM-4	3 (15,8)
C35-IR	Guardia	Líquido abdominal	2010	EFM-4	
C3-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFM-5	
C7-IRE2	Guardia	Líquido abdominal	2010	EFM-5	2 (10,5)
C14-IRE2	Clínica	Líquido abdominal	2010	EFM-6	1 (5,3)
C53-IR	UTI	Absceso	2014	EFM-7	1 (5,3)
C40-IR	Traumatología	Hemocultivo	2014	EFM-8	1 (5,3)
C44-IRE2	UTI	Absceso	2014	EFM-9	1 (5,3)
C51-IRE2	Cirugía	Líquido abdominal	2014	EFM-10	1 (5,3)

*: sin datos, **: *E. faecium*.

La Figura N° 21 muestra la mayor detección de tipos de clones (n=6) en el 2014, coincidiendo que en dicho año se obtuvo la mayor cantidad de aislamientos de *E. faecium* (n=9; 37,5 %). EFM-1 fue el clon más diseminado. En 2010, así como en 2014, el clon EFM-2 y el EFM-4, fueron los más diseminados, ambos en un 40 %.

Figura N° 21. Porcentaje de frecuencias del tipo de clon detectado en cepas de *E. faecium* provenientes de infecciones invasivas, según año de aislamiento. HMRS, Argentina. Año 2015.

Para la especie *E. faecalis*, el campo pulsado se realizó por etapas debido a que el n muestral superaba el número de muestras que podían procesarse simultáneamente con dicha metodología. Varios ADN de diferentes cepas fueron procesados por duplicado y triplicado, debido a la presencia de variables no deseables, como se observa en la calle/línea N° 14 del gel correspondiente a la Fotografía N° 9 y en las calles/líneas N° 14 y 18 del gel correspondiente a la Fotografía N° 11. En ambos casos, el pulsotipo no pudo ser leído debido a la digestión total o parcial de material genético bacteriano inserto en agarosa.

Fotografía N° 8. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecalis* productores de infecciones invasivas digeridos con *Sma*I y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1 y 12: λ , *lambda ladder marker*. Línea 2: C8-IR; línea 3: C10-IR; línea 4: C11-IR; línea 5: C13-IR; línea 6: C17-IR; línea 7: C50-IR; línea 8: C39-IR; línea 9: C43-IR; línea 10: C44-IRE1; línea 11: C47-IRE1.

Fotografía N° 9. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecalis* productores de infecciones invasivas digeridos con *Sma*I y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1: λ , *lambda ladder marker*. Línea 2: C26-IR; línea 3: C27-IR; línea 4: C28-IR; línea 5: C29-IR; línea 6: C25-IR; línea 7: C33-IR; línea 8: C36-IR; línea 9: C41-IR; línea 10: C42-IR.

Fotografía N° 10. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecalis* productores de infecciones invasivas digeridos con *Sma*I y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1 y 24: λ , *lambda ladder marker*. Línea 2: C38-IRE2; línea 3: C46-IR; línea 4: C47-IRE1; línea 5: C48-IRE1; línea 6: C50-IR; línea 7: C51-IRE1; línea 8: C6-IR; línea 9: C8-IR; línea 10: C12-IRE2; línea 11: C18-IR; línea 12: C20-IRE1, línea 13: C21-IR; línea 14: ADN digerido por completo. Línea 15: C29-IRE2; línea 16: C30-IRE2; línea 17: C36-IR; línea 18: C37-IR; línea 19: C49-IRE2; línea 20: C4-IR; línea 21: C24-IR; línea 22: C23-IR; línea 23: C5-IR.

Fotografía N° 11. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecalis* productores de infecciones invasivas digeridos con *Sma*I y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1 y 27: λ , *lambda ladder marker*. Línea 2: C1-IR; línea 3: C2-IR; línea 4: C4-IR; línea 5: C5-IR; línea 6: C6-IR; línea 7: C7-IRE1; línea 8: C8-IR; línea 9: C9-IR; línea 10: C10-IR; línea 11: C11-IR; línea 12: C12-IRE1, línea 13: C12-IRE2; línea 14 y 18: ADN digerido por completo. Línea 15: C14-IRE1; línea 16: C15-IR; línea 17: C16-IRE2; línea 19: C18-IR; línea 20: C19-IR; línea 21: C20-IRE1; línea 22: C54-IR; línea 23: C55-IR; línea 24: C21-IR; línea 25: C22-IR; línea 26: C23-IR.

Tabla N° 24. Clones de *E. faecalis* detectados por electroforesis de campo pulsado. Año 2015.

Cepa	Servicio	Muestra	Año	Pulsotipo	Frecuencia <i>n</i> (%)
C43-IR	Cirugía	Absceso	2014	EFC^{**}-2	5 (11,37)
C46-IR	Cirugía	Líquido abdominal	2014	EFC-2	
C47-IRE1	Cirugía	Líquido abdominal	2014	EFC-2	
C50-IR	Clínica	Hemocultivo	2014	EFC-2	
C51-IRE1	Cirugía	Líquido abdominal	2014	EFC-2	
C11-IR	Cirugía	Líquido abdominal	2010	EFC-3	4 (9,10)
C13-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-3	
C22-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-3	
C33-IR	Guardia	Absceso	2013	EFC-3	2 (4,54)
C54-IR	Traumatología	Hemocultivo	2014	EFC-4	
C55-IR	UTI	Hemocultivo	2014	EFC-4	
C12-IRE1	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-5	3 (6,83)
C12-IRE1.1	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-5.1	
C15-IR	s/d	Líquido articular	2013	EFC-5	
C5-IR	s/d	Absceso	2010	EFC-6	1 (2,27)
C6-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-7	
C7-IRE1	Guardia	Líquido abdominal	2010	EFC-7	4 (9,10)
C19-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-7	
C28-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-7	
C9-IR	s/d	Absceso	2013	EFC-8	1 (2,27)
C1-IR	s/d	Líquido abdominal	2010	EFC-9	1 (2,27)
C2-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-10	1 (2,27)
C4-IR	s/d	Líquido abdominal	2010	EFC-11	1 (2,27)
C37-IR	Traumatología	Hemocultivo	2014	EFC-12	4 (9,10)
C49-IR	UTI	Hemocultivo	2014	EFC-12	
C41-IR	Traumatología	Líquido articular	2014	EFC-12.1	
C42-IR	Guardia	Absceso	2014	EFC-12.1	1 (2,27)
C8-IR	s/d	Absceso	2010	EFC-13	
C10-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-14	
C14-IRE1	Clínica	Líquido abdominal	2010	EFC-15	1 (2,27)
C29-IR	s/d	Absceso	2010	EFC-16.1	4 (9,10)
C39-IR	UTI	Líquido pericárdico	2014	EFC-16	
C44-IRE1	UTI	Absceso	2014	EFC-16	
C52-IRE1	Traumatología	Líquido articular	2014	EFC-16.1	1 (2,27)
C23-IR	Cirugía	Líquido abdominal	2010	EFC-17	
C24-IR	s/d	Absceso	2013	EFC-18	
C27-IR	Traumatología	Líquido articular	2013	EFC-19	1 (2,27)
C25-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-20	1 (2,27)
C26-IR	s/d	Hemocultivo	2013	EFC-21	1 (2,27)
C20-IRE1	Cirugía	Absceso	2010	EFC-22	1 (2,27)
C21-IR	Traumatología	Líquido articular	2013	EFC-23	1 (2,27)
C17-IR	s/d	Líquido articular	2013	EFC-24	1 (2,27)
C18-IR	Guardia	Líquido abdominal	2010	EFC-25	1 (2,27)
C36-IR	s/d	Absceso	2013	EFC-26	1 (2,27)

*: sin datos; **: *E. faecalis*.

A diferencia de *E. faecium*, *E. faecalis* mostró el mayor porcentaje de aislamientos, así como de tipos de clones detectados ($n=13$) en 2013, siendo EFC-3 y EFC-7 los clones detectados con mayor porcentaje de prevalencia en dicho año, ambos con un 16,7 %. En 2010, la detección fue más homogénea en cuanto al porcentaje, pero más heterogénea en relación a la cantidad de tipos clonales ($n=11$), es decir, se observó más diversidad de clones pero menor frecuencia de aislamiento en cada uno de ellos. En 2014, se detectaron solo 5 tipos clonales, siendo EFC-2 ($n=5$, 33,3 %), EFC-12 ($n=4$, 26,7 %) y EFC-16 ($n=3$, 20 %), los más prevalentes (Figura N° 22).

Figura N° 22. Porcentaje de frecuencias del tipo de clon detectado en cepas de *E. faecalis* provenientes de infecciones invasivas según año de aislamiento. HMRS, Argentina. Año 2015.

En la Fotografía N° 4 se mostró la detección de una posible variante de colonia pequeña de *E. faecalis*, aislada de un hemocultivo, proveniente de un paciente con diagnóstico de endocarditis. La caracterización genotípica por PFGE demostró que la colonia pequeña resultó ser un subtipo del clon EFC-5 y fue denominado EFC-5.1.

En relación a la edad de los pacientes, la mayor cantidad de tipos clonales para la especie *E. faecalis* se observó en el rango etario V comprendido entre 64 y 75 años ($n=13$). Para *E. faecium* la mayor cantidad de clones se observó en el rango etario IV comprendido entre 52-63 años, con $n=5$.

A pesar que para ambas especies de enterococos, ciertos datos respecto a la variable Servicio del HMRS no pudieron determinarse, la mayor detección de clones de *E. faecalis* se evidenció en cirugía ($n=7$) y traumatología ($n=6$), siendo EFC-2 el clon diseminado con mayor frecuencia en el Servicio de cirugía durante el 2014 ($n=4$). En ambos, servicios se observó también mayor porcentaje en el consumo de ATM en terapia empírica (Tabla N° 22). Para *E. faecium*, la mayor frecuencia de clones EFM, se observó en los servicios de traumatología y UTI.

La muestra clínica más prevalente en este estudio fue hemocultivo. Respecto a esta variable, se observó que el tipo de clon que predominó en *E. faecalis* aislados de sangre fue EFC-7 y en *E. faecium* EFC-1. Se determinó que, la distribución de especies de enterococos no fue la misma entre las categorías del tipo de clon ($p=0,002$; para muestras independientes).

OBJETIVO ESPECIFICO N° 5

IV.4. Caracterización genética de cepas seleccionadas de *Enterococcus* spp. por Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci (MLST) y determinación de la estructura genética poblacional.

IV.4.1. Análisis de la variabilidad genética de clones de *E. faecalis* y *E. faecium*

El análisis del polimorfismo genético de los genes constitutivos del esquema de MLST, para ambas especies, se realizó enviando a secuenciar los genes de $n=9$ (20,4 %) cepas de *E. faecalis* y de $n=8$ (42,1 %) cepas de *E. faecium*, seleccionadas estratégicamente. Aquellas cepas que no fueron enviadas a secuenciar pero que, presentaron idéntico pulsotipo obtenido por PFGE y que, lógicamente, integraban el mismo clon, se les asignó el mismo ST de la cepa con idéntico pulsotipo secuenciada.

IV.4.2. Corridas electroforéticas de los productos amplificados correspondientes a genes constitutivos de los esquemas de MLST para *E. faecalis* y *E. faecium*

La amplificación de los genes constitutivos para la especie *E. faecalis* puede observarse en las siguientes fotografías N° 12 a N° 18, la cepa C38E2 se utilizó como control (+):

Fotografía N° 12. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *gdh* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular (bp: pares de base); línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 13. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *gyd* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 14. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *pstS* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 15. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *xpt* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 16. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *yiqL* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 17. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *aroE* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 18. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *gki* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Se muestran seguidamente, fotografías N° 19 a 21 de las corridas electroforéticas para 4/7 genes constitutivos *atpA*, *gdh*, *pstS* y *gyd* para algunas cepas de *E. faecium*.

Fotografía N° 19. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *pstS* en cepas *E. faecium*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 10: control (+) y línea 11: control (-).

Fotografía N° 20. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *gyd* en cepas *E. faecium*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 10: control (+) y línea 11: control (-).

Fotografía N° 21. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de los genes *atpA* y *gdh* en cepas *E. faecium*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 9: control (+); línea 10: control (-).

IV.4.3. Resultados de MLST para *E. faecalis*

Para *E. faecalis* se detectaron 7 ST diferentes en el total de las cepas analizadas ($n=9$), siendo ST9 (CC9) el detectado en mayor cantidad ($n=5/22$; 22,7 %). Los demás ST, ST236 (CC213), ST720, ST179 (CC16), fueron detectados en 4 oportunidades. Los ST388 (CC388) y 604 se detectaron en 2 oportunidades y el ST281 (CC2) en una oportunidad. ST720 y ST604 resultaron “singletons” es decir, aislamientos que no pertenecían a ningún CC decripto hasta la fecha. La mayoría de los perfiles alélicos obtenidos fueron reportados anteriormente por otros investigadores, mientras que el ST720 encontrado en esta investigación, no había sido descrito hasta la fecha a nivel mundial y según datos registrados en PubMLST solo ha sido detectado en Argentina (Tabla N° 25). Estos resultados fueron enviados al curador de la base de datos <https://pubmlst.org> en mayo de 2016 obteniéndose la siguiente designación para las 2 cepas:

Tabla N° 25. Designación de nuevo ST720.

Aislamiento	Alias	<i>gdh</i>	<i>gyl</i>	<i>pstS</i>	<i>gki</i>	<i>aroE</i>	<i>xpt</i>	<i>yqiL</i>	ST
<i>E. faecalis</i> C11-IR	87609	35	7	3	2	56	1	5	720
<i>E. faecalis</i> C33-IR	38416	35	7	3	2	56	1	5	720

Search or browse *Enterococcus faecalis* isolates database

Enter search criteria or leave blank to browse all records. Modify form parameters to filter or enter a list of values.

Isolate provenance/phenotype fields: id = [Enter value...]

Allele designations/scheme fields: ST (MLST) = 720

Action: [Reset] [Submit]

2 records returned. Click the hyperlinks for detailed information.

Isolate fields							MLST								
id	isolate	aliases	key	country	year	source category	epidemiology	<i>gdh</i>	<i>gyl</i>	<i>pstS</i>	<i>gki</i>	<i>aroE</i>	<i>xpt</i>	<i>yqiL</i>	ST
1421	E. faecalis C11-IR	87609	A4132	Argentina	2010	hospitalized patient	clinical_isolate	35	7	3	2	56	1	5	720
1422	E. faecalis C33-IR	38416	A4133	Argentina	2013	hospitalized patient	clinical_isolate	35	7	3	2	56	1	5	720

Analysis tools:

Breakdown: [Fields] [Two Field] [Combinations] [Polymorphic sites] [Schemes/alleles] [Publications]

Analysis: [BURST] [Codons] [Presence/Absence] [PhyloTree] [PhyloViz]

Export: [Dataset] [Sequences]

Figura N° 23. Captura de pantalla donde se muestra la designación del nuevo ST720 y su localización en la base de datos *on line*.

La Tabla N° 26 muestra los diferentes perfiles alélicos, los ST así como los CC, el año de aislamiento y el tipo de clon detectados en las cepas seleccionadas de *E. faecalis*.

Tabla N° 26. Caracterización genética de cepas seleccionadas de *E. faecalis* utilizando tipado por secuenciación de múltiples loci (MLST). Año 2016.

Especie	Cepa	Año	Clon	Perfil alélico							ST	CC ^ψ	BAPS
				<i>gdh</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>gki</i>	<i>aroE</i>	<i>xpt</i>	<i>yqiL</i>			
EFC**	C43-IR	2014	EFC-2	4	6	16	4	1	1	4	9	9	1
	C46-IR	2014	EFC-2	4	6	16	4	1	1	4	9	9	1
	C47-IRE1	2014	EFC-2	4	6	16	4	1	1	4	9	9	1
	C50-IR	2014	EFC-2	4	6	16	4	1	1	4	9	9	1
	C51-IRE1	2014	EFC-2	4	6	16	4	1	1	4	9	9	1
	C11-IR	2010	EFC-3	35	7	3	2	56	1	5	720	s/d	3
	C13-IR	2013	EFC-3	35	7	3	2	56	1	5	720	s/d	3
	C33-IR	2013	EFC-3	35	7	3	2	56	1	5	720	s/d	3
	C22-IR	2013	EFC-3	35	7	3	2	56	1	5	720	s/d	3
	C54-IR	2014	EFC-4	35	7	40	32	32	26	31	388	388	1
	C55-IR	2014	EFC-4	35	7	40	32	32	26	31	388	388	1
	C15-IR	2013	EFC-5	2	7	11	1	23	16	2	604	s/d	2
	C12-IRE1	2013	EFC-5	2	7	11	1	23	16	2	604	s/d	2
	C12-IRE1.1	2013	EFC-5.1	2	7	11	1	23	16	2	604	s/d	2
	C6-IR	2013	EFC-7	5	1	1	3	7	1	6	179	16	3
	C7-IRE1	2010	EFC-7	5	1	1	3	7	1	6	179	16	3
	C19-IR	2013	EFC-7	5	1	1	3	7	1	6	179	16	3
	C28-IR	2013	EFC-7	5	1	1	3	7	1	6	179	16	3
	C37-IR	2014	EFC-12	11	6	50	33	1	38	10	236	213	1
	C49-IR	2014	EFC-12	11	6	50	33	1	38	10	236	213	1
	C42-IR	2014	EFC-12.1	11	6	50	33	1	38	10	236	213	1
	C41-IR	2014	EFC-12.1	11	6	50	33	1	38	10	236	213	1
	C52-IRE1	2014	EFC-16	15	7	3	2	56	1	5	281	2	3

Ψ: complejo clonal; *: Análisis Bayesiano de la estructura poblacional; **: *E. faecalis*; s/d: sin datos.

El ST720 solo se diferenció en un gen del perfil alélico con la cepa de ST281. Su gen *gdh* del perfil varió del número 15 del ST281 al 35 para el ST720. Cuando se realizó el alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas de ambos alelos del locus *gdh*, con el *software* Clustal Omega, se observaron cinco sustituciones de bases nucleotídicas, es decir una transición de base pirimidínica por otra base pirimidínica (Figura N° 24).

```

gdh15      CCTCCTGTTGC TTTTCTGAAAAAGAAATTCGGACTGAAAAAGTAAAAGCTTTACGTGCC
gdh35      CCTCCTGTTGC TTTTCTGAAAAAGAAATTCGGACTGAAAAAGTAAAAGCTTTACGTGCC
*****

gdh15      ATCCGCCTTTATTCTGAAGAAGAAGCCCTTCAAATTTTCGTGCGTGGACAATACGGCGAA
gdh35      ATCCGCCTTTATTCTGAAGAAGAAGCCCTTCAAATTTTCGTGCGTGGACAATACGGCGAA
*****

gdh15      GGTACAGCTAGCTGATCAAACATTTGCAGCCTATCGTGATGAACCGAATGTGGCAGAACT
gdh35      GGTACAGCTAGCTGATCAAACATTTGCAGCCTATCGTGATGAACCGAATGTGGCAGAACT
*****

gdh15      TCATCCACTGAACTTTTGTGCTGGTAAATTTTAAATTGATAATTTCCGTTGGTCTGGC
gdh35      TCATCCACTGAACTTTTGTGCTGGTAAATTTTAAATTGATAATTTCCGTTGGTCTGGC
*****

gdh15      GTCCCTTTCTATGTTGCGACAGGTAAACGATTAAGTAAAAAGGTACACGATTAACATC
gdh35      GTCCCTTTCTATGTTGCGACAGGTAAACGATTAAGTAAAAAGGTACACGATTAACATC
*****

gdh15      GTCTTTAAACAAGTACCTATTAATGTCTTCAAAGATGATACGTGTGAAGAATGCGATAAA
gdh35      GTCTTTAAACAAGTACCTATTAATGTCTTCAAAGATGATACGTGTGAAGAATGCGATAAA
*****

gdh15      ACCGATTTACCACCGAATGTTTTAACTATCTATATCCAACCAACTGAAGGATTTTCATTA
gdh35      ACCGATTTACCACCGAATGTTTTAACTATCTATATCCAACCAACTGAAGGATTTTCATTA
*****

gdh15      ACCTTAAATGGAAGAAATCGGTCAAGGGTTAATACAACCTCCAGTGAACTTGATTTT
gdh35      ACCTTAAATGGAAGAAATCGGTCAAGGGTTAATACAACCTCCAGTGAACTTGATTTT
*****

gdh15      CGTCAAAGTGCTGAAATGACTGAAAATAGTCCAGAAGCATAAGAAAACT
gdh35      CGTCAAAGTGCTGAAATGACTGAAAATAGTCCAGAAGCATAAGAAAACT
*****

```

Figura N° 24. Sitios polimórficos detectados para el locus *gdh*. Sustitución puntual de T→C y G→T en la secuencia genética de los alelos 15 y 35 del gen *gdh* del perfil alélico de *E. faecalis*. **gdh15**: secuencia obtenida para el alelo 15; **gdh35**: secuencia obtenida para el alelo 35.

El programa bioinformático *Phyloviz* 2.0 y el análisis por goeBURST mostró una conexión entre los ST720 y ST281 que variaban en solo 1 alelo (SLV: del inglés *single locus variant*). En la Figura N° 26 se muestran variaciones genéticas y una posible relación evolutiva entre los ST detectados en esta investigación. Los números 1, 5 y 6 (distancia lineal) reflejan la cantidad de

alelos diferentes entre los 7 alelos totales de los genes del esquema de MLST, para *E. faecalis*. En la Tabla N° 26 se destaca en negrita la diferencia de solo 1 alelo del gen *gdh* (35 por 15).

A modo de ejemplo en la Figura N° 25, se muestra la homogeneidad en el color de los círculos que representa que los mismos están integrados por idénticos clones (EFC-2) con mismo ST9 y fueron aislados en un mismo año. Círculos heterogéneos, como ST720 y ST179, muestran cepas con mismo ST, mismo clon pero aislados en años diferentes.

Figura N° 25. Análisis goeBURST obtenido con los 7 ST detectados para *E. faecalis* involucrados en infecciones invasivas (*Phyloviz* 2.0). ST281 y ST720 varían en un máximo de solo 1 alelo (SLV). Los colores representan el tipo de clon y año de aislamiento. El tamaño de los círculos es proporcional al número de cepas aisladas con mismo ST.

En la siguiente captura de pantalla (Figura N° 26) se visualizan los únicos 2 aislados de *E. faecalis* encontrados en esta investigación, provenientes de pacientes hospitalizados, con designación de nuevo ST, post envío al curador de la base de datos. Del mismo modo, se muestran

variables como país, año de aislamiento, origen de aislamiento y epidemiología. Además, se muestra otra cepa de *E. faecalis* HG6280 ST9, aislada en 1989 en Argentina (Lopardo *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1991) por lo que solo son 3 las cepas de esta especie reportadas en PubMLST.org. provenientes de Argentina.

Search or browse *Enterococcus faecalis* isolates database

Enter search criteria or leave blank to browse all records. Modify form parameters to filter or enter a list of values.

Isolate provenance/phenotype fields: country = Argentina + ⓘ

Display/sort options: Order by: id ascending Display: 25 records per page ⓘ

Action: Reset Submit

3 records returned. Click the hyperlinks for detailed information.

Isolate fields ⓘ								MLST							
id	isolate	aliases	key	country	year	source category	epidemiology	gdh	gyd	pstS	gki	aroE	xpt	yqiL	ST
20	HG6280	TX0630	A0214	Argentina	1989	hospitalized patient	hosp_outbreak	4	6	16	4	1	1	4	9
1421	E. faecalis C11-IR	87609	A4132	Argentina	2010	hospitalized patient	clinical_isolate	35	7	3	2	56	1	5	720
1422	E. faecalis C33-IR	38416	A4133	Argentina	2013	hospitalized patient	clinical_isolate	35	7	3	2	56	1	5	720

Figura N° 26. Captura de pantalla: 3 aislados de *E. faecalis* provenientes de pacientes hospitalizados de Argentina con designación de ST. Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2017.

Los $n=7$ ST encontrados en esta investigación, fueron comparados con los mismos ST reportados a nivel mundial según país (Figura N° 27). Todos ellos fueron determinados en clones de *E. faecalis* provenientes de muestras clínicas de pacientes hospitalizados. Como excepción, el ST604 fue el único proveniente de una muestra de materia fecal de un paciente no hospitalizado reportado en Suecia. El ST9 así como el ST179 fueron los detectados con mayor frecuencia.

ST	Frecuencia absoluta <i>n</i>	País de aislamiento
9	22	España, Brasil, Polonia, Argentina , EE.UU.
179	5	España, Sur Corea, Países Bajos
720	2	Argentina
236	1	Noruega
281	1	Francia
388	1	Francia
604	1	Suecia
TOTAL (N)	33	

Figura N° 27. Distribución a nivel país de los ST de *E. faecalis* aislados de pacientes hospitalizados detectados en esta investigación, en relación a los mismos ST detectados a nivel mundial.

Fuente: <https://pubmlst.org> (Query profile history for *Enterococcus faecalis* locus/sequence definitions database).

Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2017.

IV.4.4. Resultados de MLST para *E. faecium*

En el total de las cepas caracterizadas genéticamente se detectaron 5 ST diferentes, siendo el ST predominante ST25 (CC9) que agrupó a $n=4/12$ (33,3 %) cepas. El segundo perfil alélico más frecuente fue el ST52, que se detectó en 3 cepas. ST18 (CC17) y ST792, fueron ambos detectados en 2 cepas. ST19 (CC17) fue hallado en una oportunidad. El ST792, detectado en $n=2$ cepas y el ST52 resultaron ser *singletons*. En este trabajo no se detectaron nuevos ST para la especie *E. faecium* (Tabla N° 27).

Tabla N° 27. Caracterización genética de cepas seleccionadas de *E. faecium* utilizando tipado por secuenciación de múltiples loci (MLST). Año 2016.

Especie	Cepa	Año	Clon	Perfil alélico							ST	CC ^Ψ	BAPS [*]
				<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purK</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	<i>adk</i>			
EFM ^{**}	C30-IR	2013	EFM-1	9	3	1	6	1	1	1	25	9	2.3
	C38-IR	2014	EFM-1	9	3	1	6	1	1	1	25	9	2.3
	C47-IRE2	2014	EFM-1	9	3	1	6	1	1	1	25	9	2.3
	C48-IR	2014	EFM-1	9	3	1	6	1	1	1	25	9	2.3
	C52-IRE2	2014	EFM-3	7	1	1	1	5	1	1	18	17	3.3
	C45-IR	2014	EFM-3	7	1	1	1	5	1	1	18	17	3.3
	C16-IR	2013	EFM-4	12	9	6	3	1	13	1	52	s/d	7
	C20-IRE2	2013	EFM-4	12	9	6	3	1	13	1	52	s/d	7
	C35-IR	2010	EFM-4	12	9	6	3	1	13	1	52	s/d	7
	C53-IR	2014	EFM-7	1	3	1	44	1	1	28	792	s/d	3.1
	C40-IR	2014	EFM-8	7	1	1	1	1	11	1	19	17	7
	C44-IRE2	2014	EFM-9	1	3	1	44	1	1	28	792	s/d	3.1

Ψ: complejo clonal; *: Análisis Bayesiano de la estructura poblacional; **: *E. faecium*; s/d: sin dato.

Al igual que para *E. faecalis*, el programa bioinformático *Phyloviz* 2.0 y el análisis por goeBURST mostraron para clones de *E. faecium*, variación entre los alelos, observándose ST que variaron hasta en 5 genes (ST19 y ST52). ST19 y ST18 resultaron ser DLV (DLV: del inglés *double-locus variants*) y ST792 y ST25, TLV: del inglés *triple-locus variant* (Figura N° 28). La homogeneidad en el color de los círculos representa que los mismos están integrados por idénticos clones (ST18; EFM-3) aislados en el mismo año. El círculo heterogéneo ST52, se integró por cepas que pertenecieron al mismo clon EFM-4, pero una de ellas se aisló en año diferente. Con ST25 se observa pertenencia a un mismo clon EFM-1, a excepción de una cepa, que fue aislada en 2013 mientras que, todas las demás lo fueron en 2014. El último círculo heterogéneo dado por ST792, se constituyó por 2 cepas, aisladas en un mismo año, que resultaron ser diferentes clones.

Figura N° 28. Análisis goeBURST obtenido con los 5 ST detectados en clones de *E. faecium* involucrados en infecciones invasivas (*Phyloviz* 2.0). Los colores representan el tipo de clon y año de aislamiento. El tamaño de los círculos es proporcional al número de cepas aisladas con mismo ST.

La estimación filogenética a través de matrices de similitudes y distancias con el algoritmo de Máxima Verosimilitud, realizada con los ST obtenidos para clones *E. faecium* enviados a secuenciar ($n=8$), se observa en la Figura N° 29.

Figura N° 29. Análisis filogenético molecular por Método de *Maximum Likelihood* (ML) o Máxima Verosimilitud basado en modelo de Tamura-Nei. El análisis evolutivo fue realizado con MEGA7. Escala: 0.0010 sustituciones por posición de nucleótido. Niveles de *bootstrap*: 100 %. *: Sin agrupación.

El análisis fue realizado concatenando los 7 genes secuenciados para los 8 aislados, con un total de 3.458 posiciones nucleotídicas. Los porcentajes en los nudos (no mostrados), que indican niveles de *bootstrap* significativos, fueron todos del 100 %. Topologías equivalentes fueron obtenidas al analizar los mismos ST con los métodos *Neighbor-Joining* (NJ) y UPGMA.

Se observó una mayor identidad con las secuencias nucleotídicas de las cepas C30-IR, C38-IR y C47-IRE2 (mismos clones, mismos ST). Así mismo, idénticos resultados se obtuvieron para cepas C53-IR y C44-IRE2. Resultados diferentes se encontraron con las cepas C40-IR y C16-IR, observándose ramas cercanas con mayor distancia entre si, que infieren mayores cambios nucleotídicos. La cepa C52-IRE2 resultó sin agrupación.

OBJETIVO GENERAL N° 2

Detectar resistencia antimicrobiana y evaluar *in vitro* opciones antimicrobianas en cepas de enterococos multirresistentes

OBJETIVO ESPECIFICO N° 6

IV.5. Determinación del perfil de resistencia *in vitro* frente a los antimicrobianos de importancia clínica mediante pruebas cualitativas y cuantitativas (CIM).

IV.5.1. Estudio de sensibilidad *in vitro* cualitativo

Las Tablas N° 28, 29, 30 y 31 muestran los perfiles de resistencia detectados por método de difusión por disco en *E. faecalis* según muestra clínica, año de aislamiento y clon. Solo una cepa **C39-IR** no se agrupó en las tablas siguientes, debido a que provenía de líquido pericárdico (pericarditis). Dicha cepa solo presentó resistencia intrínseca a Q/D, CLI y ERI.

Tabla N° 28. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecalis* aisladas de líquidos articulares. Año 2015.

Cepa	Muestra	Año	CLON	Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
C41-IR	Líqu. cadera	2014	EFC-12.1	No detectado*
C15-IR	Líqu. art. rodilla	2013	EFC-5	No detectado
C52-IRE1	Líqu. cadera	2014	EFC-16.1	GEH, STH, CIP, LVX
C27-IR	Líqu. cadera	2013	EFC-19	GEH, STH, CIP, LVX, CHL
C21-IR	Líqu. cadera	2013	EFC-23	GEH, STH
C17-IR	Líqu. art. rodilla	2013	EFC-24	No detectado

GEH: gentamicina, STH: estreptomicina, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, CHL: cloranfenicol. *: solamente se observó la resistencia intrínseca correspondiente a Q/D: Quinupristin/Dalfopristin, CLI: clindamicina y ERI: eritromicina.

Tabla N° 29. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecalis* aisladas de líquidos abdominales. Año 2015.

Cepa	Muestra	Año	CLON	Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
C46-IR	Líqu. abd.*	2014	EFC-2	GEH, PEN
C47-IRE1	Líqu. abd.	2014	EFC-2	GEH, PEN
C51-IRE1	Líqu. perit.**	2014	EFC-2	GEH, PEN
C11-IR	Líqu. abd.	2010	EFC-3	GEH, STH, CIP, LVX
C7-IRE1	Líqu. perit.	2010	EFC-7	GEH
C1-IR	Líqu. perit.	2010	EFC-9	No detectado [§]
C4-IR	Líqu. abd.	2010	EFC-11	GEH
C14-IRE1	Líqu. perit.	2010	EFC-15	STH, CIP, LVX
C23-IR	Líqu. perit.	2010	EFC-17	No detectado
C18-IR	Líqu. abd.	2010	EFC-25	No detectado

*: líquido abdominal, **: líquido peritoneal, GEH: gentamicina, STH: estreptomina, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, PEN: penicilina. §: solamente se observó la resistencia intrínseca correspondiente a Q/D: Quinupristin/Dalfopristin, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina.

Tabla N° 30. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecalis* aisladas de abscesos. Año 2015.

Cepa	Muestra	Año	CLON	Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
C42-IR	Absc. pierna	2014	EFC-12.1	No detectado [§]
C43-IR	Absc. renal	2014	EFC-2	GEH, PEN
C29-IR	Absc. hep.*	2010	EFC-16.1	STH, CIP, LVX
C44-IRE1	Absc. hep.	2014	EFC-16	No detectado
C9-IR	Absc. útero	2013	EFC-8	No detectado
C8-IR	Absc. subf.**	2010	EFC-13	No detectado
C33-IR	Absc. cutáneo	2013	EFC-3	GEH, STH, CIP, LVX
C24-IR	Absc. ovárico	2013	EFC-18	STH
C20-IRE1	Absc. hep.	2010	EFC-22	No detectado
C36-IR	Absc. cutáneo	2013	EFC-26	No detectado
C5-IR	Absc. hep.	2010	EFC-6	GEH

*: absceso hepático, **: absceso subfrénico, GEH: gentamicina, STH: estreptomina, PEN: penicilina. §: solamente se observó la resistencia intrínseca correspondiente a Q/D: Quinupristin/Dalfopristin, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina.

Tabla N° 31. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecalis* aisladas de hemocultivos. Año 2015.

Cepa	Muestra	Año	CLON	Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
C50-IR	Hem [§]	2014	EFC-2	GEH, PEN
C13-IR	Hem	2013	EFC-3	STH, LVX, CIP
C22-IR	Hem	2013	EFC-3	GEH, STH, LVX, CIP
C54-IR	Hem	2014	EFC-4	GEH
C55-IR	Hem	2014	EFC-4	GEH
C12-IRE1	Hem	2013	EFC-5	No detectado*
C12-IRE1.1	Hem	2013	EFC-5.1	No detectado
C6-IR	Hem	2013	EFC-7	GEH, LVX, CIP
C19-IR	Hem	2013	EFC-7	GEH
C28-IR	Hem	2013	EFC-7	GEH
C2-IR	Hem	2013	EFC-10	No detectado
C37-IR	Hem	2014	EFC-12	No detectado
C49-IR	Hem	2014	EFC-12	No detectado
C10-IR	Hem	2013	EFC-14	No detectado
C25-IR	Hem	2013	EFC-20	No detectado
C26-IR	Hem	2013	EFC-21	No detectado

§: hemocultivo, GEH: gentamicina, STH: estreptomicina, , CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, PEN: penicilina. *: solamente se observó la resistencia intrínseca correspondiente a Q/D: Quinupristin/Dalfopristin, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina.

En la especie *E. faecalis* se observó resistencia antimicrobiana en 23/44 (52,3 %) aislamientos, ya sea frente a 1 ATM como para ≥ 2 o más ATM (Figura N° 30).

El perfil de resistencia para Q/D, CLI y ERI detectado en las $n=44$ cepas, no se contabilizó como resistencia, debido a que dicho perfil corresponde a resistencia intrínseca para la especie *E. faecalis*. La resistencia intrínseca de esta especie a estos 3 ATM, fue utilizada como parte de control de proceso para la identificación y se observó 100 % de resistencia para los 3 ATM. No se reportaron clones de *E. faecalis* con MDR en esta muestra.

Figura N° 30. Porcentaje de *E. faecalis* resistentes a 1 o ≥ 2 ATM para $n=23$ cepas (100 %). Año 2015.

Para los aminoglucósidos se observó ANRAG, resultando un 43,2 % ($n=19/44$) de resistencia para GEH y un 22,7 % ($n=10/44$) para STH. Respecto a quinolonas se detectó un 20,4 % ($n=9/44$) de resistencia para ambas LVX y CIP. Con penicilina se observó halo de inhibición pequeño en 11,4 % ($n=5/44$) y todas estas cepas se agruparon como clon EFC-2, presentando idéntico perfil de resistencia. Todas las cepas (100 %) fueron sensibles a LZD, TGC, VAN, TEC, AMP y SAM por prueba de difusión. Solo una cepa presentó resistencia a CHL. El perfil de resistencia a GEH, STH, CIP y LVX fue observado en 5 cepas siendo el perfil más frecuente.

Respecto al agrupamiento por clones se observó que, dentro de los grupos de clones más abundantes, el clon EFC-2 y EFC-12 fueron los que presentaron un perfil de RA homogéneo y, todas las cepas que integraron ambos grupos clonales habían sido aisladas en 2014. Los grupos clonales EFC-3, EFC-7 y EFC-16 resultaron con perfiles de resistencia más heterogéneos. Así, la

mayoría de las cepas pertenecientes al clon EFC-7 presentaron el perfil solo con resistencia a GEH y solo una de ellas presentó el perfil GEH, LVX, CIP. Similar resultado sucedió con el clon EFC-3, la mayoría de las cepas presentó el perfil GEH, STH, CIP, LVX y solo una de ellas no presentó resistencia a GEH. El clon EFC-16 resultó ser el más heterogéneo de todos, ya que las cepas con pulsotipo EFC-16.1 fueron las que presentaron el perfil de resistencia más extenso, y no coincidieron con las EFC-16.

Las siguientes Tablas N° 32, 33, 34 y 35 muestran los perfiles de RA detectados en *E. faecium*, según muestra clínica, año de aislamiento y clon. La resistencia a ERI y a CLI no se contabilizó, ya que al igual que *E. faecalis*, *E. faecium* es intrínsecamente resistente a estas drogas.

Tabla N° 32. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecium* aisladas de líquidos articulares. Año 2015.

Cepa	Muestra	Año	CLON	Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
C34-IR	Líqu. cadera	2013	EFM-2	PEN
C52-IRE2	Líqu. cadera	2014	EFM-3	PEN, AMP, SAM

PEN: penicilina, AMP: ampicilina, SAM: ampicilina/sulbactam.

Tabla N° 33. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecium* aisladas de líquidos abdominales. Año 2015.

Cepa	Muestra	Año	CLON	Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
C35-IR	Líqu. perit.**	2010	EFM-4	No detectado
C47-IRE2	Líqu. abd.*	2014	EFM-1	VAN , Q/D, PEN
C31-IR	Líqu. abd.	2010	EFM-2	LVX, PEN, AMP
C32-IR	Líqu. intravesicular	2010	EFM-2.1	No detectado
C7-IRE2	Líqu. perit.	2010	EFM-5	GEH, Q/D
C14-IRE2	Líqu. perit.	2010	EFM-6	No detectado
C51-IRE2	Líqu. perit.	2014	EFM-10	No detectado

*: líquido abdominal, **: líquido peritoneal; GEH: gentamicina, Q/D: Quinupristin/Dalfopristin, PEN: penicilina, AMP: ampicilina, LVX: levofloxacina, VAN: vancomicina.

Tabla N° 34. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecium* aisladas de abscesos. Año 2015.

Cepa	Muestra	Año	CLON	Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
C20-IRE2	Absc. hep.*	2013	EFM-4	No detectado
C53-IR	Absc. abd.**	2014	EFM-7	GEH, <u>VAN, TEC</u> , LVX, CIP, PEN, AMP, SAM,
C44-IRE2	Absc. hep.	2014	EFM-9	<u>VAN, TEC</u> , LVX, CIP, PEN, AMP, SAM

*: absceso hepático, **: absceso abdominal, GEH: gentamicina, VAN: vancomicina, TEC: teicoplanina, PEN: penicilina, AMP: ampicilina, SAM: ampicilina/sulbactam, LVX: levofloxacina.

Tabla N° 35. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecium* aisladas de hemocultivos. Año 2015.

Cepa	Muestra	Año	CLON	Perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
C16-IR	Hem*	2013	EFM-4	PEN
C48-IR	Hem	2014	EFM-1	<u>VAN, TEC</u> , Q/D, PEN
C38-IR	Hem	2014	EFM-1	No detectado
C30-IR	Hem	2013	EFM-1	<u>VAN</u>
C45-IR	Hem	2014	EFM-3	PEN
C3-IR	Hem	2013	EFM-5	No detectado
C40-IR	Hem	2014	EFM-8	STH, PEN, AMP, SAM

*: hemocultivo, STH: estreptomicina, Q/D: quinupristin/dalfopristin, PEN: penicilina, AMP: ampicilina, SAM: ampicilina/sulbactam, VAN: vancomicina, TEC: teicoplanina.

RA para la especie *E. faecium* fue observada en 12/19 (63,1 %) aislamientos, ya sea frente a 1 ATM como para ≥ 2 o más ATM (Figura N° 31).

Figura N° 31. Porcentaje de *E. faecium* resistentes a 1 o ≥ 2 ATM para $n=12$ cepas (100 %). Año 2015.

En clones de *E. faecium* fue observada MDR definido como cepa aislada no susceptible a ≥ 1 ATM en ≥ 3 categorías de ATM en $n=3$ cepas. Todas las cepas MDR fueron a su vez EFMVR. Tres cepas resultaron fenotipo VanA y $n=2$ resultaron fenotipo VanB. La resistencia a VAN fue del 26,3 % y a TEC del 15,8 %. Cuatro de las $n=5$ cepas EFMVR fueron aisladas en el mismo año (2014), a excepción de la cepa C30-IR que se aisló en 2013. Las cepas EFMVR se recuperaron de hemocultivos (2/5), absceso abdominal (1/5), absceso hepático (1/4) y líquido abdominal (1/5).

Ampicilino-resistencia se detectó en un 26,3 % ($n=5$) del total de los clones de *E. faecium*, al igual que para SAM. Frente a PEN, 10/19 cepas presentaron resistencia (52,6 %).

Resistencia a quinolonas se observó en baja cantidad, para LVX 15,8 % y para CIP solo en un 10,5 %. Frente a los aminoglucósidos se detectó ANRAG para STH en un 5,3 % y para GEH un 10,5 %. Con Q/D 15,8 % de resistencia fue detectada.

El 100 % de los *E. faecium* fueron sensibles a LZD, TGC y CHL.

A diferencia de *E. faecalis* se observó mayor heterogeneidad en el perfil de RA en los clones más prevalentes de *E. faecium*. Las cepas que integraron el clon EFM-1 presentaron 4 perfiles de RA diferente. El clon EFM-2 integrado por 3 cepas, también presentó 3 perfiles diferentes.

El análisis estadístico demostró diferencias entre RA a GEH siendo diferente el comportamiento entre especies *E. faecalis* y *E. faecium* ($p=0,012$). No se observó lo mismo frente a la RA a STH ($p=0,096$), según especies. Con glucopéptidos se observó diferencia estadísticamente significativa entre resistencia a VAN ($p=0,000$) y TEC ($p=0,007$) y tipo de especie aislada.

Con el grupo de quinolonas no se observó diferencia significativa entre resistencia y especie de enterococos aislada, tanto para LVX ($p=0,668$) como para CIP ($p=0,345$).

Frente a PEN se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=0,006$) entre RA según especie aislada; al igual que con AMP ($p=0,000$) y también con el β -lactámico más inhibidor de β -lactamasas: SAM ($p=0,000$). Para LZD y TGC no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=1,000$).

IV.5.2. Estudio de sensibilidad *in vitro* cuantitativo (CIM)

La CIM se determinó en todos los aislamientos de *Enterococcus* spp. que presentaron categoría resistente o intermedia por prueba cualitativa. En la Figura N° 32 se observa el porcentaje de RA obtenido por CIM ($\mu\text{g/mL}$) para clones de *E. faecalis* y *E. faecium*.

En *E. faecalis*, la CIM a PEN resultó ser sensible en todas las cepas ensayadas (4 y 8 $\mu\text{g/mL}$). Sin embargo, con el test de difusión se obtuvieron halos con categoría resistentes para todo el grupo clonal EFC-2, siendo la mayoría de 14 mm. Por este motivo, en estas cepas se determinó a su vez la producción de β -lactamasa. Frente a los aminoglucósidos, ANRAG fue observado para GEH (43,2 %; **CIM:** $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$) y STH (22,7 %; **CIM:** $\geq 2048 \mu\text{g/mL}$). Para quinolonas el porcentaje de resistencia fue el mismo, LVX y CIP (20,4 %; **CIM:** $\geq 32 \mu\text{g/mL}$). La CIM a CHL en la única cepa resistente a este ATM *E. faecalis* C27-IR resultó ser igual a $\geq 32 \mu\text{g/mL}$.

En *E. faecium* se observó 26,3 % de resistencia a VAN (**CIM:** 16, 24 y 512 $\mu\text{g/mL}$) y 15,8 % de resistencia a TEC (**CIM:** 0,25; 0,38; 16 y 96 $\mu\text{g/mL}$), ambos resultados determinaron el fenotipo de resistencia a glucopéptidos. Frente a los β -lactámicos, un gran porcentaje de clones

fueron resistentes a este grupo, con 47,4 % de RA a PEN (CIM: 16 y $> 256 \mu\text{g/mL}$), y con un 26,3 % de RA para AMP (CIM: 16, 32 y $\geq 256 \mu\text{g/mL}$) y SAM (CIM: $> 256 \mu\text{g/mL}$).

ANRAG se observó en escasos clones y fue detectado para GEH (10,5 %; CIM: 512 y $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$) y STH (5,3 %; CIM: 1024 $\mu\text{g/mL}$). Con quinolonas se detectó para LVX 15,8 % (CIM: $> 32 \mu\text{g/mL}$) y para CIP 10,5 % (CIM: $> 32 \mu\text{g/mL}$). A Q/D la resistencia fue baja, siendo de 15,8 %.

Figura N° 32. Porcentaje de resistencia antimicrobiana determinada por CIM ($\mu\text{g/mL}$) en *E. faecalis* y *E. faecium*.
 GEH: gentamicina, STH: estreptomicina, VAN: vancomicina, TEC: teicoplanina, Q/D: quinupristin/dalfopristin,
 CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, PEN: penicilina, AMP: ampicilina, SAM: ampicilina/sulbactam.

Se investigó la asociación entre producción de hemolisina (Tabla N° 18) y la RA a GEH, STH, VAN, TEC, LVX, CIP, PEN, AMP y SAM. Se detectó asociación estadísticamente significativa entre producción fenotípica de β -hemólisis y RA a GEH ($p=0,004$), β -hemólisis y RA a VAN ($p=0,001$) y β -hemólisis y RA a TEC ($p=0,044$).

Se observa en la siguiente fotografía la determinación de la CIM a VAN por método de E-test en dos aislados de *E. faecalis*.

Fotografía N° 22. Concentración inhibitoria mínima de VAN (CIM: 0,75 µg/mL) y TEC (CIM: 0,50 µg/mL) frente a *E. faecalis* C45-IR y CIM de VAN (CIM: 1 µg/mL) frente a *E. faecalis* C16-IR obtenida por E-test.

IV.5.3. Detección fenotípica de producción de β -lactamasa

Se investigó la producción de β -lactamasa en aquellos aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium* que resultaron mostrar halos de inhibición dudosos para AMP, PEN y SAM ó que la CIM al grupo β -lactámicos resultó ser alta. Se aplicó también el criterio de la evaluación del diámetro de inhibición de SAM comparado con el de AMP ($\Delta > 5$) según recomendaciones sugeridas por “WHONET-Argentina”, Rosario, Octubre de 2016.

Cinco cepas *E. faecalis* ($n=5/44$; 11,4 %) integrantes del clon EFC-2, el cual se encontró mayormente diseminado en el Servicio de cirugía, resultaron ser productoras de β -lactamasa. La Fotografía N° 23 muestra resultados de algunas cepas con prueba de detección de β -lactamasa positiva (disco rojo) y de β -lactamasa negativa (disco amarillo claro).

En *E. faecium* $n=4/19$ (21 %) cepas fueron productoras de la enzima. En otras cepas *E. faecium*, que también presentaron RA al grupo de β -lactámicos, no se detectó la producción de la enzima.

La Tabla N° 36 muestra las características genéticas de las cepas productoras de β -lactamasa y el nuevo perfil de RA. Dicho perfil determinado de manera cuali y cuantitativa, se completó con los demás ATM β -lactámicos a los que la producción de esta enzima, confiere

resistencia. Como se explicó anteriormente, dicha RA a veces, no es detectada por pruebas de difusión por disco o CIM, debido a que ciertas cepas la producen en muy baja cantidad.

Fotografía N° 23. Detección fenotípica de la producción de β -lactamasa (método de nitrocefín) en cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*. Disco rojo: prueba positiva, disco amarillo claro: prueba negativa. Cepa C47-IRE1 muestra una producción más débil. *S. aureus* ATCC 29213 se utilizó como cepa β -lactamasa (+) para control de proceso.

Las pruebas estadísticas no paramétricas aplicadas mostraron asociación significativa entre producción de β -lactamasa y RA a PEN ($p=0,000$).

Tabla N° 36. Cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* productoras de β -lactamasa. Características genéticas, perfil de resistencia antimicrobiana (RA) y producción fenotípica de citolisina/hemolisina.

Especie	Cepa	Año	Muestra	Clon/ ST	Nuevo perfil de RA	Halo AMP (mm)	Halo SAM (mm)	Hemolisina	Servicio
<i>E. faecalis</i> Bla+	C43-IR	2014	Absceso	EFC-2/9	GEH, PEN, AMP	24	31	(-)	Cirugía
	C46-IR	2014	Líqu. abd.*	EFC-2/9	GEH, PEN, AMP	20	28	(-)	Cirugía
	C47-IRE1	2014	Líqu. abd.	EFC-2/9	GEH, PEN, AMP	21	30	(-)	Cirugía
	C50-IR	2014	Hem**	EFC-2/9	GEH, PEN, AMP	22	30	(-)	Clínica
	C51-IRE1	2014	Líqu. abd.	EFC-2/9	GEH, PEN, AMP	23	29	(-)	Cirugía
<i>E. faecium</i> Bla+	C16-IR	2013	Hem	EFM-4/52	PEN, AMP	17	26	(-)	UTI
	C47-IRE2 VanB	2014	Líqu. abd.	EFM-1/25	VAN, Q/D, PEN, AMP	15	23	(+)	Cirugía
	C48-IR VanA	2014	Hem	EFM-1/25	VAN, TEC, Q/D, PEN, AMP	17	23	(+)	Cirugía
	C34-IR	2013	Líqu. art.§	EFM-2	PEN, AMP	15	21	(+)	Traumatología

*: líquido abdominal, **: hemocultivo, §: líquido articular.

OBJETIVO ESPECIFICO N° 7

IV.6. Determinación de la presencia de genes de resistencia a glucopéptidos mediante técnicas de amplificación génica.

La detección de genes *van* fue realizada por PCR en toda cepa que presentó resistencia cualitativa y cuantitativa para VAN y TEC. Solamente $n=5$ cepas *E. faecium* presentaron genotipo de resistencia a VAN, $n=3$ correspondieron a *vanA* y $n=2$ a *vanB* (Tabla N° 37). C47-IRE2 y C48-IR a su vez, fueron clones productores de β -lactamasa.

Tabla N° 37. Genotipos de resistencia a glucopéptidos en *E. faecium* aislados de infecciones invasivas humanas.

Cepa EFMVR	Muestra	CLON	ST	Fenotipo	Genotipo	CIM VAN ($\mu\text{g/mL}$)	CIM TEC ($\mu\text{g/mL}$)
C44-IRE2	Absceso	EFM-9	792	VanA	<i>vanA</i>	512	96
C48-IR	Hem **	EFM-1	25	VanA	<i>vanA</i>	512	96
C53-IR	Absceso	EFM-7	792	VanA	<i>vanA</i>	512	96
C30-IR	Hem	EFM-1	25	VanB	<i>vanB</i>	24	0,38
C47-IRE2	Líqu. abd.*	EFM-1	25	VanB	<i>vanB</i>	16	0,25

*: líquido abdominal, **: hemocultivo

OBJETIVO ESPECIFICO N° 8

IV.7. Evaluación *in vitro* de antimicrobianos frente a cepas multirresistentes utilizando curvas de letalidad.

En la última etapa de la tesis, fueron realizadas veinte curvas de letalidad para detectar actividad bacteriostática, bactericida y/o sinergia de ATM. Para tal fin, fueron seleccionadas 5 cepas, todas EFMVR siendo 3 de ellas MDR. El criterio de selección fue detallado en el capítulo Materiales y Métodos.

Dentro de la población EVR, se seleccionaron 2 EFMVR que también fueron productores de β -lactamasa. Debido a que no se detectó MDR en clones de *E. faecalis*, se estudiaron solo

EFMVR. Las cepas seleccionadas fueron (Tabla N° 38): **C44-IRE2, C48-IR, C53-IR, C30-IR y C47-IRE2**. A excepción de la cepa C53-IR, todas fueron productoras de hemolisina o citolisina y las cepas C48-IR y C47-IRE2 a su vez, fueron productoras de β -lactamasa. Se detectó asociación estadísticamente significativa entre MDR y tipo de especie de enterococos aislada ($p=0,000$). Ambas variables presentaron un cierto grado de correlación evidenciada por coeficiente de Spearman de 0,447 para un nivel de significancia de $p=0,000$. El análisis de regresión lineal múltiple ejecutado mostró que, las variables predictoras género del pacientes ($p=0,055$) así como presencia de MDR detectada en algunas cepas ($p=0,000$), se asociaron significativamente con la variable dependiente “*aislamientos de especies de enterococos*”. Sin embargo, las otras variables independientes edad ($p=0,568$), terapia antimicrobiana previa ($p=0,071$), presencia de comorbilidades ($p=0,108$) no se asociaron de manera significativa. Dicho análisis fue realizado primeramente, observando correlaciones por Spearman. Los valores obtenidos en el estudio de regresión lineal fueron: **$p=0,001$** con ANOVA; y la bondad del ajuste del modelo se evaluó con: $R^2 = 29,4 \%$ y R^2 ajustado = $23,2 \%$. El $29,4 \%$ de la variación total, puede ser explicado por la relación entre las variables dependientes con las independientes. El resto, $70,6 \%$, se debe a otras causas.

Tabla N° 38. CIM ($\mu\text{g/mL}$) de antimicrobianos en cepas seleccionadas de EFMVR y/o MDR aisladas de infecciones invasivas humanas para estudios con curvas de letalidad.

EFMVR	CLON/ ST	Genotipo	GEH ($\mu\text{g/mL}$)	VAN ($\mu\text{g/mL}$)	TEC ($\mu\text{g/mL}$)	PEN ($\mu\text{g/mL}$)	AMP ($\mu\text{g/mL}$)	SAM ($\mu\text{g/mL}$)	LVX ($\mu\text{g/mL}$)	CIP ($\mu\text{g/mL}$)	IMP** ($\mu\text{g/mL}$)
C44-IRE2	9/792	<i>vanA</i>	≤ 128	512	96	> 256	≥ 256	> 256	> 32	> 32	> 64
C53-IR	7/792	<i>vanA</i>	≥ 1024	512	96	> 256	≥ 256	> 256	> 32	> 32	> 128
C48-IR Bla (+)	1/25	<i>vanA</i>	≤ 128	512	96	8	2	S [§]	≤ 2	≤ 1	8
C30-IR	1/25	<i>vanB</i>	≤ 128	24	0,38	8	2	S	≤ 2	≤ 1	8
C47-IRE2 Bla (+)	1/25	<i>vanB</i>	≤ 128	16	0,25	16	2	S	≤ 2	≤ 1	16
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	--	--	4–16	1–4	0,25–1	1–4	0,5–2	--	0,25–2	0,25–2	0,5–2

*: según CLSI, 2015; **: según EUCAST, 2016; §: categoría sensible.

Para las cepas productoras de β -lactamasa, **C48-IR** y **C47-IRE2**, se aplicaron los criterios del CLSI (2015) correspondientes, asumiendo resistencia para AMP y PEN y sensibilidad (S) a SAM (Tabla N° 38), debido a que un test (+) para β -lactamasa predice resistencia a PEN así como a AMP.

Las CIM a los ATM LZD y TGC para las 5 cepas EFMVR no se muestran en la Tabla N° 38, ya que todas resultaron ser categoría sensibles por ambas pruebas (difusión por disco y CIM) para ambos ATM.

IV.7.1. Evaluación *in vitro* de la actividad bactericida de LVX e IMP frente a cepas de *E. faecium* vancomicina resistentes y/o MDR.

Las concentraciones antimicrobianas utilizadas para evaluar la acción de IMP y LVX fueron: LVX = 8 µg/mL, IMP = 8 µg/mL, IMP/LVX = 8/32 µg/mL; IMP/LVX = 32/32 µg/mL e IMP/LVX = 16/64 µg/mL. La Tabla N° 39 muestra la magnitud de la bactericia (*en negrita*) así como la sinergia antimicrobiana observada en algunas cepas a diferentes tiempos de incubación.

Tabla N° 39. Recuentos de bacterias EFMVR y/o MDR sobrevivientes expresados en Log₁₀ UFC/mL post-incubación con diferentes concentraciones de IMP, LVX y dupla IMP/LVX.

CEPAS	LVX				IMP				IMP/LVX				IMP/LVX				IMP/LVX			
	[8 µg/mL]				[8 µg/mL]				[8/32 µg/mL]				[32/32 µg/mL]				[16/64 µg/mL]			
	HORAS																			
	0*	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24
C44-IRE2	6,3	5	6,3	7	6,3	6,9	7	7,7	6,3	4,7	5,7	7,4	6,3	4,3	5,4	7	6,3	4,1	4,3	6,5
C48-IR	5,9	3,5	3,3	2	5,9	4,5	4,1	2	5,9	3,7	3,3	2	5,9	4,3	3,6	2	5,9	3,8	3,1	2
C53-IR	5,8	7,1	8,5	8,7	5,8	7,1	7,7	7,9	5,8	7,3	7,2	8	5,8	6,6	7,2	7,8	5,8	6	6,8	7
C30-IR	5,6	4,4	4	3,2	5,6	5,6	4,5	3,8	5,6	4,1	4,1	3,1	5,6	4,8	3,3	2	5,6	4,4	4	3
C47-IRE2	5,5	4,1	3,3	2	5,5	6,7	6,9	8	5,5	3,7	3,7	2	5,5	4,3	3,1	2	5,5	4	3,3	2

*: tiempo cero, inóculo inicial.

IV.7.1.1. ETAPA I: Combinación β -lactámico con quinolona

La capacidad de matar en relación al tiempo, con concentraciones fijas de IMP y LVX o dupla de ambos ATM, muestra diferentes comportamientos intraespecie. Se observó acción o efecto bactericida en 3/5 (60 %) cepas EFMVR con estos fármacos (Tabla N° 39). LVX a concentración equivalente a 8 $\mu\text{g/mL}$ mostró efecto bactericida a las 24 h con las cepas **C48-IR** y **C47-IRE2** (en ambas cepas se observó caída de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL). Adicionalmente, en estas cepas, el efecto bactericida fue observado con las tres duplas de IMP y LVX de diferentes concentraciones, observándose caídas de hasta casi 4 $\log_{10}$ UFC/mL (Tabla N° 39).

Sinergia antimicrobiana fue observada con las duplas ensayadas sobre los clones **EFM-1**, **ST25: C48-IR**, **C30-IR** y **C47-IRE2**, aunque en relación a IMP solo para las cepas **C30-IR** y **C47-IRE2**, ya que LVX actuando como droga única, produjo disminución del recuento en $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL a las 24 h en estas 2 cepas, incluso, en las cepas **C48-IR** (*vanA*) y **C47-IRE2** (*vanB*) clon EFM-1, con patrones diferentes de resistencia a VAN y β -lactamasa (+), el efecto sinérgico fue observado también a las 8 h post-incubación (Tabla N° 39).

Con las cepas **EFMVR** y **MDR C44-IRE2** y **C53-IR**, se observó sobrecrecimiento microbiano con ausencia de bactericidia y sinergia para todas las concentraciones fijas de ATM ensayadas, ya sea utilizando monodroga o en dupla ATM.

Para esta dupla antimicrobiana, el efecto sinérgico se observó, en la mayoría de las veces, a las 8 y 24 h (tiempo óptimo de contacto). Las dos curvas de vida realizadas, una con cepa control *E. faecalis* ATCC 29212 y la otra con cada cepa EFMVR y/o MDR, mostraron crecimiento exponencial sin evidencia de contaminación ni disminución del crecimiento microbiano.

IV.7.1.2. Análisis de las curvas de letalidad

Los puntos de las curvas para cada aislamiento se sometieron a regresión lineal simple. Pendientes de las rectas resultantes con signos negativos, fueron asumidas como bactericidia (Tabla N° 40).

Tabla N° 40. Valor (%) del coeficiente de determinación (R^2) de cada curva de cinética realizada con LVX e IMP, solos o en combinación, para todas las cepas EFMVR y/o MDR.

CEPAS	R^2 (%) [*]				
	m ^{**}				
	LVX 8 µg/mL	IMP 8 µg/mL	IMP/LVX 8/32 µg/mL	IMP/LVX 32/32 µg/mL	IMP/LVX 16/64 µg/mL
C44-IRE2	29 % + 0,3378	92 % + 0,4306	25 % + 0,4418	13 % + 0,3294	0,6 % + 0,0779
C48-IR	89 % - 1,1885	93 % - 1,2055	93 % - 1,2156	98 % - 1,2429	95 % - 1,2389
C53-IR	92 % + 0,9884	96 % + 0,9668	83 % + 0,6459	99 % + 0,6544	99 % + 0,6544
C30-IR	95 % - 0,7588	89 % - 0,6619	89 % - 0,7462	98 % - 1,237	97 % - 0,8228
C47-IRE2	99 % - 1,1327	95 % + 0,77	90 % - 1,0539	99 % - 1,171	97 % - 1,1065

*: coeficiente de determinación; **: valor de la pendiente de la ecuación de la recta ($y = mx + h$).

Las Figuras N° 33 a N° 37 muestran gráficamente la evaluación de la sinergia antimicrobiana detectada en ciertos clones de *E. faecium* frente a diferentes concentraciones de IMP y LVX.

Figura N° 33. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C44-IRE2 genotipo *vanA* productor de absceso hepático.

Figura N° 34. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C48-IR genotipo *vanA* productor de bacteriemia.

Figura N° 35. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C53-IR genotipo *vanA* proveniente de absceso abdominal.

Figura N° 36. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C30-IR genotipo *vanB* productor de bacteriemia.

Figura N° 37. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C47-IRE2 genotipo *vanB* proveniente de líquido abdominal.

IV.7.2. Evaluación *in vitro* de la actividad bactericida de TGC y GEH frente a cepas de *E. faecium* vancomicina resistentes y/o MDR.

Las concentraciones antimicrobianas utilizadas para evaluar la acción de TGC y GEH fueron TGC = 0,8 µg/mL, GEH = 32 µg/mL, TGC/GEH = 0,2/16 µg/mL; TGC/GEH = 0,8/32 µg/mL y TGC/GEH = 1/64 µg/mL. La Tabla N° 41 muestra la magnitud de la bactericida (*en negrita*) así como la sinergia antimicrobiana observada en algunas cepas a diferentes tiempos de incubación.

Tabla N° 41. Recuentos de bacterias EFMVR y/o MDR sobrevivientes expresados en Log₁₀ UFC/mL post-incubación con diferentes concentraciones de TGC, GEH y dupla TGC/GEH.

CEPAS	TGC [0,8 µg/mL]				GEH [32 µg/mL]				TGC/GEH [0,2/16 µg/mL]				TGC/GEH [0,8/32 µg/mL]				TGC/GEH [1/64 µg/mL]			
	HORAS																			
	0*	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24
C44-IRE2	5,6	5,8	7,2	7,5	5,6	3,8	4,4	7	5,6	3,1	4,1	6	5,6	4,3	3,8	6	5,6	4,9	4,1	2
C48-IR	4,9	6,1	6,6	7	4,9	2	2	2	4,9	2,9	2	2	5	2,6	2	2	5	3,3	2,6	2
C53-IR	5,8	6,9	7,3	8,5	5,8	5	5,4	4	5,8	5	5	4,5	5,8	5,9	5,9	2,9	5,8	6,1	5,3	4,1
C30-IR	5,2	6	6,2	6,4	5,2	7,3	8	8,5	5,2	7,3	7,5	7,9	5,2	7	7,3	8	5,2	4,8	4,9	4,1
C47-IRE2	5,2	5,9	6,2	8,3	5,2	2,9	2	2	5,2	4,8	2,9	2	5,2	3,3	3	2	5,2	4,5	3,4	2

*: tiempo cero, inóculo inicial.

IV.7.2.1. ETAPA II: combinación de una glicilciclina con un aminoglucósido

La velocidad bactericida, en relación al tiempo, con concentraciones fijas de TGC y GEH o dupla de ambos ATM, muestra también diferentes comportamientos intraespecie. Se observó, al igual que la dupla anterior, acción o efecto bactericida en 3/5 (60 %) cepas EFMVR y/o MDR con estos fármacos. TGC actuando sola, no mostró efecto bactericida a ningún tiempo, a concentración equivalente a 0,8 µg/mL, aunque sobre la cepa **C30-IR clon EFM-1** se observó leve bacteriostasis (Tabla N° 41). A diferencia, GEH (32 µg/mL) actuando como monodroga, mostró bactericidia a las 8 y 24 h (caída de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL), solamente con la cepa **C47-IRE2 clon EFM-1**.

El efecto bactericida fue observado con las tres concentraciones seleccionadas de las duplas de TGC y GEH (Tabla N° 41), observándose un efecto más pronunciado con deltas (δ) de -2,9 y -3,2 en las cepas **C48-IR** y **C47-IRE2** respectivamente, ambas **EFM-1**. Para la cepa MDR **C44-IRE2 clon EFM-9**, solo se detectó éste efecto con la concentración más alta TGC (1 µg/mL) y GEH (64 µg/mL), a las 24 h (Tabla N° 41).

La sinergia antimicrobiana fue observada en relación a TGC con los clones **C48-IR EFM-1** y **C47-IRE2 EFM-1**, ya que GEH, actuando como ATM mas activo y droga única, produjo disminución del recuento en $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL a las 8 y 24 h en ambas cepas. Además, cuando se realizó la curva de matanza con estas cepas, se detectó sinergia con las 3 combinaciones de concentraciones de TGC y GEH ensayadas (Tabla N° 41).

Con la cepa MDR **C53-IR clon EFM-7**, se encontró sinergia con la dupla TGC (0,8 µg/mL) y GEH (32 µg/mL). Los 2 ATM actuando como monodroga sobre dicha cepa, no disminuyeron el recuento microbiano a través del tiempo, idénticos resultados se observaron en **C44-IRE2** con TGC y GEH actuando como monodrogas.

Con la cepa **C30-IR** no se observó actividad microbicida ni sinergia para todas las concentraciones de ATM ensayadas, ya sea como monodroga o en dupla (Tabla N° 41). Adicionalmente, en dicha cepa, se encontró antagonismo, ya que las duplas TGC (0,2 µg/mL) y GEH (16 µg/mL) junto a TGC (0,8 µg/mL) y GEH (32 µg/mL) mostraron un aumento en el crecimiento de más de $> 1 \log_{10}$ UFC/mL a las 24 h, en la curva de asociación de ATM respecto a TGC en solitario.

Las dos curvas de vida realizadas, una con cepa control *E. faecalis* ATCC 29212 y la otra con cada cepa EFMVR y/o MDR, mostraron crecimiento exponencial, sin evidencia de contaminación ni disminución del crecimiento microbiano.

IV.7.2.2. Análisis de las curvas de letalidad

Los puntos de las curvas para cada aislamiento se sometieron a regresión lineal simple. Pendientes de las rectas resultantes con signos negativos, fueron asumidas como bactericidia (Tabla N° 42).

Tabla N° 42. Valor (%) del coeficiente de determinación (R^2) de cada curva de cinética realizada con TGC y GEH, solos o en combinación, para todas las cepas EFMVR y/o MDR.

CEPAS	R^2 (%) m^{**}				
	TGC 0,8 µg/mL	GEH 32 µg/mL	TGC/GEH 0,2/16 µg/mL	TGC/GEH 0,8/32 µg/mL	TGC/GEH 1/64 µg/mL
C44-IRE2	91 % + 0,7198	0,42 % + 0,0565	4,26 % + 0,2127	0,72 % + 0,0693	91 % -1,1584
C48-IR	93 % + 0,6677	60 % - 0,8811	82 % - 0,9714	77 % - 0,9413	93 % - 0,9464
C53-IR	96 % + 0,8321	71 % - 0,5087	86 % - 0,3803	58 % - 0,8762	75 % - 0,5956
C30-IR	88 % + 0,3679	89 % + 1,0598	80 % - 0,8347	88 % + 0,8523	82 % - 0,3256
C47-IRE2	86 % + 0,9578	81 % - 1,0431	95 % - 1,1396	95 % - 1,0005	98 % - 1,068

*: coeficiente de determinación; **: valor de la pendiente de la ecuación de la recta ($y = mx + h$)

Las Figuras N° 38 a N° 42 muestran gráficamente la evaluación de la sinergia antimicrobiana detectada en ciertos clones de *E. faecium* frente a diferentes concentraciones de TGC y GEH.

Figura N° 38. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C44-IRE2 genotipo *vanA* proveniente de absceso hepático.

Figura N° 39. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C48-IR genotipo *vanA* productor de bacteriemia.

Figura N° 40. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C53-IR genotipo *vanA* proveniente de absceso abdominal.

Figura N° 41. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C30-IR genotipo *vanB* productor de bacteriemia.

Figura N° 42. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C47-IRE2 genotipo *vanB* aislado de líquido abdominal.

IV.7.3. Evaluación *in vitro* de la actividad bactericida de IMP y VAN frente a cepas de *E. faecium* vancomicina resistentes y/o MDR.

Las concentraciones antimicrobianas utilizadas para evaluar la acción de IMP y VAN fueron IMP = 64 µg/mL, VAN = 32 µg/mL, IMP/VAN = 16/16 µg/mL; IMP/VAN = 32/32 µg/mL e IMP/VAN = 64/32 µg/mL. La Tabla N° 43 muestra la magnitud de la bactericida (*en negrita*) así como la sinergia antimicrobiana observada en algunas cepas a diferentes tiempos de incubación.

Tabla N° 43. Recuentos de bacterias EFMVR y/o MDR sobrevivientes expresados en Log₁₀ UFC/mL post-incubación con diferentes concentraciones de IMP, VAN y dupla IMP/VAN.

CEPAS	IMP [64 µg/mL]				VAN [32 µg/mL]				IMP/VAN [16/16 µg/mL]				IMP/VAN [32/32 µg/mL]				IMP/VAN [64/32 µg/mL]			
	HORAS																			
	0 [*]	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24
C44-IRE2	5,3	4,1	5,7	5,5	5,3	5,2	5,1	5,9	5,3	4,1	5,1	6	5,3	4,3	4,5	7	5,3	4,2	4,9	5
C48-IR	5,9	4,6	3,6	2	5,9	5,8	5,4	5	5,9	4,6	5,3	4,5	5,9	5,3	5,1	4,2	5,9	5,7	4,8	4,6
C53-IR	5	6,5	7	8	5	5,9	6	7	5	7,1	8	8,3	5	6	4,3	7	5	5,9	6,5	8
C30-IR	5,5	5,3	4,3	2,3	5,5	5,4	5,5	5,3	5,5	5,7	5,6	5	5,5	6,2	5,3	4,5	5,5	5,7	5,1	4,4
C47-IRE2	5,5	4,3	3,3	2,6	5,5	4,7	4,2	6,9	5,5	4,1	3,9	3,4	5,5	4,2	4,1	3,3	5,5	4,9	4,5	3,6

*: tiempo cero, inóculo inicial.

IV.7.3.1. ETAPA III: combinación de β -lactámico con glucopéptido

Con la dupla IMP y VAN se observó escaso efecto bactericida y prácticamente ausencia de sinergia, incluso sobre clones genotipo *vanB*. Solamente IMP (64 $\mu\text{g/mL}$) actuando como monodroga, produjo bactericidia en 2 cepas, **C48-IR** y **C30-IR**, resultando en caídas de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL (Tabla N° 43), debido a que sus CIM a dicho ATM resultaron ser las mas bajas.

Sinergia antimicrobiana fue observada únicamente con la cepa **C47-IRE2** con las duplas IMP (16 $\mu\text{g/mL}$) y VAN (16 $\mu\text{g/mL}$) e IMP (32 $\mu\text{g/mL}$) y VAN (32 $\mu\text{g/mL}$), aunque en relación a VAN, ya que con IMP actuando como droga única, se produjo disminución del recuento en $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL a las 8 y 24 h, aunque sin llegar a producirse bactericidia (Tabla N° 43).

Con las cepas **C44-IRE2**, **C48-IR** y **C30-IR** pudo observarse efecto bacteriostático no así frente a la cepa **C53-IR**, con la cual no se observó ningún tipo de efecto con ninguna de las concentraciones ensayadas.

Las dos curvas de vida realizadas, una con cepa control *E. faecalis* ATCC 29212 y la otra con cada cepa EFMVR y/o MDR para IMP y VAN, mostraron crecimiento exponencial sin evidencia de contaminación ni disminución del crecimiento microbiano.

IV.7.3.2. Análisis de las curvas de letalidad

Los puntos de las curvas para cada aislamiento se sometieron a regresión lineal simple. Pendientes de las rectas resultantes con signos negativos, fueron asumidas como bactericidia (Tabla N° 44).

Tabla N° 44. Valor (%) del coeficiente de determinación (R^2) de cada curva de cinética realizada con IMP y VAN, solos o en combinación, para todas las cepas EFMVR y/o MDR.

CEPAS	R^2 (%) [*]				
	m ^{**}				
	IMP 64 µg/mL	VAN 32 µg/mL	IMP/VAN 16/16 µg/mL	IMP/VAN 32/32 µg/mL	IMP/VAN 64/32 µg/mL
C44-IRE2	30 %	98 %	4,7 %	14 %	22 %
	+ 0,3694	- 0,1085	- 0,1027	- 0,2195	+ 0,2723
C48-IR	99 %	94 %	48 %	95 %	92 %
	- 1,2709	- 0,3061	- 0,3536	- 0,5226	- 0,4986
C53-IR	97 %	92 %	88 %	20 %	96 %
	+ 0,9378	+ 0,5911	+ 1,063	+ 0,4096	+ 0,9374
C30-IR	88 %	36 %	46 %	52 %	76 %
	- 1,059	- 0,05	- 0,1502	- 0,3992	- 0,3774
C47-IRE2	99 %	16 %	90 %	98 %	89 %
	- 0,939	+ 0,3565	- 0,6537	- 0,6192	- 0,6518

*: coeficiente de determinación; **: valor de la pendiente de la ecuación de la recta ($y = mx + h$).

Las Figuras N° 43 a N° 47 muestran gráficamente la evaluación de la sinergia antimicrobiana detectada en ciertos clones de *E. faecium* frente a diferentes concentraciones de IMP y VAN.

Figura N° 43. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C44-IRE2 genotipo *vanA* aislado de líquido abdominal.

Figura N° 44. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C48-IR genotipo *vanA* productor de bacteriemia.

Figura N° 45. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C53-IR genotipo *vanA* productor de absceso abdominal.

Figura N° 46. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C30-IR genotipo *vanB* productor de bacteriemia.

Figura N° 47. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C47-IRE2 genotipo *vanB* aislado de líquido abdominal.

IV.7.4. Evaluación *in vitro* de la actividad bactericida de LZD y GEH frente a cepas de *E. faecium* vancomicina resistentes y/o MDR.

Las concentraciones antimicrobianas utilizadas para evaluar la acción de LZD y GEH fueron LZD = 0,5 µg/mL, GEH = 128 µg/mL, LZD/GEH = 0,5/32 µg/mL; LZD/GEH = 0,5/64 µg/mL y LZD/GEH = 0,5/128 µg/mL. La Tabla N° 45 muestra la magnitud de la bactericida (*en negrita*) así como la sinergia antimicrobiana observada en algunas cepas a diferentes tiempos de incubación.

Tabla N° 45. Recuentos de bacterias EFMVR y/o MDR sobrevivientes expresados en Log₁₀ UFC/mL post-incubación con diferentes concentraciones de LZD, GEH y dupla LZD/GEH.

CEPAS	LZD				GEH				LZD/GEH				LZD/GEH				LZD/GEH			
	[0,5 µg/mL]				[128 µg/mL]				[0,5/32 µg/mL]				[0,5/64 µg/mL]				[0,5/128 µg/mL]			
	HORAS																			
	0*	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24	0	4	8	24
C44-IRE2	5,2	5	7,1	7,9	5,2	2	2	2	5,2	4	2	2	5,2	2	3	2	5,2	2	2	2
C48-IR	5	5,9	6	7	5	2,6	2,3	2	5	6,4	7,2	7,5	5	6,3	7,3	7,5	5	6,3	7,1	7,5
C53-IR	5,3	5,9	7,3	8	5,3	5,3	4,2	2,6	5,3	4,7	4,3	2,8	5,3	5	3,9	3,5	5,3	4,7	4,2	2
C30-IR	5,7	6,1	7,3	8,3	5,7	3,6	2,6	2	5,7	4,3	4	2	5,7	3,5	3,9	2	5,7	3,6	2,3	2
C47-IRE2	5,5	6,7	7	7,5	5,5	2	2	2	5,5	2	2	2	5,5	2	2	2	5,5	2	2	2

*:tiempo cero, inóculo inicial.

IV.7.4.1. ETAPA IV: combinación de una oxazolidinona con aminoglucósido

La dinámica de la actividad bactericida de LZD y GEH fue analizada en la última etapa. LZD actuando por si solo, no produjo descenso de crecimiento microbiano en ningún aislado, debido a su actividad bacteriostática. Sin embargo, cuando fue combinado con GEH, en determinadas horas, se observó efecto bactericida en 4/5 cepas (80 %). Con las 3 combinaciones de LZD y GEH fue observado dicho efecto en la cepa **C44-IRE2** (Tabla N° 45), inclusive a partir de las 4 horas post-incubación. Mismo efecto fue observado con la cepa **C47-IRE2** (“disminución de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL”). Con la cepa **C30-IR** este efecto se observó con las tres combinaciones de LZD y GEH pero, a diferencia de las cepas anteriores, a las 24 h post-incubación. En la cepa **C53-IR** (resistente a GEH) la bactericidia solo fue detectada con la combinación más alta: LZD 0,5 y GEH 128 $\mu\text{g/mL}$ y solamente a las 24 h.

GEH actuando como droga única, produjo disminución del recuento en todos los aislados analizados excepto, en una cepa, la MDR **C53-IR** que presento ANRAG, en este caso a GEH con CIM de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ (Tabla N° 45). Sobre esta cepa, la única combinación que tuvo efecto bactericida fue LZD 0,5 y GEH 128 $\mu\text{g/mL}$, a las 24 h post-incubación (caída de -3,3). Por lo que GEH 128 $\mu\text{g/mL}$, tuvo un efecto bactericida *in vitro* sobre 4 aislados, inclusive en algunos clones, dicho efecto comenzó a partir de las 4 h post-incubación.

IV.7.4.2. Análisis de las curvas de letalidad

Los puntos de las curvas para cada aislamiento se sometieron a regresión lineal simple. Pendientes de las rectas resultantes con signos negativos, fueron asumidas como bactericidia (Tabla N° 44).

Tabla N° 46. Valor (%) del coeficiente de determinación (R^2) de cada curva de cinética realizada con LZD y GEH, solos o en combinación, para todas las cepas EFMVR y/o MDR.

CEPAS	R^2 (%) m^{**}				
	LZD 0,5 µg/mL	GEH 128 µg/mL	LZD/GEH 0,5/32 µg/mL	LZD/GEH 0,5/64 µg/mL	LZD/GEH 0,5/128 µg/mL
C44-IRE2	98 % + 0,7903	60 % - 0,9528	89 % - 1,1409	73 % - 0,913	69 % - 0,8625
C48-IR	93 % + 0,6001	76 % - 0,9425	92 % + 0,815	92 % + 0,8353	92 % + 0,7596
C53-IR	98 % + 0,9391	88 % - 0,9212	91 % - 0,8042	94 % - 0,6636	86 % - 1,0405
C30-IR	93 % + 0,6001	93 % - 0,9425	92 % + 0,815	92 % + 0,8353	92 % + 0,7596
C47-IRE2	92 % - 0,630	60 % - 1,05	60 % - 1,05	60 % - 1,05	60 % - 1,05

*: coeficiente de determinación; **: valor de la pendiente de la ecuación de la recta ($y = mx + h$).

Las Figuras N° 48 a N° 52 muestran gráficamente la evaluación de la sinergia antimicrobiana detectada en ciertos clones de *E. faecium* frente a diferentes concentraciones de LZD y GEH.

Figura N° 48. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C44-IRE2 genotipo *vanA* aislado de líquido abdominal.

Figura N° 49. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C48-IR genotipo *vanA* aislado de hemocultivo.

Figura N° 50. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C53-IR genotipo *vanA* productor de absceso abdominal.

Figura N° 51. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C30-IR genotipo *vanB* aislado de hemocultivo.

Figura N° 52. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C47-IRE2 genotipo *vanB* aislado de líquido abdominal.

V. DISCUSION

*L*as investigaciones del presente trabajo de tesis doctoral, se realizaron con el fin de caracterizar fenotípicamente y genotípicamente cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de líquidos obtenidos por punción, provenientes de infecciones invasivas. Para poder cumplir con los objetivos propuestos, se seleccionó como ámbito de estudio, un nosocomio de autogestión perteneciente al Sistema Integrado de Salud Pública del municipio de Tandil, localidad del centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Para recuperar las cepas se diseñó un estudio descriptivo, retrospectivo de corte transversal. La caracterización de las bacterias se realizó con test fenotípicos y se confirmó con técnicas proteómicas y genómicas de última generación, que incluyeron secuenciación de genes del ADN. Esto último permitió determinar la estructura genética poblacional de enterococos productores de infecciones invasivas en el HMRS en un periodo de tiempo determinado. Se investigó el perfil de RA con métodos estandarizados y por PCR se realizó la detección de genes de resistencia a glucopéptidos. Finalmente, fueron investigadas combinaciones antimicrobianas para evaluar la presencia de sinergia bactericida sobre clones EFMVR y/o MDR.

Enterococcus spp. es un género bacteriano integrado por especies que, generalmente, se consideran patógenas oportunistas. En los últimos años, comenzó a observarse una tendencia lineal ascendente en el aislamiento y la diseminación policlonal de *E. faecalis* y *E. faecium* con características virulentas y con multirresistencia antimicrobiana a nivel mundial. Hace varios años atrás, se pensaba que las infecciones producidas por cepas de este género eran solo de origen endógeno. Actualmente, con el progreso científico en medicina humana y demás tecnologías de avanzada, procedimientos invasivos están siendo utilizados a nivel mundial con el fin de optimizar diagnósticos en la detección de patologías. A su vez, la concurrencia de la comunidad a instituciones de salud se ha elevado exponencialmente y posibilitaría un aumento de infecciones enterocócicas de origen exógeno.

Frente a este escenario diversos estudios epidemiológicos, realizados en diferentes regiones geográficas, comenzaron a diseñarse para recuperar, aislar y caracterizar estas bacterias, sobretodo porque la detección de EVR y de enterococos con MDR, es una de las tantas problemáticas de Salud Pública en muchos países (Aarestrup *et al.*, 2000; Agerso *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2011; Lebreton *et al.*, 2013). Sin embargo, escasos trabajos epidemiológicos han

sido realizados con enterococos aislados de infecciones invasivas humanas a nivel mundial. En esta escasa muestra, la mayoría de estos trabajos, se enfoca generalmente solo en EVR.

Los objetivos específicos N° 1 y 2 de esta tesis doctoral iniciada en marzo de 2012, tuvieron como finalidad aislar, para caracterizar correctamente, cepas de *Enterococcus* spp. provenientes de líquidos obtenidos por punción, producto de infecciones invasivas humanas. Se realizó la identificación fenotípica por pruebas convencionales en todas las cepas y se confirmó la misma por espectrometría de masas a través de sistema MALDI TOF-MS, una metodología diagnóstica de última generación y de alto poder de discriminación, que gradualmente se está implementando en Argentina. Sesenta y tres (N=63) cepas pertenecientes al género *Enterococcus* fueron recuperadas de 5 tipos diferentes de muestras clínicas, durante las cohortes 2010, 2013 y 2014, de las cuales se identificaron $n=44$ (69,8 %) como *E. faecalis* y $n=19$ (30,2 %) como *E. faecium* (Figura N° 17). El mayor porcentaje de aislamientos observados para *E. faecalis* sucedió en la cohorte 2013 ($n=18$; 40,9 %) y para *E. faecium* fue en 2014 ($n=9$; 47,4 %) hecho relacionado con el mayor ingreso de pacientes de ambos géneros, en las cohortes 2013 y 2014. La Figura N° 18 mostró una tendencia ascendente en el aislamiento de enterococos de infecciones invasivas a través de los años en el HMRS, sobre todo para *E. faecium*, obteniendo un $R^2 = 70$ %.

A diferencia de lo utilizado en esta tesis para identificar los enterococos, Gawryszewska *et al.*, (2016) aplicó métodos convencionales, sistema MALDI TOF-MS y adicionó sistema Vitek MS, para identificar 140 cepas de *E. faecalis* (54,1 %), 112 de *E. faecium* (43,2 %) y 7 cepas (2,7 %) pertenecientes a otras especies de *Enterococcus* spp. a partir de muestras obtenidas de infecciones invasivas. Solamente utilizaron técnicas genómicas para caracterizar especies *E. faecium*. Estos autores realizaron el estudio en un periodo mas acotado de tiempo (mayo 2010 y junio 2011) comparado con el de esta tesis y, quizás la obtención del elevado N muestral, corresponda a la recolección de las cepas a partir de 30 hospitales. Por otro lado, Sienko *et al.*, (2015) durante 23 meses, también aislaron 30 cepas de *E. faecalis* y 20 de *E. faecium* a partir de sangre, pus, líquido peritoneal, líquido pericárdico, LCR y lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes con infecciones invasivas internados en 2 Hospitales de Bialystok, Polonia. Cada aislamiento a diferencia de esta tesis, fue identificado con sistema Vitek2 y confirmados con biología molecular (detección de gen cromosómico *ddl*). Osuka *et al.*, (2016) seleccionaron al

azar 10 cepas de *E. faecalis* y de *E. faecium* productoras de infecciones invasivas por cada año durante un periodo entre 2003 y 2014. Si bien coincide con las mismas especies identificadas en esta tesis, solamente recuperaron las cepas de dos tipos de muestras clínicas, hemocultivos y LCR. Burguer Moreira *et al.*, (2016) recuperaron a partir de hemocultivos, piel y partes blandas, material óseo y líquidos de derrame, 30 aislamientos de *E. faecalis* obtenidos de infecciones invasivas de pacientes atendidos en el Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires durante marzo-setiembre de 2014.

Desde el punto de vista de los primeros pasos del diagnóstico microbiológico, las investigaciones realizadas por Gawryszewska *et al.*, (2016), Osuka *et al.*, (2016), Sienko *et al.*, (2015) y Burguer Moreira *et al.*, (2016) muestran que, *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies recuperadas e identificadas con mayor prevalencia a nivel mundial de muestras clínicas provenientes de infecciones invasivas humanas, por lo que los resultados obtenidos en esta tesis, coinciden con lo reportado en la literatura científica. Así mismo, *E. faecalis* si bien siempre ocupó el primer puesto, con altos porcentajes de aislamientos, actualmente se está observando un aumento de aislamientos de clones intrahospitalarios de alto riesgo de *E. faecium* a nivel mundial (Aarestrup *et al.*, 2000; Conde-Estevez *et al.*, 2010; Osuka *et al.*, 2015; Gawryszewska *et al.*, 2016).

La identificación fenotípica convencional en el género *Enterococcus* y otros, ha sido reemplazada por otros métodos con mayor sensibilidad y especificidad que están revolucionando los laboratorios de microbiología, acortando los tiempos e identificando con elevada precisión muchas especies de bacterias y otros microorganismos. Las técnicas convencionales fenotípicas no permiten detectar con exactitud especies no *faecalis* de enterococos (Gawryszewska *et al.*, 2016). Para algunas especies de este género debido a la diversidad y a la heterogeneidad de las características fenotípicas, existe mucha discordancia comunicada por investigadores en el diagnóstico bacteriológico de rutina. Por otro lado, la comunicación de las variantes de colonias en las especies *E. faecalis* y *E. faecium*, que presentan características bioquímicas que dificultan muchas veces su correcta identificación, estimula la utilización de métodos de diagnóstico microbiológico no fenotípicos con alto poder de discriminación, como por ejemplo el MALDI TOF-MS y/o técnicas de biología molecular (Freitas *et al.*, 2016).

Freitas *et al.*, (2017) comunicaron que la utilización de espectrometría de masas permite llevar a cabo la rápida detección de clones de alto riesgo de *E. faecium*. Otros investigadores como Kirschner *et al.*, (2001) publicaron un estudio en el cual realizaron la comparación de métodos fenotípicos (API, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France y MicroScan), genotípicos (PCR), de espectroscopía vibracional (Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y Raman) y secuenciación del ARNr 16S, para clasificar e identificar enterococos aislados de diversos reservorios. Este estudio concluyó que los métodos espectroscópicos y de secuenciación, fueron los más discriminatorios y permitieron identificar con precisión y rapidéz diversas especies de este género, coincidiendo con esta tesis.

En infecciones invasivas la tasa de mortalidad muchas veces es elevada (Schlapbach *et al.*, 2015), por lo que es necesario acortar los tiempos en el diagnóstico bacteriológico, sobre todo porque se necesita decidir una terapia antimicrobiana rápida, específica y más dirigida. Estos tipos de patologías generan mayores días de internación, mayor consumo de ATM de amplio espectro y generalmente bactericidas, modificaciones o ajustes del esquema antimicrobiano empírico inicial, lo que provoca sobrecostos en Salud Pública. Frente a ésta situación multifactorial, generar una identificación rápida, de bajo costo, con menor consumo de insumos/reactivos y que sea precisa para detectar el microorganismo causante del proceso infeccioso, da un valor agregado positivo al laboratorio de microbiología clínica. Por todo lo expuesto, en *Enterococcus* spp. se observó que, los métodos fenotípicos de identificación a nivel de especie, poseen menor poder de discriminación y son menos reproducibles que los métodos genotípicos. Se destaca, la complementariedad en el uso de técnicas proteómicas y genómicas para optimizar y validar la correcta y rápida identificación de especies de enterococos.

Dentro del contexto de un correcto diagnóstico bacteriológico, en una placa de Petri correspondiente al sembrado de un hemocultivo proveniente de un paciente masculino, de 43 años, con diagnóstico de endocarditis, se observaron presumiblemente variantes morfológicas de colonias pequeñas (Fotografía N° 4). Sin embargo, no fue objetivo de esta tesis aplicar un protocolo de identificación tales como la prueba de auxotrofismo y otras, para comprobar fehacientemente, la pertenencia de estas colonias al grupo de variantes de colonias pequeñas (Wellingshausen *et al.*, 2009). Ambos tipos de colonias *E. faecalis* C12-IRE1 (colonia de tamaño mayor) y *E. faecalis* C12-IRE1.1 (posiblemente variante de colonia pequeña) fueron identificadas

por triplicado con MALDI TOF-MS, no presentaron β -hemólisis y el PFGE mostró 2 pulsotipos diferentes. Este tipo de hallazgo, ha sido comunicado como excepcional por otros investigadores, en especies *E. faecium* y *E. faecalis* (Proctor *et al.*, 2006; Gröbner *et al.*, 2012; Aspiroz *et al.*, 2013; Egido *et al.*, 2015). La mayoría de las alertas sobre la presencia de SCV del inglés *small colony variants* de enterococos, correspondieron a aislamientos de *E. faecalis* provenientes de hemocultivos. Varias de estas muestras provenían de endocarditis, coincidiendo con lo observado en ésta tesis (Wellinghausen *et al.*, 2009; Egido *et al.*, 2015; Ogihara *et al.*, 2016). Sin embargo, no fue objetivo confirmar si *E. faecalis* C12-IRE1.1 correspondía a una SCV. Pero dado la observación de algunas coincidencias en cuanto a procedencia del germen por ejemplo, sería interesante a futuro realizar sobre dicha colonia, las pruebas bioquímicas correspondientes para determinar si efectivamente dichas células pertenecen a una SCV.

Las variantes de colonias pequeñas se han observado en otros géneros bacterianos. En el género *Enterococcus*, comenzaron a comunicarse hace muy pocos años atrás (Gröbner *et al.*, 2012; Ogihara *et al.*, 2016). El rol del microbiólogo clínico es crucial a la hora de observar y analizar una placa de cultivo en el contexto del cuadro clínico infeccioso del paciente. La principal sospecha de la presencia de SCV, es cuando se observan varios morfotipos de colonias en un cultivo microbiano, especialmente provenientes del sembrado de muestras clínicas tomadas de infecciones persistentes o recurrentes. La importancia de identificar y analizar estas colonias radica en que, al sobrevivir intracelularmente y presentar características bioquímicas y patogénicas diferentes, complican el tratamiento antimicrobiano y podrían convertirse en pequeñas células mutantes resistentes (Wellinghausen *et al.*, 2009). Un ejemplo de esto lo comunicaron Freitas *et al.*, (2016), describiendo el primer reporte de una co-infección con variantes morfológicas de una cepa *E. faecium* ST117 aislada de hemocultivo, con resistencia a LZD en Portugal. Dichas colonias presentaron patrón de susceptibilidad antimicrobiana diferente.

Los métodos de tipificación fenotípicos tienen un valor discriminatorio insuficiente, es por este motivo que se alerta a detectar e identificar estas subpoblaciones de bacterias de crecimiento más lento y fenotipo inestable, con tecnología más robusta como MALDI TOF-MS así como realizar pruebas necesarias y complementarias para confirmar su pertenencia a SCV.

La producción de hemolisina o citolisina, una proteína secretada con actividad lítica sobre células procariotas y eucariotas, también fue investigada fenotípicamente en esta tesis como parte

del diagnóstico microbiológico. Se postula que la misma contribuye con toxemia y daño tisular en las infecciones enterocócicas (Garza-Velasco *et al.*, 2002). Chow *et al.*, (1993) utilizando conejos como modelo animal, demostraron que la hemolisina asociada a la producción de sustancia de agregación, contribuía a la virulencia en endocarditis experimental. En este trabajo entre las 63 cepas evaluadas, se detectó la expresión fenotípica de β -hemolisina solamente en cepas de la especie *E. faecium* ($n=13$; 68,4 %) siendo las cepas aisladas de líquidos abdominales las que mostraron mayor porcentaje ($n=6$; 46,2 %) de detección, seguido de las cepas aisladas de hemocultivos ($n=4$; 30,8 %). Se detectó asociación estadísticamente significativa entre tipo de hemólisis y tipo de especie de enterococos aislada ($p=0,000$) para un nivel de significancia del 95 %, según prueba estadística aplicada. Cinco cepas (5/13) del total que produjo hemolisina se aislaron de pacientes que luego fallecieron y todos resultaron ser del género masculino. Vergis *et al.*, (2002) diseñaron un estudio prospectivo observacional y determinaron, a diferencia de lo detectado en esta tesis, la expresión de hemolisina en *E. faecalis* (23/211; 11 %;) productores de bacteriemia. Giridhara Upadhyaya *et al.*, (2010) realizaron un estudio comparativo entre expresión de FV en 200 *E. faecalis* provenientes de infecciones clínicas y 100 *E. faecalis* de microbiota comensal (heces). El 16,5 % de los aislados clínicos y el 19 % de los aislados de microbiota comensal produjeron hemolisina. Otro estudio realizado en un hospital de Bulgaria, con el fin de estudiar la incidencia de determinantes de virulencia en aislados clínicos de *E. faecalis* y *E. faecium*, demostró la ausencia de este FV en *E. faecium* (Strateva *et al.*, 2016).

Hällgren *et al.*, (2009) realizaron la detección de determinantes genéticos de virulencia de sustancia de agregación (*asa1*), proteína enterocócica de superficie (*esp*) y operon de citolisina en *E. faecium* y *E. faecalis* de origen clínico. En ninguna cepa *E. faecium* se detectaron los genes *cyl*, solamente su detección se observó en 12 de 94 *E. faecalis*. Sin embargo, Gulhan *et al.*, (2006) detectaron fenotípicamente, citolisina en un 18,2 % de cepas *E. faecium* aisladas de reservorio humano coincidiendo con esta tesis.

No es frecuente observar actividad hemolítica en especies *E. faecium* provenientes de muestras clínicas humanas, ya que este FV es mayormente detectado fenotípicamente en *E. faecium* provenientes de reservorios no humanos, tales como animales o alimentos de origen animal (Sanlibaba *et al.*, 2018). Los enterococos habitan nichos ecológicos altamente competitivos, que los estimulan a expresar diferentes FV intraespecie, así como mecanismos de RA. En esta tesis, se realizó detección fenotípica para determinar el tipo de hemólisis, sin realizar

la detección genotípica de los subtipos de genes *cyl*. Muchas cepas integrantes de esta muestra, podrían tener el operon *cyl*, el cual al no expresarse, fenotípicamente no es detectable la producción de hemolisina. Sin embargo, puede favorecerse su expresión *in vivo*, es por este motivo que, la frecuencia encontrada para enterococos β -hemolíticos en esta tesis, podría no reflejar lo que sucedería *in vivo*, teniendo en cuenta que la expresión de muchos FV, tal como se comentó anteriormente, depende directamente del nicho ecológico donde se encuentre la bacteria. Respecto a este punto, se considera que posee limitaciones debido a que se recomienda el ensayo fenotípico seguido del molecular (detección de genes *cyl*) para la evaluación de la capacidad hemolítica en aquellas cepas de enterococos no hemolíticas, para evaluar efectivamente su potencial de virulencia y no sesgar los resultados.

Según resultados de esta tesis y, teniendo en cuenta que, la mayoría de las cepas que expresaron β -hemólisis provenían de líquidos abdominales, podría esperarse que se realicen de manera más eficiente características patogénicas como la penetración bacteriana en los tejidos intestinales humanos, toxemia y cierto daño celular y tisular, provocado por la expresión de ésta proteína. Algunas investigaciones han demostrado que este FV, cumpliría un papel en la patogenia de la infección enterocócica exacerbando su virulencia (Huycke et al, 1991; Coburn & Gilmore, 2003). Sin embargo, otros autores continúan expresando que la asociación entre la presencia de ciertos FV y el aumento de la patogenicidad en cepas de enterococos es aún controvertida (Huycke *et al.*, 1991, Vergis *et al.*, 2002).

En esta tesis se detectó la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium* aislados de una misma muestra (1 por paciente) en 7 oportunidades (Tabla N° 17), hallazgo que no se detecta de rutina en los laboratorios de microbiología. Camins *et al.*, (2007) también comunicaron la presencia de 2 EVR (*E. faecalis* y *E. faecium*) aislados de una misma muestra de un paciente, cuando realizaron una investigación de infecciones invasivas producidas por EVR. Dichos autores refieren que, posiblemente dicho hallazgo, estaría representando una colonización y no un proceso infeccioso verdadero. Debido a los escasos reportes en la literatura científica y a que este tipo de hallazgo no es común, se considera que quizás estas 7 muestras presenten error pre-analítico, y alguna de las 2 especies de enterococos detectadas sea un contaminante. Es de destacar que, todos los pacientes de los cuales provenían dichas muestras tenían ≥ 73 años y presencia de comorbilidades y 4/7 (57,1 %) fallecieron. Un paciente presentaba cirrosis

alcohólica, otro tenía CA de colon y otro paciente CA de hígado, otro paciente presentó traumatismo abdominal producto de un accidente de tránsito y el otro paciente fue multitratado con ATM, ya que debutó con una infección de prótesis. En todas estas personas con inmunosupresión o con presencia de traumatismos en zona abdominal o que fueron tratados con ATM de amplio espectro por períodos largos de tiempo, es más factible la traslocación intestinal enterocócica. Se ha demostrado, utilizando modelos animales, que *E. faecalis* puede traslocar a través del epitelio intestinal intacto, para causar posteriormente infección sistémica y/o muerte por lo que sería posible que se presente tal situación como un primer paso del mecanismo de patogénesis bacteriana enterocócica (Wells *et al.*, 1990; van der Heijden *et al.*, 2014). En esta tesis muchas de las cepas provenían de líquidos abdominales ($n=4$), muestra clínica donde enterococos generalmente integra cultivos polimicrobianos y muchas veces actúa como colonizante, su rol es controvertido y es difícil determinar si es agente causal primario del proceso infeccioso.

El tercer objetivo de esta investigación correspondió a establecer la relación entre especie de enterococo aislada y variables clínicas y demográficas de los pacientes con infección invasiva.

El mayor porcentaje de aislamientos de *E. faecalis* (36,4 %) y *E. faecium* (36,8 %), fue a partir de sangre, coincidiendo con Camins *et al.*, (2007), Burguer Moreira *et al.*, (2016) y Gawryszewska *et al.*, (2016). Sin embargo, para la especie *E. faecium*, en esta tesis, su aislamiento en sangre coincidió también con su detección en líquidos abdominales (36,8 %) (Tabla N° 19). Hemocultivos fue la muestra clínica más solicitada ($n=22$; 40 %), sobretodo en 2013 (Figura N° 19); coincidiendo con Jean *et al.*, (2001), Camins *et al.*, (2007) y Gawryszewska *et al.*, (2016), posiblemente porque se trató de pesquisar una bacteremia secundaria post-infección o porque bacteriemia, sepsis y endocarditis son las patologías enterocócicas observadas con mayor frecuencia a nivel mundial. En el Hospital de Clínicas José de San Martín, de Buenos Aires durante el período marzo-septiembre de 2014, Bourguer Moreyra *et al.*, (2016) comunicaron 15 aislamientos de *E. faecalis* a partir de hemocultivos, 8 de líquidos de derrame, 5 de materiales óseos y 2 de piel y partes blandas, en una investigación realizada para evaluar la actividad de AMP-ceftriaxona sobre dicha especie.

Líquidos abdominales fue una de las muestras mas solicitadas en el HMRS ($n=13$; 23,7 %) luego de hemocultivos. *E. faecalis* se aisló en un 22,7 % y *E. faecium* en un 36,8 % a partir de este tipo de muestra clínica. Coincide este hecho con Camins *et al.*, (2007) quienes reportaron luego de hemocultivos, que las muestras tomadas de sitios quirúrgicos profundos y flúidos peritoneales fueron las mas frecuentes. Si bien Gawryszewska *et al.*, (2016) también comunicó el aislamiento de *E. faecalis* y *E. faecium* a partir de líquidos abdominales (principalmente peritoneales) luego de hemocultivos, la tercera muestra más solicitada fue LCR seguido de abscesos. En esta investigación la tasa de mortalidad correspondió a un 27,3 % ($n=15/55$), y en ese grupo de 15 pacientes las muestras más solicitadas fueron líquidos abdominales ($n=4$) y abscesos, sobretodo hepáticos ($n=4$). La presencia de enterococos en líquidos abdominales puede representar un marcador de morbilidad y gravedad sobretodo si se los aísla a partir de pacientes adultos mayores y con enfermedad de base grave (Dupont *et al.*, 2011).

Los abscesos correspondieron a un 21,9 % ($n=12$), de los cuales *E. faecalis* se aisló en un 25 % y *E. faecium* en un 15,9 %. *Enterococcus* spp. ha sido aislado con alta frecuencia de abscesos hepáticos, lo cual genera un problema clínico significativo (Mücke *et al.*, 2017). En esta tesis, dicha muestra clínica fue la más solicitada ($n=4$) dentro de todos los tipos de abscesos; todas las muestras fueron tomadas a pacientes masculinos y los 4, fallecieron. En el Hospital Universitario de Frankfurt, Alemania, se estudió el rol de este género y otras bacterias MDR y su asociación con abscesos hepáticos piógenos por 2009 a 2015. *Enterococcus* spp. (28,9 %) en total: *E. faecium* $n=26$; *E. faecalis* $n=13$ fueron los microorganismos más detectados. Dichos autores demuestran que se subestima la presencia de enterococos en este tipo de patologías, incluso no se lo cubre con el tratamiento empírico (Mücke *et al.*, 2017), situación que viene comunicándose a través del tiempo.

Finalmente, líquidos articulares fue la cuarta muestra clínica más solicitada, con un $n=7$ (12,7 %). De estas muestras, se recuperó en un 13,6 % *E. faecalis* y en un 10,5 % *E. faecium*. Resultados similares reportaron Tornero *et al.*, en 2014, quienes detectaron mayor aislamiento de *E. faecalis* (89 %) frente a un porcentaje menor de *E. faecium* (9 %) cuando estudiaron las características clínicas y microbiológicas de 203 pacientes con infecciones de prótesis articulares debido a *Enterococcus* spp. Peel *et al.*, (2012) reportaron el aislamiento de *Enterococcus* spp. de infecciones de prótesis articulares principalmente como integrante de cultivos polimicrobianos,

diferente a lo encontrado en esta tesis. Si bien se reportan porcentajes menores al 10 % de infecciones articulares producidas por estas bacterias, aislar las mismas a partir de líquidos articulares, se asocia a un peor pronóstico, probablemente debido a la producción de *biofilm* y a la tolerancia de enterococos a muchas clases de ATM (Berbari *et al.*, 2006; Marculescu *et al.*, 2006; Moran *et al.*, 2007).

En este trabajo de tesis ambas especies de enterococos fueron aisladas de todos los tipos de líquidos a excepción de la única muestra obtenida de líquido pericárdico $n=1$ (1,8 %), de la cual solamente se aisló *E. faecalis*.

El análisis de la relación entre tipo de especie aislada, género y edad del paciente demostró que la recuperación de *E. faecalis* fue mayor en pacientes del género masculino $n=30$ (68,2 %) y menor en pacientes de género femenino $n=14$ (31,8 %). Misma observación se encontró con la recuperación de *E. faecium*, mayores aislamientos se observaron en pacientes del género masculino $n=16$ (84,2 %) y menores aislamientos a partir del género femenino $n=3$ (15,8 %). Estos resultados obedecen a que en esta tesis, se encontró un claro predominio de pacientes del género masculino $n=40$ (72,7 %) sobre el género femenino $n=15$ (27,3 %). La edad promedio fue de $59 \pm 18,8$ años con un mínimo de 16 y un máximo de 92 años. El rango etario con mayor porcentaje de pacientes con infección invasiva fue el V, comprendido entre 64 y 75 años. Estos resultados coinciden con lo encontrado por Toledo *et al.*, en 2004 quienes también comunicaron mayor porcentaje de pacientes del género masculino en relación a femeninos, cuando diseñaron un estudio para aislar especies de enterococos causantes de infecciones y estudiar la RA. Otro trabajo realizado en Polonia investigando infecciones invasivas enterocócicas humanas, también reportó un mayor porcentaje (56 %) de pacientes del género masculino y menor porcentaje de pacientes femeninos (42,1 %) coincidiendo con los resultados de ésta tesis (Gawryszewska *et al.*, 2016). La edad promedio detectada en el trabajo realizado en Polonia fue 89 años, la misma fue diferente a lo encontrado en este trabajo (59 años). En la Ciudad de Córdoba, Argentina, se realizó un estudio observacional prospectivo de 117 episodios de bacteriemia por enterococos, en pacientes adultos del Hospital Nacional de Clínicas (Manassero *et al.*, 2016). El 78 % de los pacientes fue mayor de 55 años, 71 pacientes fueron varones y 46 pacientes fueron mujeres, con edades comprendidas entre los 25 y los 97 años (Manassero *et al.*, 2016). Estos resultados se asemejan a los observados en la presente investigación. Otro estudio realizado en nuestro país por

Togneri *et al.*, (2005), para analizar la clínica y la epidemiología de la portación intestinal de EVR en una unidad de terapia intensiva, demostró resultados muy similares. Estos investigadores reportaron mayor cantidad de pacientes varones y menor de mujeres; con una edad media de 54 años y un rango comprendido entre 28 y 80 años.

En relación al tipo de especie y uso de terapia antimicrobiana previa: no se encontró asociación estadística entre aislamiento de especies de enterococos y consumo de ATM previos ($p=0,196$), al igual que para especie de enterococos y evolución del paciente: alta o fallecimiento ($p=0,873$) quizás debido al bajo n muestral.

Cuarenta y cuatro pacientes $n=44$ (80 %) habían recibido terapia antimicrobiana empírica, siendo CIP y ceftriaxona, seguido de cefalexina, los ATM más utilizados como monoterapia empírica. La dupla mayormente utilizada fue metronidazol/CIP. En todas las cohortes se observó consumo de ATM, siendo 2010 el año en que se observó mayor porcentaje (92,9 %) de utilización de los mismos como profilaxis antimicrobiana empírica (Figura N° 20). Numerosos pacientes de este estudio presentaban diferentes comorbilidades y se mostró que patologías de base tales como DBT y CA fueron las más prevalentes. Es sabido que no se pueden realizar trasplantes, ni cirugías complejas, ni administrar quimioterapia para CA sin antes pensar en una profilaxis ATM. Sin embargo, esta descripto que en muchas situaciones clínicas y en ciertas infecciones producidas por enterococos, en muchas instituciones de salud, no se tiene en cuenta su cobertura con la profilaxis antimicrobiana. A su vez, la diversidad de antibiótipos, la diferente sensibilidad intraespecie frente a un mismo ATM y la circulación de clones evolucionados intrahospitalarios, complica aún más un tratamiento dirigido para enterococos MDR y/o EFMVR. McBride *et al.*, (2010), evaluaron bacteriemias por enterococos sensibles a VAN y hallaron como factor predictor de mortalidad el recibir un tratamiento empírico inapropiado. Se conoce que pacientes con bacteriemia por EVR tienen 2,5 veces mayor probabilidad de morir, que pacientes con aislamientos de enterococos VAN sensibles. Donskey *et al.*, (2000) utilizando un modelo animal, demostró que la prescripción de ATM β -lactámicos con mínima actividad anti-enterococos promovía la colonización del tracto gastrointestinal de ratones con EVR. Otros estudios han encontrado una fuerte correlación con el uso de cefalosporinas de espectro extendido y ATM anti-anaerobios y la colonización con EVR (Donskey *et al.*, 2000; Owstrosky *et al.*, 2001). En esta tesis, tal como se comentó, CIP y ceftriaxona fueron los ATM más utilizados en

los pacientes con diagnóstico presuntivo de infección invasiva. Se ha observado también que en pacientes inmunocomprometidos que reciben ATM, *E. faecium* MDR se convirtió en la especie intestinal dominante (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2012; van Harten *et al.*, 2017). Recientemente, Hendrickx *et al.*, (2018), inocularon ratones tratados con cefalosporina y observaron durante el tratamiento ATM, que la cepa utilizada de *E. faecium* con CIM a ceftriaxona > 512 µg/mL y a cefoxitina 256 µg/mL para inocular, colonizó el lado apical del epitelio del colon.

Un ejemplo de la utilización adecuada de profilaxis antimicrobiana fue comunicada por Brasg *et al.*, (2017) quienes utilizaron el *screening* previo a través de hisopados rectales para la detección de EVR en pacientes. Dicha práctica representó una herramienta muy útil para aplicar o no, profilaxis empírica con LZD o daptomicina. Respecto al *screening* a través de hisopados rectales para detectar EVR, se observa que no es una práctica regular que se realice en muchos hospitales de nuestro país así como a nivel mundial, aún en la actualidad (Bonten *et al.*, 2001; Popiel & Miller, 2014; Frakking *et al.*, 2018). Tal situación está relacionada directamente con que, en ciertas instituciones, se evalúa el costo-beneficio de aplicar esta práctica y se rigen por protocolos de decisión de aislamientos para pacientes. Según sea la gravedad del germen, el impacto epidemiológico que el mismo representa (por ejemplo: por portación de elementos genéticos móviles de rápida diseminación tal como plásmidos que diseminan BLEEs) y si en dicho nosocomio existen antecedentes de brotes por tales microorganismos se decidirá recurrir a esta estrategia. EL CDC ha comunicado lineamientos que expresan adecuadamente cuando es necesario aplicar el *screening* previo a través de hisopados rectales para la detección de EVR (<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00039349.htm>). En el HMRS esta práctica comenzó a realizarse luego del primer brote de EVR.

Otras de las variables analizadas fueron la frecuencia de aislamiento del tipo de especie recuperada según Servicio de internación en el HMRS. Se distribuyeron de la siguiente manera: *E. faecium* y *E. faecalis* fueron aislados con mayor frecuencia de cirugía y traumatología, en ambos servicios se detectó mayor utilización de ATM como terapia empírica previa. No se observó diferencias estadísticamente significativas entre distribución de especies de enterococos y Servicio de internación del paciente ($p=0,282$) coincidiendo con Bantar *et al.*, (2007).

En relación al tipo de infecciones diagnosticadas, comorbilidades y tipo de muestras clínicas en las cohortes 2010, 2013 y 2014, se determinó que en el HMRS, las principales infecciones fueron en primer lugar, osteoarticulares o asociadas a implantes ortopédicos ($n=11$); en segundo lugar se ubicaron las infecciones graves post-traumatismos, producidas como consecuencia de un accidente de auto/moto ($n=6$) y el tercer lugar fue ocupado por las infecciones post-quirúrgicas ($n=5$), muchas de ellas producto de cirugías realizadas en pacientes con CA de colon y esófago como enfermedad de base. Peritonitis ($n=2$), apendicitis ($n=2$) y litiasis vesicular ($n=1$) registraron un menor porcentaje de frecuencia, al igual que las infecciones invasivas como osteomielitis ($n=1$); sepsis ($n=1$); bacteriemia con foco urinario ($n=1$); bacteriemia sin foco ($n=1$), endocarditis ($n=1$) y pericarditis ($n=1$). Resultados diferentes fueron comunicados por Gawryszewska *et al.*, (2016), quienes trabajaron de manera colaborativa con 30 hospitales, de 26 regiones diferentes de Polonia, para aislar 259 enterococos de infecciones invasivas. En dicho estudio los episodios de bacteriemias fueron los más prevalentes, seguidos de sepsis; el segundo lugar fue ocupado por infecciones abdominales y el tercer lugar endocarditis. Idénticos resultados a los obtenidos por Gawryszewska *et al.*, (2016), comunicó el grupo de Jean *et al.*, (2001) estudiando infecciones invasivas debido a EVR, en 11 pacientes adultos, del *National Taiwan University Hospital*, quienes detectaron con mayor frecuencia bacteriemias ($n=9$), seguido de 1 empiema pleural y 1 episodio de peritonitis. Si bien las infecciones osteoarticulares o asociadas a implantes ortopédicos fueron las más prevalentes en este trabajo, durante 2010, 2013 y 2014, evidentemente fueron el puntapié inicial para el inicio de una bacteriemia enterocócica. El HMRS es un nosocomio de autogestión que en su mayoría, recibe pacientes de localidades que rodean el partido de Tandil. A su vez, se internan en el, pacientes con patologías agudas y crónicas, muchos de los cuales vienen derivados de otras localidades más alejadas. Por lo que el tipo y la frecuencia de la infección invasiva en un período determinado de tiempo serán como esta descripto, inherentes de cada nosocomio, y dependerá del tipo de paciente que ingresa al hospital y, de los gérmenes más prevalentes que causan las mismas. Esto obliga a realizar estudios epidemiológicos moleculares en cada institución, para reconocer características microbiológicas de los microorganismos circulantes e identificar los causantes de los procesos infecciosos de los pacientes.

Finalmente, las patologías de base crónica, múltiples comorbilidades, problemas en el sistema inmune, predisponen a debutar con infecciones por cocos gram positivos

multirresistentes como enterococos y *S. aureus*. Al recabar ciertos datos de la historia clínica de los pacientes, se observó presencia de patologías de base crónica como DBT tipo I y II; insuficiencia renal crónica; alcoholismo; artrosis; artritis reumatoidea, CA de ovario, CA de hígado, CA de páncreas y CA de colon. Frente a la presencia de pacientes con CA que debutan con infecciones invasivas, se debe tener en cuenta que, el tratamiento para erradicar enterococos, es complicado, debido a la probabilidad de este microorganismo de desarrollar RA y tolerancia frente a β -lactámicos. Gawryszewska *et al.*, (2016) reportaron analizando la situación epidemiológica de infecciones entorococcicas invasivas, insuficiencia renal crónica, DBT y lesiones como comorbilidades presentes en los pacientes a los que se les aisló *Enterococcus*. Es por esto último que, la elevación de tasas de mortalidad, sobre todo en bacteriemias por EVR (que aumenta la tasa hasta el 60 %), pueden deberse a que estas infecciones se desarrollan en pacientes con serios problemas de inmunidad y múltiples comorbilidades (Jean *et al.*, 2001; Patel, 2003; Canton & Ruiz-Garbajosa, 2013). En esta investigación la tasa de mortalidad correspondió a un 27,3 % ($n=15/55$), sin embargo podría pensarse porque no fue demostrado, que no respondió a episodios de bacteriemia, la mayoría de los pacientes fallecidos tenían CA como patología de base y las muestras clínicas mas solicitadas en el rango de los que fallecieron, correspondieron a abscesos y líquidos abdominales.

En este estudio, el cuarto objetivo específico se diseñó para caracterizar genéticamente e investigar la vinculación epidemiológica de los aislados de ambas especies en 2010, 2013 y 2014, correctamente identificadas con MALDI TOF-MS. Para esta ocasión se procedió a utilizar técnicas de biología molecular para determinar la relación clonal de los aislamientos analizando los pulsotipos obtenidos por PFGE. Este análisis mostró, aplicando los criterios de Tenover *et al.*, (1995), la presencia de una elevada diversidad genética en las cepas de enterococos, detectando 10 tipos clonales entre la muestra de $n=19$ aislamientos de *E. faecium* y 25 tipos clonales entre los $n=44$ aislamientos de *E. faecalis*.

En Cuba, Quiñones Perez (2010) también observó amplia variabilidad genética, detectando 49 pulsotipos diferentes en una muestra de 83 *E. faecalis* y 9 pulsotipos en la muestra de 10 aislamientos de *E. faecium*. Sin embargo, estas cepas fueron recuperadas de 15 hospitales de 3 provincias de Cuba. En el estudio de Quiñones Perez, al igual que esta tesis, se testearon

todos los enterococos independientemente de su sensibilidad a VAN. La misma autora trabajando con cepas procedentes de un único hospital, determinó mayor diversidad genética en la especie *E. faecalis* intrahospitalaria, detectando 54 pulsotipos diferentes en una muestra de 55 *E. faecalis* (1,01 aislamiento/pulsotipo). Estos hallazgos son similares a lo obtenido en esta tesis, donde se estudiaron cepas provenientes de un mismo hospital y donde fue observado diseminación de diversos clones en los diferentes años, sin embargo la relación aislamiento/pulsotipo fue diferente.

Corso *et al.*, en 2007, estudiando la epidemiología molecular de 189 EFMVR provenientes de numerosos hospitales de nuestro país, detectaron 35 patrones de PFGE, siendo el clon 1 el predominante, con 24 subtipos. Dicho clon se recuperó en 19 de 30 hospitales. Estas cepas fueron aisladas de hisopados rectales, orina, sangre y otros sitios. Este trabajo de tipo multicéntrico fue realizado en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS “DR. CARLOS G. MALBRAN” conjuntamente con el grupo Argentino colaborativo de EVR. Dichos autores sugieren que existe una diseminación intra e inter-hospitalaria de clones de EFMVR que portan el gen *vanA*, el cual parecería ser el principal mecanismo de resistencia a VAN en Argentina (Corso *et al.*, 2007). Kovensky *et al.*, (2002) también comunicaron la epidemiología molecular solo de los EVR provenientes de un hospital de quemados de Buenos Aires, recuperados entre mayo de 1998 y mayo de 2002. La búsqueda demostró 4 tipos clonales (A, B, C y D) detectados en 12 aislamientos de *E. faecium*. Las muestras tomadas fueron de hisopados rectales, sangre y orina. En Tehran, República Islámica de Irán, Saeidi *et al.*, (2017); detectaron menor diversidad genética, encontrando 7 pulsotipos de un total de 125 aislados de *E. faecalis*, provenientes de 2 hospitales. En otro estudio recientemente publicado por Akpaka *et al.*, (2017); se demostró la presencia de 6 tipos clonales entre 70 *E. faecium* y 7 *E. faecalis* cuando evaluaron las características genéticas y la epidemiología molecular de EVR aislados de 8 países del caribe. Todos estos resultados evidencian que la epidemiología molecular es inherente de cada lugar geográfico y depende del contexto ecológico de donde se aísle la bacteria. Sin embargo, la habilidad de especies de este género para intercambiar elementos genéticos móviles, con el fin de generar linajes clonales adaptados al hospital o fuera de el, hace que exista hoy a nivel mundial, una diseminación de diversos clones emergentes evolucionados genéticamente y de alto riesgo, con particularidades compartidas (Guzman Prieto *et al.*, 2016).

En esta tesis se determinó que el clon mas prevalente para *E. faecalis* fue EFC-2 ($n=5$; 11,4 %) y para *E. faecium* EFM-1 ($n=4$; 21 %), según se observa en las Figuras N° 21 y N° 22. El clon EFC-2 se encontró diseminado en el Servicio de cirugía, detectándose en 4/5 aislados. Para *E. faecium* por ejemplo, el clon EFM-3 solo se detectó en traumatología. En general, el análisis de los resultados obtenidos permitió observar que la mayor diversidad clonal para ambas especies se observó en el Servicio de traumatología, detectándose 8 tipos de clones, 5 de *E. faecalis* y 3 de *E. faecium*. Se determinó la presencia de 7 clones circulantes en los servicios de UTI (4 clones de *E. faecium* y 3 de *E. faecalis*), cirugía (4 clones de *E. faecalis* y 3 de *E. faecium*) y guardia (4 clones de *E. faecalis* y 3 de *E. faecium*). En ambas especies se observó también que un mismo clon fue detectado en diferentes años. Esto demuestra que, dentro del hospital Ramón Santamarina, existe una circulación y re-circulación de clones de enterococos que, dependiendo del nicho ecológico en el que se encuentran, evolucionan más que otros, ya sea por mutación (menos frecuente) o por recombinación (más frecuente). La observación de distintas bandas en los pulsotipos detectados, luego de digerir el ADN, también puede obedecer a mutaciones, por ejemplo, por la presión antimicrobiana utilizada según cada servicio. Como consecuencia de fenómenos genéticos, como inserciones o deleciones, que incrementan o disminuyen el tamaño de una banda, o bien mutaciones que crean o eliminan puntos de corte de la enzima, se obtienen distintos patrones de bandas según clon (Tenover *et al.*, 1995). La policlonalidad detectada podría deberse a la diversidad genética generada por transferencia lateral de elementos genéticos móviles que albergan el transposón *vanA*. A su vez, que existan múltiples cepas circulando en una institución de salud, puede también explicarse por el uso cada vez mayor, de agentes antimicrobianos de amplio espectro como cefalosporinas de segunda generación, fluoroquinolonas y combinaciones de penicilinas que incluyen inhibidores de β -lactamasa. Adicionalmente, el uso irracional de ATM predispone a elevar la tasa de RA. Una de las características de la endemia por EFMVR comunicada en el estudio de Rodríguez *et al.*, (2013), fue la policlonalidad, que ya había sido documentada en 1996-1998 y también, en un estudio posterior en 2002-2003, en los cuales fue detectada la presencia de 5 clones co-existentes en el Hospital de Clínicas "José de San Martín".

La circulación/re-circulación de pacientes entre servicios, hace inferir que la diseminación de un mismo clon es posible y que además éste, puede mejorar su material genético y como

resultado dar otro pulsotipo. Otra vía de diseminación de los clones encontrados en este estudio, pudo ocurrir por transmisión horizontal a través de las manos del personal de salud (médicos, enfermeras).

Se observó que en la historia clínica de muchos pacientes con infecciones invasivas, el CA fue una enfermedad de base bastante frecuente ($n=8$; 14,5 %) y estos pacientes multitratados, o con períodos largos de estancia intrahospitalaria fueron susceptibles de adquirir infecciones graves. Dichos pacientes pudieron ingresar al nosocomio con clones genéticamente evolucionados, traídos desde otros servicios de otros nosocomios, de servicios del mismo hospital o bien de la comunidad. El análisis de la distribución de clones dentro del HMRS por año, mostró que ningún clon se aisló consecutivamente en las 3 cohortes. Por parte de *E. faecalis* solo los clones EFC-3, EFC-7 y EFC-16 fueron aislados en 2 años consecutivos. En *E. faecium* sucedió lo mismo solo con los clones EFM-1, EFM-2, EFM-4 y EFM-5.

La epidemiología molecular también es una herramienta que, en situaciones epidémicas o de brotes, permite evaluar la clonalidad de los aislados en un tiempo y espacio definido. Sin embargo, se conoce que al ser un procedimiento técnico relativamente complejo, exige de instrumentación específica. No todos los centros de diagnóstico microbiológico poseen esta infraestructura y lamentablemente en nuestro país, no se encuentra presente en todos los laboratorios de microbiología clínica de todos los hospitales. Es por este motivo que, para realizar este tipo de trabajo, las muestras deben derivarse a centros más especializados o, se deben conseguir vinculaciones con otros grupos de investigación para poder llevar a cabo estos estudios armando convenios respectivos. En Argentina, existe una red coordinada por la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) “Dr. Carlos Malbrán” donde se encuentra el Laboratorio Regional y Nacional de Referencia en Resistencia a los Antimicrobianos. Aproximadamente, 95 hospitales centinelas pertenecen a la Red Nacional de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos WHONET-Argentina. De esta manera y para ahorrar recursos, el ANLIS centraliza todo lo inherente a resultados vinculados a detección e investigación de mecanismos de RA con fuerte impacto en la Salud Pública, a través del Laboratorio de referencia. El trabajo en equipo entre profesionales de la salud, la gestión y vinculación del conocimiento son necesarios para cumplimentar los objetivos, sobre todo cuando de salud humana se trata.

El PFGE explora todo el cromosoma para detectar la variabilidad existente en los lugares de restricción de la enzima de corte utilizada para digerir el ADN. En este caso, es posible detectar cambios microevolutivos que generan patrones relacionados pero no idénticos. Esto es un claro ejemplo del poder discriminativo del PFGE, y su excelente reproducibilidad, al ser una técnica muy sensible a la microvariación de una muestra de microorganismos aislados, en un período de tiempo determinado.

La mayoría de la bibliografía publicada en el mundo hace referencia sobretodo a la epidemiología molecular enfocada, generalmente, en los EVR. Este hecho hace que, quizás comparar resultados referidos a la caracterización molecular de enterococos, tanto EVR como no EVR, a partir de infecciones invasivas, resulte dificultoso más aún cuando dichas publicaciones son verdaderamente escasas.

La morbimortalidad elevada que se observa con infecciones producidas por grupos bacterianos problemáticos, que adquieren y diseminan MDR, recombinan o mutan, como cocos gram positivos (SAMR, EVR), bacilos gram negativos productores de BLEEs y la emergencia y diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas, constituyen problemáticas preocupantes para la Salud Pública. La evolución y la elevada velocidad de diseminación intra e interhospitalaria de este tipo de grupos bacterianos con sus mecanismos de resistencias, muchas veces de difícil control y tratamiento, preocupa al personal de instituciones de salud. Esto impulsa a investigar la genética intrahospitalaria de este tipo de microorganismos, que diseminan clones emergentes de alto riesgo y que generan gastos excesivos en Salud Pública. Cabe aclarar también que el ingreso de enterococos provenientes del medio ambiente comunitario hacia el medio intrahospitalario es posible. En Argentina, Pourcel *et al.*, (2017), recientemente demostraron la relación clonal entre *E. faecalis* con alto nivel de resistencia a GEH, aislados de alimentos y de humanos. Este trabajo constituye el primer estudio que demuestra la diseminación clonal de cepas con genes móviles de resistencia, en Tandil, Buenos Aires.

La caracterización molecular de las bacterias analizadas en esta tesis se completó con técnicas de última generación, utilizando también secuenciación genética. En esta etapa se logró conocer y determinar la estructura genética poblacional de *E. faecalis* y *E. faecium*. Si bien PFGE permitió determinar los tipos, sub-tipos y la frecuencia de clones, no fue adecuado para realizar

estudios filogenéticos, ni para determinar la estructura poblacional de enterococos circulantes en el HMRS. PFGE ha sido adaptada para su uso en enterococos y es considerada por muchos laboratorios como la técnica estándar de oro para la tipificación molecular, sin embargo se aplica más que nada para reconocer la epidemiología local o de un corto período de tiempo, por el contrario el tipado por MLST, se aplica para definir la epidemiología global o a largo plazo. La complementación de ambas técnicas, PFGE y MLST, fue muy valiosa a la hora de obtener información genética de la muestra bajo estudio. Elucidar la estructura poblacional de una muestra de patógenos bacterianos emergentes y/o re-emergentes, provenientes de un nicho ecológico bien determinado, es un requisito previo para el control efectivo de géneros bacterianos implicados en infecciones graves que hoy son un problema preocupante en el sistema público sanitario.

La herramienta metodológica utilizada para cumplimentar el 5^{to} objetivo de este proceso de investigación fue MLST: tipificación por secuenciación de múltiples *loci*. Dicho marcador molecular presenta excelente reproducibilidad, interpretación y un alto poder de discriminación. Sin embargo, la realización del proceso dependiendo del *n* muestral puede resultar complejo y de alto costo.

Con los resultados obtenidos secuenciando genes constitutivos del ADN de enterococos seleccionados estratégicamente y trabajando con programas bioinformáticos, 7 ST diferentes se detectaron para *E. faecalis*, en el total de las cepas analizadas (*n*=9). ST9 (CC9) fue la secuencia tipo detectada en mayor cantidad (*n*=5/22; 22,7 %). Los demás ST, ST236 (CC213), ST720, ST179 (CC16), fueron detectados en 4 oportunidades. Recientemente, Dai *et al.*, (2018) reportaron también la detección de cepas de *E. faecalis* pertenecientes al CC16, coincidiendo con esta tesis. Los ST388 (CC388) y 604 se detectaron en 2 oportunidades y el ST281 (CC2) en una oportunidad. ST720 y ST604 resultaron “*singletons*” es decir, aislamientos que no pertenecían hasta la fecha a ningún CC descripto. El ST720 encontrado en esta investigación según datos registrados en PubMLST solo ha sido detectado en Argentina hasta la fecha.

El análisis BAPS (realizado en colaboración con datos analizados y publicados por el grupo de investigación del IRyCIS-Madrid) mostró que la mayoría de los ST detectados para *E. faecalis* se agruparon en BAPS 1: ST9, ST388 y ST236. Once cepas *n*=11/22 (50 %) de *E. faecalis*, pertenecieron a este grupo. Los demás ST se agruparon en BAPS 2 (ST604) con un total

de $n=2$ cepas y en BAPS 3 (ST720, ST179 y ST281) en $n=9$ cepas. El ST9 detectado en esta investigación fue el más prevalente. Todas estas cepas pertenecían al clon EFC-2, el más frecuente en *E. faecalis*. Este clon se aisló en 2014, en su mayoría en pacientes masculinos que fueron atendidos en el Servicio de cirugía (4 de 5). En la base de datos PubMLST.org solamente figuran $n=25$ cepas con ST9 para *E. faecalis*. La mayoría proviene de aislamientos clínicos de pacientes hospitalizados y de brotes intra-hospitalarios. El país que mayormente ha enviado cepas a la base de datos, es España. El ST9 pertenece al CC9 que al igual que el CC2, son complejos clonales ancestrales de alto riesgo, adaptados a los ambientes hospitalarios y diseminados por todo el mundo. En 1989 se reportó en nuestro país, en el Hospital Nacional de referencia en Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan” de la Provincia de Buenos Aires, un brote intrahospitalario de *E. faecalis* productores de β -lactamasa (Murray *et al.*, 1992). Este clon resultó ser ST9.

Al igual que en esta tesis, Tedim *et al.*, (2015), realizando un estudio para investigar la biología de poblaciones de enterococos intestinales, aislados de pacientes hospitalizados y no-hospitalizados de diferentes grupos etarios, también detectó el ST179 integrante del CC16 y BAPS 3, en cepas aisladas de personas internadas y de personas que no se habían internado. Dichos clones presentaron RA a GEH y fueron VAN sensibles. Zheng *et al.*, (2017) estudiaron 265 aislamientos clínicos de *E. faecalis* obtenidos de pacientes de un hospital Universitario de China entre enero 2010 y junio 2016. Estos autores detectaron 44 tipos de ST diferentes, de los cuales ST16 y ST179 fueron las más prevalentes, coincidiendo en parte con lo detectado en esta investigación en la muestra de *E. faecalis* clínicos. Raven *et al.*, (2016) estudiando el genoma de linajes de *E. faecalis* adaptados al hospital, también detectaron cepas con ST179 a partir de clones VAN sensibles, aislados de hemocultivos, coincidiendo con lo encontrado en esta investigación, donde 3/4 cepas con ST179 fueron aisladas de hemocultivos. Al igual que los autores anteriores, Kawalec *et al.*, (2007) investigaron la estructura clonal de *E. faecalis*, aislados de hospitales de Polonia, utilizando MLST. La muestra estuvo integrada por clones no invasivos e invasivos recuperados de sangre, líquido peritoneal, LCR y otros. Dicho autor y sus colaboradores también reportaron el ST9 en 4 aislados, cuando enviaron a secuenciar los 7 genes constitutivos del perfil alélico de 150 *E. faecalis*. Dentro de las 150 cepas seleccionadas estratégicamente MLST reveló 53 ST, con el mismo criterio utilizado en esta tesis. Al contrario de lo detectado en esta investigación, Quiñones *et al.*, (2009) realizó el análisis de la epidemiología molecular de 33 *E. faecalis* aislados de diferentes regiones de Cuba, utilizando

cepas invasivas y no invasivas. Sin embargo, ningún ST coincidió con los detectados en esta tesis.

Todos los ST de *E. faecalis* encontrados en la muestra de esta investigación están reportados en la base de datos *on-line*, a excepción del ST720 que fue ingresado a la misma luego de su envío al curador de dicha base.

La estructura poblacional de *E. faecalis* así como sus características microbiológicas, si bien dependen del nicho ecológico en el cual habitan y de su habilidad para adquirir genes de virulencia por TGH, a pesar de esto existen complejos clonales que están diseminados a nivel mundial. Tal es el caso de los CC2, CC9 y CC87 considerados de alto riesgo e integrados por clones que causan infecciones en pacientes hospitalizados (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2009; Solheim *et al.*, 2011). En algunos integrantes de dichos conjuntos de clones se han identificado genes con roles potenciales para la adaptación o la persistencia en medioambientes hospitalarios, cuya expresión podría contribuir a la habilidad de *E. faecalis* a elevar la patogenicidad para causar enfermedad infecciosa, como los integrantes del CC2. Esta capacidad de adaptación requiere de un mecanismo eficiente de intercambio genético, que se da en muchas especies de *Enterococcus* spp.. Estudios moleculares realizados a nivel mundial, aplicando MLST y utilizando programas bioinformáticos, han demostrado que la estructura poblacional de *E. faecalis* es no-clonal, epidémica y los procesos de recombinación juegan un rol importante en los 2 complejos mayores emergentes CC2 y CC9, adaptados al hospital. La recombinación es lo que produce las variaciones genéticas que resultan luego en clones emergentes evolucionados (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Guzman Prieto *et al.*, 2016). En esta tesis se detectaron clones circulantes dentro del HMRS integrantes del CC2, CC9 y CC16.

La no clonalidad en las poblaciones de *E. faecalis* fue demostrada por el análisis de los árboles filogenéticos de estimación de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood*), utilizando las secuencias genéticas concatenadas de los genes *housekeeping* del MLST. Prácticamente los árboles realizados con todos los clados mostraron bajo soporte *bootstrap*. Esto podría deberse a que el proceso de intercambio horizontal de ADN pudo oscurecer la señal filogenética en reconstrucciones filogenéticas basadas en nucleótidos de cepas de *E. faecalis* (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Tedim *et al.*, 2015). Tal situación, ha sido comunicada por otros investigadores. De hecho, cuando se intentó realizar árboles filogenéticos para los clones de *E. faecalis* en esta tesis,

el análisis fue dificultoso y se obtuvieron árboles diferentes con el programa informático. Por dicho motivo no se presentó la figura respectiva en la sección resultados, al contrario con *E. faecium* fue posible reconstruir un árbol para inferir la filogenia. Para esta especie, la estructura poblacional es diferente y se discutirá a continuación.

Para *E. faecium* se detectaron 5 ST diferentes en el total de las cepas caracterizadas genéticamente ($n=8$). El ST predominante fue ST25 (CC9) que agrupó a $n=4/12$ (33,3 %) cepas. El segundo perfil alélico más abundante fue el ST52, se detectó en 3 cepas. ST18 (CC17) y ST792, fueron ambos detectados en 2 cepas. ST19 (CC17) fue hallado en una oportunidad. El ST792 (detectado en $n=2$ cepas) y el ST52 resultaron ser *singletons*. En este trabajo no se detectaron nuevos ST para la especie *E. faecium*. Los CC mas prevalentes fueron: CC9 y CC17.

Teniendo en cuenta que los EFMVR son un problema muy relevante para la OMS, que dichos microorganismos integran el grupo ESKAPE y que la escases de ATM para combatir clones de alto riesgo es real y preocupa, la mayoría de las investigaciones están referidas a su búsqueda y al estudio de su estructura poblacional y son mayores en comparación con *E. faecalis*. La búsqueda y recuperación de EFMVR se ha extendido a otros nichos ecológicos como animales de granja, alimentos de origen animal y personas sanas.

En nuestro país, se conoce hasta la fecha, solo una comunicación del grupo de Faccone y col., (2012). Este grupo realizó MLST para cepas EFMVR, representativas de dos clones mayoritarios A y B, provenientes de diferentes hospitales de Argentina. Dicha comunicación confirmó que las cepas analizadas pertenecían al ST17, quien es el genotipo fundador del CC17, CC integrado por cepas de alto riesgo, que producen brotes intrahospitalarios (Willems *et al.*, 2012). Los clones de alto riesgo presentan particularidades que se asocian a la presencia de mecanismos de resistencia con relevancia clínica, a su vez son capaces de colonizar nichos animados e inanimados durante largos periodos de tiempo y tienen capacidad para producir infecciones graves o invasivas por lo que cobra mucha relevancia su detección.

En esta tesis no se detectaron cepas con ST17, pero si se detectaron clones integrantes del CC17, como los ST18 y ST19. La base de datos PubMLST muestra que muchos de los ST19 reportados hasta el momento, si bien han sido aislados de pacientes hospitalizados, una gran parte de ellos provienen de muestras tomadas a mascotas, como perros y gatos. Delpech *et al.*, (2012) demostraron la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium* con perfiles de RA, aislados de alimentos de

origen animal, del partido de Tandil. Estos resultados muestran una posible circulación de estos microorganismos con RA asociada, dentro de ésta comunidad agrícola-ganadera. En el presente trabajo se detectaron grupos BAPS heterogéneos en el grupo de cepas de *E. faecium*, enviadas a secuenciar. Cuatro cepas ($n=4$) pertenecieron al grupo BAPS 2.3. A su vez, dicho grupo se subdivide en otros, que se asocian a cepas aisladas de pacientes hospitalizados y no hospitalizados. Sin embargo, todos los ST que integraron el grupo BAPS 2.3 fueron ST25, que es la secuencia tipo de aislados hospitalarios. Dos ($n=2$) cepas con ST18 detectadas en esta investigación pertenecían al BAPS 3.3, integrado por pacientes hospitalizados y no hospitalizados, donde algunos subgrupos del mismo se componen de cepas que provienen de origen animal y de otros reservorios. Otras $n=2$ cepas formaron parte del BAPS 3.1 el cual está integrado sobretodo por cepas de origen animal. Sin embargo, cepas de reservorio humano con susceptibilidad diferente a AMP también están dentro de este grupo. Las últimas $n=4$ cepas con ST52 ($n=3$) y ST19 ($n=1$) fueron BAPS 7, las cuales se han encontrado en reservorios humanos, animales, así como de alimentos. Esto último coincide con el trabajo de Tedim *et al.*, (2015), quien encontró más de 120 aislados del grupo BAPS 7 cuando investigó la biología de la población intestinal de *Enterococcus*, aislados de individuos hospitalizados y no hospitalizados.

La transferencia entre el ecosistema humano, animal y la microbiósfera ambiental es posible, así como el ingreso por diversas vías de clones resistentes, desde la comunidad hacia el ambiente intrahospitalario y viceversa. Una manera de evolución de estas cepas hacia clones más virulentos es por capitalismo genético. Al estudiar las cepas integrantes del CC17, se ha observado que pueden mejorar su genoma accesorio, utilizando eficientemente la TGH. Si bien no todas las cepas que integran el CC17 poseen MDR, se conoce que líneas genéticas epidémicas como la anterior, tienen ventajas adaptativas sobre el resto de la población microbiana. Como ejemplo de este hecho se conoce el gen *esp*, primer elemento adaptativo que se describió, específico de cepas de *E. faecium*, asociadas al ambiente hospitalario (Willems *et al.*, 2012). Este gen está localizado en un elemento conjugativo integrado que contribuye también a la formación de *biofilm*.

El grupo de Tedim *et al.*, (2017) reportó la detección de ST18 (BAPS 3.3a1 y AmpR resistentes) y ST25 (BAPS 2.3a y ampicilino sensibles) cuando estudió la dinámica clonal a largo plazo, de cepas de *E. faecium* causantes de infecciones del torrente sanguíneo (1995-2015), en

España. Coincidiendo con lo encontrado en la investigación de Tedim *et al.*, (2017), 3 clones ST25 y 1 clon ST18 provenientes de hemocultivos fueron detectados en este trabajo, siendo el ST25 el detectado con mayor frecuencia. Dicha secuencia tipo también integra el CC9 que proviene de cepas aisladas de aves de corral.

Akpaka *et al.*, (2017), analizaron 18 EVR provenientes de pacientes hospitalizados del Hospital *King Edward IV* de Bermuda. MLST reveló ST750, ST736 y ST18. En Korea (Jung *et al.*, 2014) y en China (Sun *et al.*, 2012) también detectaron clones EVR con MDR con ST pertenecientes al CC17. Pinholt *et al.*, (2015) estudiaron múltiples brotes intrahospitalarios producidos por *E. faecium* *vanA* en diferentes nosocomios de Dinamarca, entre 2012-2013. Dicho estudio demostró la presencia de 7 cepas con ST18 en una muestra de 132 EFMVR, además se observó una estructura policlonal en la muestra, coincidiendo con esta investigación. Se destaca que el 20 % de las cepas fueron aisladas de hemocultivos y de muestras clínicas provenientes de infecciones intraabdominales, por lo que dichos investigadores, subrayan que EFMVR, no solo es un colonizador intestinal, sino que también es un patógeno que causa infecciones graves en hospitales de dicho país. A diferencia de Pinholt *et al.*, (2015), en esta tesis, los *E. faecium* ST18 detectados no fueron resistentes a VAN. El hallazgo de este tipo de ST pertenecientes a CC de alto riesgo, evidentemente es un denominador común en la investigación de la estructura poblacional de enterococos, provenientes de ambientes hospitalarios, tal como se evidencia en diferentes publicaciones.

Leavis *et al.*, (2006) también identificaron el CC17 de EFMVR de alto riesgo, diseminados en cinco continentes y su correlación con la RA a AMP y quinolonas conjuntamente con la presencia de una isla de patogenicidad. La mayoría de los *E. faecium* causantes de IAAS pertenecen a linajes 17, 18 y 78 que progresivamente fueron adquiriendo determinantes de RA y ventajas microbiológicas para optimizar el primer paso de la patogénesis bacteriana, la colonización. El ST18 detectado en esta investigación y en las anteriores, se recupera mayormente de pacientes hospitalizados, tal es así que PubMLST.org muestra que para dicha secuencia tipo, hasta la fecha el 94,6 % pertenece a aislados de muestras clínicas de pacientes internados, de brotes intrahospitalarios y de cultivos de vigilancia intrahospitalaria. Muchas de estas cepas presentaron AMP resistencia tal como se demostró en esta investigación.

Actualmente se conoce que la estructura poblacional de ambas especies es diferente. Mientras que *E. faecalis* posee una población donde los genes implicados en la colonización del paciente o la virulencia están ampliamente diseminados, a través de diferentes nichos; *E. faecium* posee subpoblaciones bien definidas, con especificidad de origen: **Clado A**: integrado por clones de los subgrupos BAPS 2.1 y 3.3 asociados al hospital, que principalmente provienen de pacientes hospitalizados que causan IAAS y; **Clado B**: asociado a aislados comunitarios, principalmente aislados de personas sanas o de individuos no hospitalizados, pertenecientes al grupo BAPS 1 (Galloway-Peña *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2012; Guzman Prieto *et al.*, 2016).

Estos hallazgos, detectados secuenciando genomas completos y utilizando BAPS, sugieren la presencia de subpoblaciones específicas de *E. faecium* con diferentes trayectorias evolutivas. Algunos investigadores postulan subdivisiones para el **clado A**: el clado A1, que en su mayoría está formado por clones aislados de pacientes hospitalizados; el clado A2_1, el cual es más pequeño y esta integrado por cepas provenientes de animales, pacientes hospitalizados y no hospitalizados, el clado A2_2 similar al clado A2_1, con el agregado de cepas aisladas de porcinos; el clado A2_3, con cepas provenientes de pacientes hospitalizados y no hospitalizados y el clado A2_4, de clones de pacientes hospitalizados y aves de corral. El **clado B**, por su parte se compone de clones provenientes de animales, pacientes hospitalizados, no hospitalizados y medioambientales (Willems *et al.*, 2000; Guzman Prieto *et al.*, 2016).

Como hipótesis mas fuerte se postula que la evolución de cepas *E. faecium* es diferente a *E. faecalis*. Poblaciones de *E. faecium*, mediante la adquisición acumulativa de elementos adaptativos, se han adecuado eficazmente al nicho ecológico del hospital y aparentemente la recombinación no sería tan elevada como en *E. faecalis* (Willems *et al.*, 2012). Sin embargo, de Been *et al.*, (2013) demostraron que eventos de recombinación en el genoma central, están asociados con la evolución adaptativa en *E. faecium*. Dicha especie tiene un pangenoma capaz de adquirir e incorporar ADN con *pool* de genes necesarios para su mejor adaptación. Su enriquecimiento, con determinantes genéticos, parece ser un proceso acumulativo que anteriormente describimos como “capitalismo genético”. Esto permitiría la transición de *E. faecium*, desde patógenos comensales a patógenos nosocomiales, particularmente del clado A1.

Por otra parte, otros grupos de investigación, refuerzan la teoría de que la tasa de recombinación es alta en *E. faecium*, por lo que genera mayor diversidad genética q las mutaciones (Feil *et al.*, 2004). Según el modelo de evolución clonal de bacterias y en el marco

del MLST, la diversificación ocurre por la aparición de nuevos alelos en alguno de los *loci*, que determinan la aparición de nuevos ST, generando las denominadas variantes de locus simple (SLVs). Dichas variantes luego, pueden continuar diversificándose en forma progresiva, de allí que existan para muchos genes, muchos alelos. En poblaciones de esta especie la combinación de genotipos, ocurre a partir de transferencia lateral de bloques de ligamiento, por recombinación, diferente a lo que sucede en un modelo de poblacional de tipo clonal (Feil y Spratt, 2001).

Por el costo económico que insume realizar la técnica de MLST, más la secuenciación, la mayoría de las investigaciones aplican esta técnica seleccionando estratégicamente cepas representativas de grupos clonales. Por este motivo es que no pudo darse a conocer en su totalidad la diversidad genética de ambas especies productoras de infecciones invasivas. Sin embargo, se observó gran diversidad genética en la pequeña muestra seleccionada. Quizás esto sea el resultado de una introducción de clones de *E. faecalis* y/o *E. faecium*, desde la comunidad hacia el hospital municipal, para luego establecerse los mismos dentro del nosocomio. Esto se evidencia por el hecho de haber detectado en esta investigación, ST integrantes de CC compuestos por cepas intra y extra-hospitalarias y algunas de las cuales, se aíslan también de reservorio animal así como de pacientes de la comunidad. Llama la atención también, la dinámica de distribución de diferentes ST por año en HMRS, durante el transcurso del estudio. Es decir, se observaron nuevos ST en las cepas según el año de aislamiento. Algunos investigadores coinciden en este hallazgo, es por este motivo que postulan que, independientemente de sus diferencias en el genoma central y el patrón de descendencia, todas las cepas contienen estructuras accesorias específicas del genoma, supuestamente asociado con una especialización de cada ámbito hospitalario (Heikens *et al.*, 2008; Van Schaik W & Willems RJ, 2010).

Tedim *et al.*, (2015) demostró que aislados de pacientes no hospitalizados y hospitalizados se agrupan en BAPS 3 de *E. faecalis*. Los clones EFC-7 y EFC-16 que fueron detectados en 2 cohortes en éste trabajo pertenecieron al BAPS 3. Como se mencionó anteriormente, los CC de *E. faecalis* están más ampliamente distribuidos, no son tan específicos de huésped o nicho ecológico a diferencia de los CC de *E. faecium*, que si son más específicos de un determinado reservorio. El clon más abundante en *E. faecium* fue EFM-1, ST25 y perteneciente al BAPS 2.3, compuesto en su mayoría por cepas fenotipo VanA y VanB y que parecerían estar adaptados al ambiente del HMRS, por sus características microbiológicas y su

RA. La mayoría de los ST25 publicados en la base de datos PubMLST.org muestra que dicho ST se encontró mayormente en cepas provenientes de pacientes hospitalizados y conjuntamente la mayoría presentó genotipo *vanA*.

Dos cepas EFMVR susceptibles a AMP descritas en Francia en 1986-87 presentaron el mismo ST25, detectado en esta tesis. Al igual que en esta investigación, los ST25 aislados en dos hospitales de Francia presentaron patrones de PFGE con alto número de bandas comunes, aunque fueron clasificados como clonalmente no relacionados, esto último no coincide con lo determinado en esta tesis. Los aislados de Francia fueron AMP susceptible. En esta tesis, a diferencia de lo expresado en el trabajo francés, los 2 clones ST25 fueron AMP y PEN resistentes debido a que se detectó producción de β -lactamasa.

Un árbol filogenético es la representación gráfica de un alineamiento múltiple de secuencias, por lo que cepas agrupadas en el, se asumen como relacionadas y ancestro-descendientes. El análisis filogenético molecular de clones *E. faecium* realizado concatenando las secuencias de los 7 genes del MLST, se muestra en la Figura N° 31. Con los métodos aplicados con el *software* MEGA7, se observó congruencias entre las topologías, mostrando niveles de *bootstrap* significativos (equivalente a una $p < 0,05$). El grupo I se constituyó con las cepas C38-IR, C40-IR y C47-IRE2, todas pertenecían al clon EFM-1, ST25, CC9 y BAPS 2.3, y las ramas del árbol poseían idénticas distancias. Sin embargo, el perfil de RA fue diferente entre estas 3 cepas a pesar de esta similitud genética. Al grupo II lo integraron las cepas MDR y EFMVR, C53-IR y C44-IRE2, de diferente clon pero mismos ST792 y BAPS 3.1. Estas cepas resultaron *singletons*, ya que aún no se ha observado que integren algún CC. Su perfil de RA solamente difirió en la sensibilidad a GEH, mientras que C53-IR presentó alto nivel de resistencia a GEH, C44-IRE2 fue sensible. Las cepas C40-IR y C16-IR que formaron el grupo III, si bien se agruparon juntas, genéticamente no fueron idénticas, la distancia de sus ramas desde el nodo, fue diferente, lo que infiere una relación ancestral pero con cierta diversidad genética. Por este motivo pertenecían a distinto clon y presentaron diferentes ST y BAPS. Solamente coincidieron en pertenecer al CC17 de *E. faecium* de alto riesgo, conjuntamente con la cepa C52-IRE2 (ST18, CC17) que no resultó pertenecer a ningún grupo y fue la más alejada genéticamente. Esto puede observarse en la Figura N° 29. CC17 de alto riesgo productor de brotes intrahospitalarios incluye

linajes genéticos con RA a AMP y C52-IRE2, C16-IR y C40-IR presentaron resistencia a dicho ATM.

La utilización de MLST, enriquecido con la aplicación de herramientas bioinformáticas, permitió conocer la genética poblacional bacteriana para analizar la importancia de los fenómenos de recombinación en la evolución de las especies. Así mismo, permite comprender la influencia de dichos fenómenos en la emergencia de líneas genéticas virulentas de relevancia en clínica humana. Si bien, cada hospital tendrá una estructura poblacional bacteriana particular, la detección de clones de alto riesgo que adquieren genes de virulencia y/o RA, es un objetivo quizás un poco ambicioso, pero muy valioso a la hora de ajustar políticas de bioseguridad, de racionalizar el uso correcto de ATM y de optimizar conductas adecuadas de bioseguridad e higiene para minimizar la diseminación de estos clones.

Para el HMRS se observó diversos ST, tanto para *E. faecalis* como para *E. faecium*, provenientes de diferentes muestras clínicas y diseminados por diferentes servicios del hospital. Algunos ST fueron mas frecuentes que otros. Lo más relevante es que ciertos ST detectados, integraban CC de alto riesgo con potencial de adquirir y diseminar mayores determinantes de genes de resistencia y/o virulencia por el ambiente hospitalario.

La realización de este objetivo se pensó en base a características de ciertos patógenos bacterianos humanos, tales como los enterococos, relacionadas a estructura de su población genética, su diversidad intraespecífica y su velocidad evolutiva (Deplano & Struelens, 2006). Como se expresó oportunamente, tales rasgos genéticos, dependen de mutaciones puntuales y de la frecuencia relativa de la recombinación. Es por este motivo que la literatura científica muestra evidencias que, la estructura de una población de una especie bacteriana, puede describirse desde una clonalidad estricta donde la diversificación ocurre únicamente por mutaciones, a una población panmíctica, donde las células descendientes varían ampliamente de los ancestros debido a la alta tasa de intercambio genético aleatorio intergenómico.

En Argentina, MLST comenzó a utilizarse progresivamente en muchos géneros bacterianos, en hongos y parásitos de importancia. Particularmente con clones *E. faecalis* y *E. faecium*, hasta la fecha, solo un trabajo fue realizado únicamente con cepas de EFMVR en nuestro país (Faccone *et al.*, 2012). Durante el desarrollo de esta tesis, para enterococos, se realizaron importantes avances en el campo de la secuenciación de genomas completos. Así como la utilización del MALDI TOF-MS en Argentina está en alza, MLST será en un futuro

cercano una herramienta aplicada por otros grupos de investigación. Esto permitirá conocer, trabajando desde el ADN microbiano, las características microbiológicas, expresadas en el párrafo superior, de estructuras poblacionales de bacterias patógenas emergentes, diseminadas por hospitales de nuestro país.

Continuando con el desarrollo de los objetivos se procedió a detectar la RA. En la actualidad se estima que se consumen 100.000 toneladas de ATM destinados para el tratamiento de infecciones en la población mundial, y la mitad esta destinada para mejorar la producción de los alimentos que consumimos, para la cría de animales como cerdos, aves y peces. Hoy en día existe un complejo escenario multifactorial ya que se encuentra disminuída la producción de ATM y se considera que aproximadamente habría 60 ATM estudiándose, de los cuales se estima que solo el 15 % podría salir al mercado dentro de más de 5 años. Muchos de los que hoy están disponibles presentan poco margen terapéutico, con más toxicidad.

Se realizó la determinación de la RA de los aislados de *E. faecalis* y de *E. faecium* de forma cualitativa y cuantitativa en las N=63 cepas. La RA en el género *Enterococcus* hace varios años atrás que está bajo investigación constante, debido a que su diseminación genera no solo pérdidas económicas para la Salud Pública, sino que también, eleva la morbimortalidad sobretodo en pacientes con factores de riesgos. Se postula que en 2050 habrá más muertes por RA que por CA. Disminuir la misma, intentar buscar maneras más rápidas para su detección dentro del proceso del diagnóstico bacteriológico y generar más conocimiento, son objetivos que las organizaciones de salud internacionales tienen como prioritarios en sus agendas anuales.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) forma parte junto con, la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, de la Alianza Tripartita. Dichos organismos bajo el lema « Una sola salud » comenzaron a realizar acciones para coordinar estrategias de lucha contra la resistencia a los ATM tanto a corto, medio y largo plazo. Asimismo, promueven aplicarlas estratégicamente primero a escala mundial y luego a escala nacional y regional. Argentina, como país miembro de la OIE, ha creado una comisión nacional para el control de la RA a fin de garantizar un uso responsable de los ATM. Por otra parte, Europa ideó el *Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance* (JPIAMR) con sede en Estocolmo. Nuestro país es el único de América del Sur que participa del mismo, a través

del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT). El compromiso para combatir esta problemática esta presente en nuestro país; se avanza lento pero a pasos firmes. Esta situación de emergencias de bacterias MDR o PDR obliga no solo a trabajar en salud humana sino también en sanidad animal.

Los cambios producidos en los perfiles de RA en los últimos años obliga a realizar vigilancia epidemiológica continua para optimizar esquemas terapéuticos (Melzer *et al.*, 2000; Summers *et al.*, 2001; Till *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2004; Fraimow, 2009; Euba *et al.*, 2009; Titécat *et al.*, 2013; Murillo *et al.*, 2015). Se debe tener presente que los porcentajes de resistencia a las distintas drogas evaluadas, en los cinco microorganismos (*S. aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativos, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*) más importantes, productores de bacteriemia e identificados en la Red WHONET-Argentina, INEI-ANLIS "Dr. C. Malbrán", variaron ampliamente de hospital a hospital. Esto mismo ocurre con enterococos, situación que lleva que un sistema de vigilancia sea continuo y propio para cada institución de salud, con el objetivo de conocer el perfil de sensibilidad del microorganismo así como detectar nuevos perfiles y mecanismos de RA (Nazar *et al.*, 2010; Ceci *et al.*, 2015). Frente a este escenario, afrontar esta realidad, debiera ser el compromiso diario en cada institución. Cada nosocomio tiene que conocer el resistoma intrahospitalario para coordinar acciones que puedan disminuirlo. Particularmente, para *Enterococcus* spp., la problemática de la RA comenzó con el ingreso al mercado farmacéutico de VAN. A posteriori empezaron a observarse fracasos terapéuticos en pacientes con infecciones por enterococos. En 1990, el CDC comunicó al EVR como una emergencia internacional, constituyendo su presencia un riesgo para la salud en pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos.

Como se comentó al inicio de esta discusión, en el partido de Tandil (Buenos Aires) a partir de 2008, se empezó un estudio epidemiológico para reconocer y detectar perfiles de RA en enterococos aislados de diferentes reservorios. De esta manera y luego de recuperar y caracterizar especies del género de reservorios no humanos, se comenzó a pensar y diseñar su búsqueda en pacientes atendidos en la misma localidad, con el fin de abordar la epidemiología de este género desde diversas aristas. Dicha pesquisa se realizó a partir de muestras clínicas obtenidas de infecciones graves y complicadas.

En esta investigación, RA fue observada en 23/44 (52,3 %) aislamientos de clones de *E. faecalis*, ya sea frente a 1 ATM como para ≥ 2 o más ATM (Figura N° 30). No se reportaron cepas con MDR en esta muestra para esta especie. El perfil de RA investigado demostró la presencia de clones con resistencia a aminoglucósidos. ANRAG fue observado para GEH (43,2 %; CIM: $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$) y STH (22,7 %; CIM: $\geq 2048 \mu\text{g/mL}$). Sparo *et al.*, (2013) comunicaron la presencia de citolisina y alto nivel de resistencia a GEH en *E. faecalis* de origen humano, animal y de alimentos de origen animal. Las muestras clínicas provenían de pacientes internados con infecciones invasivas en el HMRS. Se tomaron también muestras de heces de pollos, de una granja del partido de Tandil, así como de carne picada de carnicerías de la misma ciudad. En las muestras humanas todos los aislamientos provenientes de hemocultivo presentaron alto nivel de resistencia a GEH + *cylA* (gen que expresa para citolisina). La producción de citolisina contribuye a la gravedad de la enfermedad infecciosa en el hombre, tanto como en modelos animales. Dicho trabajo demostró también la presencia del gen *aac* (6')-*Ie-aph* (2'')-*Ia* en *E. faecalis* diseminados en el ecosistema, que podrían transferirse a otras especies de este género ya que algunos de éstos genes, se ubican en elementos genéticos móviles como transposones. La transferencia genética *in vivo*, de genes que confieren alto nivel de resistencia a GEH, desde cepas de *E. faecalis* aisladas de alimentos de origen animal hacia la microbiota humana, utilizando ratones como modelo animal, también fue demostrada por Sparo *et al.*, en 2012.

Para quinolonas el porcentaje de resistencia fue el mismo. LVX y CIP fue 20,4 % (CIM: $\geq 32 \mu\text{g/mL}$). Solo una cepa *E. faecalis*, C27-IR, presentó resistencia a CHL y la CIM a este ATM resultó ser $\geq 32 \mu\text{g/mL}$. Todas las cepas (100 %) fueron sensibles a LZD, TGC, VAN y TEC coincidiendo en parte con lo comunicado por Marco & Dowzicky (2016), quienes mostraron mas del 99 % de sensibilidad a LZD, VAN y TGC en una muestra de 1205 *E. faecalis* de diferentes muestras clínicas.

El perfil de resistencia a GEH, STH, CIP y LVX fue el observado con mayor frecuencia en los 44 aislados de *E. faecalis*. Cuatro cepas que presentaron este perfil, si bien provenían de diferentes muestras, todas fueron ST720, el nuevo ST detectado con esta investigación e informado solo en Argentina hasta la fecha. La mayoría de estos pacientes había recibido como ATM empírico cefalosporinas de primera y tercera generación y 3 de las cepas, habían sido aisladas en 2013. Los pacientes que presentaban patología de base crónica (ACV y cirrosis)

podieron colonizarse y luego infectarse con la cepa ST720 circulante en el nosocomio. Los ingresados por guardia (accidente de tránsito) si bien podrían haber adquirido la cepa circulante del nosocomio, también podrían haber introducido la cepa desde la comunidad hacia el hospital. Estas 4 cepas pertenecen al grupo BAPS 3 de *E. faecalis*. Dicho grupo fue descrito por Tedim *et al.*, (2015), quienes demostraron que el mismo está integrado por cepas de origen hospitalario y comunitario. Las cepas aisladas por Tedim *et al.*, (2015), integrantes del BAPS 3, también presentaron ANRAG, conjuntamente con resistencia a LVX, coincidiendo esto con lo detectado en esta investigación. Osuka *et al.*, (2016), también examinaron la prevalencia de ANRAG en *E. faecalis* y *E. faecium* causantes de infecciones invasivas, en Minami Ibaraki Area, Japón. Las cepas fueron recuperadas de sangre y de LCR, entre 2003 y 2014. Si bien detectaron ANRAG, demostraron que dicha resistencia fue equivalente a la detectada en estudios previos en la misma región geográfica.

Al igual que en esta investigación, el fenotipo de resistencia detectado con mayor frecuencia en *E. faecalis*, aislados de hospitales de Cuba, fue para quinolonas y aminoglucósidos (Quiñones Perez, 2010). Gawryszewska *et al.*, (2016), determinaron la susceptibilidad de AMP, PEN, VAN, TEC, GEH, STH, LZD, TGC, CHL, CIP y Q/D en enterococos invasivos en Polonia. Coincidiendo con esta tesis, todos los aislados fueron sensibles a LZD y todos los *E. faecalis* fueron susceptibles a VAN y TEC. Sin embargo, en su muestra ningún *E. faecalis* fue resistente a AMP, diferente a lo encontrado en esta investigación. Dichos autores reportaron más del 50 % de ANRAG en *E. faecalis* y *E. faecium*, a diferencia de este trabajo, donde dicha resistencia fue menor al 50 %. Sin embargo, Gawryszewska *et al.*, (2016), trabajaron con un N poblacional mucho mayor, quizás por ese motivo el ANRAG fue más elevado. Resultados disímiles reportó Burguer Moreira *et al.*, (2016), en relación a la resistencia a AMP cuando evaluó la actividad *in vitro* de la asociación entre AMP y ceftriaxona. Utilizó 30 aislamientos de *E. faecalis* obtenidos de forma prospectiva, de infecciones invasivas de pacientes atendidos en el Hospital de Clínicas José de San Martín, CABA. Los aislamientos se obtuvieron de hemocultivos, líquidos de derrame, materiales óseos y piel y partes blandas. Todos fueron sensibles a AMP (CIM = 0,25-1,0 µg/mL). Si bien en el presente trabajo de tesis se observó sensibilidad a AMP en dicha especie con el antibiograma por difusión, sucedió un resultado interesante desde el punto de vista clínico-microbiológico: producción de β-lactamasa.

Se detectó la presencia del clon EFC-2, ST9-CC9, BAPS 1, compuesto por 5 cepas de idéntico perfil de resistencia: GEH, PEN, AMP (Tabla N° 36). Dicho clon, aislado en el 2014, se encontró diseminado principalmente en el Servicio de cirugía. En éstos $n=5/44$ (11,4 %) *E. faecalis*, la CIM a PEN resultó ser sensible en todas las cepas ensayadas (4 y 8 µg/mL) y con el test de difusión, se obtuvieron halos de inhibición dudosos para SAM, AMP y PEN. Para descartar la presencia de una penicilinas, se aplicó el criterio de la evaluación del diámetro de inhibición de SAM comparado con el de AMP ($\Delta > 5$), según recomendaciones sugeridas por “WHONET-Argentina”. La detección de β -lactamasa se realizó por método de disco de nitrocefín. Leich & Boonlayangoor (1992), mostraron que el método cromogénico es de mejor utilidad como prueba rápida de detección de β -lactamasas en *E. faecalis*, comparados con los métodos yodométricos y acidimétricos. La producción de esta enzima es un hecho científico escasamente comunicado, pero de elevada relevancia microbiológica en cuanto a su detección se refiere, en enterococos. Esta enzima, que es idéntica a la de *S. aureus*, en enterococos es constitutiva y muchas veces es producida en bajo nivel por algunas cepas, a diferencia de la β -lactamasa estafilocócica de tipo A, codificada por el gen *blaZ*, la cual es inducible (Tomayko *et al.*, 1996; Cercenado, 2011). Para su detección deben tomarse ciertas precauciones para no obtener un resultado erróneo, ya que esta enzima muchas veces puede producirse en baja concentración y es dependiente del inóculo utilizado. La perspicacia del microbiólogo ayuda en su detección, ya que estas cepas se muestran como sensibles *in vitro* a las penicilinas, cuando se realiza un antibiograma en el laboratorio por difusión con discos o por dilución. De hecho, la bibliografía recomienda siempre realizar la prueba de detección en aislados procedentes de sangre, huesos y de LCR. En este grupo de *E. faecalis* pertenecientes al clon EFC-2 productores de β -lactamasa, 3 cepas provenían de líquidos abdominales, 1 de absceso y otra de hemocultivo. Afortunadamente, las cepas de *E. faecalis* productoras de esta enzima son escasas a nivel mundial, pero han sido descriptos casos esporádicos en EE. UU., Canadá, Argentina, Líbano e India. Cercenado (2011) comunicó que no se han reportado por el momento, *E. faecalis* productores de β -lactamasa en Europa. Su expresión confiere resistencia a PEN, AMP y ureídopenicilinas (piperacilina), siendo sensibles a IMP y a las combinaciones de β -lactámicos, con inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, tazobactam, sulbactam). Muchas de estas cepas, se presentan también con alto nivel de RA a GEH, coincidiendo con lo detectado en este trabajo, ya que las 5 cepas *E. faecalis* β -lactamasa positivas, presentaron CIM a GEH ≥ 1024 µg/mL.

El primer caso de detección de β -lactamasa sucedió en Houston, Texas (EE. UU.), en 1981 (Murray & Mederski-Samoraj, 1983). Posteriormente, en nuestro país se publicó en 1990, un brote de *E. faecalis* productores de β -lactamasa (3 cepas) y resistentes a aminoglucósidos siendo el primer reporte fuera de EE. UU. (Lopardo *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1992). Murray *et al.*, (1991), utilizando campo pulsado, demostraron que las cepas *E. faecalis* provenientes de pacientes hospitalizados y productores de dicha enzima, aisladas en EE. UU. (Connecticut y Massachusetts), Líbano y Argentina, presentaban diferentes pulsotipos. Sin embargo, las provenientes de Delaware, Texas, Pennsylvania, Florida y Virginia (EE. UU.) fueron todas similares. Posteriormente, Wells *et al.*, (1992), realizaron un estudio donde se concluyó que en un hospital de EE.UU., un total de 124 de 1506 aislados (8,2 %) de *E. faecalis*, provenientes de 70 pacientes, fueron productores de β -lactamasa. A su vez, este autor analizó los datos epidemiológicos de los pacientes y encontró una fuerte asociación entre riesgo de infección o colonización por *E. faecalis*, productores de β -lactamasa y resistentes a alto nivel a GEH, con enfermedad de base grave (APACHE II score, > 6) y uso previo de tratamiento antimicrobiano. En esta tesis, 2/5 pacientes con infecciones invasivas, de los cuales se recuperaron estas cepas, uno tenía SIDA y otro CA de colon, como comorbilidades graves. Otros 2 pacientes debutaron con apendicitis y uno poseía un absceso renal. Excepto 1 paciente, todos habían recibido terapia antimicrobiana empírica. Los genes *bla* que codifican para β -lactamasa, son generalmente de ubicación plasmídica, por lo que pueden transferirse por conjugación a otras bacterias que causan infecciones humanas o a otros *Firmicutes* (Murray & Mederski-Samaroj, 1983). Su diseminación, tanto como su detección, genera un problema a la hora de administrar un tratamiento para el paciente. La importancia clínica radica en que los ATM β -lactámicos, así como los aminoglucósidos y glucopéptidos, constituyen el tratamiento de elección de las infecciones enterocócicas graves. Dicha enzima destruye a un grupo importante de ATM que se utilizan para realizar sinergia, sobre todo con los aminoglucósidos. El último reporte de su detección en Argentina para *E. faecalis*, lo comunicó Quinteros *et al.*, (2010), en el Congreso de Microbiología del mismo año. Dichos autores observando también la disminución en la medida del halo a AMP con respecto a la media poblacional y la diferencia de halo mayor a 5 mm para SAM, sospecharon la presencia de una β -lactamasa en un *E. faecalis* aislado de urocultivo y, por PCR, confirmaron la presencia del gen *blaZ*.

La RA detectada para las cepas *E. faecium* fue más compleja desde el punto de vista clínico, ya que se determinó la presencia de clones MDR circulantes en el HMRS, conjuntamente con resistencia a VAN y AMP, algunos de los cuales también fueron productores de β -lactamasa. La CIM determinó que *E. faecalis* presentara RA a 4 ATM ensayados y *E. faecium* a 10 ATM.

Si bien, el 100 % de los clones de *E. faecium* fueron sensibles a LZD, TGC y CHL, la multirresistencia definida como “cepa aislada no susceptible a ≥ 1 ATM en ≥ 3 categorías de ATM” fue observada en $n=4/19$ cepas (21,05 %). Gawryszewska *et al.*, (2016), reportó un total de 71,4 % de MDR en 112 *E. faecium* aislados en Polonia.

A nivel mundial se está observando y dando alerta sobre la emergencia de clones *E. faecium* con resistencia, no solo a VAN sino también a AMP. La inclusión de EFMVR dentro del grupo ESKAPE es por el escenario preocupante observado tanto en Europa como en EE. UU. respecto de esta bacteria. El CDC lo ha señalado como grave amenaza para la Salud Pública (<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>). Este hecho genera un desafío aún mayor para microbiólogos e infectólogos, ya que estas cepas integran hoy el grupo denominado “clones internacionales multirresistentes de bacterias patógenas”. El *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net) reportó recientemente una variabilidad significativa de diferentes grados de resistencia a VAN, según país, en *E. faecium*. Precisamente, el CDC de Europa comunicó un 12,5 % de prevalencia de enterococos causantes de infecciones del torrente sanguíneo en UTI, de hospitales europeos en 2012, valor que se mantuvo entre 8,5 % - 10,9 %, por 2010 y 2013 (Mendes *et al.*, 2016). El estudio realizado por Mendes *et al.*, (2016), Gawryszewska *et al.*, (2016) y el correspondiente a esta tesis demostraron la presencia de MDR en clones de *E. faecium* productores de infecciones invasivas, muchos de ellos aislados de hemocultivos.

A través de un estudio longitudinal, se demostró en EE. UU. que se logró disminuir la prevalencia de enterococos causantes de infecciones del torrente sanguíneo. En 2001 y 2002 enterococos constituyó un 11 % aproximadamente de prevalencia, entre todos los microorganismos causantes de bacteriemias. Este valor pasó de 14,4 % en 2009 a 9,2 % en 2014. Se postula que en dicho país la disminución del porcentaje, obedeció a que se mejoró y optimizó la detección, así como se implementaron medidas de precaución de contacto, dentro del sistema de salud de EE. UU., no solo para controlar EVR sino también para el *S. aureus* meticilino resistente (Mendes *et al.*, 2016).

Las cepas C53-IR, C44-IRE2, C47-IRE2, C30-IR y C48-IR presentaron fenotipo de resistencia a VAN. Tres fueron genotipo *vanA* y $n=2$ resultaron *vanB*. La resistencia a TEC fue del 15,8 % (CIM: 0,25; 0,38; 16 y 96 $\mu\text{g/mL}$) y la resistencia a VAN fue del 26,3 % (CIM: 16, 24 y 512 $\mu\text{g/mL}$). Cuatro de las $n=5$ cepas EFMVR, fueron aisladas en el mismo año (2014), a excepción de la cepa C30-IR que se aisló en 2013. Dos cepas (C53-IR y C44-IRE2) genotipo *vanA*, correspondieron a un brote en UTI del HMRS. Las cepas EFMVR se recuperaron de hemocultivos (2/5), absceso abdominal (1/5), absceso hepático (1/5) y líquido abdominal (1/5). Únicamente la cepa aislada de absceso abdominal no fue hemolítica, las demás todas expresaron fenotípicamente β -hemólisis.

Las cepas con genotipo *vanA* presentaron perfiles de RA no muy similares y clonalidad heterogénea, ya que pertenecieron a 3 clones diferentes, aunque 2 de ellas fueron mismo ST792 y BAPS 3.1. El operon *vanA* es de ubicación plasmídica, con lo cual su diseminación horizontal es factible. Las 2 cepas con ST792 se aislaron de UTI e integraban un brote intrahospitalario y solo se diferenciaron en la sensibilidad a GEH, mientras que C53-IR presentó ANRAG (≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$), C44-IRE2 fue sensible. Si bien la tercera cepa portó el mismo operón, su pulsotipo y ST fue diferente, ya que la misma no presentaba resistencia a quinolonas, aminoglucósidos y β -lactámicos (prueba difusión por discos) y fue positiva para β -lactamasa. Se destaca que, en el HMRS, no se realizaba hasta 2013, estudios de portación de EVR a todo paciente que ingresaba a la institución y se internaba. A partir de la detección de EVR en dicho nosocomio, se comenzó con esta práctica. Quizás el paciente ingresado al Servicio de cirugía, de cuyo hemocultivo se aisló la otra cepa genotipo *vanA* ST25, podría haber adquirido esta bacteria por transferencia horizontal, desde reservorio inanimado intrahospitalario o de manos del personal de salud.

Las infecciones por EVR presentan un riesgo de muerte dos veces mayor que las producidas por enterococos sensibles a VAN. Es por ello que, la vigilancia de la colonización por EVR permite prevenir la transmisión intranosocomial de las infecciones enterocócicas.

En Argentina, el principal fenotipo circulante de resistencia a VAN en hospitales es VanA para *E. faecium*, al igual que en Europa. Esto fue demostrado por Corso *et al.*, (2007) analizando 189 aislados de EFMVR, provenientes de 30 hospitales Argentinos, de los cuales 186 fueron EFMVR *vanA*. El fenotipo VanA, y en menor medida los VanB, son muy frecuentes en Europa y en todo el mundo. VanB se ha observado con más frecuencia en Australia. Ambos determinantes forman parte de estructuras genéticas móviles más grandes y por lo tanto son transferibles a

través de la diseminación clonal y la transferencia lateral de genes (Werner *et al.*, 2008). El primer aislamiento de EFMVR fenotipo VanA, aislado en nuestro país y en Latinoamérica, fue en 1996 (Marín *et al.*, 1998). Posteriormente, se reportaron dos aislados con otro genotipo (operón *vanB*), en 2 pacientes sin internación previa, ni tratamiento prolongado con ATM, complicando el perfil epidemiológico de EVR en Argentina (Miranda *et al.*, 2003). A partir de este suceso se comenzó con la vigilancia epidemiológica de EVR en algunos hospitales de Argentina. Ponessa *et al.*, (2006), también detectaron EVR fenotipo VanA cuando investigaron el nivel de colonización fecal de pacientes hospitalizados en áreas críticas, de cuatro instituciones asistenciales de la Ciudad de Rosario, Santa Fe. Lopez Moral *et al.*, (2012), comunicaron un brote de 18 EFMVR y MDR en un hospital de Buenos Aires. Los 18 portaron el gen *vanA* y se identificaron 5 tipos clonales por PFGE. En esta tesis a partir de 19 *E. faecium*, 10 tipos clonales fueron detectados, lo que evidencia que la epidemiología molecular es propia de cada institución de salud, aunque pueden encontrarse clones compartidos, por diseminación inter hospital.

Las 2 cepas con genotipo *vanB* fueron genéticamente más homogéneas, ambas presentaron mismo pulsotipo (clon EFM-1), mismo ST25 pero fueron aisladas en años consecutivos, por lo que podría decirse que es un clon establecido. Sin embargo, C47-IRE2 a diferencia de C30-IR dió positivo el test de nitrocefin para detección de β -lactamasa. Dicha cepa C47-IRE2, fue aislada en la misma placa de Petri del cultivo del líquido abdominal proveniente de un paciente con apendicitis conjuntamente con la cepa *E. faecalis* C47-IRE1, clon EFC-2 y ST9 y productora de la enzima. Posiblemente, este hecho se deba a la TGH del gen *blaZ*, ya que se conoce que habitualmente, dicho gen, se ubica en un plásmido (Zscheck & Murray, 1993). El gen *blaZ* se ha detectado de manera excepcional en *E. faecium* en EE. UU. e Italia (Coudron *et al.*, 1992; Sarti *et al.*, 2012). En Argentina se han comunicado escasos aislamientos de *E. faecium* genotipo *vanB*. En esta tesis, se detectó una cepa EFMVR, genotipo *vanB* con expresión de β -lactamasa. Este hallazgo, si bien no fue comprobado genotípicamente por estudios moleculares y de secuenciación, sería el primero en nuestro país.

Sarti *et al.*, (2012), comunicaron el aislamiento de 8 cepas de *E. faecium* aisladas de orina, sangre y líquido peritoneal, a partir de pacientes internados en Modena, Italia, durante 2010. Dichas cepas también presentaron MDR y pulsotipos muy diferentes así como diferentes ST, aunque todas pertenecieron al mismo CC17. Por PCR e hibridación fue detectado el operon *blaZ-blaI-blaR1*. En esta tesis $n=4$ cepas *E. faecium* fueron positivas para β -lactamasa, 2 provenían de

hemocultivos, 1 de líquido abdominal y la última de líquido articular. El inóculo utilizado para realizar el test fue alto, para evitar falsos negativos, hecho que ha sido comunicado como estrategia a tener en cuenta al realizar la técnica por disco.

Si bien la regulación de la expresión de la enzima es diferente, Zscheck & Murray (1991) demostraron que la β -lactamasa enterocócica poseía secuencia nucleotídica muy similar a la β -lactamasa estafilocócica, por lo que postulan que enterococo probablemente adquirió la enzima desde *S. aureus* a través de plásmidos, utilizando conjugación bacteriana. Sin embargo, Sarti *et al.*, (2012), utilizando sucesivas hibridaciones y técnicas de biología molecular sobre sus cepas, demostraron que el operón *blaZ* estaba asociado al cromosoma. Más estudios son necesarios para dilucidar algunas cuestiones, como la transferencia entre cepas intra e interespecie, así como para determinar la secuencia genética completa. A diferencia del estudio anterior y hace más de 20 años atrás, Coudron *et al.*, (1992), comunicaban el primer aislamiento de *E. faecium* productor de β -lactamasa y resistente a aminoglucósidos. Estos autores habían reportado alta frecuencia de aislamiento de *E. faecalis* Bla⁺ con ANRAG en su hospital, por lo que predecían un difícil escenario a futuro con *E. faecium*, ya que habían detectado que dicha enzima se transmitía mediante plásmido.

En esta tesis, las pruebas estadísticas no paramétricas aplicadas, mostraron asociación significativa entre producción de β -lactamasa y RA a PEN ($p=0,000$) para *E. faecalis* y *E. faecium*.

La relevancia de detectar EFMVR con genotipos de RA a VAN y TEC de transmisión horizontal, en el ámbito de estudio, es que son indicadores de potenciales brotes epidémicos. Por este motivo se deben tomar y ajustar conductas ya descriptas, para evitar su rápida diseminación intrahospitalaria, así como el uso de otras alternativas terapéuticas que deben “cuidarse” para no promover la emergencia de nuevos mecanismos de RA. En hospitales públicos de autogestión, el Ministerio de Salud provincial envía solo drogas ATM disponibles; por tal motivo la racionalización en el uso prudente de ATM, es una responsabilidad del profesional de salud que las aplica o las prescribe. En HMRS no se dispone habitualmente de las nuevas drogas utilizadas en países desarrollados, como daptomicina, tedizolid, Q/D y la promesa de la oritavancin. En otras instituciones de salud de Argentina si es posible usar quizás daptomicina y/o Q/D. Por este motivo es que se acota aún más la línea terapéutica.

En relación a la RA frente a glucopéptidos, Gawryszewska *et al.*, (2016), publicaron resultados parecidos a los encontrados en este estudio. Estos autores detectaron resistencia a VAN en 8 aislamientos de EFMVR; 5 de ellos mostraron el fenotipo VanA y los 3 restantes fenotipo VanB. Theilacker *et al.*, (2009), comunicaron un brote de infecciones invasivas por 25 EFMVR en un hospital alemán. La infección invasiva durante este brote se limitó a pacientes con comorbilidad subyacente grave. La mortalidad de la infección por EFMVR se mantuvo alta, a pesar del tratamiento con ATM como LZD y Q/D. Camins *et al.*, (2007), estudiaron la incidencia de infecciones invasivas por EVR en Atlanta, EE. UU. y concluyeron que las mismas aumentaron durante los 3 años que duró el estudio (1997-2000). Estos EVR provenían frecuentemente de muestras de sangre, abscesos y líquidos peritoneales, similar a lo detectado en esta tesis, aunque en esta investigación se recibió un número mucho menor de muestras clínicas. Camins *et al.*, (2007), también detectaron diseminación policlonal de EVR entre hospitales y encontraron asociación estadística entre estas bacterias y la asistencia sanitaria incorrecta. Así mismo, estos autores enfatizaron en la necesidad de comenzar con un tratamiento rápido y dirigido, en pacientes con patologías infecciosas invasivas.

Gozalan *et al.*, (2015), estudiaron la epidemiología molecular de EFMVR aislados de pacientes ingresados en un hospital de Turquía (muestra clínica: hisopados rectales) y de pacientes internados por infecciones graves (muestras clínicas: sangre, LCR, líquido pleural y peritoneal), durante 2012 y 2013. Sus resultados demostraron que todos los aislados fueron resistentes a PEN G, AMP y presentaron alto nivel de resistencia a GEH, de la misma manera fueron susceptibles a Q/D y LZD; similar a lo detectado en algunas cepas de *E. faecium* que integraron la muestra de esta tesis. Todos los aislados EFMVR del estudio publicado por Gozalan *et al.*, portaban el gen *vanA* y mediante PFGE evidenciaron que la mayoría de las cepas (>90 %) pertenecían a un mismo clon, resultados no coincidentes con este estudio. Estos autores concluyeron, que en su ámbito de estudio, existió una transmisión cruzada entre aislados invasivos y no-invasivos, durante el período del estudio.

En esta investigación se observó que la presencia de resistencia a VAN ($p=0,000$) y TEC ($p=0,007$) se asoció estadísticamente con la especie *E. faecium*.

Frente al grupo de los β -lactámicos, en *E. faecium*, se observó un gran porcentaje de clones resistentes a este grupo: 47,4 % de RA a PEN (CIM: 16 y > 256 $\mu\text{g/mL}$), 26,3 % de RA

para AMP (CIM: 16, 32 y ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$) y SAM (CIM: > 256 $\mu\text{g/mL}$). En aquellas cepas *E. faecium* donde se observó RA frente a PEN y no fue detectada β -lactamasa, se sospecha que el mecanismo de hiperproducción de PBP5 estaría presente, ya que actualmente es relativamente frecuente encontrar en los hospitales cepas con RA a PEN, AMP, AMC e IMP (Cercenado, 2011). Un hallazgo similar fue comunicado por Eymard *et al.*, (1990) quienes detectaron 6 cepas de *E. faecium* penicilino resistentes aisladas de sangre, LCR, material óseo y orina provenientes en su mayoría de pacientes con infecciones invasivas y de género masculino coincidiendo con esta tesis. Cuatro de estos pacientes habían adquirido IAAS. La evaluación de la presencia de β -lactamasa fue realizada al igual que en esta tesis, por test de cefalosporina cromogénica aunque dichos autores aplicaron también test acidimétrico.

No fue objetivo de esta tesis investigar la presencia del gen *pbp5* por PCR, aunque esto si puede pensarse como posible objetivo a futuro, para demostrar si dicha resistencia puede deberse a mutaciones en el gen *pbp5*, que impliquen una menor afinidad por las penicilinas. Se ha comprobado experimentalmente que una plataforma genética cromosomal, que contiene *pbp5* en cepas de *E. faecium* AMP resistentes, puede ser transferida hacia otros *E. faecium*, siendo la diseminación de *pbp5* por TGH posible (Novais *et al.*, 2016).

La presencia de altas CIM a AMP (≥ 256 $\mu\text{g/mL}$) y a CIP (> 32 $\mu\text{g/mL}$) u otra quinolona, parece ser un buen marcador fenotípico de cepas adquiridas desde el ambiente nosocomial (CC17), hecho observado en esta investigación. Estos aislados pertenecen al clado A o “clado asociado a aislados del hospital que provienen de pacientes hospitalizados” (Galloway-Peña *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2012). Muchas de estas cepas integran subgrupos enriquecidos con elementos genéticos móviles que le otorgan mayor habilidad para colonizar (adhesinas) y persistir en huéspedes humanos.

Rodríguez *et al.*, (2013), analizaron la prevalencia de enterococos en las IAAS y la evolución de la RA en el Hospital de Clínicas “José de San Martín” de Buenos Aires. Para tal fin, estudiaron 1873 aislamientos de *Enterococcus* spp. pertenecientes a pacientes internados, con IAAS. La prevalencia de *E. faecium* aumentó de un 1,5 % en 1996 a un 4 % en 2010, situación observada a nivel mundial en muchos nosocomios. El 95 % de los aislamientos de *E. faecium* fueron resistentes a AMP, mientras que no ocurrió lo mismo frente a *E. faecalis*, donde todos los aislamientos fueron sensibles a AMP. No se detectó resistencia a LZD ni a TGC en *Enterococcus* spp. lo que coincide con resultados obtenidos en esta tesis, al igual que la frecuencia del tipo de

especie aislada: *E. faecalis* (64,2 %) y *E. faecium* (30,4 %). Manassero *et al.*, (2016), analizaron 117 episodios de bacteriemia por enterococos en Córdoba, Argentina, demostrando que el 88 % (29/33) de los aislamientos de *E. faecium* fue resistente a AMP y el 54 % (18/33) a VAN y TEC. En Oporto, Portugal, recientemente Freitas *et al.*, (2017), detectaron altos grados de colonización por enterococos AmpR en residentes de centros de cuidados de salud. Oporto es una región que presenta altas tasas de enterococos multirresistentes, tanto en pacientes infectados como en portadores sanos. Para realizar el estudio, se tomaron muestras fecales de 48 residentes, de 2 centros (período 2015-2016) y se demostró la colonización con EFMVR genotipo *vanA* y con resistencia a AMP. Adicionalmente, encontraron asociación significativa entre exposición reciente a ATM y colonización con enterococos AmpR. En Tandil, Buenos Aires, Delpech *et al.*, (2012), comunicaron la presencia de *Enterococcus* resistentes a VAN y AMP recuperados de alimentos artesanales de origen animal. Los autores concluyen que dichos alimentos pueden actuar como reservorios no humanos de ambas especies que expresan MDR. Sørensen *et al.*, (2001), realizaron un estudio doble ciego, randomizado, en 18 personas voluntarias sanas, que demostró la portación intestinal de *E. faecium* resistentes a ATM, luego de su ingestión a través de carne de pollo y cerdo. El grupo fue dividido al azar; 6 voluntarios ingirieron cepas *E. faecium* (1×10^7 UFC/mL), resistente a glucopéptidos, obtenidas de pollos, el otro grupo de 6, ingirió *E. faecium* (1×10^7 UFC/mL), resistente a estreptograminas, obtenido a partir de cerdos y el último grupo de 6, ingirió *E. faecium* (1×10^7 UFC/mL), sensible a ambos grupos de ATM. Durante 14 días post-ingestión, fueron detectados *E. faecium* resistentes en la materia fecal de los voluntarios, demostrando que dichos microorganismos, sobrevivieron al pasaje gástrico y se multiplicaron en el tracto intestinal.

Se ha sugerido que las cepas con resistencia a AMP sirven como sustratos para la aparición de brotes de EVR, en instituciones europeas y estadounidenses, y esto podría deberse a la identificación de una región cromosómica transferible de 60 kb que comprende *pbp5* y un transposón que confiere resistencia a glucopéptidos (*vanB2*-CTn5386) (Coque *et al.*, 2005). La AMP o la VAN son los tratamientos estándares para los enterococos sensibles y la combinación de AMP o VAN con un aminoglucósido es importante para lograr sinergismos y mayor actividad bactericida, sobretodo en infecciones graves. Detectar estos mecanismos de resistencias en cepas enterocócicas circulantes, tanto sea en ambiente hospitalario como en la comunidad, es un hecho

con un impacto negativo para la Salud Pública. Estos mecanismos pueden diseminarse fácilmente por TGH, método exitoso utilizado por enterococos para dispersar y perpetuar la especie. Frente a PEN se observó diferencia estadísticamente significativa ($p=0,006$) entre RA, según especie aislada; al igual que con AMP ($p=0,000$), y también con el β -lactámico inhibidor de β -lactamasa, SAM ($p=0,000$).

Los aminoglucósidos no son eficaces en monoterapia frente a los enterococos debido a la resistencia natural. Sin embargo, cuando se asocian con un ATM que actúa sobre la pared celular (β -lactámico o un glucopéptido), se observa un efecto sinérgico bactericida necesario para el tratamiento de infecciones graves (bacteriemia, endocarditis y meningitis). Tal situación ocurre si no existen mecanismos de resistencias para este grupo. Por este motivo, lo deseable es que enterococos aislados de infecciones invasivas presenten sensibilidad. En *E. faecium* el alto nivel de resistencia para GEH se observó en muy bajo porcentaje: 10,5 %; CIM: 512 y $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ y para STH en un 5,3 %; CIM: 1024 $\mu\text{g/mL}$. El análisis estadístico demostró diferencias entre RA a GEH siendo diferente el comportamiento entre especies *E. faecalis* y *E. faecium* ($p=0,012$). No sucedió lo mismo frente a RA a STH ($p=0,096$), según especies.

Del Campo *et al.*, (2000), evaluaron la resistencia a aminoglucósidos en 690 enterococos aislados de sangre, orina y exudados de pacientes de un hospital de Zaragoza, España. Detectaron ANRAG en $n=7$ *E. faecium*, 65 % para GEH y 42 % para STH. Recientemente, Santos *et al.*, (2017), detectaron 16,7 % de alto nivel de RA a GEH y 25,8 % de RA de alto nivel a STH en 18 de 132 *E. faecium* integrantes de CC de enterococos resistentes asociados con infecciones en pacientes con CA, en Brasil. Cinco de 18 aislamientos clínicos GEH resistentes, portaban el gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* tal como lo comunicó Sparo *et al.*, en 2013.

Al contrario de esta tesis, Emaneini *et al.*, (2016), detectaron 96, 2 % de ANRAG en *E. faecalis* ($n=19$) y *E. faecium* ($n=8$) aislados de pacientes de un hospital Iraní durante 2012, a pesar de la escasa muestra. El gen *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* fue encontrado en 26/27 aislados.

En esta tesis, con quinolonas se detectó, al igual que con los aminoglucósidos, bajo porcentaje de RA; 15, 8 % para LVX (CIM: $> 32 \mu\text{g/mL}$) y 10, 5 % para CIP (CIM: $> 32 \mu\text{g/mL}$) y no se observó diferencia significativa entre resistencia y especie de enterococos aislada, tanto para LVX ($p=0,668$) como para CIP ($p=0,345$). La RA a fluoroquinolonas, entre aislados clínicos de enterococos es frecuente y se conoce que la actividad de CIP frente a enterococo es moderada. Sin embargo, en la muestra de los 19 *E. faecium*, solo 3 de ellas fueron resistentes a LVX y 2 a

ciprofloxacina. Para LZD y TGC no se observó diferencia estadísticamente significativa entre las especies ($p=1,000$) y todas fueron sensibles.

Para ambas especies se detectó asociación estadísticamente significativa entre β -hemólisis y RA a GEH ($p=0,004$), β -hemólisis y RA a VAN ($p=0,001$) y β -hemólisis y RA a TEC ($p=0,044$) coincidiendo en parte con resultados publicados por Sparo *et al.*, (2013) quienes comunicaron la presencia de citolisina y alto nivel de resistencia a GEH en *E. faecalis* de origen humano. Aunque estos resultados tal como se expresó anteriormente, podrían estar sesgados debido a que la detección de β -hemólisis se realizó solo de manera fenotípica, y este tipo de determinación posee limitaciones por la probable presencia de genes silenciosos cuya expresión depende del ambiente o las condiciones de cultivo.

*E*l último objetivo específico de este trabajo de tesis doctoral consistió en evaluar *in vitro* combinaciones antimicrobianas frente a cepas multirresistentes y/o EFMVR (Ver Tabla N° 38), utilizando curvas de letalidad, un método cinético de determinación del poder bactericida.

Como se demostró anteriormente, luego de una correcta caracterización a nivel proteómico y genómico, se procedió a determinar el perfil de RA de *E. faecalis* y *E. faecium*. Dicha evaluación permitió detectar MDR únicamente en ciertos aislados de *E. faecium*. A su vez, la PCR permitió definir los genotipos de resistencia a glucopéptidos para esta única especie circulantes en el HMRS. Adicionalmente, se estableció la relación clonal de los aislados y se determinó la estructura genética poblacional, observando que algunos de los clones de ambas especies integraban CC de alto riesgo, adaptados al ambiente hospitalario, para lo cual la terapéutica antimicrobiana necesaria es escasa para su tratamiento.

Kristich *et al.*, (2014), destacaron que la real importancia clínica de *Enterococcus* spp. está directamente relacionada a la RA, la cual contribuye a la colonización e infección, sobretodo por las características de cada una de ellas, ya sea RA intrínseca, RA adquirida y tolerancia. Estos investigadores expresaron que, “...a pesar de un esfuerzo considerable, los investigadores todavía tienen que encontrar otras combinaciones de antibióticos que sean sinérgicamente bactericidas contra los enterococos”. El escenario actual a nivel mundial es: diseminación de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a AMP, ANRAG en ambas especies, con lo cual se elimina el sinergismo entre agentes activos contra pared celular y aminoglucósidos y a la alta prevalencia

de EVR, que sigue elevándose en muchos países, en reservorios humanos y en no humanos. Dicho escenario se observó en clones *E. faecium* aislados del HMRS, siendo VAN, AMP y aminoglucósidos obsoletos para tratar algunas de estas cepas provenientes de infecciones invasivas.

Teniendo en cuenta que no se dispone de terapias confiables para infecciones graves y profundas, causadas por estas cepas EFMVR y MDR, es que elegir un ATM frente a tal situación es un gran desafío para el entorno clínico (Kristich *et al.*, 2014; Gagetti *et al.*, 2018). Hay que tener presente que en esta tesis se observó un porcentaje de mortalidad del 27,3 % ($n=15/55$), aunque no se encontró asociación estadísticamente significativa entre enterococo MDR y fallecimiento.

La RA de cada cepa de enterococo varía intraespecie como interespecie. Puede ejemplificarse esta característica en el trabajo publicado por Burguer Moreira *et al.*, (2016), quienes evaluaron actividad *in vitro* de AMP-ceftriaxona frente a 30 aislamientos de *E. faecalis*, recuperados de infecciones invasivas, donde solamente en 22/30 aislamientos se observó asociación sinérgica. Rodríguez *et al.*, (2013), realizaron estudios de sinergia frente a aislamientos EFMVR recuperados de IAAS en el Hospital de Clínicas "José de San Martín" en Argentina. Ninguno de los ATM ni de las combinaciones ensayadas fueron bactericidas frente a los aislados *E. faecium* resistentes a VAN.

Por este motivo, cada cepa seleccionada debe ser evaluada *in vitro* individualmente por curvas de muerte, análisis que se realizó de este modo en esta tesis. Si bien el n muestral fue bajo, se observó un comportamiento inherente a cada cepa caracterizada.

Para tratar infecciones por *E. faecium* MDR no existe un criterio unificado. Una posible propuesta sería separar los aislados de acuerdo con su CIM para AMP y su ANRAG (Murray *et al.*, 1986; Arias *et al.*, 2010; Kristich *et al.*, 2014). Si es a) **CIM $\leq$ 64 $\mu\text{g/mL}$ y no presenta ANRAG** se propone para su tratamiento: altas dosis de AMP y aminoglucósidos; b) si es **CIM $\leq$ 64 $\mu\text{g/mL}$ y presenta ANRAG** se propone para su tratamiento altas dosis de AMP y IMP (siempre y cuando su CIM sea $< 32 \mu\text{g/mL}$); LZD + agente activo pared celular; altas dosis AMP y altas dosis de daptomicina o Q/D con altas dosis de AMP o doxiciclina; c) aislados con **CIM 64 $> \mu\text{g/mL}$ y no presenta ANRAG**: LZD + agente activo pared celular; daptomicina y aminoglucósidos + otro agente activo pared celular o Q/D y + agente activo pared celular y d) con **CIM 64 $> \mu\text{g/mL}$ y presenta ANRAG**: LZD + agente activo pared celular; daptomicina y

otro agente activo (TGC) o Q/D y otro agente activo. Cuando se menciona otro agente activo podría ser: TGC, doxiciclina con rifampicina, AMP o fluorquinolonas (si el aislado es susceptible). Es de recordar que en el HMRS no se cuenta con daptomicina y Q/D. En esta tesis se observaron 3 situaciones, a parte de la resistencia a VAN, se presentaron aislados con a) CIM para AMP $\leq 64 \mu\text{g/mL}$ y no ANRAG, b) con CIM para AMP $> 64 \mu\text{g/mL}$ y no ANRAG y c) con CIM para AMP $> 64 \mu\text{g/mL}$ y ANRAG.

Se trabajó *in vitro* combinando ATM con diferentes mecanismos de acción. ATM concentración dependiente y tiempo dependiente. Algunas de las combinaciones utilizadas en este objetivo específico fueron probadas por otros investigadores, aunque en este tópico, muchas veces es difícil extrapolar resultados. Es necesario realizar, luego estudios *in vivo* que son los más dificultosos, para poder obtener conclusiones validadas y de base mas firme. No se observa generalmente correlación *in vitro* con *in vivo*. Las concentraciones utilizadas fueron cercanas a la CIM del microorganismo. Los ATM ensayados también se pensaron, porque en general, pueden conseguirse fácilmente en la práctica hospitalaria.

La primera dupla utilizada fue **IMP** y **LVX**. Si bien IMP, el primer carbapenémico ampliamente utilizado, no es un medicamento de primera línea para tratar la infección por enterococos, se ha observado que tiene buena actividad *in vitro* con *E. faecalis*. A su vez, se conoce que IMP podría convertirse en un fármaco útil para tratar infecciones mixtas, que incluyen enterococos (Clissold *et al.*, 1987), siempre y cuando se tengan presente los mecanismos de resistencias que puedan expresar estas bacterias y el sitio de infección a tratar. Con estudios pilotos realizados sobre ciertos aislados invasivos de *E. faecalis* (algunos de los cuales integraron el N muestral de esta tesis), se observó actividad sinérgica con LVX y IMP (datos no mostrados) y por este motivo se decidió elegir dicha combinación con aislados EFMVR y MDR.

Con la dupla IMP y LVX para clon **C44-IRE2** se observó bacteriostasis. Se partió a tiempo 0 h de un inóculo inicial de $1,9 \times 10^6$ UFC/mL y el mismo resultó de $3,2 \times 10^6$ UFC/mL a las 24 h, con lo cual solo se obtuvo un sobrecrecimiento de $+ 0,2 \log_{10}$. No se observó lo mismo con la cepa **C53-IR**, de características genéticas idénticas mismo ST, mismo clon y *vanA*. Las fluorquinolonas son ATM concentración dependientes, con prolongado efecto post-antibiótico, donde la concentración máxima del mismo se prefiere siempre sobre la CIM del microorganismo [Cmax/CIM]. La CIM a LVX del clon **C44-IRE2** fue $\geq 32 \mu\text{g/mL}$, posiblemente la concentración

de LVX 64 µg/mL, en la dupla con IMP 16 µg/mL, logró frenar *in vitro* el sobrecrecimiento bacteriano hasta las 24 h. Para el clon **C53-IR**, el comportamiento fue de total indiferencia a ambos ATM, solos o en combinación. Es decir, la actividad de los dos ATM no difirió de la actividad del más efectivo en solitario. Erdem *et al.*, (2004), estudiaron el efecto *in vitro* de LVX y VAN frente a 10 *E. faecium* con ANRAG con curvas de letalidad. Solamente observó sinergia en una oportunidad. Smith *et al.*, (1997), evaluaron la interacción sinérgica de LVX con AMP frente a *E. faecium*, la mayoría fueron cepas MDR. Dichos autores reportaron sinergia a concentraciones específicas de ambos ATM sobre algunas cepas MDR y dicho efecto se determinó utilizando curvas de letalidad. Similares resultaron detectaron Landman *et al.*, (1993), frente a *E. faecium* resistentes a AMP, VAN y GEH cuando combinaron CIP con AMP, en aislados que presentaban CIM a dicha quinolona $\leq$ a 8 µg/mL y el efecto bactericida fue detectado solamente en 12 de 15 cepas.

Se conoce que en muchas bacterias, con igual ST y mismo clon pero con perfiles de susceptibilidad diferentes, su comportamiento frente a una misma dupla de ATM y misma concentración, generalmente no es idéntico. Quizás la CIM a LVX de la cepa **C53-IR** resultó ser mucho más elevada que la CIM para la cepa **C44-IRE2**, por eso en esta última cepa se observó bacteriostasis con la dupla más alta (Tabla N° 39). Es posible también que la biología molecular pueda responder el porque de este hallazgo, analizando los genes involucrados en el mecanismo de RA a quinolonas en ambas cepas.

Con IMP podría existir una hiperproducción de PBP5 (mecanismo descripto) que produce resistencia moderada a dicho ATM. Sin embargo, no fue objetivo de esta tesis realizar el estudio molecular de la presencia de *pbp5*. Torres *et al.*, (1993) y Weinstein (2001) propusieron que es posible predecir la sensibilidad de enterococos a IMP con los resultados de la evaluación de la sensibilidad a PEN y AMP. Estos investigadores, encontraron dicha correlación en aislados de *E. faecium*, aunque el grupo español de Torres *et al.*, (1993), lo había descripto más tempranamente.

En esta tesis, para ambas cepas la CIM a AMP fue $\geq$ 256 µg/mL y para PEN $>$ 256 µg/mL por lo que podría predecirse que la sensibilidad a IMP estará muy disminuída. Igualmente, se determinó la CIM a IMP en estos clones, utilizando CIM en medio sólido. Es de destacar que se han encontrado cepas de *E. faecium* con diferente evolución de resistencia a IMP, así como a los demás β -lactámicos (El Amin *et al.*, 2001; El Amin *et al.*, 2002). El Amin *et al.*, (2002), reportaron 3 cepas de *E. faecium* sensibles a AMP (0,25 - 1 µg/mL) y resistentes a IMP (4 - 16

µg/mL) aisladas de sangre y de abscesos abdominales, de pacientes adultos mayores que habían recibido IMP en UTI, en un hospital de Suecia. Casualmente, las cepas **EFMVR genotipo vanA**, **ST792**, **C44-IRE2** y **C53-IR** habían sido aisladas de un absceso abdominal y hepático de 2 pacientes internados en UTI, que habían recibido IMP como terapia antimicrobiana previa. Es de destacar que en el apartado introducción se hizo referencia a la escasa cobertura que presenta enterococos sobretodo en infecciones intraabdominales. Estos pacientes recibieron terapia empírica con dicho ATM, quizás sin pensar en los mecanismos de RA que presentan o pueden expresar estas bacterias o sin pensar en su cobertura. IMP es una droga reservada, potente y muy utilizada en UTI, que debe “cuidarse” y racionalizarse, así como validarse su uso mediante protocolos (Gomez, 2011). Si bien es discutible arribar a dichas conclusiones por el escaso tamaño muestral y estadísticamente no puede validarse, un estudio con más cantidad de aislados debiera realizarse para poder corroborar éstos hallazgos. Algunos investigadores hacen referencia a que, la combinación de fluorquinolonas con β -lactámicos, da como resultado indiferencia frente a enterococos y, si bien el sinergismo se ha observado, raramente fue reportado (Erdem *et al.*, 2004). Sin embargo, con la cepa **EFMVR C30-IR** se observó sinergia bactericida con las 3 duplas de concentraciones combinadas de LVX y IMP ensayadas, a las 24 h. En las cepas **productoras de β -lactamasa C47-IRE2 y C48-IR** también se observó caída de $> 2 \log_{10}$ UFC/mL con las 3 duplas ensayadas, aunque no puede hablarse de una verdadera sinergia, porque con cada droga en solitario también se observó la misma caída a las 24 h para estas 2 cepas. A excepción de IMP 8 µg/mL que no produjo disminución del recuento a las 24 h en la cepa **C47-IRE2**. Posiblemente porque la CIM a PEN de **C47-IRE2** fue más superior que **C48-IR** (16 µg/mL vs. 8 µg/mL) y, teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, en relación a la predicción de la CIM de IMP observando la CIM de PEN, podría pensarse que dicha bacteria quizás presente una CIM de 16 µg/mL o más, y al ser la CIM elegida de 8 µg/mL para la curva de letalidad, dicha concentración no pudo frenar su crecimiento. De hecho, esto se terminó de confirmar, luego de evaluar la CIM a IMP en todas las cepas, lo que arrojó como resultado CIM a IMP de 16 µg/mL para **C47-IRE2** y CIM a IMP de 8 µg/mL para **C48-IR**, confirmando lo comunicado por Torres *et al.*, (1993) y Weinstein (2001).

El estudio de regresión lineal simple (Tabla N° 40) mostró coeficientes de determinación $R^2 > 0,7$ (expresado en %) y pendientes de la recta resultantes con signos (-) que fueron asumidos como bactericidia y signos (+) que se asumieron como crecimiento microbiano. Estos resultados

indican que la combinación *in vitro* de LVX con IMP a las concentraciones utilizadas, presentó un efecto sinérgico sobre EFMVR que poseían genotipo *vanB*, transferible horizontalmente. Además se detectó bactericidia sobre EFMVR resistentes a AMP, PEN y productores de β -lactamasas, siempre y cuando su perfil de RA demostró sensibilidad a quinolonas (Ver Tabla N° 38).

La segunda dupla ensayada fue **TGC y GEH**. TGC es el primer representante semisintético de ATM con espectro extendido del grupo de las glicilciclinas, que muestra buena actividad *in vitro*. Se ha estudiado su acción utilizándola como monodroga o combinada frente a cocos gram positivos y bacilos gram negativos (Entenza & Moreillon, 2009). En monoterapia ha demostrado actividad frente a enterococos MDR, utilizando infecciones en modelos animales, incluida endocarditis experimental (Lefort *et al.*, 2003). Este ATM concentra bien en tejidos intraabdominales y penetra fácilmente en vegetaciones cardíacas. Sin embargo, no alcanza buenos niveles sanguíneos, por lo que es dudoso su uso como monoterapia en infecciones del torrente sanguíneo por enterococos. Frente a EFMVR y AmpR, no productores de bacteriemia se sugiere como dosis de carga de TGC 100 mg seguida de dosis de mantenimiento de 50 mg cada 12 horas. No obstante, combinado con daptomicina (Polidori *et al.*, 2011) y otros ATM, puede ser una opción interesante contra especies más frecuentes de enterococos, en ciertos tipos de infecciones invasivas.

TGC es un ATM tiempo dependiente y bacteriostático, fue combinado con GEH, un aminoglucósido concentración dependiente, de bajo costo, que aún sigue siendo utilizado y desempeña un papel útil en el tratamiento de infecciones bacterianas graves producidas por enterococos sensibles a la misma.

El protocolo de trabajo de la red WHONET de Argentina con vigencia 1 de enero de 2017 (<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/Protocolo-WHONET-consensuado-2017-final.pdf>) sugiere agregar en una placa de Petri, TGC junto a minociclina y LZD solamente en EVR. CLSI no dispone, a diferencia de EUCAST, de puntos de corte para este ATM frente a enterococos, por lo que WHONET sugiere los propuestos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) estableciendo para TGC disco de 15 μ g, los halos de ≥ 21 mm como categoría sensible, diámetros de halos entre 20-17 mm, como intermedios y halos < 16 mm como resistentes. WHONET también recomienda para todas aquellas cepas que serán sometidas a

tratamiento con TGC y hasta nueva actualización, considerar sensibles todas las cepas con halos ≥ 21 mm (correlaciona con CIM $\leq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$). Cepas con halos entre 17 y 20 mm deberán ser confirmadas por CIM. El ECOFF es definido como el valor de CIM más alto para una especie que no presenta mecanismos de resistencia. El ECOFF de la CIM a TGC, en *E. faecium*, dado por EUCAST hasta la actualidad, es 1 $\mu\text{g/mL}$, siendo la CIM de 0,064 $\mu\text{g/mL}$, la más observada.

En esta tesis, todos los halos del antibiograma obtenidos para TGC, en *E. faecalis* tanto como en *E. faecium*, fueron ≥ 21 mm por lo que podría asumirse que sus CIM fueran $\leq 1,0$ $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, no se observó acción bacteriostática a través del tiempo con curvas de letalidad, con TGC utilizada sola, a concentración 0,8 $\mu\text{g/mL}$ en ninguna de las cepas ensayadas de *E. faecium*. En todas las cepas se observó sobrecrecimiento microbiano a todos los tiempos. La tolerancia a los ATM es la capacidad que tiene un microorganismo, tal como enterococos, de dejarse inhibir en su crecimiento, pero sin ser eliminado. Este fenómeno puede proporcionar un grado de resistencia y aumentar la dificultad en el tratamiento de infecciones que requieren acción bactericida y eficaz, como en endocarditis. Quizás con TGC sucedió dicho efecto, tal como lo reportaron otros autores (Huang *et al.*, 2008), esto podría aumentar la supervivencia de las bacterias y luego observar un rebrote de crecimiento luego de la eliminación del ATM. Una posible estrategia para contrarrestar este fenómeno es adicionar otro ATM y buscar sinergia. Huang *et al.*, (2008), estudiaron la actividad bactericida comparativa de daptomicina, glucopéptidos, LZD y TGC contra bacterias gram positivas en Taiwán, entre ellas EFMVR. Observaron el 90 % de tolerancia (9 de 10 aislados EFMVR) con TGC.

Cuando se combinó estratégicamente TGC con GEH en esta investigación, se observó sinergia frente a los clones **MDR y EFMVR C53-IR y C44-IRE2**, a las 24 h, con algunas concentraciones ensayadas. Frente al clon **C44-IRE2** se detectó sinergia bactericida con la concentración más alta utilizada (TGC 1 $\mu\text{g/mL}$ y GEH 64 $\mu\text{g/mL}$), observándose una caída del inóculo $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL, a las 24 h. Con las combinaciones de concentraciones mas bajas de ambos ATM, si bien hubo crecimiento a las 24 h, este fue muy pequeño, solo de + 0,4 $\log_{10}$ UFC/mL. Con la cepa **C53-IR** fue detectada sinergia a las 24 h, con la dupla TGC 0,8 $\mu\text{g/mL}$ y GEH 32 $\mu\text{g/mL}$. Sorpresivamente, con la dupla de concentración más alta, se observó caída del inóculo de menos 1,7 $\log_{10}$ UFC/mL, a las 24 h, no llegándose a detectar una verdadera sinergia,

según definición. Frente a ambas cepas, GEH actuando como droga en solitario, no produjo caída del inóculo a las 24 h.

Con las cepas **C48-IR** y **C47-IRE2**, productoras de β -lactamasa y EFMVR, se observó sinergia antimicrobiana con las 3 concentraciones de las combinaciones diseñadas y a diferentes tiempos de incubación. Haciendo referencia a la definición y observando el recuento de sobrevivientes, solo a las 24 h para ambas cepas, se detectó sinergia con las 3 concentraciones de las duplas ensayadas respecto a TGC y, la sinergia comenzó tempranamente, a las 8 h post-incubación. Mercier *et al.*, (2002), estudiaron la actividad antimicrobiana mediante curvas de letalidad de combinaciones de TGC con otros ATM (VAN, GEH, rifampicina y doxiciclina) frente a EFMVR y *S. aureus* sensibles a TGC. La única combinación que logró mejorar la actividad antimicrobiana frente a 2 cepas EFMVR fue TGC con GEH. Pontikis *et al.*, (2013), usando una combinación de TGC 0,8 mg/L y GEH 16 mg/L, sobre un modelo experimental de endocarditis en conejos infectados con *E. faecium* resistentes a LZD, encontraron un efecto antimicrobiano sostenible, con la mayor acción a las 6 h. Nannini *et al.*, (2003), utilizando un modelo de peritonitis en ratones infectados con *E. faecalis* y *E. faecium*, algunos de ellos EVR, encontraron que TGC mostró buena actividad tanto *in vivo* como *in vitro* frente a ciertas cepas. Sugirieron que este ATM podría ser una opción para el tratamiento de infecciones enterocócicas.

Frente a la cepa más sensible **C30-IR** pero EFMVR, se observó un resultado disímil. Pareciera observarse un antagonismo (recuento a las 24 h de $\leq 2 \log_{10}$ UFC/mL del inóculo inicial con la combinación de los 2 ATM, comparado a la muerte bacteriana resultante del ATM más activo). El hecho puntual es que la definición no se cumple en su totalidad, debido a que los ATM actuando en solitario, no produjeron descenso del inóculo a las 24 h. La cepa **C30-IR** EFMVR presentó moderadamente alto nivel de RA a GEH, dado por una CIM de $\leq 128 \mu\text{g/mL}$. Se conoce que en aquellas cepas con CIM de GEH = 128-500 $\mu\text{g/mL}$ y CIM de STH = 512-1000 $\mu\text{g/mL}$, se observa falta de sinergia cuando se asocian aminoglucósidos. Cuando se obtiene este tipo de resultados, se recomienda confirmar con curvas de letalidad (Lopardo *et al.*, 1995; Famiglietti *et al.*, 2003). Este último hecho detectado con **C30-IR**, no se observó con las demás cepas EFMVR que también presentaron CIM a GEH $\leq 128 \mu\text{g/mL}$ (excepto C53-IR). No se encuentra explicación para este resultado, aunque posiblemente las CIM a GEH de las demás

cepas, fueron mucho mas bajas que la CIM a GEH de **C30-IR** ó quizás se este frente a la presencia de algún error metodológico, tal como se ha descripto en la literatura.

La tercera dupla ensayada fue **IMP y VAN**. La evidencia científica muestra que con dicha combinación se ha observado sinergismo *in vitro*, frente a enterococos resistentes a PEN, a glucopéptidos y aminoglucósidos (Leclercq *et al.*, 1991; Gutmann *et al.*, 1994). Estos autores hablan de un efecto bacteriostático con la combinación de estos ATM, limitado a especie específica y describen que no se ha observado sinergismo bactericida con dicha combinación. Sin embargo, *in vivo*, utilizando un modelo de endocarditis producido por *E. faecium* en conejos, IMP y VAN fue significativamente más efectivo que AMP sola o que AMP y VAN. Leclercq *et al.*, (1991), sorprendentemente observaron un marcado sinergismo *in vitro* entre PEN o IMP y glucopéptidos frente a EVR, pero sugieren que el mecanismos de la actividad sinérgica de β -lactámicos y glucopéptidos, frente a enterococos resistentes a estos últimos, aún no están claros. Por su parte Brandt *et al.*, (1996), encontraron que la dupla VAN y IMP no mostró sinergia *in vitro*, pero si produjo caída significativa del inóculo de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a VAN y moderada resistencia intrínseca a AMP e IMP *in vivo* ($p < 0,01$).

Utilizar IMP en cepas EFMVR no está sugerido, debido a que dicha especie posee resistencia intrínseca a este ATM. Si se ha observado que IMP generalmente es activo frente a *E. faecalis* PEN susceptibles. Se conoce también que para el tratamiento de infecciones graves por enterococos, se recurre a la combinación sinérgica porque no hay ATM bactericidas. Se recuerda que, Torres *et al.*, (1993) y Weinstein (2001), publicaron que puede predecirse *in vitro* la CIM a IMP con el resultado de la CIM a PEN y AMP. En esta tesis, se calculó la CIM a IMP en los $n=5$ aislados EFMVR que se estudiaron por curvas de letalidad y a su vez se determinó la misma según CLSI, en medio sólido, utilizando IMP como droga sólida de pureza analítica certificada. Se tuvieron en cuenta los puntos de cortes dados por EUCAST (categoría sensible aislados con $CIM \leq 4 \mu\text{g/mL}$ y categoría resistentes, aislados con $CIM > 8 \mu\text{g/mL}$) y FDA (susceptible, $\leq 4 \mu\text{g/mL}$; intermedio, $8 \mu\text{g/mL}$ y resistente, $\geq 16 \mu\text{g/mL}$), ya que el CLSI no dispone de los puntos de corte para enterococos. Las CIM determinadas para IMP en las cepas MDR y/o EFMVR variaron entre 8 y $> 128 \mu\text{g/mL}$ y se observó, al igual que lo comunicado por Torres *et al.*, (1993), una estrecha correlación entre las CIM de PEN, AMP e IMP. En esta tesis, como en otros

estudios, se observó también que generalmente la CIM a AMP resultó ser una dilución por debajo de la de PEN y que las CIM de IMP también se incrementaron con la resistencia a PEN.

Toledo *et al.*, (2004), estudiaron la RA en aislados de especies de enterococos causantes de infecciones. Con dicho trabajo detectaron $n=11$ cepas *E. faecium* aisladas de orina (3), líquidos abdominales (6), herida quirúrgica (1) y muestra de herida de pie diabético (1), determinando solo un 54,5 % de sensibilidad a IMP. Las cepas resistentes a este ATM presentaron CIM entre 8 y 64 $\mu\text{g/mL}$ al igual que para AMP, similar a lo sucedido con las cepas estudiadas por curvas de letalidad en esta tesis. Considerando el mecanismo de resistencia para PEN, presuntamente involucrado en aislados clínicos de *E. faecium* negativos para β -lactamasa (superproducción de PBP de baja afinidad y mutaciones en *pbp5*), podría esperarse lo mismo para AMP e IMP. De hecho, Boyce *et al.*, comunicaron en 1992 que la resistencia a PEN, en esta especie, se asociaba con consumo excesivo de IMP. En esta tesis, las 2 cepas MDR y EFMVR genotipo *vanA*, aisladas en 2014, de pacientes internados en UTI que habían recibido IMP como tratamiento empírico, fueron las que presentaron las CIM más altas a PEN y AMP.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, que IMP es un ATM que amplía el espectro de los β -lactámicos frente a gram positivos, que posee mayor resistencia a la hidrólisis por β -lactamasas y que tiene un efecto post-antibiótico apreciable, tanto sobre gram positivos como sobre gram negativos, se decidió nuevamente combinarlo, pero en esta oportunidad, a una mayor concentración en solitario y en dupla con un glucopéptido.

Unicamente la dupla utilizada con concentraciones más altas IMP 64 $\mu\text{g/mL}$ y VAN 32 $\mu\text{g/mL}$ produjo una leve bacteriostasis frente a **C44-IRE2**, comenzando con un inóculo inicial de $1,9 \times 10^5$ UFC/mL, a tiempo 0 h, para finalizar a las 24 h con 1×10^5 UFC/mL, debido a que, la CIM a IMP de la cepa **C44-IRE2** fue más baja que la CIM de la cepa **C53-IR** a dicho ATM. Esto se evidencia porque se observó el mismo efecto de bacteriostasis que produjo IMP a concentración 64 $\mu\text{g/mL}$ sobre la cepa **C44-IRE2** actuando como droga en solitario (Ver Tabla N° 43).

Frente a las cepas **C48-IR** y **C47-IRE2** productoras de β -lactamasa, si bien se observó caída del inóculo a las 24 h de incubación, con las tres concentraciones elegidas para las duplas, dicha disminución no llegó a ser una verdadera bactericidia, ni sinergia para la cepa **C48-IR**. Sin embargo, y a diferencia de lo que sucedió con **C53-IR**, para la cepa **C47-IRE2** se observó caída

de $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL, a las 24 h, con las combinaciones IMP 16 $\mu\text{g/mL}$ y VAN 16 $\mu\text{g/mL}$ e IMP 32 $\mu\text{g/mL}$ y VAN 32 $\mu\text{g/mL}$. Con IMP 64 $\mu\text{g/mL}$, actuando en solitario, se observó actividad bactericidia solo a las 24 h (Tabla N° 43). Es por este motivo que no se detectó sinergia bactericidia. Al ser los valores del $\log_{10}$ UFC/mL diferentes pero no tan lejanos entre estas 2 cepas, quizás exista un efecto inóculo.

Con la cepa **C30-IR**, la cual fue sensible al grupo β -lactámico y resultó genotipo *vanB* (**C30-IR** presentó una CIM a VAN de 24 $\mu\text{g/mL}$), solo se observó bacteriostasis a través del tiempo, incluso con VAN, actuando en solitario a 32 $\mu\text{g/mL}$. Si bien con IMP 16 $\mu\text{g/mL}$ y VAN 32 $\mu\text{g/mL}$ el inóculo descendió $> 1 \log_{10}$ UFC/mL, dicha dupla no logró ser sinérgica. Este hallazgo no muestra una correlación microbiológica entre curva de letalidad y CIM. Posiblemente esto se deba a variables metodológicas propias de la técnica aplicada.

IMP actuando en solitario a 64 $\mu\text{g/mL}$ produjo actividad bactericida a las 24 h, en 2 cepas, **C30-IR** y **C48-IR**, porque la CIM a dicho carbapenem en ambas cepas fue 8 $\mu\text{g/mL}$.

Si bien IMP es un ATM tiempo-dependiente, cuando se compararon los resultados obtenidos a las 2 concentraciones utilizadas para IMP en solitario, 8 $\mu\text{g/mL}$ y 64 $\mu\text{g/mL}$, sobre las 5 cepas, se observó que con la concentración más elevada la magnitud de la bactericidia aumentó solo en las cepas genotipo *vanB*. Esto debiera corroborarse con otros estudios utilizando mayor números de cepas, con mismas características microbiológicas y epidemiológicas.

La cuarta y última dupla ensayada fue **LZD y GEH**. LZD es un ATM sintético con actividad tiempo-dependiente y con acción fundamentalmente frente a cocos gram positivos, con MDR (Jacqueline *et al.*, 2003). Pertenece a un nuevo grupo, las oxazolidinonas. Si bien es bacteriostático se ha observado que tiene acción frente a ciertos escenarios clínicos producidos por enterococos. Su utilización está aprobada por la FDA de los EE.UU. y por la ANMAT para tratar infecciones por EVR. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de proteínas en forma temprana, uniéndose al sitio 23S del ARNr bacteriano de la subunidad 50S.

Algunos científicos postulan que la combinación de LZD con aminoglucósidos no se ha estudiado en profundidad para el tratamiento de infecciones enterocócicas, debido a que ambas clases de agentes, inhiben la síntesis de proteínas al actuar sobre la subunidad ribosómica de la célula, y es poco probable que la terapia de combinación sea sinérgica (Zimmer *et al.*, 2003). Sin embargo, es cierto que con GEH comparten el sitio diana de acción, pero no actúan sobre el

mismo punto en el ribosoma. La GEH interrumpe la síntesis normal de proteínas por acción irreversible al ribosoma. Debido al sitio único de inhibición, aún no ha sido demostrado resistencia cruzada con otros inhibidores de síntesis proteica (Hashemian *et al.*, 2018) y, existen escasos reportes de resistencia a LZD en enterococos.

FDA aprobó el uso de LZD junto con Q/D, principalmente para tratar infecciones por EFMVR. Ambos compuestos son recomendados por la Asociación Estadounidense del Corazón para el tratamiento de endocarditis infecciosa, producida por *E. faecium* MDR. Aunque, al ser LZD bacteriostático, muchas comunicaciones muestran y recomiendan precaución en su uso en endocarditis, ya que se han observado fracasos en el tratamiento (Falagas *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2007).

A diferencia de TGC para LZD el CLSI dispone de puntos de corte para interpretar la CIM a este último ATM con enterococos. Si el resultado es $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ la categoría es sensible; 4 es intermedia y $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ es resistente. Se decidió utilizar LZD a CIM baja $0,5 \mu\text{g/mL}$ debido a que ningún aislado de enterococos en esta tesis, presentó RA a LZD y combinarlo con GEH teniendo en cuenta que, en la muestra de las 5 cepas ensayadas, sólo una cepa presentó RA a GEH (**C53-IR**).

Al igual que otros trabajos, LZD en solitario, no mostró actividad bactericida a través del tiempo, en las 5 cepas ensayadas. El inóculo a las 24 h se elevó $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL en todos los EFMVR. Utilizando la técnica dinámica de curva de muerte, si se observó leve acción bacteriostática antes de las 6 h con LZD $0,5 \mu\text{g/mL}$ sobre las 5 cepas de EFMVR ensayadas. Sin embargo, al combinarlo con GEH, se observó un efecto bactericida temprano en algunas cepas (a partir de las 4 h), mostrando caídas $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL en 4 cepas, incluidas las cepas **MDR** y **EFMVR C53-IR** y **C44-IRE2**, pues existió un 80 % de bactericidia (Ver Tabla N° 45). La sinergia obtenida fue en relación a LZD, no así en relación a GEH, ya que esta última, actuando en solitario a $128 \mu\text{g/mL}$, logró efecto bactericida en 4 cepas, excepto en la **C53-IR**, que presentó alto nivel de resistencia a GEH (Ver Tabla N° 38). Si bien en esta última cepa no se detectó bactericidia, si se observó efecto sinérgico de LZD y GEH, a las 24 h y el inóculo disminuyó en menos de $3,3 \log_{10}$ UFC/mL.

Posiblemente, el efecto sinérgico detectado con esta dupla se deba a la acción de GEH, un ATM concentración dependiente o quizás LZD refuerce aun más la sinergia. Dicho efecto no se detectó en algunas cepas con GEH a concentración $32 \mu\text{g/mL}$ (20 % de efecto bactericida) pero si

se observó, con GEH a 128 µg/mL. Con las cepas de EFMVR evaluadas en esta tesis, no se observó antagonismo de LZD y GEH en las primeras 6 h, descrito por Jacqueline *et al.*, (2003), para *S. aureus*. Dichos autores postulan que LZD inhibe los mecanismos de transporte activo requeridos para la absorción dependiente de energía de aminoglucósidos, en células bacterianas, similar a lo que sucede para tetraciclina y cloranfenicol. Sin embargo, aún no se ha establecido el significado clínico de estas observaciones. Estos datos apoyan la necesidad de realizar investigaciones *in vivo* para validar la interacción observada *in vitro*, entre LZD y aminoglucósidos, sobre ciertas bacterias. Por otro lado, sería interesante aumentar el *n* muestral y evaluar dicha combinación con cepas aisladas de infecciones graves y que compartan perfiles de RA y características genéticas similares

Jacqueline *et al.*, (2003), estudiaron *in vitro*, la actividad de LZD solo y combinado con GEH, frente a *S. aureus* utilizando curvas de letalidad. Para tal fin, usaron 4 aislados de *S. aureus* resistentes a meticilina provenientes de hemocultivos. Con LZD y GEH, sobre dichas cepas, se observó actividad antagónica sobre el temprano efecto bactericida de GEH. Brauers *et al.*, (2007), estudiaron la actividad bactericida de daptomicina, VAN, TEC y LZD frente a un EFMVR y otro aislado sensible a VAN, entre otros microorganismos, utilizando suero humano. Con dicho experimento, LZD, a concentración 10,4 mg/L, mostró actividad bacteriostática.

En 1999, *Clinical Infectious Diseases* publica el primer caso de una paciente neutropénica (neutrófilos: < 100/µL) con bacteriemia persistente debido a EFMVR, quien responde con cura clínica y microbiológica a la terapia con LZD y GEH (Noskin *et al.*, 1999, Yim *et al.*, 2017). En relación al uso combinado de este ATM *in vivo*, Le *et al.*, (2010), documentaron el éxito del tratamiento de 3 pacientes que presentaron meningitis por EFMVR, utilizando daptomicina con LZD o GEH, basándose en parámetros farmacodinámicos obtenidos *in vitro*.

La CIM es un parámetro *in vitro* estático, obtenido de una concentración fija de ATM, que no permite ver el comportamiento de la dinámica de la acción microbicida de la droga a través del tiempo. La CIM tampoco proporciona información de la tasa de actividad bactericida y desde el punto de vista farmacodinámico no permite observar si dicha tasa se eleva, aumentando las concentraciones antimicrobianas. Bactericidia y sinergismo son parámetros farmacológicos y efectos deseables a lograr en la cura de muchas infecciones invasivas, sobre todo en pacientes inmunosuprimidos.

La experiencia obtenida del trabajo de esta tesis, demuestra que la correcta determinación de la actividad bactericida de un ATM se obtiene aplicando estudios de cinética de muerte, utilizando curvas de letalidad. La indicación clínica de esta prueba es el ensayo de sinergismo de ATM frente a una infección grave producida por una bacteria MDR, en donde no se vislumbran opciones terapéuticas seguras según las pruebas de sensibilidad habituales. A diferencia de otras metodologías, como el tablero de damas, las curvas de cinética de muerte, al medir la actividad microbicida, son más relevantes para situaciones clínicas en la cual se necesita una terapia bactericida combinada. Sin embargo, al ser algo engorrosas e insumir mucho tiempo, son poco accesibles al trabajo diario de un laboratorio de microbiología clínica, sobretudo en países en vías de desarrollo. Básicamente se utilizan con fines de investigación. Variables como medio de cultivo seleccionado, pH, inóculo (fase de crecimiento y tamaño), concentración de iones e incubación, se deben controlar muy bien para disminuir los sesgos en la metodología. En esta tesis, si bien las curvas de letalidad se realizaron sin agitación constante, a determinados tiempos, se realizó una agitación en cada tubo, con el fin de mejorar el contacto del ATM con la bacteria, homogeneizando la muestra. Quizás por este motivo, muchas veces se observó bactericidia utilizando como concentración del ATM, la misma CIM que presentó la bacteria. Recordemos que la CIM es un parámetro estático. Otro punto interesante pensado para los estudios de curvas de letalidad realizados en esta tesis, fue no elevar demasiado las concentraciones de los ATM, porque si bien podría haberse pensado subir CIM x 5 o CIM x 10 para lograr la tan esperada sinergia *in vitro*, no da luego el margen terapéutico para usar dichas drogas en ensayos *in vivo*.

La ventaja de estos modelos *in vitro* radica en que permiten la comparación directa de los efectos de diversas concentraciones de ATM y proporcionan una evaluación mucho más detallada que la CIM, ya que la farmacodinamia ofrece parámetros más fidedignos para predecir éxito o fracaso terapéutico. Adicionalmente, muestran la concentración antimicrobiana óptima que logra el mayor efecto microbicida a un tiempo determinado.

El inconveniente quizás más importante es que muchas veces no se observa correlación con resultados *in vivo*, debido a que las condiciones estáticas, dadas en un entorno *in vitro*, difícilmente reflejen una situación dinámica de lo que ocurre en un órgano diana, en condiciones *in vivo* (farmacocinética). Por este motivo, la actividad bactericida del suero es una metodología que brinda información muy valiosa, pero la misma no fue objetivo de esta tesis. Si bien todos los

datos obtenidos *in vitro*, con el desarrollo del objetivo específico N° 8, fueron relevantes, necesitarían a futuro corroborarse *in vivo*.

Administrar el ATM correcto, en cantidad adecuada, por período de tiempo adecuado, utilizando la mejor vía, con intervalo de dosis óptimo y con diagnóstico preciso de la bacteria, son las aristas por la cual se logrará el éxito la de terapia antimicrobiana. Los datos obtenidos en esta tesis, desarrollando curvas de letalidad, pueden ser el puntapié inicial para comenzar con estudios más profundos y validados *in vivo*, en especies MDR y EFMVR del género *Enterococcus* spp.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis permitieron arribar a las siguientes conclusiones:

- Se caracterizaron fenotípicamente y genotípicamente cepas de *E. faecalis* ($n=44$) y *E. faecium* ($n=19$) aisladas de líquidos obtenidos por punción, provenientes de infecciones invasivas humanas, de pacientes internados en el HMRS de Tandil, Buenos Aires. Esta identificación correspondió a aislados de 3 cohortes, 2010, 2013 y 2014. Se demostró que *E. faecalis* fue la especie más prevalente seguida de *E. faecium* productoras de infecciones invasivas en dicho nosocomio.
- Se observó que las cepas aisladas de *Enterococcus* spp. en el HMRS fueron más prevalentes en pacientes masculinos que habían recibido tratamiento antimicrobiano previo.
- Se observó una elevada disminución en el tiempo del diagnóstico bacteriológico utilizando la tecnología MALDI TOF-MS, detectando con precisión el aislado bacteriano en menos de una hora, post cultivo de 24 h. El médico, con una identificación temprana del microorganismo, podría optimizar una terapéutica empírica más acertada y dirigida, y quizás resolver el cuadro clínico infeccioso de manera rápida y eficaz en el paciente. La demora en el tratamiento ATM provoca aumento de la mortalidad en situaciones de urgencia como el shock séptico. Este retraso puede deberse al tiempo que muchas veces demandan los diagnósticos microbiológicos, que pueden atrasarse aún más dependiendo de la bacteria implicada, como así también de los mecanismos de resistencia que la bacteria pueda presentar, de quizás difícil detección ó desconocidos. Por este motivo, en esta tesis la aplicación del método MALDI TOF-MS permitió rápida confirmación de la especie de enterococos aislada y se observó concordancia con resultados obtenidos fenotípicamente únicamente con la especie *E. faecalis* no así con la especie *E. faecium*.
- Se detectó asociación estadísticamente significativa entre MDR y cepas de *E. faecium* aislada ($p=0,000$) y ambas variables presentaron un cierto grado de correlación, evidenciada por coeficiente de Spearman para un nivel de significancia de $p=0,000$.

- Se determinó por primera vez en nuestro país, la epidemiología molecular conjuntamente de *E. faecalis* y *E. faecium* provenientes de infecciones invasivas, independientemente de su sensibilidad a vancomicina, estudiando la relación clonal por electroforesis de campo pulsado. Diez clones fueron detectados en $n=19$ cepas *E. faecium* y $n=25$ tipos de clones para la muestra de $n=44$ *E. faecalis*. Se encontró una alta diversidad clonal entre *E. faecalis* y se identificaron algunos clones prevalentes asociados previamente con infecciones hospitalarias.
- El presente trabajo constituye el primer estudio de caracterización molecular y de variantes genéticas intraespecíficas, de especies de enterococos provenientes de líquidos obtenidos por punción por técnica genómica de Tipificación de Secuencias en Múltiples Loci en nuestro país.
- Este es el primer estudio que contribuye al conocimiento y establece la estructura genética poblacional de estos microorganismos productores de infecciones invasivas en el HMRS, de Argentina. Esto permitió realizar análisis comparativos epidemiológicos con cepas de las mismas especies, aisladas de un mismo reservorio a nivel regional y mundial.
- En esta tesis se detectó y reportó un nuevo ST para la especie *E. faecalis*, designado ST720, el cual no había sido decripto hasta la fecha a nivel mundial y según datos registrados en PubMLST solo ha sido detectado en Argentina. El mismo fue enviado para su publicación en la base de datos <https://pubmlst.org/>.
- MLST y PFGE permitieron detectar clones circulantes de ambas especies en el nosocomio municipal, pertenecientes a líneas genéticas epidémicas (los “complejos clonales intrahospitalarios de alto riesgo”), como el CC2, CC9 y CC16 para *E. faecalis* y CC17 y CC9 para *E. faecium*. Las líneas genéticas epidémicas tienen ventajas adaptativas sobre el resto de la población bacteriana intrahospitalaria. Las características de clones de enterococos que integran la estructura poblacional de una institución de salud, su circulación y su evolución genética, son particularidades que quedan evidenciadas por estudios moleculares. Si bien estos estudios demandan un equipamiento de costo elevado,

es importante la realización de los mismos para poder conocer la epidemiología molecular local o el *pool* genético que poseen las cepas de una institución determinada. Las técnicas moleculares nos brindan información valiosa para poder modificar conductas que hacen al manejo de una patología infecciosa (discriminar entre colonización e infección ó ajustar un tratamiento terapéutico empírico). El HMRS al ser un hospital público, que recibe pacientes derivados de otros centros, es susceptible a recibir cepas bacterianas MDR, PDR o XDR, con diversos pulsotipos, motivo por el cual la vigilancia epidemiológica, no solo para el género enterococos, sino también para otros, no debe dejar de practicarse y mejorarse.

- Las cepas *E. faecium* pertenecientes al CC17 presentaron RA a ATM β -lactámicos como AMP y aminoglucósidos utilizados para tratar infecciones graves por enterococos. El análisis por MLST y BAPS permitió reconocer también que, ciertos clones de EFMVR con MDR no se asociaron con el entorno hospitalario.
- Se detectó el perfil de RA en todas las cepas de manera cuali y cuantitativa. Dicho estudio mostró MDR solo en la especie *E. faecium*. La RA a quinolonas y aminoglucósidos fue la mas frecuente para *E. faecalis*. La RA a β -lactámicos y glucopéptidos lo fue para *E. faecium*. La RA de cada cepa de enterococo debe evaluarse en cada situación puntual en el contexto de la patología infecciosa de cada paciente debido a que varía intraespecie como interespecie. No solo con enterococos, sino también con otros géneros, generalizar frente a una misma situación no es posible. Cada institución de salud debe establecer cuáles son los tipos de riesgos que llevan a que un paciente debute con este tipo de infección, así como también, debe conocer que características microbiológicas tienen las cepas bacterianas que circulan por el hospital, sobre todo, enfocándose en los perfiles de RA más prevalentes así como en los mecanismos de resistencia emergentes. Esto permite tomar medidas y ajustar conductas de bioseguridad desde el servicio de control de infecciones para evitar su deseminación intrahospitalaria e interhospitalaria.
- Se detectó la presencia del clon EFC-2, ST9-CC9, BAPS 1, compuesto por 5 cepas *E. faecalis* productoras de β -lactamasa, de idéntico perfil de resistencia: GEH (resistencia de

alto nivel), PEN, AMP. Dicho clon, aislado en 2014, se encontró diseminado principalmente en el Servicio de cirugía. Esto constituye un hallazgo excepcional de relevancia clínica-epidemiológica y escasamente comunicado, en cepas de *E. faecalis* de Argentina (año 1989). La vigilancia de la resistencia es una herramienta útil para monitorear la emergencia o re-emergencia de mecanismos de RA y para dar alerta sobre medidas de control de infecciones, para evitar su diseminación. El hallazgo de este raro fenotipo, asociado a CC de alto riesgo, como CC2 y CC9 podría promover su diseminación en un futuro cercano. Lo relevante también es la identificación de un clon aparentemente exitoso de *E. faecalis* ST9-CC9 productor de β -lactamasa en este hospital, que podría estar circulando desde 1989. Por lo que se necesitan más estudios para confirmar que este es el mismo clon que ha estado circulando y evolucionando en el HMRS en todos estos años y conocer las razones del éxito del mismo.

- Se detectaron 4 cepas de *E. faecium* productoras de β -lactamasa, 2 de las cuales provenían también del Servicio de cirugía, que pertenecieron al mismo clon y ST (EFM-1, ST25), y se aislaron en el mismo año (2014), al igual que las cepas *E. faecalis*. Hasta la actualidad solo han sido descritas cepas *E. faecium* productoras de la enzima en EE. UU. e Italia, por lo que se necesitará confirmar este hallazgo por técnicas moleculares a futuro cercano.
- En el HMRS, el 26,3 % de las cepas *E. faecium* fueron VAN resistentes. Los genotipos *vanA* y *vanB* fueron detectados en 3 y en 2 oportunidades respectivamente. Estos son adquiridos, inducibles, transferibles y codificados por operones localizados en transposones, por lo que las medidas de aislamiento para el paciente portador y el refuerzo en el control de su diseminación, son objetivos urgentes y necesarios para evitar su propagación.
- Con este trabajo de tesis se reconoce que, la detección y el control epidemiológico de los enterococos MDR es necesario realizarlo tanto en reservorios humanos como no humanos, para evitar su diseminación e impacto en salud pública.
- La evaluación *in vitro* de las curvas de letalidad aplicadas a clones EFMVR y/o MDR demostró que:

-**LVX con IMP** a las concentraciones utilizadas, presentó un efecto sinérgico sobre EFMVR que poseían genotipo *vanB*. Además se detectó efecto bactericida sobre EFMVR resistentes a AMP, PEN y productores de β -lactamasas. El mayor efecto bactericida sobre algunas cepas fue con LVX 8 μ g/mL.

-**TGC con GEH** produjeron sinergia con algunas concentraciones ensayadas frente a los clones MDR y EFMVR C53-IR y C44-IRE2. Frente al clon C44-IRE2 se detectó sinergia bactericida con la concentración más alta utilizada (TGC 1 μ g/mL y GEH 64 μ g/mL). Con las cepas C48-IR y C47-IRE2, productoras de β -lactamasa y EFMVR se observó sinergia antimicrobiana, con las 3 concentraciones de las combinaciones diseñadas y a diferentes tiempos de incubación, respecto a TGC, comenzando la sinergia tempranamente a las 8 h post-incubación.

-**IMP con VAN** fue la dupla con menor efectividad frente a los aislados ensayados en esta tesis. IMP actuando en solitario a 64 μ g/mL produjo actividad bactericida a las 24 h, en solo 2 cepas, C30-IR y C48-IR. Sinergia solo fue observada con una cepa EFMVR.

-**LZD con GEH** produjo 80 % de bactericidia, siendo mejor su acción que la combinación TGC y GEH. Dicho efecto fue observado en algunas cepas a las escasas 4 h post-incubación. Esta dupla mostró sinergia incluso frente a C53-IR y C44-IRE2 cepas MDR y EFMVR. La sinergia fue en relación a LZD, no así en relación a GEH, ya que esta última actuando en solitario a 128 μ g/mL logró efecto bactericida en 4 cepas, excepto, en la cepa C53-IR que presentó alto nivel de resistencia a GEH. LZD no mostró actividad bactericida a través del tiempo en las 5 cepas ensayadas, el inóculo a las 24 h se elevó $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL en todos los EFMVR.

- Los datos obtenidos en esta tesis, desarrollando curvas de letalidad, pueden ser el puntapié inicial para comenzar con estudios más profundos y validados *in vivo*, en especies MDR y EFMVR del género *Enterococcus* spp.
- Este trabajo de tesis permite contribuir al conocimiento, plantear y pensar proyecciones para continuar avanzando fuertemente en la temática emergente de la resistencia antimicrobiana y su control en nuestro país, así como, re-pensar estrategias de vigilancia epidemiológica en el contexto de “Una Salud”.

“La versatilidad y la evolución genética hacia una mayor virulencia y los cambios del patrón de susceptibilidad antimicrobiana de enterococos, dependen de cada institución, por lo que esto promueve vigilancia epidemiológica continua, sobretudo en patologías infecciosas graves y también en otras. Adicionalmente, la falta de racionalización en el uso de ATM y el tratamiento empírico poco validado, pueden permitir la emergencia de linajes clonales de alto riesgo, lo que conlleva a elevar la morbimortalidad de nuestros pacientes y generar mayores gastos para un sistema de Salud Pública en nuestro país.

Este estudio aporta por primera vez conocimiento científico sobre la caracterización y la epidemiología molecular, así como la RA de las especies más prevalentes de enterococos productores de infecciones invasivas aisladas de líquidos de punción en un hospital de Buenos Aires, Argentina”.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

A

Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;37(2):127-37.

Abele-Horn M, Schupfner B, Emmerling P, Waldner H, Göring H. Persistent wound infection after herniotomy associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Infection*. 2000;28(1):53-4.

Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146(3713):837.

Agersø Y, Pedersen AG, Aarestrup FM. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) in enterococci from humans, pigs and poultry. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(5):832-9.

Agudelo Higueta NI and Huyck MM. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. En: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, *et al.*, editors. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.

Akpaka PE, Kissoon S, Jayaratne P, Wilson C, Golding GR, Nicholson AM. Genetic characteristics and molecular epidemiology of vancomycin-resistant Enterococci isolates from Caribbean countries. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185920.

Akpaka PE, Kissoon S, Wilson C, Jayaratne P, Smith A, Golding GR. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Bermuda. *PLoS One*. 2017;12(3):e0171317.

Ammerlaan HS, Troelstra A, Kruitwagen CL, Kluytmans JA, Bonten MJ. Quantifying changes in incidences of nosocomial bacteraemia caused by antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63: 1064-70.

Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, *et al.* *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol*. 2016;6:1534.

Antimicrobial resistance surveillance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>. Fecha de consulta: 29 de junio de 2016.

Antonello VS, Zenkner F, França J, Santos BR. *Enterococcus gallinarum* meningitis in an immunocompetent host: a case report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52(2):111-2.

Arciola CR, Campoccia D, Baldassarri L, Pirini V, Huebner J, Montanaro L. The role of *Enterococcus faecalis* in orthopaedic peri-implant infections demonstrated by automated ribotyping and cluster analysis. Biomaterials. 2007;28(27):3987-95.

Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. Clin Microbiol Infect. 2010;16(6):555-62.

Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. Nat Rev Microbiol 2012;10:266-78.

Aspiroz C, Díez-Manglano J, Villuendas MC, Toyas C. Small colony variants of *Enterococcus faecalis* isolated from a patient with native aortic endocarditis. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31(9):630-7.

Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana. 2006. Argentina. p. 1628.

B

Baddour LM, Wilson WR, Bayer AS, Fowler VG, Tleyjeh IM, *et al*. Infective Endocarditis in Adults: Diagnosis, Antimicrobial Therapy, and Management of Complications. A Scientific Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. Circulation. 2015;132(15):1435-86.

Baldini M, Selzer P. Patrones de resistencia a antibióticos de enterococos aislados de aguas estuarinas. Rev Argent Microbiol. 2008;40 (1):48-51.

Baldisserotto Comerlato C, Costa Carvalho de Resende M, Caierão J, Alves d'Azevedo P. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(5):590-5.

Ballard SA, Grabsch EA, Johnson PD, Grayson ML. Comparison of three PCR primer sets for identification of *vanB* gene carriage in feces and correlation with carriage of vancomycin-resistant enterococci: interference by *vanB*-containing anaerobic bacilli. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:77-81.

Bantar C, Alcazar G, Franco D, Vesco E, Salamone F, Izaguirre M, *et al*. Impact of antibiotic treatment on bacterial resistance rates from patients with hospital-acquired infection. J Chemother. 2007;19(6):673-6.

Baquero F, Coque TM, Canton R. Antibiotics, complexity, and evolution. ASM News. 2003;69:547-52.

Baquero F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. Nat Rev Microbiol. 2004;2(6):510-8.

Barisani JL, Benchetrit GA. Consenso de endocarditis infecciosa. Disponible en: <http://www.sadi.org.ar/recomendaciones-y-consensos/item/16-endocarditis-infecciosa>. Acceso: 23 de junio de 2017.

Beavis RC, Chait BT. Matrix-assisted laser desorption ionization massspectrometry of proteins. Methods in Enzymol. 1996;270:519-51.

Beltrán C. Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. Rev Chil Infect. 2004; 21 (Supl 1): S39-S44.

Berbari EF, Osmon DR, Duffy MCT, et al. Outcome of prosthetic joint infection in patients with rheumatoid arthritis: the impact of medical and surgical therapy in 200 episodes. Clin Infect Dis. 2006;42:216-23.

Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. Trends Microbiol. 1995;3:149-54.

Biondi E, Galas M, Tuduri E, Vázquez M, Corso A, ARG Red WHONET. Principales patógenos causantes de bacteriemia en Argentina y su resistencia a los antimicrobianos. Comunicación a VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas – SADEBAC. 27 al 29 junio de 2012. Buenos Aires, Argentina.

Bischoff M, Bauer J, Preikschat P, Schwaiger K, Mölle G, Hölzel C. First detection of the antiseptic resistance gene *qacA/B* in *Enterococcus faecalis*. Microb Drug Resist. 2012;18(1):7-12.

Blanco MA, Mónaco MB, Lopardo HA. Evaluación de un sistema automatizado para la identificación de especies de enterococos. Acta Bioquím Clín Latinoam. 2010;44 (2): 239-42.

Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?. Lancet Infect Dis. 2001;1(5):314-25.

Boyce JM, Opal SM, Potter-Bynoe G, LaForge RG, Zervos MJ, Furtado G, et al. Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistant enterococci. Antimicrob Agents Chemother. 1992;36(5):1032-9.

Brandt C, Rouse MS, Laue N, Stratton C, Wilson W, Steckelberg M. Effective Treatment of Multidrug-Resistant Enterococcal Experimental Endocarditis with Combinations of Cell Wall-Active Agents. J Infectious Diseases. 1996; 173:909-13.

Brasg I, Elligsen M, MacFadden D, Daneman N. Predictive utility of swab screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in selection of empiric antibiotics for *Enterococcus* sterile-site infections: a retrospective cohort study. CMAJ Open. 2017;5(3):E632-E637.

Brauers J, Kresken M, Menke A, Orland A, Weiher H, Morrissey I. Bactericidal activity of daptomycin, vancomycin, teicoplanin and linezolid against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* using human peak free serum drug concentrations. Int J Antimicrob Agents. 2007;29(3):322-5.

Britt NS, Potter EM. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. J Glob Antimicrob Resist. 2016;5:57-61.

Bretón JR, Peset V, Morcillo F, Cano J, Sarrión A, Pérez-Belles C, *et al.* Meningitis neonatal por *Enterococcus* spp.: presentación de cuatro casos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002;20(9):443-7.

Broder KW, Moise PA, Schultz RO, Forrest A, Schentag JJ. Clinical experience with linezolid in conjunction with wound coverage techniques for skin and soft-tissue infections and postoperative osteomyelitis. Ann Plast Surg. 2004;52(4):385-90.

Buelow E, Bello González TDJ, Fuentes S, de Steenhuijsen P, WAA, Lahti L, Bayjanov JR, *et al.* Comparative gut microbiota and resistome profiling of intensive care patients receiving selective digestive tract decontamination and healthy subjects. Microbiome. 2017;5(1):88.

Burnett RJ, Haverstock DC, Dellinger EP, Reinhart HH, Bohnen JM, Rotstein OD, *et al.* Definition of the role of enterococcus in intraabdominal infection: analysis of a prospective randomized trial. Surgery. 1995;118(4):716-21.

Burguer Moreira N, Nastro M, Vay C, Famiglietti Á, Rodríguez CH. *In vitro* activity of ampicillin-ceftioxaone against *Enterococcus faecalis* isolates recovered from invasive infections. Rev Argent Microbiol. 2016;48(1):57-61.

Buschelman BJ, Bale MJ, Jones RN. Species identification and determination of high-level aminoglycoside resistance among enterococci. Comparison study of sterile body fluid isolates, 1985-1991. Diagn Microbiol Infect Dis. 1993;16(2):119-22.

C

Camins BC, Farley MM, Jernigan JJ, Ray SM, Steinberg JP, Blumberg HM. A population-based investigation of invasive vancomycin-resistant *Enterococcus* infection in metropolitan Atlanta, Georgia, and predictors of mortality. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007;28(8):983-91.

Cantón R. Lectura interpretada del antibiograma: ¿ejercicio intelectual o necesidad clínica?. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002;20:176-85.

Cantón R, Ruiz-Garbajosa P. Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.) Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;31(8):543-51.

Cattoir V, Leclercq R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?. J Antimicrob Chemother. 2013;68:731-42.

Cardona AF, Wilson SE. Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of telavancin in their treatment. Clin Infect Dis. 2015;61 Suppl 2:S69-78.

Cardoso T, Ribeiro O, Aragão IC, Costa-Pereira A, Sarmento AE. Additional risk factors for infection by multidrug-resistant pathogens in healthcare-associated infection: a large cohort study. BMC Infect Dis. 2012; 12: 375.

Ceci M, Delpech G, Sparo M, Mezzina V, Sánchez Bruni S, Baldaccini B. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. J Infect Dev Ctries. 2015;9(11):1195-203.

Cercenado E. *Enterococcus*: phenotype and genotype resistance and epidemiology in Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29 Suppl 5:59-65.

Chao CT, Yang SY, Huang JW. Peritoneal dialysis peritonitis caused by *Enterococcus avium*. Perit Dial Int. 2013;33(3):335-6.

Chen C, Sun J, Guo Y, Lin D, Guo Q, Hu F, Zhu D, Xu X, Wang M. High Prevalence of vanM in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Shanghai, China. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(12):7795-8.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001; 65(2): 232-260.

Christie C, Hammond J, Reising S, Evans-Patterson J. Clinical and molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in a pediatric teaching hospital. Journal of Pediatrics. 1994;125(3):392-99.

Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. Clin Infect Dis. 2000;31:586-9.

Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, *et al*. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(11): 2474-2477.

Cisneros-Herrerosa JM, Cobo-Reinoso J, Pujol-Rojo M, Rodríguez-Baño J, Salavert-Lletíe M. Guía para el diagnóstico y tratamiento del paciente con bacteriemia. Guías de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25(2):111-30.

Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev. 2004;17(4): 840-62.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline, Vol.19 No. 18. Wayne, PA: CLSI, 1999. Disponible en: <http://demo.nextlab.ir/getattachment/096a51d4-1530-4f81-92c0-f5477c584b9b/CLSI-M26-A.aspx>

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Wayne, PA: CLSI, 2015, Document M100-S25.

Clissold SP, Todd PA, Campoli-Richards DM. Imipenem/cilastatin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. Drugs. 1987;33(3):183-241.

Coburn PS, Gilmore MS. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. Cell Microbiol. 2003;5(10):661-9.

Cocos Gram positivos: Parte II: Estreptococos, enterococos y bacterias “similares a *Streptococcus*”. Cap. 13. En: Koneman. Diagnostico Microbiológico: Texto y Atlas en color. 6^{ta} Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 2008. pp: 667-671.

Coll P, Coque TM, Dominguez MA, Vázquez J, Vila J. Cap. 18. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Emilia Cercenado y Rafael Cantón Eds. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España. 2005. pp: 1-68.

Conceição N, da Silva LE, Darini AL, Pitondo-Silva A, de Oliveira AG. Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: *pbp4* gene polymorphism and genetic diversity. Infect Genet Evol. 2014;28:289-95.

Conde-Estevez D, Sorli L, Morales-Molina JA, Knobel H, Terradas R, Mateu-de Antonio J, *et al.* Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(6):342-8.

Coombs GW, Daley DA, Thin Lee Y, Pang S, Pearson JC, Robinson JO, *et al.* Australian Group on Antimicrobial Resistance Australian Enterococcal Sepsis Outcome Programme annual report, 2014. Commun Dis Intell Q Rep. 2016;40(2):E236-43.

Coque TM, Willems RJ, Fortún J, Top J, Diz S, Loza E, *et al.* Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(7):2693-700.

Corso A, Faccone D, Galletti P, Togneri A, Lopardo H, Melano R, *et al.* First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. Int J Antimicrob Agents. 2005;25:51-6.

Corso AC, Gagetti PS, Rodríguez MM, Melano RG, Ceriana PG, Faccone DF, Galas MF; VRE Argentinean Collaborative Group. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. *Int J Infect Dis*. 2007;11(1):69-75.

Coudron PE, Markowitz SM, Wong ES. Isolation of a betalactamase-producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:1125-6.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):380-407.

D

Dadfarma N, Imani Fooladi AA, Oskoui M, Mahmoodzadeh Hosseini H. High level of gentamicin resistance (HLGR) among *Enterococcus strains* isolated from clinical specimens. *J Infect Public Health*. 2013;6(3):202-8.

Dahl A, Lauridsen TK, Arpi M, Sørensen LL, Østergaard C, Sogaard P, *et al*. Risk Factors of Endocarditis in Patients with *Enterococcus faecalis* Bacteremia: External Validation of the NOVA Score. *Clin Infect Dis*. 2016;63(6):771-5.

Dai D, Wang H, Xu X, Chen C, Song C, Jiang D, *et al*. The emergence of multi-resistant *Enterococcus faecalis* clonal complex, CC4, causing nosocomial infections. *J Med Microbiol*. 2018;67(8):1069-77.

Daniel W. Bioestadística. Base para el análisis de las Ciencias de la Salud. Noriega Editores. Mexico. 1993.

Dargere S, Vergnaud M, Verdon R, Saloux E, Le Page O, Leclercq R, *et al*. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2308-10.

de Been M, van Schaik W, Cheng L, Corander J, Willems RJ. Recent recombination events in the core genome are associated with adaptive evolution in *Enterococcus faecium*. *Genome Biol Evol*. 2013;5(8):1524-35.

De Belder D, Lucero C, Rapoport M, Rosato A, Faccone D, Petroni A, *et al*. Genetic Diversity of KPC-Producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, and *Citrobacter freundii* Isolates from Argentina. *Microb Drug Resist*. 2017 Dec 13.

De Benedictis TH, Gorecki GA. Enterococcal osteomyelitis in the diabetic patient. *J Am Podiatr Med Assoc*. 1986;76(1):38-42.

de Garnica ML, Valdezate S, Gonzalo C, Saez-Nieto JA. Presence of the *vanC1* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from ewe bulk tank milk. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 3):494-5.

de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(9):860-8.

del Campo R, Tenorio C, Rubio C, Castillo J, Torres C, Gómez-Lus R. Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant *Enterococcus* spp. in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;15(3):221-6.

Del Coco VF. (2012) Efecto de *Enterococcus faecalis* CECT7121 sobre la viabilidad e infectividad de *Cryptosporidium* spp. en modelo murino. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Delaunay E, Abat C, Rolain JM. *Enterococcus cecorum* human infection, France. *New Microbes New Infect.* 2015;7:50-1.

Delpech G, Pourcel G, Schell C, De Luca M, Basualdo J, Bernstein J, *et al.* Antimicrobial resistance profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from artisanal food of animal origin in Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(10):939-44.

Delpech G, Sparo M, Pourcel G, Schell C, De Luca M, Basualdo J. *Enterococcus* spp. aislados de queso de oveja: resistencia a los antimicrobianos de utilización clínica. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 2013;33(2):129-33.

Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5857-60.

Deplano A, Struelens M. Marqueurs épidémiologiques. En: Freney J, Renaud F, Bollet C, Leclercq R eds. *Actualités permanentes en Bactériologie Clinique.* ESKA, Paris. 2006.

Desai H, Wong R, Pasha AK. A Novel Way of Treating Multidrug-resistant Enterococci. *N Am J Med Sci.* 2016;8(5):229-31.

Devriese LA, Ceyssens K, Haesebrouck F. Characteristics of *Enterococcus cecorum* strains from the intestines of different animal species. *Lett Appl Microbiol.* 1991;12:137-9.

Devriese LA, Pot B, Collins MD. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol.* 1993;75(5):399-408.

Devriese L, Baele M, Butaye P. Chapter 1.2.5. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes.* 2006;4:163-174.

Devriese LA, Vancanneyt M, Descheemaeker P, Baele M, Van Landuyt HW, Gordts B, *et al.* Differentiation and identification of *Enterococcus durans*, *E. hirae* and *E. villorum*. *J Appl Microbiol.* 2002;92(5):821-7.

Dhawan B, Gadepalli R, Kapil A. *In vitro* activity of daptomycin against *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates associated with skin and soft tissue infections: first results from India. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;65(2):196-8.

Donabedian SM, Perri MB, Vager D, Hershberger E, Malani P, Simjee S, et al. Quinupristin-dalfopristin resistance in *Enterococcus faecium* isolates from humans, farm animals, and grocery store meat in the United States. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3361-5.

Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(2):219-26.

Donskey CJ, Hanrahan JA, Hutton RA, Rice LB. Effect of parenteral antibiotic administration on the establishment of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. *J Infect Dis*. 2000;181(5):1830-3.

Dormer AE. Chemotherapy of bacterial endocarditis. *Biochem Clin*. 1963;2:61-74.

Dreher HS Jr. Subacute bacterial endocarditis due to *Streptococcus fecalis*; failure of massive prolonged penicillin treatment; a case report with autopsy. *J Kans Med Soc*. 1950;51(3):119-28.

Dupont H, Friggeri A, Touzeau J, Airapetian N, Tinturier F, Lobjoie E, et al. Enterococci increase the morbidity and mortality associated with severe intra-abdominal infections in elderly patients hospitalized in the intensive care unit. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(10):2379-85.

Durlach R, McIlvenny G, Newcombe RG, Reid G, Doherty L, Freuler C, et al. Prevalence survey of healthcare-associated infections in Argentina; comparison with England, Wales, Northern Ireland and South Africa. *Journal of Hospital Infection*. 2012;XXX:1-7.

E

ECDC SURVEILLANCE REPORT: Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011-2012. European Centre for Disease Prevention and Control, 2013.

Egido SH, Siller Ruiz MS, Revuelta I, García García I, Muñoz Bellido JL. *Enterococcus faecium* small colony variant endocarditis in an immunocompetent patient *New Microbes New Infect*. 2016;9:47-9.

El Amin N, Lund B, Tjernlund A, Lundberg C, Jalakas K, Wretling B. Mechanisms of resistance to imipenem in imipenem-resistant, ampicillin-sensitive *Enterococcus faecium*. *APMIS*. 2001;109(11):791-6.

El Amin N, Wretling B, Wenger A, Brandt V, Bille J. Ampicillin-Sensitive, Imipenem-Resistant Strains of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(2):738.

Emaneni M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, *et al.* Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. J Prev Med Hyg. 2016;57(4):E197-E200.

Entenza JM, Moreillon P. Tigecycline in combination with other antimicrobials: a review of *in vitro*, animal and case report studies. Int J Antimicrob Agents. 2009;34(1):8.e1-9.

Erdem I, Cicek-Senturk G, Yucesoy-Dede B, Yuksel-Kocdogan F, Yuksel S, Karagul E. *In vitro* effect of levofloxacin and vancomycin combination against high level aminoglycoside-resistant enterococci. Int J Antimicrob Agents. 2004;23(1):92-4.

Euba G, Lora-Tamayo J, Murillo O, Pedrero S, Cabo J, Verdaguer R, Ariza J. Pilot study of ampicillin-ceftriaxone combination for treatment of orthopedic infections due to *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(10):4305-10.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org>.

Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. International Journal of Systematic Bacteriology. 1997;47,590-2; doi: 10.1099/00207713-47-2-590. Acceso: 5 de diciembre de 2017.

Evans TJ. Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic bacterial infection of the lung in cystic fibrosis. Future Microbiol. 2015;10(2):231-9.

Eymard D, Dascal A, Hiscott J, Gioseffini S, Stevenson J, Portnoy J, *et al.* Non-beta-lactamase-producing penicillin-resistant *Enterococcus faecium* in a clinical setting. Can J Infect Dis. 1990;1(3):73-6.

F

Fabretti F, Huebner J. Implant infections due to enterococci: role of capsular polysaccharides and biofilm. Int J Artif Organs. 2005;28(11):1079-90.

Facklam R, Collins M. Identification of *Enterococcus* Species Isolated from Human Infections by a Conventional Test Scheme. J. Clin. Microbiol. 1989;27:731-4.

Facone D, Abel S, Lopez Ruiti P, Galletti P, Corso A. Diseminación de *Enterococcus faecium* con Resistencia a Glicopeptidos del Complejo Clonal 17 en Argentina. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/Diseminacion-de-E.-faecium-CC17.-Abstract.pdf>. Acceso: 20 de octubre de 2017.

Falagas ME, Manta KG, Ntziora F, Vardakas KZ. Linezolid for the treatment of patients with endocarditis: a systematic review of the published evidence. J Antimicrob Chemother. 2006;58(2):273-80.

Fallavollita L, Di Gioacchino L, Balestrini F. Bioprosthetic Aortic Valve Endocarditis in Association with *Enterococcus durans*. Tex Heart Inst J. 2016;43(2):165-7.

Fallico L, Boldrin C, Grossato A, Franchin E, De Canale E, Tommasini T, *et al.* Molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates from an Italian hospital. Infection. 2011;39(2):127-33.

Famiglietti A, Quinteros M, Predari S, Corso A, Lopardo H, Casellas J, *et al.* Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en cocos gram-positivos. Rev Arg Microbiol. 2003;35:29-40.

Fang H, Ohlsson AK, Ullberg M, Ozenci V. Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(11):3073-7.

Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol. 2004;186(5):1518-30.

Feil EJ, Spratt BG. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol. 2001;55:561-90.

Fernández Jonusas S, Brener Dik P, Mariani G, Fustiñana C, Marcó del Pont J. Infecciones nosocomiales en una Unidad de Cuidados Neonatales: programa de vigilancia epidemiológica. Arch Argent Pediatr 2011;109(5):398-405.

Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology. 2009;155:1749-57.

Fowler VG, Scheld WM, Bayer AR. Sección G: Infecciones Cardiovasculares. Cap. 77 Endocarditis e Infecciones intravasculares. En: Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas. Mandell, Douglas, Bennett. 7^{ma} Edición. Ed. ELSEVIER. España. 2012. pp: 1069-1096.

Frakking FNJ, Bril WS, Sinnige JC, Klooster JEV, de Jong BAW, van Hannen EJ, *et al.* Recommendations for the successful control of a large outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a non-endemic hospital setting. J Hosp Infect. 2018 Feb 21. doi: 10.1016/j.jhin.2018.02.016. [En prensa]

Fraimow HS. Systemic Antimicrobial Therapy in Osteomyelitis. Semin Plast Surg. 2009; 23(2): 90-9.

Franco R, Ales J, Hage A, Gonzalez Martinez A, Ballesteros R. Treatment of subacute endocarditis caused by enterococcus. Rev Clin Esp. 1959;75:116-23.

Franke AE, Clewell DB. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (*Tn916*) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. J Bacteriol. 1981;145(1):494-502.

Freitas AR, Novais C, Read A, Alves V, Peixe L. Co-infection with three linezolid-resistant *Enterococcus faecium* ST117 strain variants: what are we missing in diagnosis?. Int J Antimicrob Agents. 2016;47(6):500-1.

Freitas AR, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Coque TM, Peixe L. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. J Antimicrob Chemother. 2009;63(6):1104-11.

Freitas AR, Sousa C, Novais C, Silva L, Ramos H, Coque TM, *et al.* Rapid detection of high-risk *Enterococcus faecium* clones by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;87(4):299-307.

Freitas AR, Novais C, Duarte B, Pereira AP, Coque TM, Peixe L. High rates of colonization by ampicillin-resistant enterococci in residents at long-term care facilities in Porto, Portugal. Int J Antimicrob Agents. 2018;51(3):503-7.

Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, Jensen LB, Novais C, Peixe L, *et al.* Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). J Antimicrob Chemother. 2016;71(12):3351-66.

Friden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM, William G, Faur Y, *et al.* Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. Lancet. 1993;342:76-9.

G

Gagetti P, Bonofiglio L, García Gabarrot G, Kaufman S, Mollerach M, Vigliarolo L, *et al.* Resistance to β -lactams in enterococci. Rev Argent Microbiol. 2018 Sep 19, doi: 10.1016/j.ram.2018.01.007. [En prensa].

Gaglio R, Couto N, Marques C, de Fatima Silva Lopes M, Moschetti G, Pomba C, *et al.* Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. Int J Food Microbiol. 2016;236:107-114.

Galloway-Peña J, Roh JH, Latorre M, Qin X, Murray BE. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. PLoS One. 2012;7(1):e30187.

Garnier F, Taourit S, Glaser P, Courvalin P, Galimand M. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. Microbiology. 2000;146 (Pt 6), 1481-9.

Garza Velasco R, Hernández Acosta K, Mejía Chávez AG. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. Lab Acta. 2002;14:11-20.

Gawryszewska I, Żabicka D, Bojarska K, Malinowska K, Hryniewicz W, Sadowy E. Invasive enterococcal infections in Poland: the current epidemiological situation. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016;35(5):847-56.

Gilmore M, Francois Lebreton F, van Schaik W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion Microbiology*. 2013;16:10-6.

Gomez, M. (2011). Optimización del uso de antimicrobianos: impacto en la evolución de la resistencia bacteriana y los costos hospitalarios. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Gozalan A, Coskun-Ari FF, Ozdem B, Unaldi O, Celikbilek N, Kirca F, *et al*. Molecular characterization of vancomycin-resistant *E. faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. *Journal Med Microbiol*. 2015;64,759-66.

Graham AC, Mercier RC, Acheson LE, Pai MP. Extended-interval aminoglycoside dosing for treatment of enterococcal and staphylococcal osteomyelitis. *Ann Pharmacother*. 2004;38:936-41.

Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, *et al*. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2918-31.

Gröbner S, Beck J, Schaller M, Autenrieth IB, Schulte B. Characterization of an *Enterococcus faecium* small-colony variant isolated from blood culture. *Int J Med Microbiol*. 2012;302:40-44.

Guardabassi L, Larsen J, Skov R, Schønheyder HC. Gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* sequence type 6 with reduced penicillin susceptibility: diagnostic and therapeutic implications. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3820-1.

Gulhan T, Boynukara B, Ciftci A, Sogut MU, Findik A. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. *Iran J Vet Res*. 2015;16(3):261-6.

Gulhan T, Aksakal A, Ekin I, Savasan S, Boynukara B. Virulence Factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Humans and Pets. *Turk J Vet Anim Sci*. 2006;(30):477-82.

Gutmann L, Al-Obeid S, Billot-Klein D, Guerrier M-L, Collatz E. Synergy and resistance to synergy between beta-lactam antibiotics and glycopeptides against glycopeptide-resistant strains of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:824-9.

Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, *et al*. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? *Front Microbiol*. 2016;7:788.

H

Hällgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein HJ, Hanberger H, Nilsson LE. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and *in vitro* adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol.* 2009;299(5):323-32.

Hayes JR, English LL, Carter PJ, Proescholdt T, Lee KY, Wagner DD, *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of enterococcus species isolated from retail meats. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(12):7153-60.

Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 11):1093-101.

Hashemian SMR, Farhadi T, Ganjparvar M. Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:1759-67.

Heikens E, van Schaik W, Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of a novel genomic island specific to hospital-acquired clonal complex 17 *Enterococcus faecium* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74: 7094-7.

Hendrickx A, van de Kamer D, Willems R. Primary murine mucosal response during cephalosporin-induced intestinal colonization by *Enterococcus faecium*. *Microbiologyopen.* 2018 Feb 27. doi: 10.1002/mbo3.602. [En prensa].

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock D, *et al.* NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:996-1011.

Hindler JA, Wong-Beringer A, Charlton CL, Miller SA, Kelesidis T, Carvalho M, *et al.* In vitro activity of daptomycin in combination with β -lactams, gentamicin, rifampin, and tigecycline against daptomycin-nonsusceptible enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):4279-88.

Holtom PD, Zamorano D, Patzakakis MJ. Osteomyelitis attributable to vancomycin-resistant enterococci. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(403):38-44.

Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* 2012;3(5): 421-569.

Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, *et al.* Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1963-71.

Huang YT, Liao CH, Teng LJ, Hsueh PR. Comparative bactericidal activities of daptomycin, glycopeptides, linezolid and tigecycline against blood isolates of Gram-positive bacteria in Taiwan. Clin Microbiol Infect. 2008;14(2):124-9.

Hussain K, Ullah S, Tahir H, Alkilani WZ, Naeem M, Vinod NR, *et al.* Daptomycin-Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Native Valve Endocarditis: Successfully Treated With Off-Label Quinupristin-Dalfopristin. J Investig Med High Impact Case Rep. 2016 15;4(3):2324709616665408.

Huycke M, Joyce W, Wack M. Augmented Production of Extracellular Superoxide by Blood Isolates of *Enterococcus faecalis*. J Infect Dis. 1996;173(3):743-5.

Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis. 1998;4(2):239-49.

Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:1626-34.

I

Iaria C, Stassi G, Costa G, Di Leo R, Toscano A, Casci A. Case report Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. Infectious Diseases. 2005; 5:1-3.

J

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J Clin Microbiol. 2004;42(8):3558-65.

Jacqueline C, Caillon J, Le Mabecque V, Miegerville AF, Donnio PY, Bugnon D, *et al.* *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. J Antimicrob Chemother. 2003;51(4):857-64.

Jean SS, Fang CT, Wang HK, Hsue PR, Chang SC, Luh KT. Invasive infections due to vancomycin-resistant enterococci in adult patients. J Microbiol Immunol Infect. 2001;34(4):281-6.

Jenkins I. Linezolid and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis: successful treatment with tigecycline and daptomycin. J Hosp Med. 2007;2:343-4.

Johansson D, Rasmussen M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. Microb Pathog. 2013;55:28-31.

Johnson JA, Feeney ER, Kubiak DW, Corey GR. Prolonged Use of Oritavancin for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Prosthetic Valve Endocarditis. Open Forum Infect Dis. 2015;2(4):ofv156.

Jonas BM, Murray BE, Weinstock GM. Characterization of *emeA*, a *norA* homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(12):3574-9.

Jung MK, Ahn SH, Lee WG, Lee EH. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci isolated from non-tertiary-care and tertiary-care hospitals in Korea. Epidemiol Infect. 2014;142(11):2372-7.

K

Kaffarnik MF, Urban M, Hopt UT, Utzolino S. Impact of enterococcus on immunocompetent and immunosuppressed patients with perforation of the small or large bowel. Technol Health Care. 2012;20(1):37-48.

Kalina AP. The taxonomy and nomenclature of enterococci. Int J Syst Bacteriol. 1970;20:185-9.

Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Marc Ouellette, *et al.* Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. J Clin Microbiol. 1999; 37(11):3497-503.

Kirschner C, Maquelin K, Pina P, Ngo Thi NA, Choo-Smith LP, Sockalingum GD, *et al.* Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. J Clin Microbiol. 2001;39(5):1763-70.

Knoll BM, Hellmann M, Kotton CN. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis in adults: case series and review of the literature. Scand J Infect Dis. 2013;45(2):131-9.

Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. Epidemiol Infect. 2001;126(2):197-204.

Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schrenckenberger P, Woods G. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6ta ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2008.

Kovensky J, Corso A, Bucca R, Galletti P, Grinberg N, Rial S. Caracterización epidemiológica y molecular de Enterococos resistentes a vancomicina en el Hospital de Quemados de Buenos Aires. IX Jornadas Argentinas de Microbiología, 28 al 30 de Noviembre. Cordoba, Argentina, 2002.

Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. En: Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, *et al.*, editors. 2014. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Kristich CJ, Little JL, Hall CL, Hoff JS. Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. MBio. 2011;2(6):e00199-11.

Krull M, Klare I, Ross B, Trenchel R, Beelen DW, Todt D, *et al.* Emergence of linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a department for hematologic stem cell transplantation. Antimicrob Resist Infect Control. 2016;5:31.

Kuch A, Willems R, Werner G, Coque T, Hammerum A, Sundsfjord A, *et al.* Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. J Antimicrob Chemother. 2012;67:551-8.

Kumar A, Roberts D, Wood K, Light B, Parrillo J, Sharma S, *et al.* Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical. Crit Care Med. 2006;34 (6):1589-96.

Kumar A1, Zarychanski R, Light B, Parrillo J, Maki D, Simon D, *et al.* Early combination antibiotic therapy yields improved survival compared with monotherapy in septic shock: a propensity-matched analysis. Crit Care Med. 2010;38(9):1773-85.

Kumar A, Kumar P, Basu S. *Enterococcus fecalis* Sepsis and Leukemoid Reaction: An Unusual Association at Birth. J Pediatr Hematol Oncol. 2015;37(7):e419-20.

Kurup A, Tee WS, Loo LH, Lin R. Infection of central nervous system by motile *Enterococcus*: first case report. J Clin Microbiol. 2001;39(2):820-2.

L

Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic Streptococci. J Exp Med. 1933;57(4):571-95.

Landman D, Mobarakai NK, Quale JM. Novel antibiotic regimens against *Enterococcus faecium* resistant to ampicillin, vancomycin, and gentamicin. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(9):1904-8.

Lanza VF, Tedim AP, Martínez JL, Baquero F, Coque TM. The Plasmidome of *Firmicutes*: Impact on the Emergence and the Spread of Resistance to Antimicrobials. Microbiol Spectr. 2015;3(2):PLAS-0039-2014.

Lagnf AM, Zasowski EJ, Claeys KC, Casapao AM, Rybak MJ. Comparison of clinical outcomes and risk factors in polymicrobial versus monomicrobial enterococcal bloodstream infections. Am J Infect Control. 2016;44(8):917-21.

Larsen J, Schønheyder HC, Singh KV, Lester CH, Olsen SS, Porsbo LJ, *et al.* Porcine and human community reservoirs of *Enterococcus faecalis*, Denmark. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2395-7.

Lazovski J, Corso A, Pasteran F, Monsalvo M, Frenkel J, Cornistein W, *et al.* Estrategia de control de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en Argentina. *Rev Panam Salud Pública.* 2017;41:1-7.

Le J, Bookstaver PB, Rudisill CN, Hashem MG, Iqbal R, James CL, *et al.* Treatment of meningitis caused by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: high-dose and combination daptomycin therapy. *Ann Pharmacother.* 2010;44(12):2001-6.

Lee JH, Cho HK, Kim KH, Kim CH, Kim DS, Kim KN, *et al.* Etiology of invasive bacterial infections in immunocompetent children in Korea (1996-2005): a retrospective multicenter study. *J Korean Med Sci.* 2011;26(2):174-83.

Leaman WG, Wikingsson MB, Webster MB, Shaw CC. Caronamide and penicillin in subacute bacterial endocarditis due to *Streptococcus faecalis*. *Ann Intern Med.* 1949;30(3):646-54.

Leavis HL, Willems RJ, Top J, Bonten MJ: High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2006;44(3):1059-64.

Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):454-60.

Lebreton F, Willems R, Gilmore MS. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. En: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, *et al.*, editors. 2014. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Lebreton F, van Schaik W, McGuire AM, Godfrey P, Griggs A, Mazumdar V, *et al.* Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *MBio.* 2013;4(4). pii: e00534-13.

Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus Faecium*. *N Engl J Med.* 1988;319:157-61.

Leclercq R, Bingen E, Su QH, Lambert-Zechovski N, Courvalin P, Duval J. Effects of combinations of beta-lactams, daptomycin, gentamicin, and glycopeptides against glycopeptide-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:92-8.

Lefort A, Lafaurie M, Massias L, Petegnief Y, Saleh-Mghir A, Muller-Serieys C, *et al.* Activity and diffusion of tigecycline (GAR-936) in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(1):216-22.

Legarraga P, Moraga M, Lam M, Geoffroy E, Zumarán C, García P. Impacto de la espectrometría de masas por MALDI-TOF MS en la identificación rápida de bacterias aeróbicas y anaeróbicas de importancia clínica. *Rev Chil Infectol.* 2013; 30(2):140-46.

Leich C, Boonlayangoor S. β -lactamases tests. En: Isenberg HD (ed). Clinical Microbiology Procedures Handbook. ASM, Washington. 1992. pp. 531-538.

Leone S, Noviello S, Esposito S. Combination antibiotic therapy for the treatment of infective endocarditis due to enterococci. *Infection*. 2016;44(3):273-81.

Liesman RM, Pritt BS, Maleszewski JJ, Patel R. Laboratory Diagnosis of Infective Endocarditis. *J Clin Microbiol*. 2017 Sep;55(9):2599-608.

Lindenstrau AG, Pavlovic M, Bringmann A, Behr J, Ehrmann MA, Vogel RF. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Syst Appl Microbiol*. 2011;34:553-60.

Lopardo H, Blanco A, Carbonaro M, Ruvinsky S, Andión E, Venuta ME, *et al*. Impacto de 10 años de vigilancia de colonización con enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en un hospital pediátrico de alta complejidad. *Medicina Infantil*. 2008; XV(2):114-20.

Lopardo H, Casimir L, Hernández C, Rubeglio EA. Isolation of three strains of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990; 9(6):402-5.

Lopardo H, Blanco A. Métodos para detectar enterococos productores de β -lactamasa. *Rev Arg Microbiol*. 2007;39:105.

Lopardo H, Bantar C, Venuta ME, *et al*. Detection of high and moderately high level resistance to gentamicin and streptomycin in *Enterococcus faecium* by a disk diffusion method. *J Antimicrob Chemother*. 1995;36:237-40.

Lopez N, Kobayashi L, Coimbra R. A Comprehensive review of abdominal infections. *World Journal Emergency Surgery*. 2011;6(7):1-10.

Lopez Moral L, Corso A, Gomez A, Galletti P, Rodriguez M, Cassini E, *et al*. Brote de *Enterococo faecium* vancomicina resistente (VREfm) en un hospital de la ciudad de Buenos Aires. Comunicación a IX Congreso Argentino de Microbiología. 27 al 29 junio de 2012. Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/BROTE-DE-ENTEROCOCO-FAECIUM-VANCOMICINA-RESISTENTE-VREfm-EN-UN-HOSPITAL-DE-LA-CIUDAD-DE-BUENOS-AIRES.pdf>. Buenos Aires, 2012/.

Lossa GR, Giordano Lerena R, Fernández LE, Vairetti J, Díaz C, Arcidiácono D, *et al*. Prevalencia de infecciones hospitalarias en unidades de cuidados intensivos para adultos en Argentina. *Rev Panam Salud Pública*. 2008;24(5):324-30.

M

MacCallum WG, Hastings TW. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (Nov. Spec.), with a description of the microorganism. *J Exp Med.* 1899; 4(5-6):521-34.

MacGowan AP, Wootton M, Hedges AJ, Bowker KE, Holt HA, Reeves DS. A new time-kill method of assessing the relative efficacy of antimicrobial agents alone and in combination developed using a representative β -lactam, aminoglycoside and fluoroquinolone. *Journal Antimicrobial Chemotherapy.* 1996;38:193-203.

MacIntyre CR, Empson M, Boardman C, Sindhusake D, Lokan J, Brown GV. Risk factors for colonization with vancomycin-resistant enterococci in a Melbourne hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001;22(10):624-9.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.

Manassero NC, Navarro M, Rocchi M, di Bella H, Gasparotto AM, Ocaña V, *et al.* Análisis de 117 episodios de bacteriemia por enterococo: estudio de la epidemiología, microbiología y sensibilidad a los antimicrobianos. *Rev Argent Microbiol.* 2016;48(4):298-302.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):3140-5.

Maiden MC. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. *Annual Review of Microbiology.* 2006; 60:561-88.

Marco F, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among important pathogens collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) in Spain, 2004-2014. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016;6:50-6.

Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, *et al.* Outcome of prosthetic joint infections treated with debridement and retention of components. *Clin Infect Dis.* 2006;(42):471-8.

Marguet ER, Vallejo M, Olivera NL. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2008; 42 (4): 543-8.

Marín ME, Mera JR, Arduino RC, Correa AP, Coque TM, Stambouliau D, *et al.* First report of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clin Infect Dis.* 1998; 26:235-6.

Massa R, Bantar C, Mollerach M, Nicola F, Murray BE, Smayevsky J, *et al.* Emergence in vivo of resistance to ampicillin in a clinical isolate of *Enterococcus hirae*. J Antimicrob Chemother. 1998;42(4):559-61.

McBride SJ, Upton A, Roberts SA. Clinical characteristics and outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* bacteraemia--a five-year retrospective review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29(1):107-14.

Mc Guire JM. Ilotycin. A new antibiotic. Antibiotics & Chemotherapy 1952; 2:281.

Melzer M, Goldsmith D, Gransden W. Successful treatment of vertebral osteomyelitis with linezolid in a patient receiving hemodialysis and with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus* bacteremias. Clin Infect Dis. 2000;31(1):208-9.

Mendes RE, Farrell DJ, Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Activity of oritavancin against Gram-positive clinical isolates responsible for documented skin and soft-tissue infections in European and US hospitals (2010-13). J Antimicrob Chemother. 2015;70(2):498-504.

Mendes RE, Castanheira M, Farrell DJ, Flamm RK, Sader HS, Jones RN. Longitudinal (2001-14) analysis of enterococci and VRE causing invasive infections in European and US hospitals, including a contemporary (2010-13) analysis of oritavancin *in vitro* potency. J Antimicrob Chemother. 2016;71(12):3453-8.

Mercier RC, Kennedy C, Meadows C. Antimicrobial activity of tigecycline (GAR-936) against *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* used alone and in combination. Pharmacotherapy. 2002;22(12):1517-23.

Mercuro NJ, Davis SL, Zervos MJ, Herc ES. Combatting resistant enterococcal infections: a pharmacotherapy review. Expert Opin Pharmacother. 2018:1-14.

Metzidie E, Manolis EN, Pournaras S, Sofianou D, Tsakris A. Spread of an unusual penicillin- and imipenem-resistant but ampicillin-susceptible phenotype among *Enterococcus faecalis* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2006;57(1):158-60.

Mikalsen T, Pedersen T, Willems R, Coque T, Werner G, Sadowy E, *et al.* Investigating the mobilome in clinically important lineages of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. BMC Genomics. 2015; 16(1): 689.

Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(2):415-39.

Miranda G, Corso A, Melano R, Arismendi P, Rodríguez M, Garbervetsky L. First isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with the *vanB* genotype in Argentina: presentation of 2 cases. Rev Argent Microbiol. 2003;35(1):41-4.

Moran E, Masters S, Berendt AR, et al. Guiding empirical antibiotic therapy in orthopaedics: the microbiology of prosthetic joint infection managed by debridement, irrigation and prosthesis retention. *J Infect.* 2007;(55):1-7.

Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(6):325-32.

Moura TM, Cassenego AP, Campos FS, Ribeiro AM, Franco AC, d'Azevedo PA, et al. Detection of *vanC1* gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(4):453-6.

Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews Immunology.* 2014;14, 667-85.

Mücke MM, Kessel J, Mücke VT, Schwarzkopf K, Hogardt M, Stephan C, et al. The role of *Enterococcus* spp. and multidrug-resistant bacteria causing pyogenic liver abscesses. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):450.

Mundy M, Sahm D, Gilmore M. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiol Rev.* 2000;13(4):513-22.

Muñoz P, Rodríguez-Creixéms M, Moreno M, Marín M, Ramallo V, Bouza E, et al. Linezolid therapy for infective endocarditis. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(2):211-5.

Mulleman D, Philippe P, Senneville E, Costes C, Fages L, Deprez X, et al. Streptococcal and enterococcal spondylodiscitis (vertebral osteomyelitis). High incidence of infective endocarditis in 50 cases. *J Rheumatol.* 2006;33:91-7.

Murray BE, Lopardo HA, Rubeglio EA, Frosolono M, Singh KV. Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant, beta-lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(1):230-2.

Murray BE, Mederski-Samaroj B. Transferable beta-lactamase. A new mechanism for *in vitro* penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. *J Clin Invest.* 1983;72(3):1168-71.

Murray BE, Singh KV, Markowitz SM, Lopardo HA, Patterson JE, Zervos MJ, et al. Evidence for clonal spread of a single strain of beta-lactamase-producing *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* to six hospitals in five states. *J Infect Dis.* 1991;163(4):780-5.

Murray BE. Beta-lactamase-producing enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:2355-9.

Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med.* 2000;342(10):710-21.

Murray BE, Mederski-Samoraj B, Foster SK, Brunton JL, Harford P. *In vitro* studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggest a staphylococcal origin. Journal Clinical Investigation. 1986;77(1):289-93.

Murillo O, Grau I, Lora-Tamayo J, Gomez-Junyent J, Ribera A, Tubau F, *et al.* The changing epidemiology of bacteraemic osteoarticular infections in the early 21st century. Clin Microbiol Infect. 2015;21(3):254.e1-8.

Mutschler M, Trojan S, Defosse JM, Helmers A, Probst C, Bouillon B, *et al.* Severe sepsis caused by a linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a 10-year-old girl after multiple trauma. Int J Infect Dis. 2013;17(6):e466-7.

N

Nannini EC, Pai SR, Singh KV, Murray BE. Activity of tigecycline (GAR-936), a novel glycylcycline, against Enterococci in the mouse peritonitis model. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(2):529-32.

Narciso-Schiavon JL, Borgonovo A, Marques PC, Tonon D, Bansho ET, Maggi D, *et al.* *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* as causative agents of spontaneous bacterial peritonitis. Ann Hepatol. 2015;14(2):270-72.

Nazar JR, Lavados A, Daher O, Bischoff MC. Análisis microbiológico, epidemiológico y evolución clínica de los pacientes con bacteriemia en el Hospital Zonal de Esquel en el período 2007-2009. Revista Arg Microbiol. 2010; 42: 151-64.

Noskin GA, Siddiqui F, Stosor V, Kruzynski J, Peterson LR. Successful treatment of persistent vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia with linezolid and gentamicin. Clin Infect Dis. 1999;28(3):689-90.

Novais C, Tedim AP, Lanza VF, Freitas AR, Silveira E, Escada R, *et al.* Co-diversification of *Enterococcus faecium* Core Genomes and PBP5: Evidences of *pbp5* Horizontal Transfer. Front Microbiol. 2016;7:1581. eCollection 2016.

O

Ocvirk S, Sava I, Lengfelder I, Lagkouvardos I, Steck N, Roh J, *et al.* Surface-Associated Lipoproteins Link *Enterococcus faecalis* Virulence to Colitogenic Activity in IL-10-Deficient Mice Independent of Their Expression Levels. PLOS Pathogens. 2015; 11(6):e1004911.

Ochoa SA, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila LB, Saldaña Z, Cázares-Domínguez V, *et al.* Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. BMC Microbiol. 2013;13:291.

Ogihara S, Saito R, Sawabe E, Hagihara M, Tohda S. First Japanese case of infectious endocarditis due to *Enterococcus faecalis* small-colony variants. J Infect Chemother. 2016;22(10):716-9.

Osuka H, Nakajima J, Oishi T, Funayama Y, Ebihara T, Ishikawa H, *et al.* High-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* causing invasive infection: Twelve-year surveillance in the Minami Ibaraki Area. J Infect Chemother. 2016;22 61-3.

Ostrowsky BE, Trick WE, Sohn AH, Quirk SB, Holt S, Carson LA, *et al.* Control of vancomycin-resistant enterococcus in health care facilities in a region. N Engl J Med. 2001;344(19):1427-33.

Oyamada Y, Ito H, Fujimoto K, Asada R, Niga T, Okamoto R, *et al.* Combination of known and unknown mechanisms confers high-level resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecium*. J Med Microbiol. 2006;55(Pt 6):729-36.

Oyamada Y, Ito H, Inoue M, Yamagishi J. Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. J Med Microbiol. 2006;55(Pt 10):1395-401.

P

Palmer KL, Godfrey P, Griggs A, Kos VN, Zucker J, Desjardins C, *et al.* Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. MBio. 2012;3(1):e00318-11.

Panesso D, Reyes J, Rincón S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, *et al.* Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. J Clin Microbiol. 2010;48(5):1562-9.

Pang KW, Coorevits L, Van Acker J, Pauwels W. *Enterococcus cecorum* sepsis in a patient with liver cirrhosis, successfully treated with ceftriaxone. Acta Clin Belg. 2016:1-2.

Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clin Infect Dis. 2004;38(6):864-70.

Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. J Antimicrob Chemother. 2003;51 Suppl 3:iii13-21.

Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, *et al.* Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Science. 2003;299(5615):2071-4.

Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PF. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective?. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(5):2386-91.

Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2013;16:38-53.

Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new?. *Curr Opin Microbiol.* 2014;21:45-50.

Pigrau C, Almirante B. Oxazolidinonas, glucopéptidos y lipopéptidos cíclicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(4):236-46.

Pintado V, Cabellos C, Moreno S, Meseguer MA, Ayats J, Viladrich PF. Enterococcal meningitis: a clinical study of 39 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2003;82(5):346-64.

Pinholt M, Larner-Svensson H, Littauer P, Moser CE, Pedersen M, Lemming LE, *et al.* Multiple hospital outbreaks of *vanA Enterococcus faecium* in Denmark, 2012-13, investigated by WGS, MLST and PFGE. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(9):2474-82.

Polidori M, Nuccorini A, Tascini C, Gemigani G, Iapoce R, Leonildi A, *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) bacteremia in infective endocarditis successfully treated with combination daptomycin and tigecycline. *J of Chemotherapy.* 2011;23(4):240-1.

Ponessa A, Gambandé T, All L, Fernandez de Arroyabe G, Ferrari M, Dlugovitzky D, *et al.* Enterococos vancomicina resistentes: colonización en pacientes hospitalizados, en Rosario, Argentina. *Acta Bioq Clin Lat.* 2006; 40: 499-502.

Pontikis K, Pefanis A, Tsaganos T, Tzepi IM, Carrer DP, Giamarellou H. Efficacy of tigecycline alone and in combination with gentamicin in the treatment of experimental endocarditis due to linezolid-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3392-4.

Popiel KY, Miller MA. Evaluation of vancomycin-resistant enterococci (VRE)-associated morbidity following relaxation of VRE screening and isolation precautions in a tertiary care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35(7):818-25.

Pourcel G, Sparo M, Corso A, Delpech G, Galletti P, De Luca MM, *et al.* Molecular Genetic Profiling of Clinical and Foodborne Strains of Enterococci with High Level Resistance to Gentamicin and Vancomycin. *Clinical Microbiology: Open Accessl.* 2017;6 (1):1-8.

Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):415-8.

Prakash VP, Rao SR, Parija SC. Emergence of unusual species of enterococci causing infections, South India. *BMC Infect Dis.* 2005;5,14.

Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, *et al.* Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol. 2006;4(4):295-305.

Q

Quinteros M, Radice M, Giovannatkis M, Famiglietti A, Nicola F, Kovensky J, *et al.* Sistema Informático de Resistencia (SIR). Análisis de los datos de pacientes internados. Años 2006-2007. Asociación Argentina de Microbiología. Disponible en: <http://www.aam.org.ar>. Acceso: 17 de marzo de 2017.

Quinteros M, Di Conza J, Pino M, Buscemi M, Costa N, Deodato B, *et al.* Enterococcus faecalis beta-lactamasa positivo aislado de urocultivo. Vigilancia de la resistencia a distintos antimicrobianos. Comunicación a XII Congreso Argentino de Microbiología. 17 al 20 de Octubre 2010. Buenos Aires, Argentina.

Quiñonez Perez D. (2010). *Enterococcus* aislados en Cuba: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética. Tesis doctoral. Instituto Medicina Tropical “Pedro Kourí. La Habana, Cuba.

Quiñones D, Kobayashi N, Nagashima S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. Microb Drug Resist. 2009;15(4):287-93.

R

Rajkumari N, Mathur P, Misra MC. Soft Tissue and Wound Infections Due to *Enterococcus* spp. Among Hospitalized Trauma Patients in a Developing Country. J Glob Infect Dis. 2014;6(4):189-93.

Raven KE, Reuter S, Gouliouris T, Reynolds R, Russell JE, Brown NM, *et al.* Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. Nat Microbiol. 2016;1(3).

Reale AL, Depetri ML, Culasso C, Paviolo M, Cheguirían ML, Enrico MC, *et al.* Enterococos resistentes a vancomicina: prevalencia y factores asociados a la colonización intestinal en pacientes oncológicos del Hospital de Niños de Córdoba. Rev Argent Microbiol. 2009; 41: 92-6.

Reuke PA, Pletz MW, Baier M, Pfister W, Stallmach A, Bruns T. Emergence of spontaneous bacterial peritonitis due to enterococci—risk factors and outcome in a 12-year retrospective study. Aliment Pharmacol Ther. 2012; 35: 1199-208.

Rizzotti L, Rossi F, Torriani S. Biocide and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the swine meat chain. Food Microbiol. 2016;60:160-4.

Rodríguez CH, García S, Barberis C, Saposnik E, Weyland B, Nastro M, *et al.* *Enterococcus* spp.: Resistencia antimicrobiana en infecciones intrahospitalarias. Acta Bioq Clín Latinoam. 2013; 47(1): 155-60.

Rosenthal VD, Guzman S, Orellano PW. Nosocomial infections in medical-surgical intensive care units in Argentina: attributable mortality and length of stay. Am J Infect Control. 2003;31(5):291-5.

Rosenthal VD, Guzmán S, Crnich C. Device-associated nosocomial infection rates in intensive care units of Argentina. Infect Control Hosp Epidemiol. 2004;25(3):251-5.

Ruiz-Garbajosa P, de Regt M, Bonten M, Baquero F, Coque TM, Cantón R, *et al.* High-density fecal *Enterococcus faecium* colonization in hospitalized patients is associated with the presence of the polyclonal subcluster CC17. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(4):519-22.

Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, *et al.* Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. J Clin Microbiol. 2006;44(6):2220-8.

Ruiz-Garbajosa P, Cantón R, Pintado V, Coque TM, Willems R, Baquero F, *et al.* Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonisation and invasive disease. Clinical Microbiology Infection. 2006;12 (12):1193-98.

Ruiz-Garbajosa P, Coque TM, Cantón R, Willems RJ, Baquero F, del Campo R. Los complejos clonales de alto riesgo CC2 y CC9 están ampliamente representados en cepas hospitalarias de *Enterococcus faecalis* aisladas en España. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007;25(8):513-8.

Ruoff KL, de la Maza L, Murtagh MJ, Spargo JD, Ferraro MJ. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1990;28(3):435-7.

Ryan L, O'Mahony E, Wrenn C, FitzGerald S, Fox U, Boyle B, *et al.* Epidemiology and molecular typing of VRE bloodstream isolates in an Irish tertiary care hospital. J Antimicrob Chemother. 2015;70(10):2718-24.

S

Sader HS, Biedenbach D, Jones RN. Evaluation of Vitek and API 20S for species identification of enterococci. Diagn Microbiol Infect Dis. 1995;22(4):315-9.

Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Daptomycin Bactericidal Activity and Correlation between Disk and Broth Microdilution Method Results in Testing of *Staphylococcus aureus* Strains with Decreased Susceptibility to Vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(7):2330-6.

Saeidi S, Mirnejad R, Masoumi Zavaryani S, Rostamzadeh S. Molecular epidemiology and antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* isolates from hospitals in Tehran. Infez Med. 2017;25(2):116-122.

Sahm DF, Torres C. High-content aminoglycoside disks for determining aminoglycoside-penicillin synergy against *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol. 1988; 26(2): 257-60.

Sandoe JA, Witherden IR, Settle C. Vertebral Osteomyelitis Caused by *Enterococcus raffinosus*. J Clin Microbiol. 2001;1678-9.

Sanlibaba P, Tezel BU, Senturk E. Antimicrobial Resistance of Enterococcus Species Isolated from Chicken in Turkey. Korean J Food Sci Anim Resour. 2018;38(2):391-402.

Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int. 2016;2016:2475067.

Santos BA, Oliveira JS, Cardoso NT, Barbosa AV, Superti SV, Teixeira LM, *et al.* Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resistant enterococci associated with infections in cancer patients in Brazil. Infect Genet Evol. 2017;55:56-62.

Sartelli M, Catena F, di Saverio S, Ansaloni L, Coccolini F, Tranà C, *et al.* The Challenge of Antimicrobial Resistance in Managing Intra-Abdominal Infections. Surg Infect (Larchmt). 2015;16(3):213-20.

Sarti M, Campanile F, Sabia C, Santagati M, Gargiulo R, Stefani S. Polyclonal Diffusion of Beta-Lactamase-Producing *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2012;50(1):169-72.

Scapellato PG, Pessacq P, Corso A, Pasteran F, Rapoport M, Vasen W, *et al.* Aerobic etiology of acute appendicitis in adults. Multicenter study of abdominal sepsis in Argentina. Medicina (B Aires). 2017;77(2):121-4.

Schell C, Sparo M, Bernstein J, Grenóvero S, Delpech G, Pourcel G, *et al.* Factores de virulencia y multirresistencia en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas de infecciones invasivas humanas. Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes. 2014(9);39-40.

Schlapbach LJ, Straney L, Alexander J, MacLaren G, Festa M, Schibler A, *et al.* Mortality related to invasive infections, sepsis, and septic shock in critically ill children in Australia and New Zealand, 2002-13: a multicentre retrospective cohort study. Lancet Infect Dis. 2015;15(1):46-54.

Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int J Sys Bacteriol. 1984;34:31-4.

Schwaiger K, Bauer J, Hörmansdorfer S, Mölle G, Preikschat P, Kämpf P, *et al.* Presence of the resistance genes *vanC1* and *pbp5* in phenotypically vancomycin and ampicillin susceptible *Enterococcus faecalis*. Microb Drug Resist. 2012;18:434-9.

Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984;37(1):67-75.

Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. Microbes and Infection. 2002;4(2):215-24.

Siami G, Christou N, Eiseman I, Tack KJ; Severe Skin and Soft Tissue Infections Study Group. Clinafloxacin versus piperacillin-tazobactam in treatment of patients with severe skin and soft tissue infections. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(2):525-31.

Sieńko A, Wieczorek P, Majewski P, Sacha P, Wieczorek A, Kaczyńska K, *et al.* Virulence factors and antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from patients hospitalized in the University Hospitals in Białystok, Poland. Conference a ECCMID - 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 25 al 28 abril de 2015. Copenhagen, Dinamarca. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/275801560_Virulence_factors_and_antibiotic_resistance_in_Enterococcus_faecalis_and_Enterococcus_faecium_strains_isolated_from_patients_hospitalized_in_the_University_Hospitals_in_Bialystok_Poland.

Singh-naz N, Sleemi A, Pikis A, Patel K, Capos J. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization in children. J Clin Microbiol. 1999; 2: 413-6.

Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front Microbiol. 2015;6:791.

Sirota JH, Gerber IE, Baehr G. Chemotherapy of subacute enterococcus endocarditis. J Mt Sinai Hosp N Y. 1947;14(3):604-17.

Smith CE, Foleno BE, Barrett JF, Frosco MB. Assessment of the synergistic interactions of levofloxacin and ampicillin against *Enterococcus faecium* by the checkerboard agar dilution and time-kill methods. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997;27(3):85-92.

Solheim M, Brekke MC, Snipen LG, Willems RJ, Nes IF, Brede DA. Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface structure-proteins in hospital-associated clonal complex 2 *Enterococcus faecalis*. BMC Microbiol. 2011;11:3.

Sørensen TL, Blom M, Monnet DL, Frimodt-Møller N, Poulsen RL, Espersen F. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic-resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. N Engl J Med. 2001;345(16):1161-6.

Sparo M, Urbizu L, Solana MV, Pourcel G, Delpech G, Confalonieri A, *et al.* High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. *Lett Appl Microbiol.* 2012;54(2):119-25.

Sparo MD, Castro MS, Andino PJ, Lavigne MV, Ceriani C, Gutiérrez GL, *et al.* Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol.* 2006;100(1):123-34.

Sparo M, Nuñez GG, Castro M, Calcagno ML, García Allende MA, Ceci M, *et al.* Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* 2008;25(4):607-15.

Sparo M, Delpech G, Pourcel G, Schell C, De Luca MM, Bernstein J, *et al.* Citolisina y alto nivel de resistencia a gentamicina en *Enterococcus faecalis* de distinto origen. *RAZ y EIE* 2013; 8(2): 5-10.

Spratt BG. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:312-6.

Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G4, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(2):127-33.

Suarez ME. Infecciones Intraabdominales: Peritonitis y Abscesos. *MEDICRIT.* 2004;1(4):146-80.

Summers M, Misenhimer GR, Antony SJ. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* osteomyelitis: successful treatment with quinupristin-dalfopristin. *South Med J.* 2001;94(3):353-5.

Sun H, Wang H, Xu Y, Jones RN, Costello AJ, Liu Y, *et al.* Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates recovered from hospitalized patients among several medical institutions in China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(4):399-403.

Sun M, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Tian L, Sun Z. The first report of the *vanC₁* gene in *Enterococcus faecium* isolated from a human clinical specimen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(6):712-5.

Stinear TP, Olden DC, Johnson PD, Davies JK, Grayson ML. Enterococcal *vanB* resistance locus in anaerobic bacteria in human faeces. *Lancet.* 2001;357(9259):855-6.

T

Tambyah PA, Marx JA, Maki DG. Nosocomial Infection with Vancomycin-dependent Enterococci. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(7): 1277-81.

Tan Q, Xu H, Xu F, Aguilar ZP, Yang Y, Dong S, *et al.* Survival, distribution, and translocation of *Enterococcus faecalis* and implications for pregnant mice. FEMS Microbiol Lett. 2013;349(1):32-9.

Thadepalli H, Lou MA, Bach VT, Matsui TK, Ashis K, Mandal AK. Microflora of the human small intestine. American Journal of Surgery. 1979;138 (6): 845-50.

Thakuria B, Lahon K. The Beta Lactam Antibiotics as an Empirical Therapy in a Developing Country: An Update on Their Current Status and Recommendations to Counter the Resistance against Them. J Clin Diagn Res. 2013;7(6):1207-14.

Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Corander J, Rodríguez CM, Cantón R, Willems RJ, *et al.* Population biology of intestinal enterococcus isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. Appl Environ Microbiol. 2015;81(5):1820-31.

Tedim AP, Ruiz-Garbajosa P, Rodríguez MC, Rodríguez-Baños M, Lanza VF, Derdoy L, *et al.* Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995-2015) in Spain. J Antimicrob Chemother. 2017;72(1):48-55.

Tedim AP, Lanza VF, Manrique M, Pareja E, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R, *et al.* Complete Genome Sequences of Isolates of *Enterococcus faecium* Sequence Type 117, a Globally Disseminated Multidrug-Resistant Clone. Genome Announc. 2017;5(13).

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci. 2003;60(12):2622-36.

Teng F, Jacques-Palaz D, Weinstock G, Murray B. Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (*epa*) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. Infect Immun. 2002;70:2010-5.

Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33:2233-9.

Teo JW, Krishnan P, Jureen R, Lin RT. Detection of an Unusual *van* Genotype in a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Hospital Isolate. J Clin Microbiol. 2011;49(12): 4297-98.

Theilacker C, Jonas D, Huebner J, Bertz H, Kern WV. Outcomes of invasive infection due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a recent outbreak. Infection. 2009;37(6):540-3.

Till M, Wixson R, Pertel PE. Linezolid Treatment for Osteomyelitis Due to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. Clinical Infectious Diseases. 2002; 34:1412-4.

Titécat M, Senneville E, Wallet F, Dezèque H, Migaud H, Courcol RJ, *et al.* Bacterial epidemiology of osteoarticular infections in a referent center: 10-year study. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2013;99(6):653-8.

Togneri AM, Corso A, Gonzalez J, Lopardo H, Podesta LB, Gagetti P, *et al.* Análisis clínico-epidemiológico de la potación intestinal de enterococos resistentes a vancomicina en una unidad de terapia intensiva. *Rev Argent Microbiol.* 2005; 37(1):26-33.

Toledo C, Pérez ME, M. Rocchi, G. Gribaudo, S. Mangiaterra, A. Monterisi. Aislamiento de especies de enterococos causantes de infecciones y su sensibilidad a los antimicrobianos. *Rev Arg Microbiol.* 2004(36):31-5.

Tomayko JF, Zscheck KK, Singh KV, Murray BE. Comparison of the beta-lactamase gene cluster in clonally distinct strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:1170-4.

Top J, Willems R, Bonten M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;52(3):297-308.

Tornero E, Senneville E, Euba G, Petersdorf S, Rodriguez-Pardo D, Lakatos B, *et al.* Characteristics of prosthetic joint infections due to *Enterococcus* sp. and predictors of failure: a multi-national study. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(11):1219-24.

Torres C, Tenorio C, Lantero M, Gastañares MJ, Baquero F. High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(11):2427-31.

Tracy SI, Brown SA, Ratelle JT, Bhagra A. Rare case of simultaneous enterococcal endocarditis and prosthetic joint infection. *BMJ Case Rep.* 2016;2016.

Trieu-Cuot P, Courvalin P. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene.* 1983;23(3):331-41.

Tsai TN, Wu CP, Peng MY, Giiian CF, Lee SY, Lu JJ. Short course of linezolid treatment for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* meningitis. *Int J Clin Pract.* 2006;60(6):740-1.

U

Udy AA, Roberts JA, Lipman J. Clinical implications of antibiotic pharmacokinetic principles in the critically ill. *Intensive Care Med.* 2013;39(12):2070-82.

Uttley AH, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH, *et al.* High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol Infect.* 1989;103(1):173-81.

US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Antimicrobial Resistance Threats in the United States. Disponible en:

<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Acceso: 05 de noviembre de 2017.

V

Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecón MA, Ortega M, Coque TM, *et al.* Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother. 2009;63(1):17-20.

van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, *et al.* Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2007;13 Suppl 3:1-46.

van der Heijden KM, van der Heijden IM, Galvao FH, Lopes CG, Costa SF, Abdala E, *et al.* Intestinal translocation of clinical isolates of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and ESBL-producing *Escherichia coli* in a rat model of bacterial colonization and liver ischemia/reperfusion injury. PLoS One. 2014;9(9):e108453.

van Harten RM, Willems RJL, Martin NI, Hendrickx APA. Multidrug-Resistant Enterococcal Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies?. Trends Microbiol. 2017;25(6):467-79.

Van Schaik W, Willems RJ. Genome-based insights into the evolution of enterococci. Clin Microbiol Infect. 2010;16: 527-32.

Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hayden MK, Snyderman DR, Zervos MJ, *et al.* Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. Clin Infect Dis. 2002;35(5):570-5.

W

Wang S, Guo Y, Lv J, Qi X, Li D, Chen Z, *et al.* Characteristic of *Enterococcus faecium* clinical isolates with quinupristin/dalfopristin resistance in China. BMC Microbiol. 2016;16(1):246.

Warnke P, Köller T, Stoll P, Podbielski A. Nosocomial infection due to *Enterococcus cecorum* identified by MALDI-TOF MS and Vitek 2 from a blood culture of a septic patient. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2015;5(2):177-9.

Weinstein MP. Comparative Evaluation of Penicillin, Ampicillin, and Imipenem MICs and Susceptibility Breakpoints for Vancomycin-Susceptible and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2001; 39(7): 2729-31.

Wellinghausen N, Chatterjee I, Berger A, Niederfuehr A, Proctor RA, Kahl BC. Characterization of clinical *Enterococcus faecalis* small-colony variants. J Clin Microbiol. 2009;47: 2802-11.

Wells C, Jechorek R, Erlandsen S. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. J Infect Dis. 1990;162:82-90.

Wells VD, Wong ES, Murray BE, Coudron PE, Williams DS, Markowitz SM. Infections due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Ann Intern Med. 1992;116(4):285-92.

Werner G, Gfrorer S, Fleige C, Witte W, Klare I. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German intensive care unit patient. J Antimicrob Chemother. 2008;61:1182-83.

White B, Seaton RA. Complicated skin and soft tissue infections: literature review of evidence for and experience with daptomycin. Infect Drug Resist. 2011;4:115-27.

Willems RJ, Top J, van Den Braak N, van Belkum A, Endtz H, Mevius D, *et al.* Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Infect Dis. 2000(182):816-23.

Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, *et al.* Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg Infect Dis. 2005;11(6):821-8.

Willems R; van Schaik W. Transition of *Enterococcus faecium* from Commensal Organism to Nosocomial Pathogen. Future Microbiol. 2009;4(9):1125-35.

Willems RJ, Top J, van Schaik W, Leavis H, Bonten M, Sirén J, *et al.* Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. MBio. 2012; 3:e00151-e00212.

Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. J Appl Microbiol. 2007;102:1178-86.

Y

Yim J, Smith JR, Rybak MJ. Role of Combination Antimicrobial Therapy for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Infections: Review of the Current Evidence. Pharmacotherapy. 2017;37(5):579-92.

Yip T, Tse KC, Ng F, Hung I, Lam MF, Tang S, *et al.* Clinical course and outcomes of single-organism *Enterococcus* peritonitis in peritoneal dialysis patients. Perit Dial Int. 2011;31(5):522-8.

Z

Zárate MS, Gales A, Jordá-Vargas L, Yahni D, Relloso S, Bonvehi P, *et al.* Contaminación ambiental durante un brote de enterococo resistente a vancomicina en un hospital de Argentina. Enfermedades Infecciosas Microbiol Clin. 2007; 25(8):508-12.

Zeng J, Teng F, Weinstock G, Murray B. Translocation of *Enterococcus faecalis* Strains across a Monolayer of Polarized Human Enterocyte-Like T84 Cells. J Clin Microbiol. 2004;42(3):1149-54.

Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, *et al.* Characteristics of and Virulence Factors Associated with Biofilm Formation in Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates in China. *Front Microbiol.* 2017;8:2338.

Zimmer SM, Caliendo AM, Thigpen MC, Somani J. Failure of Linezolid Treatment for Enterococcal Endocarditis. *Clin Infect Dis.* 2003;37(3):e29-30.

Zimmermann RA, Moellering RC Jr, Weinberg AN. Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. *J Bacteriol.* 1971;105(3):873-9.

Zscheck KK & Murray BE. Genes involved in the regulation of beta-lactamase production in enterococci and staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(9):1966-70.

Zscheck KK & Murray BE. Nucleotide sequence of the beta-lactamase gene from *Enterococcus faecalis* HH22 and its similarity to staphylococcal beta-lactamase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(9):1736-40.

Zweffler B, Sar E, Feder I. Subacute bacterial endocarditis due to *Streptococcus fecalis*. *Ann Intern Med.* 1951;34(1):217-23.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AMC	Amoxicilina/ácido clavulánico
AMK	Amikacina
AMP	Ampicilina
AMX	Amoxicilina
AmpR	Ampicilina resistentes
ANRAG	Alto nivel de resistencia a los aminoglucósidos
ARN	Acido ribonucleico
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
AT	Adenina y timina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Antimicrobiano/s
BAPS	<i>Bayesian analysis of genetic population structure</i>
BHI	Caldo cerebro-corazón
CA	Cáncer
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHEF	<i>Countour-Clamped Homogeneous Electric-Field Electrophoresis</i>
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacina
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
°C	Grados centígrados
CC	Complejo clonal
CLI	Clindamicina
CC17	Complejo clonal 17 <i>E. faecium</i> vancomicina resistente
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
<i>Cluster</i>	Grupo o racimo
DBT	Diabetes
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EE. UU.	Estados Unidos de Norteamérica
<i>Efa A</i>	Gen que codifica adhesina de pared celular
EI	Endocarditis infecciosa
EFMVR	<i>Enterococcus faecium</i> vancomicina resistentes
ERI	Eritromicina
Esp	Gen de proteína de superficie
ETA	Enfermedad transmitida por alimentos
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>

EVR	Enterococos vancomicina resistentes
FV	Factores de virulencia
GC	Guanina y citosina
GEH	Gentamicina
Gel	Gen de gelatinasa
g	Gramo
IAAS	Infecciones asociadas a la atención de la salud
IRyCIS	Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria
goeBURST	<i>global optimal</i> eBURST: algoritmo que permite inferir la relación entre aislamientos bacterianos basado en el número de diferencias del perfil alélico
IPPB	Infecciones de Piel y partes Blandas
KAN	Kanamicina
Kb	Kilobase
L	Litro/s
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Log ₁₀	Logaritmo en base 10
LVX	Levofloxacin
LZD	Linezolid
MALDI TOF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry</i>
Mb	Megabase
MDR	Resistencia multidroga
MLS	Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas
mL	Mililitro/s
mg/L	Miligramos/litros
min	Minuto/s
mM	Milimolar
mm	Milímetros
mol	Molar
m/v	Masa/volumen
MLST	Tipificación de Secuencias Multilocus (<i>Multi locus sequence typing</i>)
m/z	Carga/masa
N	Tamaño de la población o universo
<i>n</i>	Número de cepas
ng	Nanogramo
ng/μL	Nanogramo/microlitro
NaCl	Cloruro de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización Naciones Unidas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
<i>pbp5</i>	Gen proteínas ligadoras de penicilina

PBP	Proteína ligadora de penicilina
PCR	Reacción en cadena de polimerasa'
PDR	Pan-resistentes
PEN	Penicilina
PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> , Electroforesis de campo pulsado
% (p/v)	Por ciento peso/volumen
PubMLST	Red internacional de base de datos de MLST
Q/D	Quinupristin/dalfopristin
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Sustancia de agregación
SAM	Ampicilina/sulbactam
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
s	Segundos
sp.	Especie
ssp.	Especies
SprE	Serinas proteasas
ST	<i>SequenceType</i> , secuencia tipo
STH	Streptomycin
TEC	Teicoplanina
TGC	Tigeciclina
TGH	Transferencia Genética Horizontal
TGI	Tracto gastrointestinal
Tn	Transposón
μ	Microlitro
μg/mL	Microgramo/mililitro
U	Unidades de enzima
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitros
UTI	Unidad de Terapia Intensiva
VAN	Vancomicina
Van	Referido al fenotipo de resistencia
van	Referido al genotipo de resistencia
% (v/v)	Por ciento volumen/volumen
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
V	Voltio
V/cm ²	Voltios/centímetros cuadrados
%	Porcentaje
w	Watt
WHONET	Software para Vigilancia de Resistencia a antimicrobianos
XDR	Extremadamente resistentes

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1. Especies que forman parte del género *Enterococcus* descubiertas en los últimos 11 años. Adaptado de <http://www.bacterio.net/enterococcus.html#r>, 2017.

Tabla N° 2. Fenotipos de resistencia a glucopéptidos en el género *Enterococcus*. Adaptado de Cercenado, 2011.

Tabla N° 3. Fenotipos de resistencia y enzimas modificadoras de aminoglucósidos en el género *Enterococcus*. Adaptado de Morosini *et al.*, 2012.

Tabla N° 4. Reactivos componentes de la solución de Proteinasa K.

Tabla N° 5. Reactivos componentes de la solución de lisis.

Tabla N° 6. Reactivos componentes de la solución de lavado.

Tabla N° 7. Reactivos utilizados para la amplificación de los genes de MLST para grupo de 10 muestras. Años 2016-2017.

Tabla N° 8. Condiciones de PCR y cebadores utilizados para amplificar los siete genes del esquema de MLST en cepas de *E. faecalis* aisladas de infecciones invasivas humanas. Años 2016-2017.

Tabla N° 9. Condiciones de PCR y cebadores utilizados para amplificar los siete genes del esquema de MLST en cepas de *E. faecium* aisladas de infecciones invasivas humanas. Años 2016-2017.

Tabla N° 10. Puntos de cortes de los antimicrobianos utilizados en el test de Kirby Bauer.

Tabla N° 11. Puntos de cortes utilizados para los antimicrobianos en la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima.

Tabla N° 12. Secuencias de oligonucleótidos empleados como cebadores en la PCR.

Tabla N° 13. Características químicas y concentraciones de los antimicrobianos utilizados en las curvas de letalidad. Años 2014-2016.

Tabla N° 14. Puntajes promedios obtenidos según especie de *Enterococcus* identificadas por espectrometría de masas. Año 2015.

Tabla N° 15. Especies de *E. faecium* identificadas, año de aislamiento y muestra clínica obtenida por punción. HMRS cohortes 2010, 2013 y 2014.

Tabla N° 16. Especies de *E. faecalis* identificadas, año de aislamiento y muestra clínica obtenida por punción. HMRS cohortes 2010, 2013 y 2014.

Tabla N° 17. Muestras clínicas donde se obtuvo desarrollo de ambas especies de *Enterococcus*: *E. faecalis* (E1) + *E. faecium* (E2). HMRS, cohorte 2010, 2013 y 2014.

Tabla N° 18. Tipo y porcentaje de hemólisis detectada según especie de enterococos aislada. HMRS cohortes 2010, 2013 y 2014.

Tabla N° 19. Especies de enterococos aisladas según muestra clínica provenientes de infecciones invasivas humanas.

Tabla N° 20. Frecuencia de pacientes con infecciones invasivas en relación al rango etario.

Tabla N° 21. Frecuencia y porcentaje de aislamientos de especies de enterococos según género del paciente y año. HMRS, 2010, 2013 y 2014.

Tabla N° 22. Especies de enterococos aisladas según Servicio del HMRS en relación al consumo de antimicrobianos.

Tabla N° 23. Clones de *E. faecium* detectados por electroforesis de campo pulsado. Año 2015.

Tabla N° 24. Clones de *E. faecalis* detectados por electroforesis de campo pulsado. Año 2015.

Tabla N° 25. Designación de nuevo ST720.

Tabla N° 26. Caracterización genética de cepas seleccionadas de *E. faecalis* utilizando tipado por secuenciación de múltiples loci (MLST). Año 2016.

Tabla N° 27. Caracterización genética de cepas seleccionadas de *E. faecium* utilizando tipado por secuenciación de múltiples loci (MLST). Año 2016.

Tabla N° 28. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecalis* aisladas de líquidos articulares. Año 2015.

Tabla N° 29. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecalis* aisladas de líquidos abdominales. Año 2015.

Tabla N° 30. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecalis* aisladas de abscesos. Año 2015.

Tabla N° 31. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecalis* aisladas de hemocultivos. Año 2015.

Tabla N° 32. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecium* aisladas de líquidos articulares. Año 2015.

Tabla N° 33. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecium* aisladas de líquidos abdominales. Año 2015.

Tabla N° 34. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecium* aisladas de abscesos. Año 2015.

Tabla N° 35. Perfil de resistencia antimicrobiana de cepas de *E. faecium* aisladas de hemocultivos. Año 2015.

Tabla N° 36. Cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* productoras de β -lactamasa. Características genéticas, perfil de resistencia antimicrobiana (RA) y producción fenotípica de citolisina/hemolisina.

Tabla N° 37. Genotipos de resistencia a glucopéptidos en *E. faecium* aislados de infecciones invasivas humanas.

Tabla N° 38. CIM (ug/mL) de antimicrobianos en cepas seleccionadas de EFMVR y/o MDR aisladas de infecciones invasivas humanas para estudios con curvas de letalidad.

Tabla N° 39. Recuentos de bacterias EFMVR y/o MDR sobrevivientes expresados en Log₁₀ UFC/mL post-incubación con diferentes concentraciones de IMP, LVX y dupla IMP/LVX.

Tabla N° 40. Valor (%) del coeficiente de determinación (R^2) de cada curva de cinética realizada con LVX e IMP, solos o en combinación, para todas las cepas EFMVR y/o MDR.

Tabla N° 41. Recuentos de bacterias EFMVR y/o MDR sobrevivientes expresados en Log₁₀ UFC/mL post-incubación con diferentes concentraciones de TGC, GEH y dupla TGC/GEH.

Tabla N° 42. Valor (%) del coeficiente de determinación (R^2) de cada curva de cinética realizada con TGC y GEH, solos o en combinación, para todas las cepas EFMVR y/o MDR.

Tabla N° 43. Recuentos de bacterias EFMVR y/o MDR sobrevivientes expresados en Log₁₀ UFC/mL post-incubación con diferentes concentraciones de IMP, VAN y dupla IMP/VAN.

Tabla N° 44. Valor (%) del coeficiente de determinación (R^2) de cada curva de cinética realizada con IMP y VAN, solos o en combinación, para todas las cepas EFMVR y/o MDR.

Tabla N° 45. Recuentos de bacterias EFMVR y/o MDR sobrevivientes expresados en Log₁₀ UFC/mL post-incubación con diferentes concentraciones de LZD, GEH y dupla LZD/GEH.

Tabla N° 46. Valor (%) del coeficiente de determinación (R^2) de cada curva de cinética realizada con LZD y GEH, solos o en combinación, para todas las cepas EFMVR y/o MDR.

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1. Dendograma de relación filogenética entre especies del género *Enterococcus* spp. Gráfico cedido con permiso del Dr. Michael S. Gilmore. Lebreton *et al.*, 2014.

Figura N° 2. Relaciones filogenéticas establecidas entre especies del género *Enterococcus* spp. realizada sobre la base de las secuencias del ADNribosomal 16S. Gráfico cedido con permiso del Dr. Michael S. Gilmore. Gilmore *et al.*, 2013.

Figura N° 3. Ubicación del género *Enterococcus* spp. como integrante de la microbiota habitual del sistema gastrointestinal humano.

Figura N° 4. La invasión de la microbiota habitual por cepas resistentes. Figura adaptada con autorización del Dr. Fernando Baquero disponible en <http://www.jpiaamr.eu/wp-content/uploads/2016/03/Fernando-Baquero.pdf>

Figura N° 5. Esquema básico de identificación fenotípica para el género *Enterococcus* spp. Adaptado de: Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schrenckenberger P, Woods G. Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6^{ta} ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2008.

Figura N° 6. Esquematación de las posibles vías de diseminación de bacterias resistentes (BR) entre el ecosistema humano, animal y la microbiósfera ambiental. Diagrama realizado con imágenes libres de derechos de autor.

Figura N° 7. Mecanismo de acción de vancomicina inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana. Figura adaptada con permiso cedido por la Dra. Bárbara Murray. Murray B, 2000.

Figura N° 8. Ubicación geográfica del HMRS en el partido de Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Coordenadas GMS, Latitud: 37°19'18'' S, Longitud: 59°07'59'' O. Diagrama realizado con imágenes libres de derechos de autor.

Figura N° 9. Procedimiento de identificación por metodología MALDI TOF-MS. Fotos de autor: placa metálica y equipo MALDI TOF-MS utilizado (IRyCIS, Madrid, España).

Figura N° 10. Captura de pantalla del cromatograma del gen *gdh* del esquema de MLST para *E. faecalis* emitido por el *Software* Chromas.Ink utilizado para editar las secuencias obtenidas. Años 2016-2017.

Figura N° 11. Captura de pantalla que ejemplifica la comparación de secuencias obtenidas de genes del esquema de MLST para cepas *E. faecalis* analizadas, con las secuencias de los alelos depositados en la base de datos. Fuente: https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_efaecalis_seQ/Def&page=batchSequenceQuery. Año 2016-2017.

Figura N° 12. Captura de pantalla que ejemplifica la asignación de ST para *E. faecalis* por combinación de los números obtenidos de cada loci según la secuencia de cada alelo. Fuente: https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_efaecalis_seQ/Def&page=profiles&scheme_id=1. Años 2016-2017.

Figura N° 13. Captura de pantalla de la página principal del sitio <http://efaecalis.mlst.net>. Años 2016-2017.

Figura N° 14. Captura de pantalla de la página principal del sitio <http://efaecium.mlst.net>. Años 2016-2017.

Figura N° 15. Flujograma final de trabajo para obtención del secuencio tipo. Adaptado de: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>. Años 2016-2017.

Figura N° 16. Esquematización del sembrado de las diluciones en una placa de Petri, a fin de realizar el conteo de bacterias sobrevivientes a diferentes tiempos de incubación.

Figura N° 17. Frecuencia y porcentaje de especies del género *Enterococcus* spp. aisladas e identificadas a partir de muestras clínicas provenientes de infecciones invasivas. Los valores graficados representan el total de microorganismos aislados con su respectiva barra de error y desviación estándar.

Figura N° 18. Líneas de tendencia lineal con su ecuación correspondiente para *E. faecalis* y *E. faecium* aislados según años 2010, 2013 y 2014. Los valores graficados representan el total de microorganismos aislados con su respectiva barra de error.

Figura N° 19. Porcentajes del consumo de antimicrobianos utilizados en profilaxis antibiótica en el HMRS en relación al año. Los valores graficados representan el porcentaje de ATM con su respectiva barra de error.

Figura N° 20. Frecuencias (*n*) de muestras clínicas obtenidas por punción provenientes de infecciones invasivas según año. HMRS, cohorte 2010, 2013 y 2014. Los valores graficados representan el total de muestras clínicas con su respectiva barra de error. **L. abd.:** líquido abdominal; **Hem:** hemocultivo; **L. art.:** líquido articular.

Figura N° 21. Porcentaje de frecuencias del tipo de clon detectado en cepas de *E. faecium* provenientes de infecciones invasivas, según año de aislamiento. HMRS, Argentina. Año 2015.

Figura N° 22. Porcentaje de frecuencias del tipo de clon detectado en cepas de *E. faecalis* provenientes de infecciones invasivas según año de aislamiento. HMRS, Argentina. Año 2015.

Figura N° 23. Captura de pantalla donde se muestra la designación del nuevo ST720 y su localización en la base de datos *on line*.

Figura N° 24. Sitios polimórficos detectados para el locus *gdh*. Sustitución puntual de T→C y C→T en la secuencia genética de los alelos 15 y 35 del gen *gdh* del perfil alélico de *E. faecalis*. **gdh15:** secuencia obtenida para el alelo 15; **gdh35:** secuencia obtenida para el alelo 35.

Figura N° 25. Análisis goeBURST obtenido con los 7 ST detectados para *E. faecalis* involucrados en infecciones invasivas (*PhyloViz* 2.0). ST281 y ST720 varían en un máximo de solo 1 alelo (SLV). Los colores representan el tipo de clon y año de aislamiento. El tamaño de los círculos es proporcional al número de cepas aisladas con mismo ST.

Figura N° 26. Captura de pantalla: 3 aislados de *E. faecalis* provenientes de pacientes hospitalizados de Argentina con designación de ST. Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2017.

Figura N° 27. Distribución a nivel país de los ST de *E. faecalis* aislados de pacientes hospitalizados detectados en esta investigación, en relación a los mismos ST detectados a nivel mundial. Fuente: <https://pubmlst.org> (*Query profile history for Enterococcus faecalis locus/sequence definitions database*). Fecha de consulta: 29 de noviembre de 2017.

Figura N° 28. Análisis goeBURST obtenido con los 5 ST detectados en clones de *E. faecium* involucrados en infecciones invasivas (*PhyloViz* 2.0). Los colores representan el tipo de clon y año de aislamiento. El tamaño de los círculos es proporcional al número de cepas aisladas con mismo ST.

Figura N° 29. Análisis filogenético molecular por Método de Maximum Likelihood (ML) o Máxima Verosimilitud basado en modelo de Tamura-Nei. El análisis evolutivo fue realizado con MEGA7. Escala: 0.0010 sustituciones por posición de nucleótido. Niveles de bootstrap: 100 %. *: Sin agrupación.

Figura N° 30. Porcentaje de *E. faecalis* resistentes a 1 o ≥ 2 ATM para $n=23$ cepas (100 %). Año 2015.

Figura N° 31. Porcentaje de *E. faecium* resistentes a 1 o ≥ 2 ATM para $n=12$ cepas (100 %). Año 2015.

Figura N° 32. Porcentaje de resistencia antimicrobiana determinada por CIM ($\mu\text{g/mL}$) en *E. faecalis* y *E. faecium*. GEH: gentamicina, STH: estreptomicina, VAN: vancomicina, TEC: teicoplanina, Q/D: quinupristin/dalfopristin, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, PEN: penicilina, AMP: ampicilina, SAM: ampicilina/sulbactam.

Figura N° 33. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C44-IRE2 genotipo *vanA* productor de absceso hepático.

Figura N° 34. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C48-IR genotipo *vanA* productor de bacteriemia.

Figura N° 35. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C53-IR genotipo *vanA* proveniente de absceso abdominal.

Figura N° 36. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C30-IR genotipo *vanB* productor de bacteriemia.

Figura N° 37. Curva de muerte de IMP y LVX frente a EFMVR C47-IRE2 genotipo *vanB* proveniente de líquido abdominal.

Figura N° 38. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C44-IRE2 genotipo *vanA* proveniente de absceso hepático.

Figura N° 39. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C48-IR genotipo *vanA* productor de bacteriemia.

Figura N° 40. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C53-IR genotipo *vanA* proveniente de absceso abdominal.

Figura N° 41. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C30-IR genotipo *vanB* productor de bacteriemia.

Figura N° 42. Curva de muerte de TGC y GEH frente a EFMVR C47-IRE2 genotipo *vanB* aislado de líquido abdominal.

Figura N° 43. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C44-IRE2 genotipo *vanA* aislado de líquido abdominal.

Figura N° 44. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C48-IR genotipo *vanA* productor de bacteriemia.

Figura N° 45. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C53-IR genotipo *vanA* productor de absceso abdominal.

Figura N° 46. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C30-IR genotipo *vanB* productor de bacteriemia.

Figura N° 47. Curva de muerte de IMP y VAN frente a EFMVR C47-IRE2 genotipo *vanB* aislado de líquido abdominal.

Figura N° 48. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C44-IRE2 genotipo *vanA* aislado de líquido abdominal.

Figura N° 49. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C48-IR genotipo *vanA* aislado de hemocultivo.

Figura N° 50. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C53-IR genotipo *vanA* productor de absceso abdominal.

Figura N° 51. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C30-IR genotipo *vanB* aislado de hemocultivo.

Figura N° 52. Curva de muerte de LZD y GEH frente a EFMVR C47-IRE2 genotipo *vanB* aislado de líquido abdominal.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografía N° 1. A: Coloración de Gram. Se observa la morfología y la agrupación de *E. gallinarum*. **1.B:** Placa con Agar Sangre Ovina (5 %) sembrada con técnica de 4^{ta} estría donde se observan colonias de *E. faecium* productoras de β -hemólisis (Foto de autora). Foto 1.A: Tomado de: <http://microbe-canvas.com//index.php>. ERASMUS MC.

Fotografía N° 2. Hospital Municipal Ramón Santamarina (HMRS), Tandil, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Disponible en: <http://www.hrsantamarina.org.ar/galeria.php>

Fotografía N° 3. Multiinoculador (replicador Steers) similar al utilizado para determinar la CIM en medio sólido. Fuente: foto de autora.

Fotografía N° 4. Morfotipo presuntivo de colonia pequeña de *E. faecalis* aislada de un hemocultivo proveniente de un paciente con diagnóstico de endocarditis. Cultivo de 24 h.

Fotografía N° 5. Aislamiento de 2 especies de *Enterococcus* con tamaño de colonia diferente, provenientes de una misma muestra clínica. **A:** crecimiento a las 24 h; **B:** crecimiento a las 48 h.

Fotografía N° 6. Hemólisis β obtenida con cepa *E. faecium* C3-IR y hemólisis tipo γ obtenida con cepa *E. faecalis* C9-IR (Fig. A). Cepa control (+) hemólisis β de *S. aureus* ATCC 25923 (Fig. B).

Fotografía N° 7. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecium* productores de infecciones invasivas digeridos con *SmaI* y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1 y 21: λ , lambda ladder marker. Línea 2: C30-IR *vanB*⁺; línea 3: C38-IR; línea 4: C47-IRE2 *vanB*⁺; línea 5: C48-IR *vanA*⁺; línea 6: C31-IR; línea 7: C32-IR; línea 8: C34-IR; línea 9: C45-IR; línea 10: C52-IRE2; línea 11: C16-IR; línea 12: C20-IRE2; línea 13: C35-IR; línea 14: C7-IRE2; línea 15: C14-IRE2; línea 16: C40-IR; línea 17: C44-IRE2 *vanA*⁺; línea 18: C51-IRE2; línea 19: C53-IR *vanA*⁺ y línea 20: C3-IR.

Fotografía N° 8. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecalis* productores de infecciones invasivas digeridos con *SmaI* y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1 y 12: λ , lambda ladder marker. Línea 2: C8-IR; línea 3: C10-IR; línea 4: C11-IR; línea 5: C13-IR; línea 6: C17-IR; línea 7: C50-IR; línea 8: C39-IR; línea 9: C43-IR; línea 10: C44-IRE1; línea 11: C47-IRE1.

Fotografía N° 9. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecalis* productores de infecciones invasivas digeridos con *SmaI* y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1: λ , lambda ladder marker. Línea 2: C26-IR; línea 3: C27-IR; línea 4: C28-IR; línea 5: C29-IR; línea 6: C25-IR; línea 7: C33-IR; línea 8: C36-IR; línea 9: C41-IR; línea 10: C42-IR.

Fotografía N° 10. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecalis* productores de infecciones invasivas digeridos con *SmaI* y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1 y 24: λ , lambda ladder marker. Línea 2: C38-IRE2; línea 3: C46-IR; línea 4: C47-IRE1; línea 5: C48-IRE1; línea 6: C50-IR; línea 7: C51-IRE1; línea 8: C6-IR; línea 9: C8-IR; línea 10: C12-IRE2; línea 11: C18-IR; línea 12: C20-IRE1; línea 13: C21-IR; línea 14: ADN digerido por completo. Línea 15: C29-IRE2; línea 16: C30-IRE2; línea 17: C36-IR; línea 18: C37-IR; línea 19: C49-IRE2; línea 20: C4-IR; línea 21: C24-IR; línea 22: C23-IR; línea 23: C5-IR.

Fotografía N° 11. Pulsotipos de ADN genómico de *E. faecalis* productores de infecciones invasivas digeridos con *SmaI* y obtenidos por PFGE. HMRS, Argentina. Año 2015. Línea 1 y 27: λ , lambda ladder marker. Línea 2: C1-IR; línea 3: C2-IR; línea 4: C4-IR; línea 5: C5-IR; línea 6: C6-IR; línea 7: C7-IRE1; línea 8: C8-IR; línea 9: C9-IR; línea 10: C10-IR; línea 11: C11-IR; línea 12: C12-IRE1; línea 13: C12-

IRE2; línea 14 y 18: ADN digerido por completo. Línea 15: C14-IRE1; línea 16: C15-IR; línea 17: C16-IRE2; línea 19: C18-IR; línea 20: C19-IR; línea 21: C20-IRE1; línea 22: C54-IR; línea 23: C55-IR, línea 24: C21-IR; línea 25: C22-IR; línea 26: C23-IR.

Fotografía N° 12. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *gdh* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular (bp: pares de base); línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 13. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *gyd* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 14. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *pstS* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 15. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *xpt* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 16. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *yiqL* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 17. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *aroE* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 18. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *gki* en cepas *E. faecalis*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 12: control (+); línea 13: control (-).

Fotografía N° 19. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *pstS* en cepas *E. faecium*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 10: control (+) y línea 11: control (-).

Fotografía N° 20. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *gyd* en cepas *E. faecium*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 10: control (+) y línea 11: control (-).

Fotografía N° 21. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de los genes *atpA* y *gdh* en cepas *E. faecium*. Línea 1: marcador de peso molecular; línea 9: control (+); línea 10: control (-).

Fotografía N° 22. Concentración inhibitoria mínima de VAN (CIM: 0,75 µg/mL) y TEC (CIM: 0,50 µg/mL) frente a *E. faecalis* C45-IR y CIM de VAN (CIM: 1 µg/mL) frente a *E. faecalis* C16-IR obtenida por E-test.

Fotografía N° 23. Detección fenotípica de la producción de β-lactamasa (método de nitrocefín) en cepas de *E. faecium* y *E. faecalis*. Disco rojo: prueba positiva, disco amarillo claro: prueba negativa. Cepa C47-IRE1 muestra una producción más débil. *S. aureus* ATCC 29213 se utilizó como cepa β-lactamasa (+) para control de proceso.

ANEXO