



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Química Clínica Diagnóstica

“Tipificación molecular de *Enterococcus faecium* multifármaco-resistente,
obtenido en hospitales públicos de la Ciudad de Querétaro”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Química Clínica Diagnóstica

Presenta

Biol. Sandra Alvarez Hidalgo

Dirigido por:

Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez

Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez
Presidente

Dr. en C. Juan Xicohtencatl Cortes
Secretario

Dr. en C. Juan Campos Guillén
Vocal

M. en C. Alma Delia Bertadillo Jilote
Suplente

M.S.P. Juana Susana Flores Robles
Suplente

Centro Universitario Querétaro, Qro.
Diciembre, 2019
México

DEDICATORIAS

A mis padres y hermanos porque siempre han estado presentes en cada proyecto de mi vida, por todo su apoyo y cariño incondicional. Porque sin ellos no sería quien soy. Sin ellos, mi vida no sería tan bella.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Trabajo financiado por los proyectos: FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL 2015 proyecto No. 0261577 y FOFI-UAQ 2018 (FME201809).

Apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el Número de CVU: 858322, durante la estancia en la Maestría en Química Clínica Diagnóstica, programa incorporado al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad PNPCCONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser los papás más extraordinarios que me haya dado Dios y la vida, por todas sus enseñanzas y apoyo sin límites, porque mis logros son de ellos. Porque siento una gran admiración hacia ellos, por los grandes seres humanos que son. Con su ejemplo y valores han logrado construir la hermosa familia a la que pertenezco y de la cual me siento enormemente orgullosa.

A mis hermanos, porque además para mí son mis mejores amigos, por los buenos ratos que pasamos cada vez que estamos juntos entre risas, enojos, tristezas... y todo lo que nos falta por compartir... Gracias por estar siempre en las buenas y en las malas.

A mis sobrinos, que son grandes seres humanos y han heredado los valores de sus padres y abuelos, espero perpetúen el ejemplo de unión familiar, sean amigos y hermanos siempre y nunca se rindan en sus proyectos de vida.

A mis cuñados, cuñadas que también son como mis hermanos y amigos.

A mis amigas de toda la vida porque sé que siempre lo seguirán siendo Estibali, Alejandra, Karla, Marisol, Sarahí, Carmen y a mi hermana Erika, que además de hermana-amiga, también es sólo amiga... y porque ha sido parte fundamental en mi vida académica por sus consejos y apoyo sin condiciones, sus enseñanzas, y la oportunidad que siempre me ha dado de aprender a su lado.

A la Dra. María Carlota García Gutiérrez por haber confiado en mí y por haberme dado la oportunidad de formar parte de su proyecto académico, por todas sus enseñanzas, apoyo, paciencia, comprensión, por ser una persona muy linda a quien siempre le estaré agradecida. Por apoyarme incluso en momentos complicados de tiempo y estrés durante la maestría, porque siempre que le pedí ayuda, siempre estuvo presente. ¡Gracias!

A todos mis sinodales y profesores de la Maestría en Química Clínica Diagnóstica, que fueron un gran ejemplo para mí, de quien aprendí mucho, no solo de cuestiones académicas sino también en aspectos de la vida que me han enseñado a ser mejor persona. Gracias por

su apoyo, su paciencia, sus conocimientos, sus consejos y asesorías. Siempre los recordaré con mucho cariño: Maestra Alma Delia Bertadillo Jilote, Maestra Susana Flores Robles, Dr. Juan Campos Guillén, Maestro David Gustavo García Gutiérrez, Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez, Dra. Angelina Rodríguez Torres, Dra. Karla Lira de León, Dr. Enrique Villareal.

Al Dr. Juan Xicohtencatl Cortes, por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial, por todas sus enseñanzas, conocimientos, comentarios y observaciones, por haberme recibido y dado la oportunidad de capacitarme en el Laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Al IBT. Gerardo Escalona Venegas por todo el tiempo que dedicó en capacitarme, guiarme y asesorarme con las técnicas moleculares, por compartir sus conocimientos de manera desinteresada. ¡Muchas gracias!

A Bibiana Flores Monzón por todo el apoyo que me brindó durante la maestría, por escucharme y acompañarme en largos ratos de trabajo, y por aquellos momentos gratos que también compartimos.

A mis compañeras y amigas de la maestría, Claudia, Silvia, Rocío y Alejandra, por los momentos compartidos, porque gracias a ustedes fue más sencillo avanzar y nunca rendirme, trabajar en equipo siempre fue lo mejor ¡gracias por todo su apoyo!

A la Universidad Autónoma de Querétaro,

A la Facultad de Química

A la Maestría en Química Clínica Diagnóstica.

A todos, gracias.

RESUMEN

Enterococcus faecium es una bacteria que forma parte de la microbiota del cuerpo humano, sin embargo, bajo ciertas circunstancias puede convertirse en patógeno, afectando principalmente a personas inmunodeprimidas. Aunado a lo anterior, *E. faecium* tiene una gran capacidad de adquirir resistencia a antibióticos así como de sobrevivir a una amplia gama de condiciones ambientales, lo cual lo convierte en un microorganismo de interés clínico y epidemiológico. Estudios de tipificación genética, han contribuido a identificar y diferenciar cepas de esta especie, principalmente las responsables de infecciones intrahospitalarias las cuales suelen ser multifármaco-resistentes (MDR -por sus siglas en inglés-). Existen diversas técnicas que se utilizan para la tipificación molecular de microorganismos, dos de ellas son la técnica de Electroforesis en Gel con Campos Pulsados o PFGE (por sus siglas en inglés) y la de Secuenciación y Tipificación Multilocus (MLST, por sus siglas en inglés). En este proyecto, se llevó a cabo la tipificación molecular de *Enterococcus faecium* MDR, los cuales fueron obtenidos de unidades pediátricas en dos hospitales públicos de la ciudad de Querétaro. Del primer hospital se seleccionaron 22 aislamientos colonizantes obtenidos durante dos periodos de muestreo (2014-15 y 2015-16) y 3 aislamientos infectantes obtenidos de un segundo hospital durante el periodo de 2016-17. En relación a la técnica de PFGE, se encontró una similitud del 60% entre ellos. Además, los resultados del dendrograma mostraron 2 clusters principales, ambos con similitudes mayores al 90%, que corresponden a los dos periodos de muestreo del 1er. hospital y el cluster 2 incluye los aislamientos infectantes. Con la técnica de MLST se obtuvieron dos STs nuevas, la ST1654 y la ST1661, las cuales no habían sido previamente identificadas en ningún lugar del mundo, posiblemente son cepas endémicas de los dos hospitales participantes en este estudio. Al analizar las dos STs con los algoritmos eBURST y goeBURST-1.2.1, se pudo determinar una asociación con el CC17. En conjunto, los resultados obtenidos por estas técnicas, sugiere una contaminación cruzada por parte del personal de salud o de los pacientes, por lo que es muy importante se tomen las medidas necesarias para evitar su diseminación.

Palabras clave: *Enterococcus faecium*, PFGE, MLST, MDR, Vancomicina.

ABSTRACT

Enterococcus faecium is bacteria member of the human microbiota, however, under certain circumstances it can become a pathogen, mainly affecting immunosuppressed patients. Moreover, *E. faecium* has a great capacity to acquire antimicrobial resistance as well as to survive a wide range of environmental conditions, thus it is a microorganism of clinical and epidemiological interest. Genetic typing studies have helped to identify and differentiate strains of this species, mainly those of nosocomial interest which are usually multidrug-resistant (MDR). There are several techniques that are used to this aim, two of them are the Pulsed-Field Gel Electrophoresis and the Multilocus Sequence Typing (MLST) technique. In this project, the molecular typing of MDR *Enterococcus faecium*, which were obtained from pediatric units from two public hospitals at the city of Querétaro, was carried out. Twenty two colonizing isolates were selected from those obtained during two sampling periods (2014-15 and 2015-16) from the first hospital and 3 infectious isolates from a second hospital (2016-17 period). Phylogenetic analysis by PFGE demonstrated an overall 60% similarity, and 2 main clusters with similarities greater than 90%, that matches with the sampling periods in the first hospital; cluster 2 includes the infecting isolates. Regarding MLST technique, two new STs were obtained, the ST1654 and the ST1661, which had not been previously identified anywhere in the world, possibly being endemic strains of the two hospitals participating in this study. The analysis with the e-BURST and goeBURST-1.2.1 algorithms, showed an association on both STs with CC17. Together, the results obtained by these techniques, suggests cross contamination by health staff or patients, so it is very important to take measures to prevent dissemination.

Keywords: *Enterococcus faecium*, PFGE, MLST, MDR, Vancomycin.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	II
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1. <i>ENTEROCOCCUS SPP.</i>	3
1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	3
1.2. <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i>	5
2. COLONIZACIONES E INFECCIONES POR <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i>	7
3. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	8
3.1. MECANISMO DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	9
3.1.1. MECANISMO DE RESISTENCIA A GLUCOPÉPTIDOS	11
4. FACTORES DE VIRULENCIA	12
5. EPIDEMIOLOGÍA	16
5.1. EPIDEMIOLOGÍA DE <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> A NIVEL MUNDIAL	16
5.2. ESTUDIOS SOBRE <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> EN MÉXICO	20
5.3. ESTUDIOS SOBRE <i>ENTEROCOCCUS FAECIUM</i> EN QUERÉTARO	25
III. HIPÓTESIS	27
IV. OBJETIVOS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
V. METODOLOGÍA	29
1. DISEÑO EXPERIMENTAL	29
1.1. DEFINICIÓN DEL UNIVERSO	29
1.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA	29
1.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	29

1.4. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	29
1.5. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA	29
1.5.1. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES	29
1.6. SELECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE ESTUDIO	30
1.7. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.	31
1.7.1. TÉCNICA DE PFGE.	31
1.7.2. TÉCNICA DE MLST	34
1.7.3. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y RELACIÓN FILOGENÉTICA	40
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1. RESULTADOS.	41
1.1. RESULTADOS PFGE	42
1.2. RESULTADOS MLST.....	43
1.2.1. NÚMERO DE ALELOS.....	45
1.2.2. ANÁLISIS CON LOS ALGORITMOS E-BURST Y GOEBURST-1.2.1.	47
2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
VII. CONCLUSIONES.....	69
VIII. REFERENCIAS.....	71
IX. ANEXOS.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título de la tabla	Página
1	Características de <i>Enterococcus spp.</i>	4
2	Clasificación de <i>E. faecium</i> .	5
3	Factores de virulencia en <i>Enterococcus spp.</i>	13
4	Perfiles de resistencia antimicrobiana.	31
5	Genes conservados y oligonucleótidos para la caracterización genética de <i>Enterococcus spp.</i> Indicando la longitud de los amplicones y las secuencias de los iniciadores utilizados.	36
6	Componentes de la mezcla de reacción y sus concentraciones para la PCR.	37
7	Condiciones utilizadas en el termociclador para la PCR.	38
8	Temperaturas de alineamiento de los oligos utilizados para la técnica de MLST.	39
9	Patrones de resistencia (PRes) a las categorías antimicrobianas (CAm).	41
10	Número de identificación del alelo y de la ST correspondiente, obtenidos para cada gen, en los aislamientos analizados por medio de la técnica de MLST.	46
11	Alelos encontrados y su relación con reportes mundiales.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título de la figura	Página
1	<i>Enterococcus faecium</i> .	3
2	Alfa-hemólisis de <i>Enterococcus faecium</i> .	5
3	Crecimiento de la Biopelícula en <i>E. faecalis</i> .	8
4	Mecanismos de resistencia a antibióticos de <i>Enterococcus spp.</i>	10
5	Clusters de los genotipos <i>vanA</i> y <i>vanB</i> .	12
6	Caracterización molecular de <i>E. faecium</i> por medio de la técnica de MLST.	35
7	Análisis de PFGE de 25 aislamientos representativos de <i>E. faecium</i> .	42
8	Amplificación por PCR de los genes <i>gdh</i> y <i>psts</i> en diez aislamientos de <i>E. faecium</i> .	44
9	Amplificación por PCR del gen <i>atpA</i> en diez aislamientos de <i>E. faecium</i> .	44
10	Bandas de ADN en gel de agarosa bajo la exposición de luz UV.	45
11	Relación de las ST1654 y ST1661 con el CC17 por medio del algoritmo goeBURST-1.2.1 utilizando un nivel de DLV (variantes de doble locus por sus siglas en inglés).	48
12	Relación de las ST1654 y ST1661 con el CC17 por medio del algoritmo e-BURST.	49
13	Perfiles alélicos de la ST1654, ST757 y ST1303.	56
14	Relación de la ST1654 con las ST757 y ST1301 por medio del algoritmo e-BURST.	56

I. INTRODUCCIÓN

Enterococcus faecium, bacteria usualmente comensal que habita primordialmente el intestino humano, es una de las principales especies que ocasionan infecciones asociadas a la atención de la salud en el mundo, siendo los más afectados, los pacientes inmunodeprimidos (Bhardwaj *et al.*, 2013). Además, se ha convertido en un agente de importancia mundial, debido a su gran capacidad de sobrevivir a condiciones adversas y de adquirir multiresistencia a diversos antimicrobianos. *Enterococcus spp.* es la segunda causa de infecciones nosocomiales a nivel mundial y la principal causa de infecciones en los Estados Unidos en un porcentaje entre el 20 y el 30% (Hassan y col., 2015; Arias y Murray 2012). En países Latinoamericanos (Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela), se ha descrito a *E. faecium* multifármaco-resistente como la causante del 22 % de las infecciones asociadas a la atención de la salud (Panesso *et al.*, 2010).

En México, no existen datos suficientes sobre la prevalencia de las infecciones por este microorganismo; sin embargo, los distintos estudios describen que es un problema de salud nacional debido a su multiresistencia (Cuellar *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2010; Reina *et al.*, 2013).

Aunado al impacto sanitario, las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes causan costos muy elevados. En Estados Unidos de América, ocasionan un incremento anual de 20 billones de dólares, pérdidas de 25 billones de dólares por la falta de productividad y 8 billones por los días de hospitalización del paciente (Rodríguez *et al.*, 2014).

Afortunadamente las técnicas moleculares existentes favorecen estudios a nivel genotípico, que permiten establecer las relaciones genéticas entre las diferentes cepas aisladas de pacientes atendidos en diversos hospitales y poder así identificar las fuentes de origen y alguna relación epidemiológica entre los mismos.

Al tipificar molecularmente a *E. faecium* y conocer su relación filogenética entre las cepas aisladas de diferentes pacientes, se podrá conocer más sobre su capacidad de transmisibilidad y sobre la generación de brotes epidémicos (Silveira *et al.*, 2013).

Pudiendo favorecer también desde un enfoque epidemiológico, el reconocimiento de cepas endémicas.

El estudio de las relaciones filogenéticas contribuye a revelar pistas importantes sobre la evolución de los *Enterococcus* y describir de manera precisa las diferencias entre aquellos asociados a infecciones comunitarias y aquellos de origen nosocomial (Arias y Murray en 2012). Estos estudios han propuesto que los aislamientos de hospitales comparten una historia evolutiva distinta a las cepas de las comunidades, concluyendo en que la mayoría de las cepas de hospitales descritas en diversos países pertenecen al complejo clonal 17, CC17 (Galloway *et al.*, 2012 & Willems *et al.*, 2011).

En México, el estudio de *Enterococcus* spp. ha sido muy limitado y se ha centrado en su resistencia antimicrobiana (Cuellar-Rodríguez *et al.*, 2007; Reina-Bautista *et al.*, 2013 & Rodríguez-Noriega *et al.*, 2014), con excepción de algunos estudios que han utilizado la técnica de PFGE para su caracterización genética (Alatorre, *et al.*, 2016; Bocanegra *et al.*, 2015 & Castillo-Rojas *et al.*, 2013). Ochoa y col. (2013) a través de técnicas de PFGE y MLST, realizaron el análisis de linajes en cepas MDR de *E. faecium* provenientes de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez, identificando un 44% de similitud entre las cepas aisladas, así como la relación con el CC17.

En la Ciudad de Querétaro, el estudio de este microorganismo se encuentra en ciernes y aún cuando estos estudios no han incluido la caracterización genética ni la búsqueda de relaciones entre los aislamientos, los resultados de patrones de resistencia sugieren una posible relación filogenética (De los Santos Aguilar *et al.*, 2015).

De esta manera, la tipificación molecular nos permitirá corroborar estas observaciones, así como, investigar su relación con la clona hospitalaria descrita mundialmente.

II. ANTECEDENTES

1. *Enterococcus spp.*

1.1. Características generales.

Enterococcus spp. pertenece al Filum Firmicutes junto con los géneros de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Lactobacilos*. Estas bacterias son consideradas como comensales humanos por formar parte de la microbiota normal, tienen una relación benigna con su hospedero; sin embargo, también son patógenos oportunistas humanos capaces de infectar una gran variedad de zonas del cuerpo. La virulencia ocasional depende de varios factores, tales como: la susceptibilidad del huésped, las variantes o clones con potencial patógeno, y la adquisición de la resistencia antimicrobiana. Las especies de *Enterococcus* causan principalmente infecciones en pacientes hospitalizados, además de que son capaces de colonizar y ocasionar infecciones en una gran variedad de animales como el ganado, por lo que debido a la presión selectiva impuesta por los antibióticos usados en estos animales, se favorece la selección de clones resistentes (Willems *et al.*, 2011).

De acuerdo con (Fernández E., 2008), las bacterias del género *Enterococcus* consisten en células esféricas u ovoides de 0.6 a 2 x 0.6 a 2.5 μm dispuestos en pares o cadenas cortas (figura 1), las cuales son notablemente más robustas que las de los *Micrococcus* y *Staphylococcus*. Los *Enterococcus* son bacterias inmóviles (aunque *E. casseliflavus* y algunas cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* pueden llegar a ser móviles), carecen de cápsula, son catalasa negativos y anaerobios facultativos.

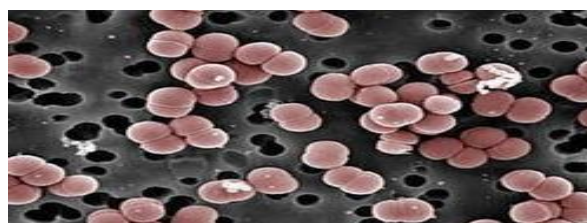


Figura 1. *Enterococcus faecium*, («Unique Biotech Limited», 2005).

Estas bacterias, se desarrollan en amplios rangos de temperatura (10°C a 45°C), hasta pH de 9.6, en presencia de bilis al 40%, y al 6.5% de NaCl (Tabla 1). Es de particular interés, su carácter termodúrico (es decir, que pueden sobrevivir a temperaturas considerablemente más elevadas que su temperatura máxima de crecimiento), lo que también le distingue de otros cocos gram positivos (Fernández E., 2008). *Enterococcus* spp. es comúnmente aislado del contenido intestinal del hombre, de animales de sangre fría o caliente, de vegetales e insectos, por lo tanto, aunque con baja frecuencia, ha sido encontrado en la tierra, en donde sobreviven durante largos periodos en presencia de humedad (Fernández E., 2008). Además, tienen una gran capacidad de crecer en puntos distantes de la fuente fecal original de contaminación, con una resistencia relativamente alta a condiciones extremas del medio ambiente (pH, temperatura y salinidad).

Tabla 1. Características de *Enterococcus* spp. (Prescott *et al.*, 2004).

Disposición predominante	En parejas o diplococos y en cadenas
Cápsula	Ausente
Hábitat	Tracto digestivo
Crecimiento	A 10°C y 45°C
NaCl	6.5%
Ph	9.6
Hemólisis	Alfa, beta o ninguna
Grupo serológico	D
% mol de G + C	34-42
Especies representativas	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. gallinarum</i>

Los *Enterococcus* se caracterizan por poseer el antígeno D de Lancefield (ácido glicerol teicoico de la pared celular) y muchos no producen hemolisinas, pero en cambio producen un halo color verdoso o marrón alrededor de sus colonias cuando crecen en Agar Sangre. Estos halos no son una auténtica hemólisis, sino se debe a la decoloración y pérdida de

potasio de los hematíes, una reacción que es denominada alfa-hemólisis (Figura 2) (Mandigan *et al.*, 2009).



Figura 2. Alfa-hemólisis de *Enterococcus faecium*. («Abis Encyclopedia. Regnum Prokaryotae», s. f.).

Los enterococos normalmente para obtener su energía dependen de la fermentación del azúcar (Prescott y col., 2004). Fermentan los hidratos de carbono a lactato sin la producción de gas. Son nutricionalmente exigentes por lo cual se les debe suministrar muchas vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas, debido a su limitada capacidad biosintética.

1.2. *Enterococcus faecium*

Enterococcus faecium pertenece al Filum Firmicutes, Orden Lactobacillales (al que pertenecen también los Lactobacilos) y se ubica en la familia Enterococcaceae (Prescott *et al.*, 2004) (Tabla 2). Esta bacteria comparte las mismas características fenotípicas del género *Enterococcus* spp. (Tabla 1).

Tabla 2. Clasificación de *E. faecium* (Prescott *et al.*, 2004).

Filum	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	Enterococcaceae
Género	<i>Enterococcus</i>
Especie	<i>Faecium</i>

E. faecium presenta algunos comportamientos particulares que resultan benéficos para el ser humano como su función probiótica. Dinleyici y col. (2013), mostraron que la administración de una mezcla de bacterias con efectos probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* y *Enterococcus faecium*), a una concentración de 2.5×10^9 ufc de cada uno, así como 625 mg de fructo-oligosacaridos y vitaminas (A, B1, B2, B6, E, y C) a niños hospitalizados con diarrea aguda durante un periodo de 5 días, redujo el tiempo de duración de la diarrea y de los días de hospitalización de una manera significativa.

Por otro lado, también se han documentado los beneficios de este microorganismo con la reducción de triglicéridos y colesterol. *E. faecium* disminuye los niveles de triglicéridos y de lipoproteínas de baja densidad; el cual se ha asociado con un incremento de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (Kumar y col., 2012; Jones y col., 2012). Las bacterias producen una enzima, la enzima hidrolasa de la sal biliar o BHS (por sus siglas en inglés), la cual lleva a cabo la desconjugación de la bilis a ácidos biliares. Los ácidos biliares desconjugados son menos eficientes en la solubilización de los lípidos, incluido el colesterol, por lo tanto, se reabsorben menos del intestino hacia la sangre (desechándose junto con las heces), disminuyendo de ese modo su concentración sérica (Jones *et al.*, 2012 & Kumar *et al.*, 2012). Otro beneficio de *E. faecium* es la síntesis de bacteriocinas contra patógenos como *Listeria monocytogenes* (Fernández E., 2008; Alvarez Cisneros y col., 2010).

A pesar de que los *Enterococcus spp.* pueden ser benéficos y formar parte de la microbiota normal como comensales humanos; bajo ciertas condiciones pueden convertirse en patógenos oportunistas. Por lo que *E. faecium* se ha convertido en una de las principales causas de enfermedad nosocomial a nivel mundial y el segundo en Estados Unidos (Panesso *et al.*, 2010).

2. Colonizaciones e infecciones por *Enterococcus faecium*

E. faecium es un microorganismo con una gran capacidad de adquirir resistencia antimicrobiana y de sobrevivir en un amplio rango de temperatura, pH, y condiciones adversas. Este patógeno oportunista, además tiene la capacidad de adquirir genes virulencia para favorecer su desarrollo, proporcionándole ventaja de colonizar el intestino humano. A pesar de que *E. faecium* se encuentra de manera ubicua en el intestino humano, sólo pertenece a menos del 1% de la microbiota intestinal (Lebreton, Willems, & Gilmore, 2014). Sin embargo, puede sobrepasar dicho porcentaje de colonización habitual, bajo ciertas situaciones, como ha ocurrido en pacientes inmunodeprimidos y cuando están bajo un tratamiento antimicrobiano, debido a que el antibiótico inhibe gran parte de la microbiota intestinal (la cual normalmente compite por espacio y alimento con el *Enterococcus*), permitiendo así su proliferación.

Las biopelículas bacterianas tienen una función importante, tanto para la colonización como para la infección (Figura 3). Las biopelículas contribuyen en la protección y adhesión de las bacterias a ciertas superficies (bióticas y abióticas) para favorecer la infección por parte de estos microorganismos (Dunny *et al.*, 2014). *E. faecalis* tiene una mayor capacidad de formar biopelículas que *E. faecium* y el fenotipo de la biopelícula es un importante factor que contribuye en la patogénesis de los enterococos al intensificar la evasión a la inmunidad del hospedero.

Las biopelículas están constituidas por adherencias superficiales, tales como: proteínas asociadas a la pared celular, autolisinas y glicolípidos, que predominan precozmente durante la fase de adhesión. Continuando, los polisacáridos, ácido lipoteicoico, ADN extracelular y proteasas contribuyen a la maduración de la biopelícula (Dunny *et al.*, 2014).

Existen genes que participan en la formación de las biopelículas, como el gen *agg*, el cual al expresarse, contribuye en la síntesis de la AS (Sustancia de Agregación, por sus siglas en inglés), que es una adhesina de superficie que media el contacto célula-célula. La AS

probablemente intensifica la virulencia, su expresión se asocia con la evasión de la inmunidad del hospedero, protegiendo contra la fagocitosis por macrófagos y contra la destrucción por leucocitos polimórficos (Yamanaka *et al.*, 2014).

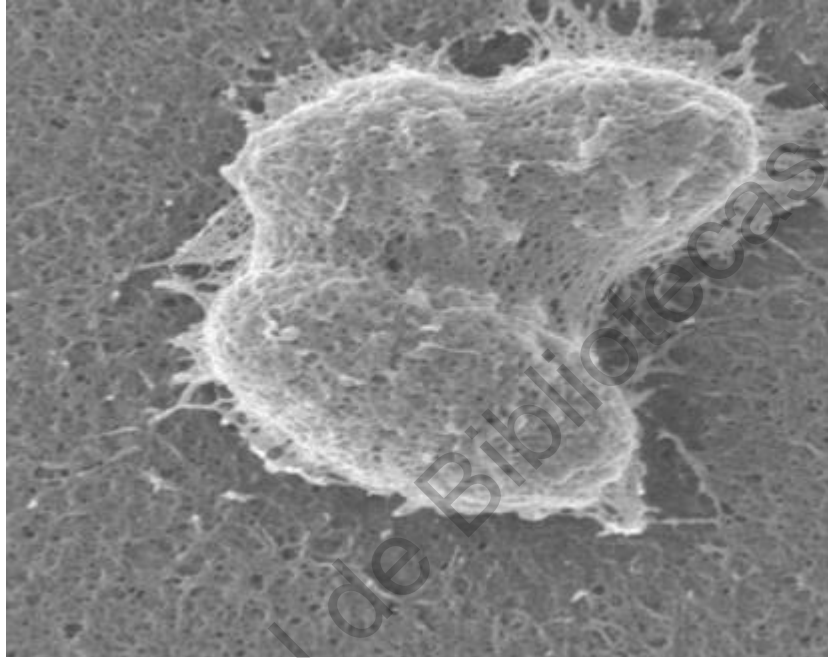


Figura 3. Crecimiento de la Biopelícula de *E. faecalis*. Micrografía preparada por Shen Dong y Katie Ballering de la Universidad de Minnesota (Dunny *et al.*, 2014).

En el proceso de infección, las biopelículas que forman algunas cepas de enterococos, los protege contra el sistema inmunológico del hospedero favoreciendo la infección. En *E. faecium* solo se han identificado tres genes relacionados con su virulencia, el gen *acm* (adhesina de colágeno de *E. faecium*), *ebpfm* (genes encargados de la síntesis de los pili) y el operón *esp* (relacionado con la expresión de biopelículas que favorecen la adhesión y la virulencia) (Dunny *et al.*, 2014).

3. Resistencia a antibióticos

El Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC) y el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), describieron las categorías de resistencia para los principales patógenos nosocomiales:

multifármaco resistente (MDR), resistencia extendida (XDR) y pandrogo resistencia (PDR) (Magiorakos *et al.*, 2012). Las definiciones de cada una de las categorías de resistencia son descritas a continuación:

1. **Multifármaco resistente o MDR:** resistencia a por lo menos un agente antibiótico de tres o más categorías de antimicrobianos.
2. **Resistencia extendida o XDR:** resistente a por lo menos un agente antibiótico de todas las categorías de antimicrobianos, excepto en 2 o menos.
3. **Pandrogo resistencia o PDR:** resistente a todos los antibióticos de todas las categorías de antimicrobianos.

Las cepas de *Enterococcus* spp. que son resistentes a vancomicina (VRE), generalmente suelen ser resistentes a otros antimicrobianos, es decir, suelen ser MDR. El primer reporte de *Enterococcus* spp. VRE fue en 1980 y desde entonces la bacteria ha mostrado una alta capacidad de MDR (Gilmore y *et al.*, 2013). De manera general, se ha reportado a *Enterococcus* spp. como una bacteria resistente a diversos antibióticos, tales como: cefalosporina, lincomicina, cotrimoxazol, a bajos niveles de penicilina y aminoglucósidos, así como, la capacidad de adquirir resistencia a la vancomicina, cloranfenicol, tetraciclinas, y aminoglicósidos (alto nivel). La resistencia a vancomicina es debido a la adquisición de mutaciones, adquisición de plásmidos y transposones (Feizabadi *et al.*, 2008; Gilmore *et al.*, 2013 & Mira *et al.*, 2014).

La resistencia a vancomicina descrito en *Enterococcus* spp. está asociada a nueve tipos de genes (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN* y *vanC*), este último ha sido identificado únicamente en *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* que son resistentes a bajas concentraciones de vancomicina (Nasaj y col *et al.*, 2016). Los genes, *vanA* y *vanB* son los más frecuentes, siendo el *vanA* el más predominante.

3.1. Mecanismo de resistencia a antibióticos

De manera general, *Enterococcus* spp. por medio de mutaciones y genes exógenos, puede adquirir resistencia a diversos antimicrobianos. Frecuentemente, la resistencia la obtienen

a través de la conjugación en respuesta a feromonas, llevándose a cabo la transferencia de plásmidos y transposones. Existen diversos mecanismos de resistencia, dependiendo también del antibiótico, por ejemplo, en *E. faecium* la resistencia a la ampicilina ocurre por la síntesis de la proteína-5 de unión a la penicilina (PBP5), la cual tiene una baja afinidad a los beta-lactámicos (Figura 4). La resistencia a estreptomicina y gentamicina se debe a mutaciones en el ribosoma y a la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, provocando alteraciones en los sitios blanco de unión (Figura 4). La resistencia a la vancomicina, es debido a la reducción de la afinidad en los sitios de unión al antibiótico; el cual, altera la síntesis del peptidoglicano. La resistencia a estreptogramina, quinopristina-dalfopristina (Q-D), incluye la modificación, inactivación y expulsión del fármaco por medio de la virginamicina acetiltransferasa (Vat), de la virginamicina B liasa (Vgb), y de la proteína macrólido unida al ATP junto con la proteína de resistencia a estreptogramina (MsrC), respectivamente. La resistencia a oxazolidinona linezolid no es muy frecuente, pero la vía principal ocurre por una mutación en el sitio de unión a la subunidad 23-S ribosomal (Arias & Murray, 2012).

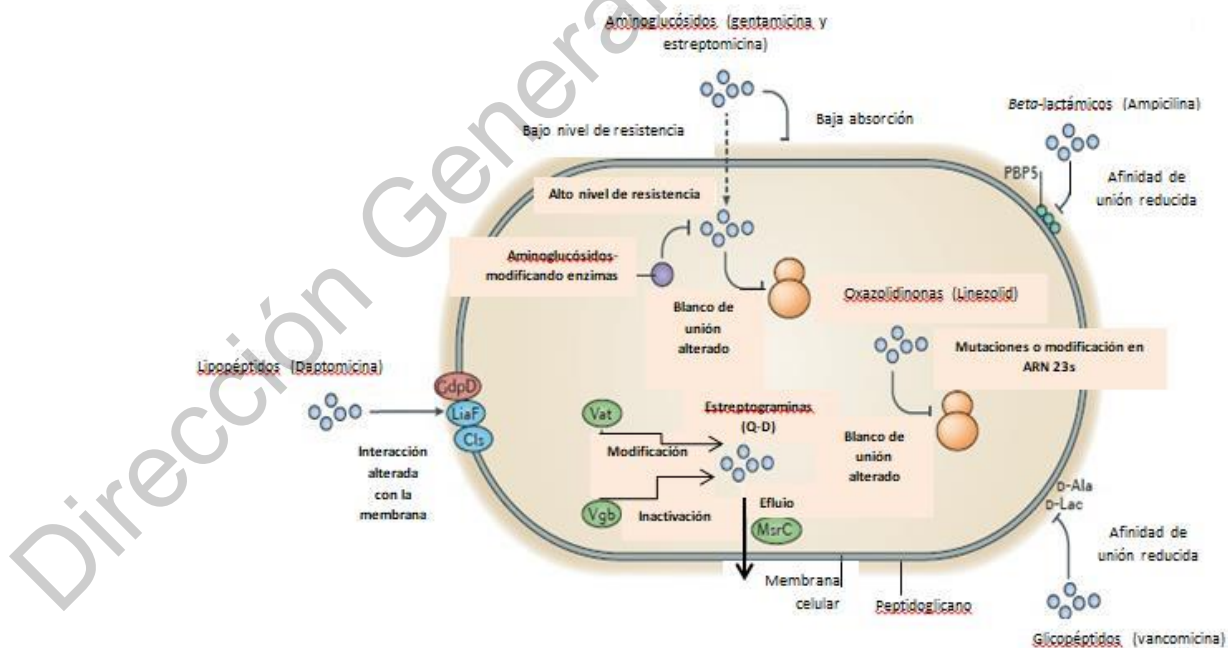


Figura 4. Mecanismos de resistencia a antibióticos de *Enterococcus spp.* (Modificada de Arias & Murray, 2012).

3.1.1. Mecanismo de resistencia a Glucopéptidos

La resistencia a glucopéptidos está mediada por los genes *Van*, siendo los genotipos *vanA* y *vanB* los más frecuentes en cepas hospitalarias de *Enterococcus* spp. Estos genes se encargan de codificar diversas proteínas (enzimas) que favorecen la resistencia a la vancomicina, las bacterias con el gen *vanA* suelen ser resistentes tanto a la vancomicina como a la teicoplanina, y las que presentan el gen *vanB*, solo a la vancomicina (Figura 5).

Los genotipos *vanA* y *vanB*, están localizados en un cluster (operón) y consisten en 7 marcos de lectura abierta y codifican para 7 enzimas. En el caso del genotipo *VanA*, los 7 marcos de lectura abierta se nombran como *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanY* y *vanZ*. Para el genotipo *vanB* son nombrados como *vanR_B*, *vanS_B*, *vanY_B*, *vanW_B*, *vanH_B*, *vanB* y *vanX_B* (Figura 5) (Kristich *et al.*, 2014).

La activación de éstos grupos de genes es dado por enzimas cinasas. En las bacterias con genotipo *vanA*, las cinasas sensoras (*vanS*) están ancladas a un receptor transmembranal; el cual, es una secuencia corta de aminoácidos con un bucle corto que conecta a dos hélices transmembranales del receptor (Mascio, Alder y Silverman, 2007). Una vez que el antibiótico (vancomicina o teicoplanina) se une al receptor, las enzimas cinasas fosforilan la histidina del lado citoplasmático de la célula (Figura 5), activando las proteínas sensoras cinasas (*vanS* y *vanR*) dimerizando *vanR*, la cual activará cada uno de los dos promotores. Posteriormente, se llevará a cabo la transcripción de los genes para la síntesis de las siete enzimas que participaran en la modificación del péptido terminal D-Ala-D-Ala a D-Ala-D-Lac o D-Ala-D-Ser (Kristich *et al.*, 2014).

Las enzimas que se codifican en éstos siete genes son: las peptidasas (*vanX*) que es una dipeptidasa que escinde D-Ala-D-Ala, la deshidrogenasa que convierte el piruvato en lactato (*vanH*), la ligasa que forma el dipéptido D-Ala-D-Lac (*vanA*), y la D-D-Carboxipeptidasa (*vanY*) que degrada los precursores producidos por las bacterias; sin embargo, aún no se conocen las funciones de los genes *vanZ* (Kristich *et al.*, 2014)..

Respecto al genotipo *vanB*, su receptor extracelular es más grande y comprende un dominio extracelular (ED) (Figura 5) que probablemente está plegado de manera independiente para el reconocimiento de señales afines y solo se activa con la vancomicina. Del mismo modo que con *vanA*, una vez que el antibiótico (vancomicina) se une al receptor, las enzimas cinasas fosforilan la histidina siguiendo un proceso similar al que sucede con *vanA* (Figura 5).

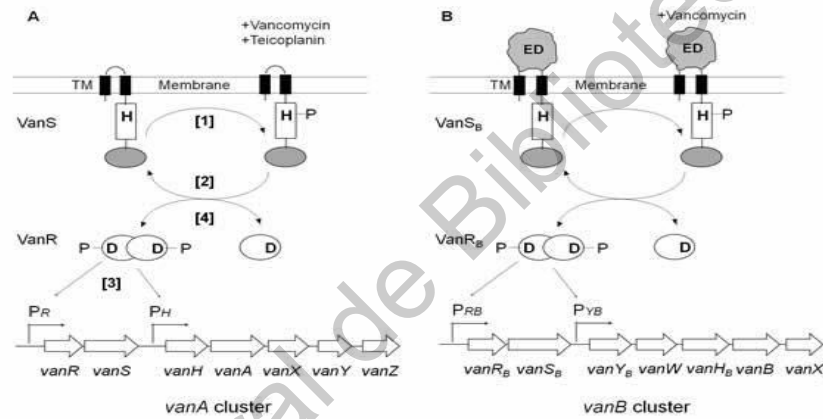


Figura 5. Clusters de los genotipos *vanA* y *vanB*. Imagen adaptada de Arthur & Quintiliani, Jr. (2001) y citada por Gilmore y col. (2014).

4. Factores de virulencia

Los principales genes de virulencia en *E. faecium* son *esp* y *hyl*; los cuales, facilitan la capacidad de prevalencia de este microorganismo y su diseminación en hospitales (Nasaj *et al.*, 2016). En la tabla 3, se muestran otros factores de virulencia de *Enterococcus spp.* y *E. faecium* (Arias & Murray, 2012).

Tabla 3. Factores de virulencia en *Enterococcus spp.* Datos tomados y modificados de Arias & Murray (2012).

Factores de virulencia	Posible función
Factores de secreción	
<p>Cyl (Citolisina-Hemolisina).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Hemolisina-citolisina (Cyl) codificada por el gen <i>cyl</i>, es una toxina y es producida por el 30% de los <i>E. faecalis</i>. Esta toxina es codificada en plásmidos sensibles a feromonas (pAD1) e incrementan la virulencia de <i>E. faecalis</i>, produciendo una reacción β-hemolítica que promueve la lisis de los glóbulos rojos en los seres humanos. Además, presenta una actividad bactericida contra otras bacterias Gram positivas (Yamanaka <i>et al.</i>, 2014). - Tiene una función en la endoftalmitis. - Está asociada con la lisis de células de la retina, de neutrófilos polimorfonucleares y de macrófagos.
<p>GelE (Gelatinasa).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Es una metaloproteasa dependiente de zinc codificada por el gen <i>gelE</i>. La enzima es secretada al medio extracelular y es capaz de degradar la gelatina, la caseína, la hemoglobina y ciertos péptidos bioactivos (feromonas quimiotácticas de <i>E. faecalis</i>); los cuales, promueven la llegada de los neutrófilos a los tejidos colonizados (Yamanaka <i>et al.</i>, 2014). - Contribuye activando la enzima autolisina, que se encarga de la degradación del peptidoglicano, de la liberación del ADN al medio extracelular y de la formación del biofilm (Yamanaka <i>et al.</i>, 2014).

	<ul style="list-style-type: none"> - Participa en la endoftalmitis, endocarditis y peritonitis, y en el movimiento a través de las células epiteliales intestinales (Panesso <i>et al.</i>, 2010).
Factores de la superficie celular	
Proteínas AS o AGG (Sustancia de agregación).	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína de superficie que forma parte de un plásmido inducible por feromonas (<i>paD</i>) y es codificada por el gen <i>agg</i>. Forma agregados bacterianos para promover la transferencia del plásmido e incrementar la capacidad invasiva de las cepas patógenas (Yamanaka <i>et al.</i>, 2014). - Los receptores de AGG en las células humanas son las integrinas $\beta 2$, localizados en la superficie de numerosos leucocitos, de las células epiteliales y endoteliales (Yamanaka <i>et al.</i>, 2014). - Favorecen la sobrevivencia y la transferencia en neutrófilos. - Participan en la endocarditis.
Espfm (Proteína de superficie enterococal de <i>E. faecium</i>).	<ul style="list-style-type: none"> - Proteína de superficie de los enterococos y es codificada por el gen <i>esp</i>. - Es un polipéptido con dominios repetitivos muy conservados y ha sido detectado en aislamientos clínicos. - El N-terminal de esta proteína tiene un péptido señal, que podría estar relacionado con la formación de biofilm. El C-terminal tiene un dominio de anclaje al peptidoglicano (Willems <i>et al.</i>, 2001). - Está relacionada a infecciones en vías urinarias y endocarditis.

<p>Ace/Acm (Adhesina del colágeno).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ace es una adhesina codificada por el gen <i>ace</i> en <i>E. faecalis</i>, participa en la unión al colágeno tipo I, colágeno tipo IV, laminina y dentina (Yamanaka <i>et al.</i>, 2014). - La proteína es importante en las primeras etapas de la infección (Yamanaka <i>et al.</i>, 2014). - Tiene una función esencial en la endocarditis e infecciones de vías urinarias
<p>Proteínas Ebpfm (Endocarditis y biofilm-asociados a pilis en <i>E. faecium</i>).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de pili - Infecciones en vías urinarias y endocarditis - Formación de biofilm
<p>Epa cluster (Antígeno polisacárido enterococal).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Formación de biofilm - Translocación a través de células epiteliales intestinales - Función en peritonitis e infecciones de vías urinarias
<p>Glicolipido DGLcDGA (Alfa-diglicosil diacilglicerol).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Función en bacteremia - Formación de biofilm - Adherencia a células epiteliales intestinales
<p>Otros factores</p>	
<p>Megaplásmidos (gen <i>hylfm</i> y otros posibles genes).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - El gen <i>hylfm</i> codifica para una hialuronidasa enterocócica y es considerada un factor de virulencia potencial en aislados clínicos del CC17); sin embargo, la actividad hialuronidasa en algunas ocasiones, no ha sido detectada en cepas de Enterococos que portan estos genes (Laverde <i>et al.</i>, 2011; Arias <i>et al.</i>, 2009). - El gen <i>hyl</i> es más frecuente en cepas VREfm que en cepas susceptibles a la vancomicina y no ha sido

	<p>detectado en aislados no hospitalarios de <i>E. faecium</i> (Arias <i>et al.</i>, 2009).</p> <ul style="list-style-type: none"> - En <i>E. faecium</i> provoca la colonización del tracto gastrointestinal del ratón. - Tiene una función en la peritonitis.
<p>Gls20 y Gls33 (Proteínas de respuesta al estrés).</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Participa en la peritonitis

5. Epidemiología

5.1. Epidemiología de *Enterococcus faecium* a nivel mundial

Como se ha observado, *Enterococcus* tiene una gran capacidad de adquirir resistencia a antibióticos así como adquirir factores de virulencia que le ayudan a sobrevivir a condiciones adversas. Este tipo de estudios son importantes junto con los estudios de prevalencia de esta bacteria y de caracterización genética para determinar las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas, pudiendo de este modo realizar una asociación entre las cepas pertenecientes a un mismo complejo clonal y por lo tanto, con su capacidad de virulencia y resistencia a los antibióticos. Es por ello que resulta importante conocer los estudios previos de este microorganismo a nivel mundial, nacional y local.

La mayoría de los estudios sobre *Enterococcus faecium* a nivel mundial, han sido en relación a su resistencia antimicrobiana. *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a vancomicina fueron descritos por primera vez en 1988, y desde entonces se han convertido en unos de los principales patógenos nosocomiales, sin embargo, en Latinoamérica su prevalencia ha sido baja (menos del 2%) (Rodríguez *et al.*, 2014).

De acuerdo con Mandigan y col. (2009), alrededor del 5% de los enfermos admitidos en un hospital adquieren infecciones nosocomiales, y menciona que cada año cerca de 1.7

millones de infecciones hospitalarias en E.U. causan directa o indirectamente 99,000 muertes.

En la India en el año 2013, Bhardwaj y col. realizaron un estudio sobre la caracterización fenotípica y resistencia a diversos fármacos de *E. faecium* y *E. faecalis* de diferentes hospitales, donde las cepas aisladas de *E. faecium* mostraron una resistencia entre el 52.4 y el 100% a diversos antimicrobianos (penicilina, ampicilina, gentamicina, kanamicina y estreptomicina), sin embargo no se observaron cepas resistentes a vancomicina. Además estos autores mencionan que los principales factores de riesgo para la adquisición de resistencia antimicrobiana son:

- a) El uso indiscriminado de antibióticos
- b) Prolongada permanencia en hospitales
- c) La severidad de la enfermedad que se esté padeciendo
- d) Y la inmunosupresión

Los *Enterococcus spp.* son bacterias de importancia etiológica en hospitales, pudiendo ocasionar infecciones graves principalmente a pacientes inmunodeprimidos, pacientes en cuidados intensivos que son sometidos a operaciones o que son cateterizados, así como en pacientes con tratamientos antimicrobianos. Aunque se consideran normalmente microorganismos comensales, pueden convertirse en patógenos ante ciertas circunstancias como las descritas anteriormente, además de su gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y su capacidad de adquirir resistencia a antibióticos. El VREfm se ha convertido en uno de los microorganismos más importantes, los cuales adquieren su resistencia a múltiples antimicrobianos a través de los genes *van*. Dichos genes provocan modificaciones en la capa de peptidoglicanos de su pared celular de tal forma que pierden afinidad a la vancomicina. Los dos genes más frecuentes son el *vanA* (resistencia a vancomicina y teicoplanina) y el *vanB* (resistencia a vancomicina) (Arias & Murray, 2008, 2012).

También de acuerdo con Arias y Murray (2012), la mayoría de los aislamientos clínicos de *Enterococcus spp.* resistentes a la vancomicina están constituidos por *E. faecium* (Arias & Murray, 2012). Recientemente a través de los análisis de caracterización genética se identificaron subpoblaciones de *E. faecium*, la subpoblación conocida como clado 'hospitalario' (un clado es una agrupación que comparte un antepasado común) se diferencia del clado 'comunitario' por haber adquirido la capacidad de diseminarse con mayor virulencia en humanos y hospitales (Galloway *et al.*, 2009). Los estudios genéticos predicen que esta división evolutiva (entre clados hospitalario y comunitario) ocurrió ancestralmente a través de miembros del clado hospitalario (previamente denominado complejo 'clonal' 17 [CC17]) que portaban con frecuencia la secuencia de inserción IS16 y el gen de resistencia a ampicilina *pbp5R*, así como islas de capacidad patógena, plásmidos o genes asociados con resistencia a antibióticos, colonización y virulencia (De Been *et al.*, 2013).

En Taiwan han incrementado de manera significativa los casos de bacteremia debido a *E. faecium* resistente a vancomicina. Debido a ello en el año 2012 se realizó una investigación para revelar las características epidemiológicas asociadas por medio de las técnicas de PFGE y MLST, así como la susceptibilidad antimicrobiana. De 134 aislamientos colectados en 12 hospitales en Taiwan, sólo dos llevaban los genes *vanB* y el resto tuvieron un genotipo *vanA* y la tipificación molecular reveló 58 pulsotipos (patrones de bandas de ADN específicos, obtenidos por la técnica de PFGE) y 13 secuencias tipo (ST) de las cuales tres pertenecían a los linajes más frecuentes: 17, 18 y 78 (Kuo *et al.*, 2014).

Por otro lado, en un hospital de Irán en 600 muestras obtenidas de diferentes salas de Unidades de Cuidados Intensivos, en 42% de las mismas, se identificó a *E. faecalis* y en 58% a *E. faecium*, éstos últimos resistentes a vancomicina en un 64.5%; en cuanto al análisis de la relación filogenética de 44 VREfm por medio de la PFGE, se revelaron 31 pulsotipos de los cuales 10 incluían patrones comunes y 21 mostraron patrones únicos. Todos tuvieron un genotipo *vanA* y mostraron una elevada resistencia a teicoplanina, ampicilina, eritromicina, ciprofloxacino y gentamicina (Arshadi *et al.*, 2017).

En otro estudio en Irán, se identificó a *E. faecium* en un 63.3% de muestras clínicas, todos los aislamientos mostraron resistencia a vancomicina y el 90% tuvieron un genotipo *vanA* y solo el 10% *vanB*, se encontró además resistencia a rifampicina (100%), teicoplanina (90%), linezolid (46.67%), quinupristina/dalfopristina (100%) y daptomicina (66.67%). Se identificaron 16 pulsotipos con la técnica de PFGE (Jahansepas *et al.*, 2018).

En Hungría, se llevó a cabo la caracterización de *E. faecium* resistente a vancomicina en 43 aislamientos clínicos, de los cuales 40 tuvieron el genotipo *vanB* y 3 el genotipo *vanA*, 100% mostraron resistencia a la ampicilina y al ciprofloxacino y el 81.4% fueron resistentes a la gentamicina. Con la técnica de PFGE se obtuvieron 9 pulsotipos y todos pertenecieron al complejo clonal 17 (CC17) (Franyó *et al.*, 2018). También de acuerdo con éste autor, la frecuencia de infecciones VREfm en Australia es alta, en donde el 36.5% de aislamientos de casos de bacteremia debido a *E. faecium* fueron resistente a la vancomicina; y en E.U. en aislamientos de infecciones nosocomiales también mostraron el 87% de resistencia a este antibiótico. En otro estudio en éste país, se identificaron 13 pulsotipos pertenecientes a las secuencias tipo ST17, ST18, ST80, ST117 Y ST203, las cuales se sabe que forman parte de clados adaptados a hospitales, la investigación se llevó a cabo en diferentes instituciones de salud en Hungría durante los años 2012 y 2014; el porcentaje de resistencia a vancomicina entre los aislamientos de *E. faecium* en éste país responsables de infecciones invasivas, fue de 0.8% en el 2011 y en el 2014 alcanzó al 8.5% (Melegh *et al.*, 2018).

En Australia a principios del año 2012 se descubrió una nueva cepa de *E. faecium* resistente a vancomicina, con secuencia tipo ST796 aislada de manera simultánea de diferentes hospitales separados geográficamente en el sureste de Australia y Nueva Zelanda, este descubrimiento indica la capacidad de los linajes de *E. faecium* de adaptarse a nuevas condiciones hospitalarias generando así nuevas cepas mejor adaptadas a hospitales (Buultjens *et al.*, 2017).

En China, un análisis sobre la diversidad de clones resistentes a vancomicina de *E. faecium* realizado en diferentes hospitales (por medio de las técnicas de PFGE y MLST), reveló un total de 96 cepas, de las cuales se identificaron 38 pulsotipos (PFGE) y las secuencias tipo predominantes fueron la ST78, mientras que las ST17, ST341 y ST342 fueron esporádicamente identificadas. *E. faecium* ST78 con el genotipo *vanA* fue el clon más predominante (Yang et al., 2016).

En un hospital universitario de Barcelona, España, se llevó a cabo la investigación de un brote por *E. faecium* resistente a vancomicina en una unidad de trasplante renal durante un periodo de 6 meses (Agosto 2012 a Enero 2013), en donde se aislaron cepas VREfm de 13 pacientes, todos fueron casos de colonización, las cepas fueron multiresistentes y presentaban el gen *vanA* y pertenecían a la ST17. Después de la implementación de medidas de control de infección estrictas tanto en los pacientes como en el medio ambiente circundante (limpieza del ambiente y equipo médico), no volvieron a ocurrir casos en el año posterior (Herrera et al., 2016).

En una revisión bibliográfica realizada por Freitas y col. (2016), sobre brotes en diferentes hospitales entre los años 1986-2012 ocasionados por *E. faecium* resistente a vancomicina, se encontraron un total de 53 con genotipo *vanA* y 18 con genotipo *vanB* en 27 países y 5 continentes, los cuales pertenecieron a las secuencias tipo ST17, ST18 y ST78 identificadas por medio de la técnica de MLST.

5.2. Estudios sobre *Enterococcus faecium* en México

La resistencia a los antibióticos ha ido en aumento y se ha convertido en un problema de salud mundial; debido a ello, existen más estudios relacionados a éste fenómeno en México, a diferencia de estudios de caracterización genética. La adquisición de resistencia antimicrobiana es constante porque forma parte del mecanismo de defensa de las bacterias que se encuentran bajo presión selectiva ante los mismos (Rodríguez et al., 2014). En base a estos autores, la investigación sobre la susceptibilidad antimicrobiana en México se

centró en el estudio de las infecciones gastrointestinales, en el estudio de los mecanismos de resistencia de aislamientos clínicos, así como de casos endémicos o de patógenos persistentes, brotes de enfermedad, y en la investigación de la resistencia de aislamientos relacionados con padecimientos de las vías respiratorias en el caso de las infecciones comunitarias. Estos investigadores, llevaron a cabo una revisión bibliográfica sobre la susceptibilidad antimicrobiana en México durante el periodo de 1973 al 2013, en donde reportan el descubrimiento de *Enterococcus* spp. en el año de 1996 con una elevada resistencia a gentamicina (entre 1990 y 1992), así como la resistencia a ampicilina en 59% de los aislamientos de *E. faecium*. En el 2007, se reportó la resistencia a vancomicina en *E. faecium* y en *E. faecalis*.

En la Ciudad de México, de manera general, durante el periodo de mayo 2004 - abril 2005, la tasa de resistencia a la vancomicina fue de 0.27 %, sin embargo en mayo del 2005 se aisló a VREfm por primera vez en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Ciudad de México). Posterior a ello en los siguientes 12 meses la tasa de resistencia a vancomicina incrementó 23 veces de 0.27% a 6.23%. En esta Institución por lo tanto, se llevó a cabo una investigación durante mayo del 2005 - abril 2006, en donde se realizó la detección de los genotipos *vanA* y *vanB* por medio de la PCR, se determinó la resistencia a la vancomicina y los aislamientos bacterianos fueron caracterizados por medio de la técnica de PFGE. *Enterococcus* resistente a vancomicina fue aislado de 27 pacientes, de los cuales 59.1% fueron recuperados del abdomen (abscesos, ascitis y heridas quirúrgica), 29.6% del tracto urinario, 7.4% de la sangre, 7.4% de tejido blando y 3.7% de hueso. En este estudio, todos los *E. faecium* aislados tuvieron un nivel alto de resistencia a la vancomicina (≥ 256 $\mu\text{g/mL}$) así como fueron resistentes a teicoplanina y el 96.3 % presentaron el genotipo *vanA*. En cuanto a la caracterización por PFGE, el análisis mostró varios pulsotipos; sin embargo, 18 de 26 aislamientos (1 aislamiento no pudo ser caracterizado) tuvieron ≤ 3 de diferencias en las bandas o fragmentos de restricción lo que sugiere una relación filogenética entre ellos con una similitud $\geq 80\%$ (Cuellar *et al.*, 2007).

En el año 2013, Reina Bautista E. y col. analizaron el perfil fenotípico de *Enterococcus faecium* y *E. faecalis* de muestras obtenidas de sangre, líquido cefalorraquídeo y líquido peritoneal de pacientes considerados con infección asociada a la atención de la salud, (también conocidas como nosocomiales) debido a *Enterococcus*. El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Pediatría en la Ciudad de México. Se obtuvieron un total de 73 muestras durante el periodo de septiembre de 2010 a enero de 2012 y se obtuvieron datos de los pacientes para determinar cuáles correspondían a infecciones intrahospitalarias. Las especies encontradas fueron *Enterococcus faecalis* 49 % (n=36), *Enterococcus faecium* 45% (n=33) y otros en un 6 % (n=4). Los cuales fueron aislados de sangre en 75.3 % (n=55) en donde el 38 % correspondían a *E. faecium*; de líquido cefalorraquídeo fueron 13.7 % (n=10) de los cuales 60 % correspondían a *E. faecium*. Las muestras de líquido peritoneal correspondieron a 11% (n=8) y 75 % a *E. faecium*.

Gutiérrez Manjarrez F. A. y col. (2010), reportaron un caso de meningitis aguda ocasionada por *E. faecium* resistente a vancomicina, a pesar de no ser considerado un patógeno habitual de este tipo de infecciones, por lo que no debe ser descartado en el diagnóstico de la misma.

En un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México (Instituto Nacional de Pediatría) durante el periodo de enero a diciembre del 2016, se obtuvieron 149 cultivos de los cuales el 31.5% pertenecieron a *E. faecium*, quienes tuvieron una resistencia muy alta a la ampicilina, penicilina y vancomicina, así como también una resistencia alta a la quinupristina y dalfopristina. También se encontró una asociación entre VREfm y algunas comorbilidades como alteraciones inmunológicas, neurológicas, metabólicas y renales (Arredondo *et al.*, 2018).

Del mismo modo, en 47 centros de salud pertenecientes a 20 Estados de la República Mexicana, muestras colectadas durante un periodo de 6 meses (del primero de enero al 30 de junio del 2018) fueron analizadas para el aislamiento de patógenos de importancia epidemiológica en el país. En donde *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina fue aislado en un 21% de las muestras. De acuerdo con esta investigación, ésta bacteria suele

aislarse de manera común en los hospitales considerados en este estudio (Garza *et al.*, 2019).

También se ha investigado el comportamiento de ésta bacteria en pacientes con cáncer. En un estudio se analizaron hemocultivos de pacientes con neoplasias hematológicas y tumores sólidos durante el periodo de 2005 al 2015, en donde se aisló a *E. faecium* en un 2.1%, de los cuales el 31.5% fueron VREfm. De manera general el aislamiento de cepas ESKAPE fue mayor en los pacientes con neoplasias hematológicas que en aquellos con tumores sólidos (Velázquez *et al.*, 2018). Por otro lado, Alatorre y col. (2016), investigaron la presencia de *E. faecium* en sangre de pacientes con neoplasias hematológicas durante el periodo de enero 2008 a diciembre de 2012, en donde se aisló un 60.3% de *E. faecium* sensible a vancomicina y un 39.7% con resistencia a la misma, sin embargo, la mayor mortalidad en los pacientes fue debido a VREfm. Las infecciones por VREfm se asociaron al uso de antibióticos, principalmente por el uso de vancomicina durante los tres meses previos al estudio. En ésta investigación, también se llevó a cabo un análisis filogenético por medio de la técnica de PFGE, con el cual se mostró la existencia de un brote policlonal, es decir, que los VREfm aislados no pertenecían a un solo clon, sino que fueron diseminándose diferentes clones de manera independiente.

Pocos estudios de caracterización genética se han realizado en México, la mayoría han sido efectuados por medio de la técnica de PFGE (Cuellar *et al.*, 2007; Alatorre *et al.*, 2016 - ya descritos previamente-, y el de Castillo-Rojas *et al.*, 2013 & Bocanegra *et al.*, 2015;). Bocanegra y col. (2015), aislaron 56 VREfm de dos hospitales de atención terciaria en México durante el periodo de 2011 a 2014, a los cuales se les determinó la susceptibilidad antimicrobiana, la producción de biofilm y se analizó la relación clonal por medio de la técnica de PFGE. Los 56 aislamientos tuvieron una resistencia muy alta a la vancomicina y teicoplanina, así como a otros antibióticos como la norfloxacin, eritromicina, estreptomina, y una resistencia baja a tetraciclina, quinupristina-dalfopristina y nitrofurantoína. Todos presentaron el genotipo *vanA* y fue en esta investigación en donde se reportó por primera vez en el continente americano, el aislamiento de dos cepas con

fenotipo VanB-genotipo *vanA*. Con la técnica de PFGE se identificaron 37 pulsotipos y 6 clones, uno de los cuales fue identificado en 5 diferentes salas de un mismo hospital durante un muestreo de 14 meses. Por otro lado, Castillo-Rojas y col. (2013), aislaron 121 *Enterococcus* de muestras de agua subterránea, agua de Xochimilco, agua tratada del área metropolitana de la Ciudad de México y de muestras clínicas. Con el análisis por PFGE, se observó que las muestras obtenidas de las diferentes fuentes de agua fueron genéticamente diferentes a las muestras clínicas, además de que éstas últimas mostraron una mayor resistencia a antibióticos.

El único estudio en México, en el que se ha investigado a *E. faecium* tanto por la técnica de PFGE como por la de MLST, es uno que fue realizado por Ochoa y col. en el año 2013, en donde doce cepas clínicas de *E. faecium* fueron aisladas de pacientes pediátricos del hospital infantil de México Federico Gómez, de los cuales 58.3 % fueron recuperados de orina, y 41.7 % de la sangre. 100 % de los aislamientos fueron resistentes a ciprofloxacino, ampicilina, amoxicilina-clavulanato, clindamicina, cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina, rifampicina, eritromicina, y teicoplanina, 16 % a linezolid y 66 % a tetraciclina y doxiciclina. El análisis de PCR reveló la presencia de los genes *vanA* en los doce aislamientos siendo el gen *esp* el más abundante con un porcentaje de 83.3 % (10 de 12) y el gen *hyl* con un porcentaje del 50 % (6 de 12). El análisis epidemiológico identificó una relación del 44 % entre las cepas resistentes a vancomicina aisladas en éste estudio (por medio de la técnica de PFGE) así como se identificaron las secuencias tipo: ST412, ST757, ST203, y ST612, a través de la técnica de MLST. La resistencia a antibióticos y la virulencia ofrecen ventajas de colonización a las bacterias que lo adquieren. Esta investigación es el primer reporte sobre cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina pertenecientes al complejo clonal 17 (CC17) en un centro de atención terciaria en México. El genoma de *E. faecium*, es muy flexible, mostrando gran capacidad para adquirir genes de resistencia al medio ambiente, genes de virulencia y colonización, favoreciendo así la selección de complejos clonales específicos para un ambiente hospitalario. Por lo tanto es fundamental el control de la propagación de las infecciones nosocomiales por *Enterococcus*

faecium resistente a vancomicina, para prevenir que siga expandiéndose de la manera en cómo lo está haciendo actualmente (Ochoa *et al.*, 2013).

5.3. Estudios sobre *Enterococcus faecium* en Querétaro

Algunos estudios que se han efectuado sobre *Enterococcus* spp. en Querétaro, son los realizados por Leo Amador y col. (2011) quienes llevaron a cabo un estudio del aislamiento de *Enterococcus* spp. de pacientes del Hospital General 1 (IMSS) durante el periodo: diciembre, 2008 – abril, 2010 (tanto de infecciones como de colonizaciones) resultando un total de 51 cepas positivas, siendo *E. faecalis* y *E. faecium* las cepas más predominantes (28 y 20 cepas respectivamente). Las fuentes clínicas más comunes fueron: líquido de diálisis peritoneal, heridas quirúrgicas, infecciones del tracto urinario, líquido cefalorraquídeo, venas centrales, huesos y secreciones oftálmicas. Las cepas de *E. faecium* fueron analizadas con diferentes pruebas de sensibilidad a antibióticos, los resultados mostraron una alta resistencia a gentamicina y estreptomina (70%), fluoroquinolonas (65%), quinupristina / dalfopristina (40%), nitrofurantoína (35%), y linezolid (35%). Además se encontraron 12 cepas con resistencia a vancomicina (9 totalmente resistentes y 3 con resistencia intermedia); todas las cepas exhibieron genotipos *vanA* y *vanB*.

Otros estudios realizados en Querétaro, consistieron en analizar los patrones de resistencia a diversos antimicrobianos (De los Santos Aguilar *et al.*, 2015) y los factores de riesgo a la infección y colonización en una unidad de neonatología (Ortega Ramírez *et al.*, 2015). En el primer estudio, se aislaron 74 cepas de *Enterococcus* resistente a vancomicina de origen nosocomial, de los cuales 64 aislamientos, fueron de *E. faecium*, siendo el 91% multi-fármaco resistentes. Sin embargo, todo ello se llevó a cabo únicamente en un hospital, por lo que hace falta realizar más investigación en otros hospitales así como en diferentes áreas o servicios de los mismos. En el segundo estudio, no se encontraron reportes de infección por VREfm, las muestras obtenidas (132 muestras) por hisopado rectal fueron colonizantes; 65 aislamientos fueron positivos para VREfm. La especie que predominó fue *Enterococcus faecium* y el genotipo *vanA* (Ortega Ramírez *et al.*, 2015).

Como se puede advertir, los estudios realizados en Querétaro han sido en relación a la prevalencia de este microorganismo en algunos hospitales de la Ciudad, así como a la sensibilidad y resistencia antimicrobiana y la identificación de los genotipos de resistencia *van* o algunos determinantes de virulencia; pero en cuanto a estudios de tipificación molecular y la búsqueda de relaciones epidemiológicas, no se ha realizado ningún tipo de investigación al respecto. Por lo tanto, este proyecto es el primer estudio de caracterización genética realizado en Querétaro en donde se utilizan éste tipo de técnicas moleculares como la de PFGE y MLST y el segundo en México en utilizar la técnica de MLST después del estudio de Ochoa y col. (2013), descrito en el apartado anterior.

III. HIPÓTESIS

Los aislamientos de cepas multifármaco-resistentes (MDR) de *E. faecium* recuperados de hospitales públicos de la Ciudad de Querétaro, son cepas relacionadas filogenéticamente y pertenecen al CC17.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Tipificar molecularmente los aislamientos MDR de *E. faecium* obtenidos en hospitales públicos de la Ciudad de Querétaro.

Objetivos específicos

1. Caracterizar genéticamente los aislamientos de *E. faecium* MDR por medio de la técnica estandarizada de PFGE.
2. Caracterizar genéticamente los aislamientos de *E. faecium* MDR por medio de la técnica estandarizada de MLST.
3. Determinar la relación filogenética entre los aislamientos de *E. faecium* MDR obtenidos de hospitales públicos.

V. METODOLOGÍA

1. Diseño experimental

Estudio descriptivo transversal observacional.

1.1. Definición del universo

Se aisló *E. faecium* MDR del cepario perteneciente al laboratorio de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.

1.2. Tamaño de la muestra

Fue un muestreo por conveniencia (basado en los recursos económicos) de los aislamientos existentes del cepario del laboratorio de enfermedades infecciosas y microbiología clínica (LEIMC), obtenidos desde noviembre del 2014 hasta febrero del 2017 procedentes de dos hospitales públicos de la Ciudad de Querétaro.

El presupuesto disponible alcanzó para el análisis de 25 aislamientos con la técnica de PFGE. Y para el análisis de 10 aislamientos con la técnica de MLST.

1.3. Criterios de inclusión

Se incluyeron todos los aislamientos de *E. faecium* MDR de origen hospitalario, tanto infectantes como colonizantes.

1.4. Criterios de eliminación

Los aislamientos contaminados que ya no pudieron ser purificados.

1.5. Definición de las variables y unidades de medida

Las cuatro variables que se consideraron en éste proyecto fueron: el perfil de MDR, los perfiles de PFGE, las secuencias tipo (ST) y el hospital de origen. Todas las variables son cualitativas y nominal policotómicas (excepto el hospital de origen, que es nominal dicotómica). La tabla completa de variables se muestra en el apartado de anexos (tabla 3).

1.5.1. Definición de las variables

MDR: Resistencia a por lo menos un agente antimicrobiano de tres o más categorías (Magiorakos *et al.*, 2012). Se efectuó la clasificación de los perfiles o patrones de

resistencia, basada en los criterios de la CDC (centro de control de enfermedades, por sus siglas en inglés) (Magiorakos *et al.*, 2012).

Perfiles PFGE: Se definieron de acuerdo a un porcentaje de similitud mayor al 80%, esto con base a los resultados obtenidos en el dendrograma por medio del coeficiente DICE y el algoritmo UPGMA.

Secuencia tipo (ST): Se obtuvieron con base al perfil alélico obtenido por medio de la técnica de MLST. En este caso, el perfil alélico se refiere al conjunto de números de alelos adquiridos de los 7 genes analizados (7 números de alelos en total [uno por cada gen]). Se analizaron los perfiles alélicos en la base de datos : <http://pubmlst.org/efaecium/> (desarrollada por Jolley *et al.*, 2018).

Hospital de origen: Hospital en donde se obtuvieron las muestras, las cuales fueron adquiridas de dos hospitales públicos de la Ciudad de Querétaro.

1.6. Selección de los aislamientos de estudio

Se analizaron aislamientos de *E. faecium* previamente identificados y que forman parte del cepario del laboratorio de enfermedades infecciosas y microbiología clínica de la Facultad de Medicina, UAQ. Las bacterias de *E. faecium* se encuentran conservadas en Litmus-Milk y glicerol al 15% a una temperatura de -35°C.

De estos aislamientos, se seleccionaron aquellos que cumplieran con un perfil de MDR con base a los perfiles de resistencia identificados previamente.

La selección basada en los perfiles de resistencia a antibióticos (ejemplos de perfiles identificados en el LEIMC, se muestran en la tabla 4), fue una selección representativa con base al porcentaje de aislamientos obtenidos para cada perfil.

Los aislamientos seleccionados de este modo, fueron caracterizados genéticamente a través de la técnica molecular de PFGE, y posteriormente se realizó una nueva selección, basada en los resultados de PFGE para la caracterización por MLST.

Tabla 4. Perfiles de resistencia antimicrobiana (Benavides *et al.*, 2017).

PRes	No. CAm	Am	Es	Fl	Gp	L	O	P	Eg	T	GL	No. De aislamiento	%
A	8	X	X	X	X		X	X	X	X		2	5
B	7	X	X	X	X	X		X	X			3	8
C	7	X		X	X		X	X	X	X		1	3
D	6	X	X	X	X			X	X			12	31
E	6	X		X	X	X		X	X			3	8
F	6	X		X	X		X	X	X			1	3
G	5	X		X	X			X	X			14	36
H	4	X		X	X			X				3	8

Am=Aminoglucósidos, **Es**=Estreptomina, **Fl**=Fluoroquinolonas, **Gp**=Glucopéptidos, **L**=Lipopéptidos, **O**=Oxazolidionas **P**=Penicilinas **Eg**=Estreptogaminas, **T**=Tetraciclinas, **GL**=Gliciliclinas. [**Patrón de Resistencia (PRes), Número de Categorías Antimicrobianas (CAm)**].

1.7. Caracterización molecular.

1.7.1. Técnica de PFGE.

Una vez seleccionados los aislamientos, se procedió a su caracterización molecular a través de la técnica de PFGE (los fundamentos de la técnica se muestran en anexos).

El protocolo que se siguió fue el de la técnica estandarizada y utilizada en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (Ochoa *et al.*, 2013). El procedimiento fue el siguiente:

1. Crecimiento bacteriano en agar BHI (Infusión Cerebro y Corazón).

Los aislamientos seleccionados fueron sembrados en placas de agar BHI (Infusión, cerebro y corazón) y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

2. Lisis celular y extracción de ADN

2.1. Se tomó una asada muy pequeña del desarrollo microbiano de *E. faecium* del agar BHI y se inoculó en la solución de suspensión (tabla 4- ver anexos) hasta la obtención de un densidad óptica (DO) de 0.8 a 1 en la escala de McFarlan.

2.1.1. Se centrifugó y eliminó el sobrenadante, lavando tres veces con la solución de suspensión y decantando el sobrenadante.

2.1.2. Al botón bacteriano se le agregaron 5 µl de mutanolisina (10 U/ µl), 15 µl de lisozima (2 mg/ml) y se completó con 180 µl con la solución de suspensión.

2.1.3. Se prepararon 10 ml de agarosa de bajo punto de fusión o LMP (promega) al 2% con buffer TE, conservándola a 45°C en baño seco.

2.1.4. Se agregaron 200 µl de agarosa LMP a cada uno de los tubos (que contenían la suspensión bacteriana con las mutanolisina y la lisozima) y se mezcló por pipeteo cinco veces.

2.1.5. Para la preparación de los bloques de agarosa o plugs, se utilizó una placa molde con pocitos, la cual fue sellada con cinta por la parte baja y se transfirieron 100 µl en cada molde o pocito (de la suspensión anterior) para preparar cada bloque. Esto se realizó por triplicado para cada cepa.

2.1.6. La placa molde previamente inoculada, fue refrigerada a 4°C durante 15 minutos para lograr la solidificación de los bloques.

2.1.7. Se removieron los bloques colocándolos en un tubo de 15 ml, el cual contenía 2 ml de la solución de lisis (ver tabla 5 en anexos) y se incubaron durante 24 horas a 37°C con agitación ligera.

2.1.8. Se removió la solución de lisis con una pipeta de plástico (evitando el daño del bloque).

2.1.9. Posteriormente se agregaron 2 ml de la solución de desproteización (tabla 6, ver anexos) y se dejó incubar a 50°C toda la noche en un baño seco.

3. Lavado de bloques y digestión enzimática.

3.1.1. Se dejaron enfriar los bloques a temperatura ambiente.

3.1.2. Se lavaron dos veces con 2 ml de agua estéril e incubaron a 50°C (en baño seco) durante 30 minutos para cada lavado. Posteriormente se lavaron dos veces más con 2 ml de solución TE (Tris 10 Mm y EDTA 1 mM) incubando 30 minutos a 25°C.

3.1.3. Se cortó el bloque en tres partes iguales y 2 partes fueron colocadas en un tubo de 1.5 ml.

3.1.4. Después se agregó a cada tubo (que contenía las dos partes del bloque) 100 µl de la solución de restricción (*smal* con 20 U) y se dejaron incubar a 30°C por cuatro horas mínimo o durante toda la noche.

Para cada reacción de 100 µl se mezclaron:

- 10 µl de buffer especial para la enzima *smal*
- 3.12 µl de enzima *smal*
- 86.8 µl de agua

4. Electroforesis.

4.1.1. Se preparó el gel de agarosa grado PFGE al 1.2% con solución TBE al 0.5X.

4.1.2. Se tomó uno de los bloques del tubo en solución de restricción, con cuidado de no dañarlo y por medio de un trozo de papel se le absorbió (por capilaridad) la solución de restricción.

4.1.3. Posteriormente se colocó en el molde para el gel, y así con cada uno de los bloques, colocándolos uno por uno a una distancia relativamente constante entre uno y otro. También se coloraron dos bloques del marcador del peso molecular (fago lambda λ), uno al inicio y otro al final del resto de los bloques.

- 4.1.4. Se posicionó el gel dentro de la cámara de PFGE y se agregaron dos litros de solución TBE 0.5X y se encendió el módulo de enfriamiento con recirculación. Se seleccionaron los parámetros o condiciones correspondientes y una vez que el buffer llegó a una temperatura de 14°C, se empezó el corrimiento.
- 4.1.5. Condiciones de corrimiento:
- 200 V (6 V/cm)
 - Temperatura del buffer de 14°C
 - Pulso inicial 5 seg.
 - Pulso final 35 seg.
 - Tiempo de corrida de 22 horas en CHEF-DRIII (Bio-rad).

5. Revelado y análisis del gel

- 5.1.1. Se sacó el gel de la cámara y fue depositado en una solución de GelRed (a una concentración 3X), durante 30 minutos.
- 5.1.2. Posteriormente el gel fue observado y analizado en el fotodocumentador (Gel DocTM EZ imager de Bio-Rad) bajo luz ultravioleta.
- 5.1.3. Para el análisis de las bandas del ADN en el gel, se utilizó el Software NTsys.versión.2.0 por medio del cual se obtuvo un dendrograma que nos mostró la relación filogenética entre los diferentes aislamientos de *E. faecium*.

1.7.2. Técnica de MLST

Con esta técnica se amplificaron 7 genes conservados o housekeeping por medio de la PCR. Se llevó a cabo el diseño de un par de oligonucleótidos (forward y reverse) para cada gen. El ADN amplificado fue analizado y observado a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Una vez obtenidos los amplicones de cada gen, fueron purificados y enviados a secuenciar a la empresa MacroGen. En la figura 6, se muestra el procedimiento general que se siguió para la caracterización de *E. faecium* con ésta técnica (en anexos se explican los fundamentos de MLST).

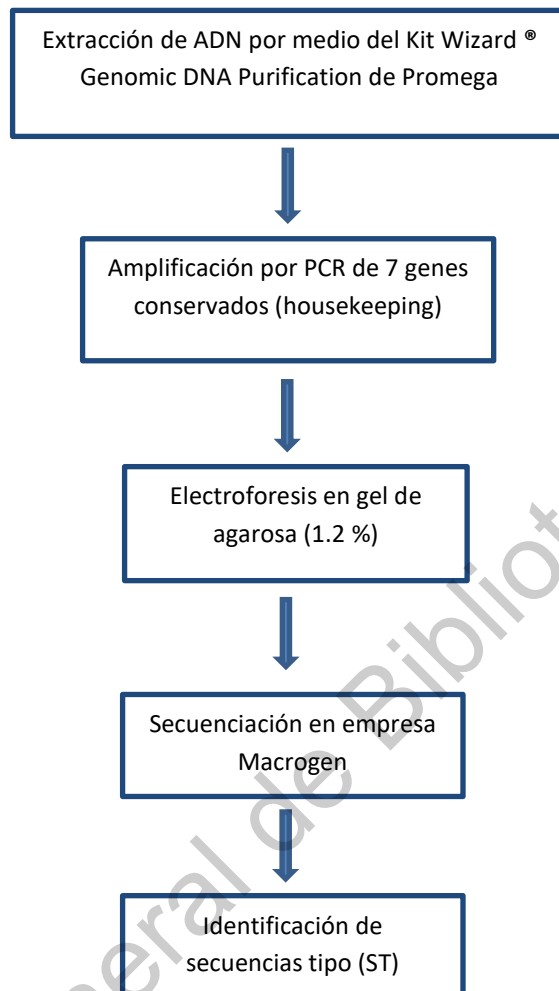


Figura 6. Caracterización molecular de *E. faecium* por medio de la técnica de MLST.

1. Genes conservados o housekeeping

Los siete genes conservados que se amplificaron e identificaron con esta técnica se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Genes conservados y oligonucleótidos para la caracterización genética de *Enterococcus spp.* (Homan *et al.*, 2002). Indicando la longitud de los amplicones y las secuencias de los iniciadores utilizados.

Gen	Nombre	Longitud de la secuencia (pb)	Oligonucleótidos
<i>adk</i>	Adenilato quinasa	437	adk1 , 5-TAT GAA CCT CAT TTT AAT GGG-3 adk2 , 5-GTT GAC TGC CAA ACG ATT TT-3
<i>atpA</i>	ATP sintasa, subunidad alfa	556	atpA1 , 5-CGG TTC ATA CGG AAT GGC ACA-3 atpA2 , 5-AAG TTC ACG ATA AGC CAC GG-3
<i>ddl</i>	D-alanina:D- alanina ligasa	465	ddl1 , 5-GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G-3 ddl2 , 5-AAA AAG AAA TCG CAC CG-3
<i>gyd</i>	Gliceraldehido-3- fosfato deshidrogenasa	395	gyd1 , 5-CAA ACT GCT TAG CTC CAA TGG C-3 gyd2 , 5-CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC-3
<i>gdh</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	530	gdh1 , 5-GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT-3 gdh2 , 5-CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA-3

<i>purk</i>	Subunidad ATPasa de fosforibosilamino imidazol carboxilasa	492	purk1 , 5-GCA GAT TGG CAC ATT GAA AGT-3 purk2 , 5-TAC ATA AAT CCC CCT GTT TY-3
<i>psts</i>	Transportador del casete de unión de ATP-fosfato	583	psts1 , 5-TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G-3 psts2 , 5-CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC-3

2. PCR

Los componentes de la mezcla de reacción de la PCR y sus concentraciones, se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción y sus concentraciones para la PCR.

Reactivo	Concentración final
Agua inyectable	-----
Master Mix (Radiant™ GC-Long Hot-Start 2X):	1X
2X- Buffer de PCR	1X
6 mM- MgCl ₂	3 mM
2 mM-dNTPs mix	1 mM
<i>Taq</i> polimerasa	1U
10 μM de oligonucleótido Foward	2.5 μM
10 μM de oligonucleótido Reverse	2.5 μM
ADN	100 ng

Estas condiciones fueron comunes a todos los genes, con excepción de los genes *purk* y *gyd*. En el caso del gen *purk*, la concentración del oligonucleótido antisentido fue de 5 μM . El oligo *purk* antisentido, es un oligo “degenerado”, es decir, que el último nucleótido de su secuencia puede ser una T o una C, debido a ello es que se decidió incrementar al doble su concentración.

Respecto a los oligos forward y reverse utilizados en la amplificación del gen *gyd*, fue necesario ajustar las concentraciones de los oligos en la reacción, para lo cual se realizó una matriz, en la que se determinó que las concentraciones óptimas de amplificación fueron de 1.25 μM y de 5 μM , respectivamente.

Las condiciones del termociclador se muestran en la tabla 7, y las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos, en la tabla 8.

Tabla 7. Condiciones utilizadas en el termociclador para la PCR.

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	35
Alineamiento de los oligos	Variable de acuerdo al gen	30 segundos	35
Extensión	72°C	30 segundos	35
Extensión final	72°C	5 minutos	1

Las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos, también fueron diferentes en la mayoría de los genes en un rango de 47 a 60°C. Los genes *atpA*, *ddl* y *gdh* amplificaron a una temperatura de alineamiento de 55°C (tabla 8).

Tabla 8. Temperaturas de alineamiento de los oligos utilizados para la técnica de MLST.

Gen	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>adk</i>	50
<i>atpA</i>	55
<i>ddl</i>	55
<i>gdh</i>	55
<i>gyd</i>	49
<i>psts</i>	60
<i>purk</i>	47

3. Electroforesis

Los productos de la PCR, se analizaron mediante una electroforesis convencional en gel de agarosa al 1.2% (IBI Scientific, Peosta, Iowa, EE.UU), utilizando el buffer de electroforesis SB 1X.

El marcador molecular utilizado fue el de HyperLadder™ 100 pb (Bioline). Las reacciones de PCR se mezclaron con el buffer de carga que contenía el colorante de ácidos nucleicos Gel Red (1:1500), en una proporción 3:10 (de reacción/buffer). La electroforesis se realizó durante 30 min a 110 V, en la cámara de electroforesis (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU). Los geles fueron revelados y analizados con el sistema de Fotodocumentación (Gel Doc™ EZ imager de Bio-Rad).

4. Secuenciación

Los productos obtenidos de la PCR se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen Inc., empresa Coreana que se encarga de realizar la secuenciación automatizada en capilar o secuenciación tipo Sanger.

1.7.3. Análisis de resultados y relación filogenética

Para el análisis de los resultados obtenidos por medio de la técnica de PFGE, se utilizó el programa de NTsys.versión.2.0, utilizando el coeficiente DICE y el algoritmo UPGMA con el cual se obtuvo un dendrograma que nos mostró la relación filogenética entre los diferentes aislamientos de *E. faecium*. Los aislamientos se consideraron relacionados filogenéticamente si obtuvieron un porcentaje de similitud igual o mayor al 80%.

En cuanto a los resultados de la técnica de MLST, ya una vez que se obtuvo la secuenciación a través de la empresa de Macrogen, se analizaron las secuencias en la base de datos: <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018), para la identificación de los alelos de cada gen y posterior determinación de los ST correspondientes.

Una vez obtenidas las STs, se llevó a cabo un análisis con los algoritmos e-BURST (<https://pubmlst.org/efaecium/> -Jolley *et al.*, 2018-) y goeBURST-1.2.1 (<http://www.phyloviz.net/goeburst/> -desarrollado por Francisco *et al.*, 2009-) para determinar la relación con los complejos clonales y STs reportados en el resto del mundo.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. RESULTADOS.

Los patrones de resistencia obtenidos de los aislamientos de *E. faecium* en tres periodos de muestreo, y que sirvieron para hacer la selección de los aislamientos para posterior análisis, se observan en la tabla 9.

Tabla 9. Patrones de resistencia (**PRes**) a las categorías antimicrobianas (**CAm**).

PRes	CAm	Aislam	Categorías antimicrobianas										PFGE	MLST
			A	Em	F	G	O	P	Eg	Te	Li	GI		
2014-15														
I	9	4	X	X	X	X	X	X	X	X	X		2	1
II	8	1	X	X	X	X	X	X	X		X			
III	8	1	X	X		X	X	X	X	X	X		1	1
IV	7	3	X	X	X	X		X		X	X		2	2
V	7	1	X	X	X	X	X	X			X		1	
VI	6	3	X	X	X	X		X			X		6	1
		4												
VII	5	1	X	X	X	X		X					1	
		5												
2015-16														
VIII	7	3	X	X	X	X		X	X		X		2	1
IX	6	1	X	X	X	X		X	X				2	
		2												
X	6	3	X		X	X		X	X		X		3	1
XI	6	1	X		X	X	X	X	X				1	
XII	4	3	X	X	X	X							1	
2016-17														
XIII	8	2	X	X	X	X	X	X	X	X			2	2
XIV	7	1	X		X	X	X	X	X	X			1	1

Aminoglucósidos (**A**), Estreptomina (**Em**) Fluoroquinolonas (**F**) Glucopéptidos (**G**) Oxazolidinonas (**O**)
 Penicilinas (**P**) Estreptograminas (**Eg**) Tetraciclinas (**Te**) Lipopéptidos (**Li**) Gliciliclinas (**GI**).

Todos los aislamientos estudiados en los tres periodos de tiempo, tuvieron un genotipo *vanA*. A partir de los patrones de resistencia se seleccionaron 25 aislamientos representativos para ser analizados con la técnica de PFGE (tabla 9, columna PFGE). De esos 25 aislamientos se seleccionaron 10 para su caracterización por MLST (tabla 9, columna MLST).

1.1. Resultados PFGE

Como se mencionó en la metodología, el análisis filogenético fue realizado con el coeficiente DICE, utilizando el algoritmo UPGMA como método de agrupamiento. Además, el dendrograma (figura 7) fue evaluado con la prueba Mantel, la cual dio como resultado, el coeficiente de correlación cofenético con un valor de $r = 0.99501$.

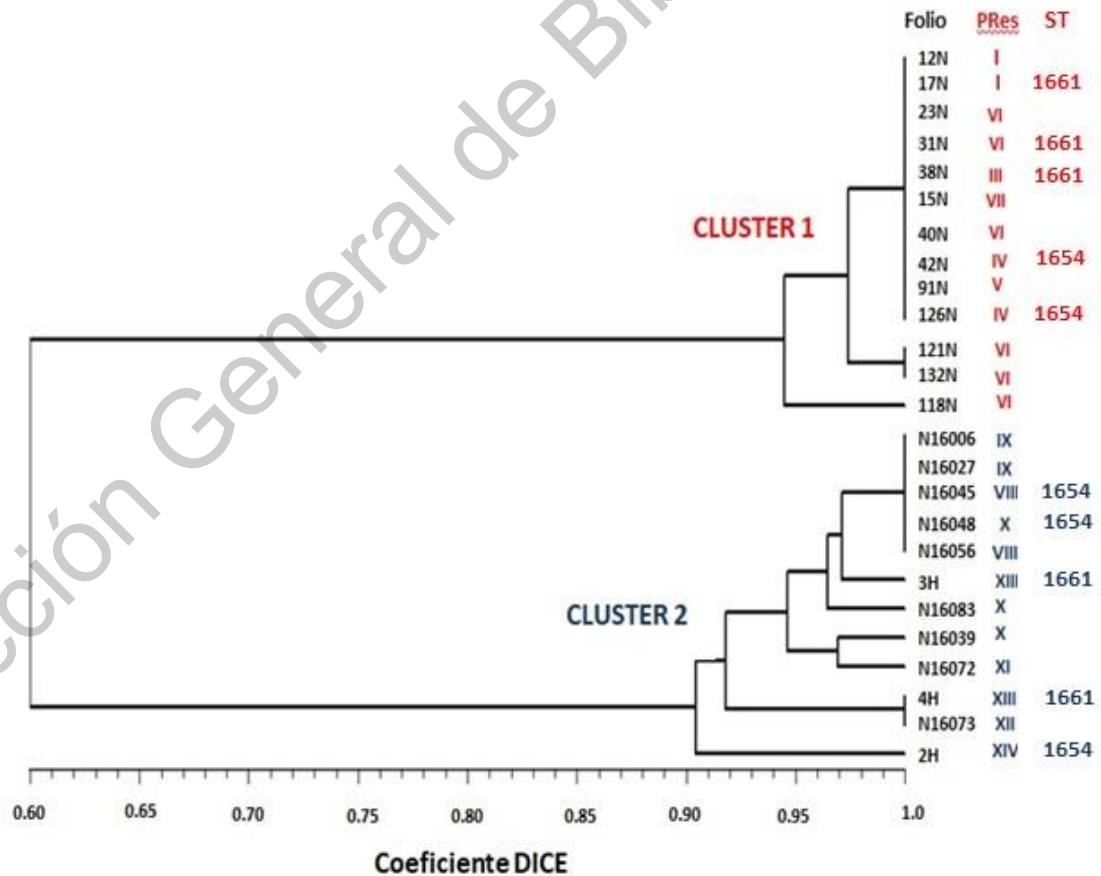


Figura 7. Análisis de PFGE de 25 aislamientos representativos de *E. faecium*. En la imagen se muestra el folio de la muestra, los patrones de MDR (PRes) y la ST.

El cluster 1, conformado por 13 aislamientos colonizantes (figura 7) obtenidos durante el primer periodo de muestreo (2014-15), tuvieron una similitud mayor al 94%. Dentro de este cluster se obtuvo un subgrupo con 10 aislamientos, los cuales tuvieron una similitud del 100% en el patrón de bandas de ADN.

El segundo cluster, está conformado por 9 aislamientos colonizantes obtenidos en el segundo periodo de muestreo (2015-16), y por 3 aislamientos infectantes (2H, 3H y 4H) de un segundo hospital, durante el periodo de 2016-17. Todos los aislamientos de este cluster tuvieron una similitud mayor al 90%. También en éste cluster, se pudo identificar un subgrupo con 5 aislamientos que presentaron una similitud del 100%.

1.2. Resultados MLST

Se lograron estandarizar las condiciones óptimas para la amplificación de los 7 genes conservados. Los componentes de la mezcla de reacción y las condiciones del termociclador utilizados para la PCR, se muestran en la metodología en las tablas 6 y 7, respectivamente. Del mismo modo, las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos, son mostradas en la tabla 8.

En la figura 8 se muestran los amplicones obtenidos de los genes *gdh* y *psts*. Para el caso de los genes *atpA* (fig. 9), *gyd* y *purk*, al no conseguir un amplicón único, fue necesario hacer el corte de la banda de interés para su purificación posterior a partir del gel (fig. 10).

La purificación del gel fue llevada a cabo con el kit de purificación Isolate II PCR and Gel column (de Bioline), para posteriormente ser secuenciadas.

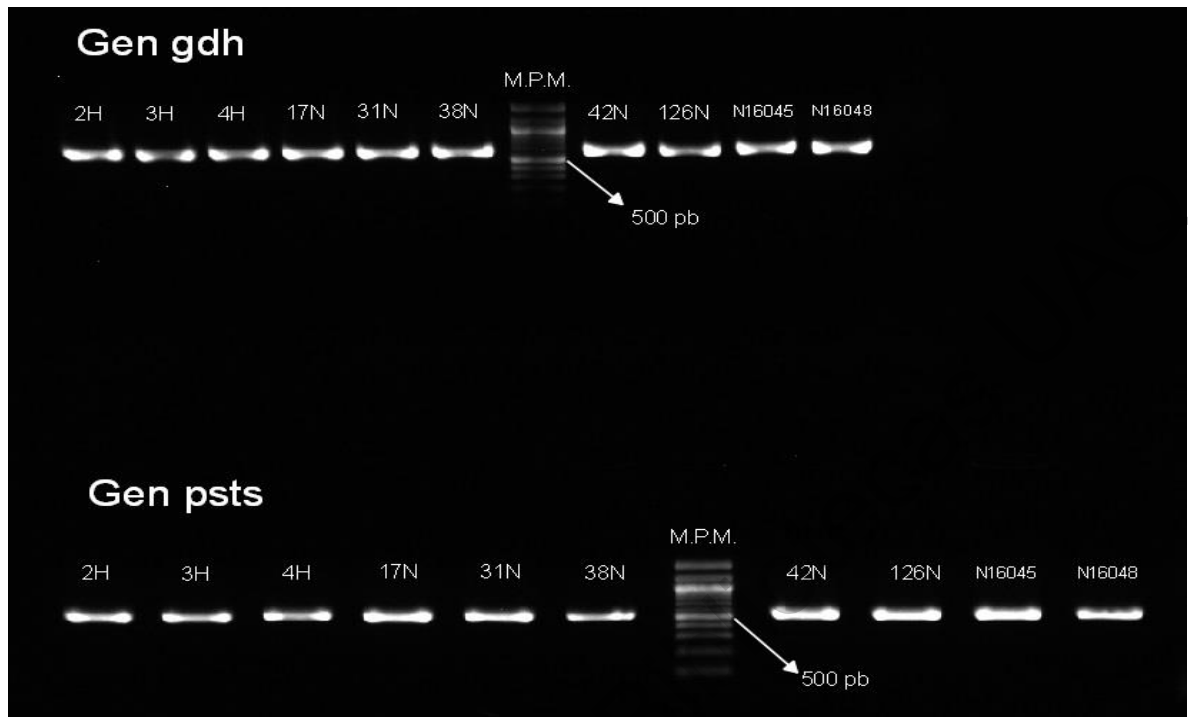


Figura 8. Amplificación por PCR de los genes *gdh* y *psts* en diez aislamientos de *E. faecium*.

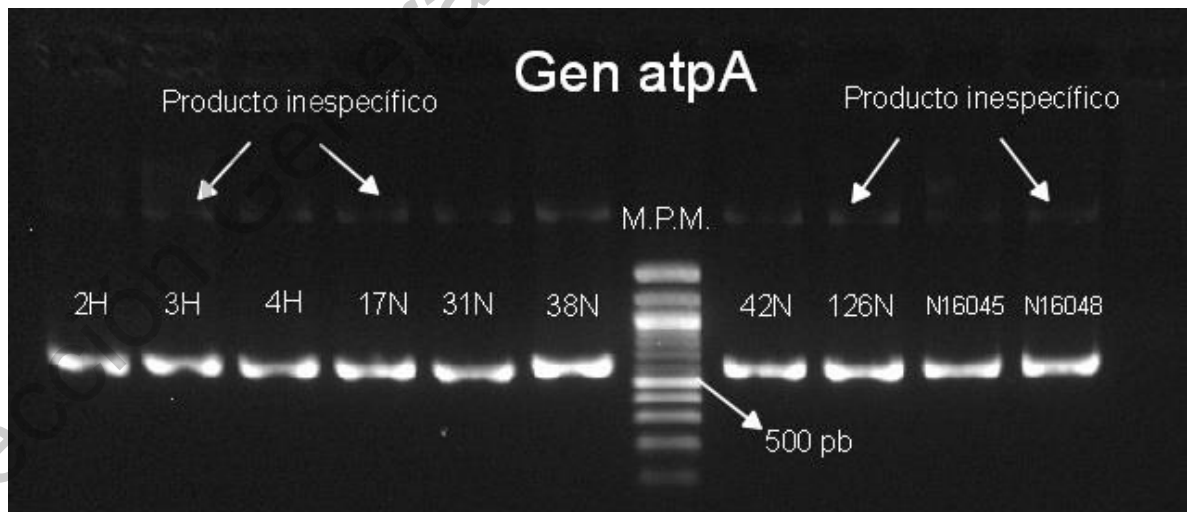


Figura 9. Amplificación por PCR del gen *atpA* en diez aislamientos de *E. faecium*. En la imagen se puede observar un producto inespecífico.

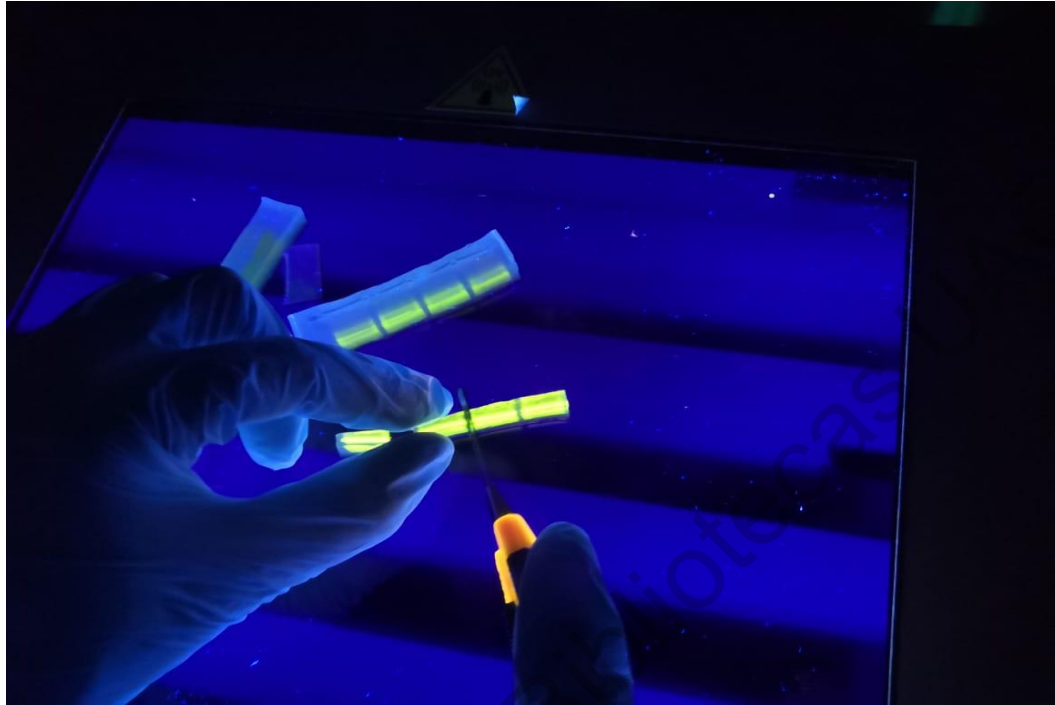


Figura 10. Bandas de ADN en gel de agarosa bajo la exposición de luz UV.

1.2.1. Número de alelos.

Como se explicó previamente, se amplificaron por PCR, 7 genes para cada cepa o aislamiento. Una vez que se obtuvieron las secuencias de cada uno, se les hizo un blast en la página de <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018). De dicho blast, el programa nos arroja un número de alelo, por lo tanto se obtiene un número para cada gen y el conjunto de esos 7 números de alelos se les conoce como perfil alélico. Los números se van asignando de acuerdo a los polimorfismos presentes en cada secuencia de ADN analizada. Por lo tanto, de la combinación de los siete números (o de cada perfil alélico) se obtiene la ST, las cuales están registradas también en la página de <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018).

De los diez aislamientos que fueron analizados para la técnica de MLST, se obtuvieron dos perfiles alélicos, los cuales se muestran en la tabla 10. Cada grupo es señalado con un color diferente.

Tabla 10. Número de identificación del alelo y de la ST correspondiente, obtenidos para cada gen, en los aislamientos analizados por medio de la técnica de MLST.

No. de Aislam.	<i>atpA</i>	<i>ddl</i>	<i>gdh</i>	<i>purk</i>	<i>gyd</i>	<i>psts</i>	<i>adk</i>	ST
17N	9	92	1	1	12	123	1	1661
31N	9	92	1	1	12	123	1	1661
38N	9	92	1	1	12	123	1	1661
42N-B	7	92	1	1	1	84	5	1654
126N	7	92	1	1	1	84	5	1654
N16045	7	92	1	1	1	84	5	1654
N16048	7	92	1	1	1	84	5	1654
2H	7	92	1	1	1	84	5	1654
3H	9	92	1	1	12	123	1	1661
4H	9	92	1	1	12	123	1	1661

Cada uno de esos perfiles alélicos, está conformado por alelos previamente descritos en la base de datos de la página de <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018), sin embargo, las combinaciones de alelos en cada perfil son únicas, es decir, que dichas combinaciones no habían sido previamente registradas, por lo que son dos nuevas ST. Los números de STs que les fue asignado a cada uno de los perfiles alélicos, son la ST1654 y la ST1661 (tabla 10).

También en la tabla 10 se puede observar, que en el caso de los genes *ddl*, *gdh* y *purk* se obtuvo el mismo número de alelo en todas las cepas (números 92, 1 y 1, respectivamente).

1.2.2. Análisis con los algoritmos e-BURST y goeBURST-1.2.1.

Para encontrar la relación de las ST1654 y la ST1661 con los complejos clonales reportados, se realizó un análisis con el algoritmo e-BURST de la base de datos de <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018), en donde se analizaron las STs obtenidas en este proyecto a través del alelo 1-purk, el cual está presente en un total de 547 STs.

Se utilizó la definición de grupo asignada por default: n-2, donde “n” es el número de locus o alelos, es decir, que en un esquema de MLST con 7 locus o alelos, se generará una representación gráfica que incluya grupos con STs que se relacionan con 5 o más locus con cualquier otro miembro del grupo. Por lo tanto, al utilizar la definición de grupo n-2, ambas STs (ST1654 y ST1661) aparecen en el diagrama (figura 11) en donde los miembros principales del CC17 están presentes, lo cual significa que están asociadas a este complejo clonal. Las STs dentro de los círculos rojos muestran relaciones con variantes de un solo locus (SLV, por sus siglas en inglés) y las del círculo azul de doble locus (DLV, por sus siglas en inglés), esto quiere decir, que solo presentan una o dos diferencias entre sus alelos respecto a la STs más cercanas a ellas.

Con el algoritmo e-BURST, la ST1661 se relaciona con la ST80 que forma parte de las co-fundadoras del CC17 y con la ST117 (fig. 11). La ST1654 se observa cercana a la ST17 sin embargo, en éste último caso, no se aprecia un enlace específico con ninguna ST, quizás debido a la saturación de STs en el círculo azul que rodea a la ST17.

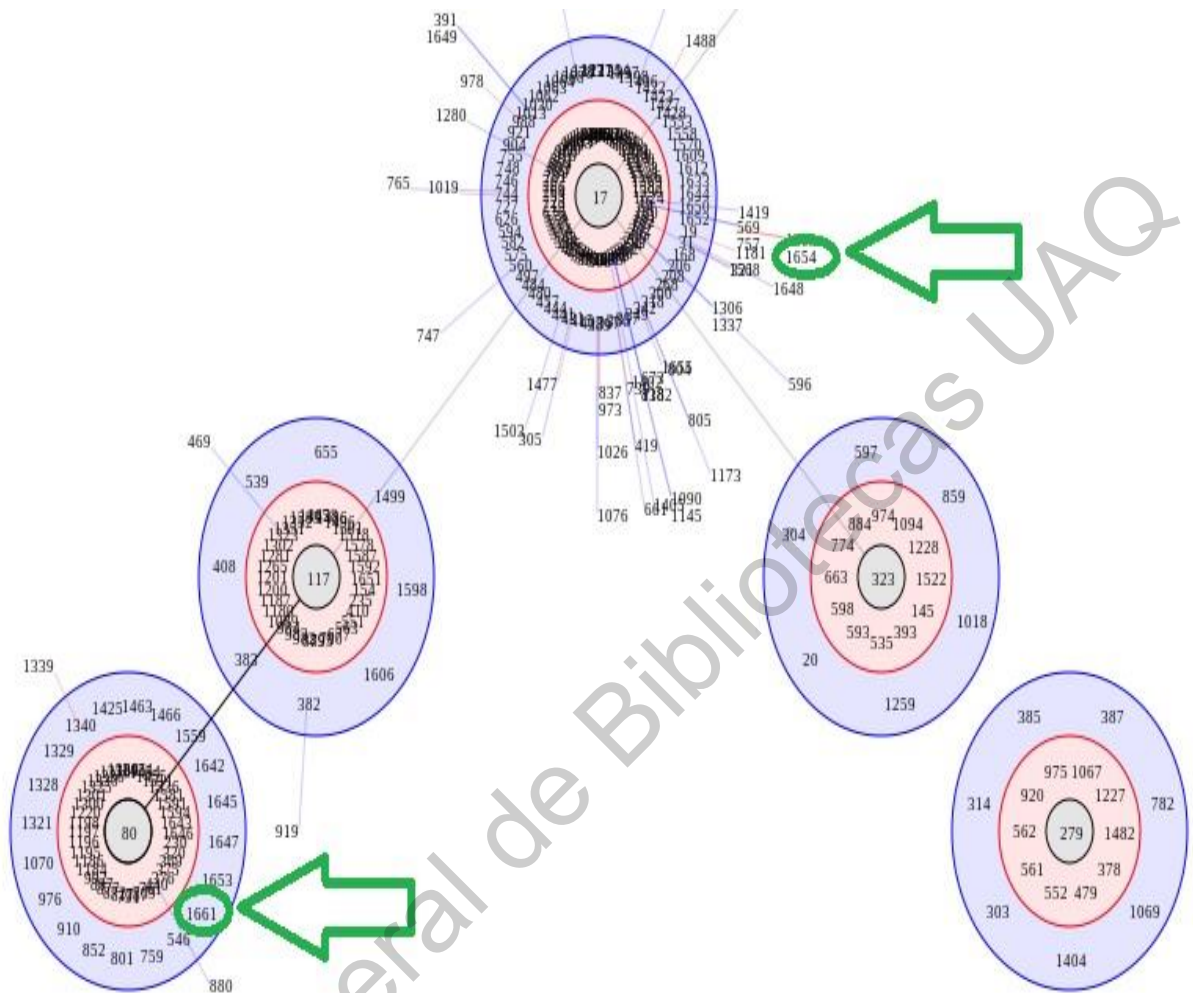


Figura 11. Relación de las ST1654 y ST1661 con el CC17 por medio del algoritmo e-BURST (base de datos de <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018).

Con la finalidad de corroborar los resultados obtenidos con e-BURST y para obtener un gráfico más claro, también se llevó a cabo el análisis con el algoritmo goeBURST-1.2.1 (<http://www.phyloviz.net/goeburst/> -Francisco *et al.*, 2009-), programa, en el que, a diferencia del e-BURST, se seleccionan las STs con las que se desea hacer el análisis.

En éste análisis se consideraron las principales STs pertenecientes al CC17, así como las STs que comparten alelos pocos comunes con las STs de este proyecto (por ejemplo, 92-ddl, 123 y 84-psts) incluyendo un total de 117 STs para el análisis que se realizó con el

2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Enterococcus faecium resistente a vancomicina (VREfm), se ha relacionado con casos de colonización e infección en hospitales de todo el mundo (Tedim & Ruiz-Garbajosa, 2016; van Hal *et al.*, 2016; Willems *et al.*, 2005). Además, VREfm ha desarrollado una multi-resistencia a antibióticos, y las cepas adaptadas a hospitales, particularmente las pertenecientes al CC17, tienen mayor posibilidad de sobrevivir en estos ambientes hospitalarios y producir factores de virulencia bajo determinadas condiciones ecológicas, lo cual podría favorecer la colonización e infección en las personas susceptibles (Willems *et al.*, 2005). Debido a lo anterior y al incremento de su prevalencia, sigue siendo un problema grave de salud a nivel mundial, por lo tanto, es muy importante continuar investigando a esta bacteria para poder así tomar las medidas pertinentes para su prevención y control.

En éste proyecto, se analizó una selección de aislamientos de *E. faecium* MDR que habían sido obtenidos de estudios previos. Los primeros 22 aislamientos corresponden a un estudio cuyo objetivo fue la identificación de cepas de *Enterococcus faecium* colonizantes intestinales y resistentes a vancomicina, analizados en dos periodos de tiempo con diferencia de un año. Estos aislamientos fueron obtenidos a través de muestreo por hisopado rectal en neonatos quienes habían estado hospitalizados por 5 o más días. Todos los neonatos estuvieron bajo tratamiento antimicrobiano. Cabe destacar que la unidad estaba dividida en 3 áreas: la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN), terapia intermedia (TI) y el área de incremento de peso (IP). Durante el primer periodo de muestreo, hubo una colonización global del área por VREfm del 49.2%, y VREfm fue obtenido en un 12%, 63% y 53% de cada área, respectivamente (Ortega *et al.*, 2015). En el segundo periodo de muestreo, sólo se identificó la colonización del área TI, a la cual se le dio seguimiento quincenal por 4 meses encontrando una frecuencia de colonización global de 48.7 % (datos no publicados).

Adicionalmente, se incluyeron los aislamientos clínicos de un segundo hospital pediátrico, producto de un seguimiento en el laboratorio del propio hospital, durante un periodo de un año (2016-2017), de donde se recolectaron 3 aislamientos obtenidos de muestras de orina.

Las muestras fueron adquiridas de niños de 13, 5 y 4 años de los servicios médicos de nefrología, terapia intensiva y del área de infecciones respiratorias agudas, respectivamente. Los niños habían estado también bajo un tratamiento antimicrobiano (datos no publicados).

En todos los casos, los aislamientos fueron analizados previamente en cuanto a su fenotipo de resistencia ampliada así como la determinación de algunos determinantes de virulencia (presencia de genes *GelE* y *Esp*, producción de biofilm, actividad hemolítica y actividad gelatinasa). El análisis de resistencia ampliada fue utilizado para clasificar el grado de MDR de acuerdo a las definiciones de la CDC y ECDC considerando las 10 CAM propuestas por Magiorakos y col. (2012).

Como se muestra en los resultados, respecto a la técnica de PFGE, los 25 aislamientos tuvieron un porcentaje de similitud mayor del 60%, dos clusters fueron identificados, uno con una similitud mayor al 94% y el segundo mayor del 90%, lo cual significa que son cepas que se encuentran relacionadas filogenéticamente. En el primer cluster, se ubican los aislamientos correspondientes al periodo de muestreo 2014-15, todos obtenidos del mismo hospital. Como se puede observar en la figura 7, diez de ellos tuvieron una similitud del 100%. En cuanto al resto de los aislamientos aunque no fueron 100% similares, tuvieron una relación filogenética muy cercana, dos de ellas con una similitud mayor del 97% y la tercera del 94% respecto a las otras (figura 7). En el caso del cluster 2, los aislamientos agrupados dentro del mismo, provienen de ambos hospitales, 9 aislamientos colonizantes del segundo periodo de muestreo (2015-16) y 3 infectantes de un segundo hospital (2H, 3H y 4H) y de un tercer periodo de muestreo (2016-17) mostrando una relación filogenética mayor al 90%.

A pesar de que los aislamientos de uno de los hospitales son colonizantes, pues no fueron asociados a un brote de infección, a nuestro saber, ya que durante el tiempo de muestreo, así como posterior a la entrega de los resultados a la institución, no se presentaron casos de infección por *E. faecium* MDR (Ortega *et al.*, 2015), sin embargo, el agrupamiento de los aislamientos en clusters con alto porcentaje de identidad interna en estos dos hospitales, podría indicar una alta contaminación cruzada entre las distintas áreas del servicio. Además

debido a esta baja diversidad clonal a juzgar por los resultados de PFGE, se sugiere que son cepas endémicas que se han estado diseminando, sin embargo es necesario llevar a cabo una caracterización genética mucho más profunda, como la secuenciación completa del genoma, y hacer un estudio comparativo incluyendo un número elevado de cepas, así como incluir el análisis de los factores ecológicos en los que desarrollan estas bacterias, para poder afirmar que efectivamente corresponden a cepas endémicas.

Por otro lado, es interesante resaltar, que los aislamientos que fueron obtenidos del mismo hospital, aunque en dos periodos distintos de tiempo, no hayan formado parte de un mismo cluster, posiblemente esto se debe a que desde un principio ya han existido ambos grupos de cepas (o clusters). Otra posibilidad, es que una misma cepa fue sufriendo con el tiempo cambios genéticos favorecidos por el medio ambiente debido quizás a un tipo de barrera física que las fueron alejando genéticamente unas de otras hasta formar nuevos clusters, pues se sabe que la presión selectiva puede orillar a este tipo de cambios genéticos (Carter *et al.*, 2016). Además la recombinación puede ocurrir, la cual es muy importante en la evolución de *E. faecium* y ha sido observada en varios locus que codifican los genes MLST (van Hal *et al.*, 2016).

Asimismo, los aislamientos infectantes, del segundo hospital se agrupan en el cluster 2, con los aislamientos colonizantes del primer hospital (figura 7), obtenidos además, en periodos de tiempo diferentes, lo cual favorece la hipótesis de una contaminación entre hospitales.

En México, existen muy pocos estudios de caracterización genética, y la mayoría solo utilizaron la técnica de PFGE (Cuellar *et al.*, 2007; Áviles *et al.*, 2012; Castillo-Rojas *et al.*, 2013; Bocanegra *et al.*, 2015; Alatorre, *et al.*, 2016), el primer estudio en donde se utilizó esta técnica, fue realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Cuellar *et al.*, 2007). Alatorre y col. llevaron a cabo la caracterización genética de aislamientos asociados a un brote de bacteremia debido a VREfm, en pacientes con neoplasias hematológicas; Bocanegra y col., la tipificación fenotípica y genotípica de VREfm aislado de dos hospitales de México (Nuevo León y Jalisco) y Castillo-Rojas y col., analizaron la relación filogenética de *E. faecium* aislado de muestras de agua

subterránea, agua de Xochimilco y agua tratada del área metropolitana de la Ciudad de México con aquellos aislados de muestras clínicas. En la mayoría de los estudios previamente citados, los aislamientos presentaron el genotipo *vanA*, únicamente dos aislamientos fueron caracterizados con el genotipo *vanA*- fenotipo VanB (Bocanegra *et al.*, 2015) y los resultados de PFGE mostraron brotes y colonizaciones debido a un mismo clon o por clones dominantes, la mayoría de estos aislamientos fueron de unidades de cuidados intensivos, de salas de hematología y oncología; varios factores pudieron influir en la incidencia de VREfm en estos pacientes: la contaminación cruzada, el uso de antimicrobianos, el padecimiento de enfermedades graves, la existencia de inmunosupresión y la transmisión horizontal de genes de resistencia entre las cepas. Sin embargo, en ninguno de estos estudios se utilizó la técnica de MLST, por lo cual no se puede saber si son las mismas o distintas cepas las que han estado contaminando las diferentes salas y hospitales. Como se indica en los resultados, del mismo modo, todos los aislamientos analizados en este proyecto (de los tres periodos de tiempo), tienen el genotipo *vanA*. Además, al igual que en la mayoría de estos estudios, existe una baja diversidad clonal en los dos hospitales de esta investigación, por lo que se considera que factores similares como los mencionados previamente pudieron influir de igual forma, en la colonización por VREfm; en este caso, también se aislaron cepas de la UCIN (12%), sin embargo la frecuencia de ésta bacteria fue mayor en las unidades de TI (63%) y de IP (53%), pudiendo existir una contaminación cruzada entre las tres salas. La alta frecuencia encontrada en las áreas distintas a cuidados intensivos, se debe a que en este caso, se analizaron aislamientos colonizantes, en comparación con los aislamientos principalmente infectantes reportados en los estudios previos.

El primer reporte en México en donde se identificaron aislamientos de VREfm MDR pertenecientes al CC17 por medio de la técnica de MLST, fue el de Ochoa y col. (2013), quienes también utilizaron la técnica de PFGE para buscar la relación filogenética entre sus aislamientos. El proyecto actual, es el segundo en México y el primero en Querétaro, en donde se utilizan ambas técnicas para la tipificación molecular de *E. faecium*.

En este proyecto con la técnica de MLST, se obtuvieron dos nuevas STs, la ST1654 y la ST1661 pues las combinaciones de los perfiles alélicos adquiridos en éste estudio, no habían sido previamente registrados en la base de datos <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018). Hasta el momento, no han sido aisladas en otros Estados de la República Mexicana ni en otros países.

Respecto a los alelos obtenidos, en la tabla 11 se resume la información más destacada sobre cada uno de los alelos encontrados, incluyendo el número de STs que presentan dichos alelos, así como algunos países de origen en donde han sido aislados y las fechas en que fueron reportados. Se puede observar que algunos de los alelos son poco frecuentes y de reciente reporte, como el alelo 92 del gen *ddl* y los alelos 84 y 123 del gen *psts*. En relación a esto último, en varios de los casos aún no se cuenta con la publicación que documente las características de los aislamientos en donde fueron reportados.

Tabla 11. Alelos encontrados y su relación con reportes mundiales.

Gen	No. de alelo	Números de STs	País de origen	Año
<i>atpA</i>	7	122	Varios países	1988-2019
<i>atpA</i>	9	227	Varios países	1964-2019
<i>ddl</i>	92	4	Irán, Dinamarca, Holanda y Polonia	2016, 2017 y 2019
<i>gdh</i>	1	942	Varios países de todo el mundo	1927-2019
<i>purk</i>	1	547	Varios países de todo el mundo	1988-2019
<i>gyd</i>	1	973	Varios países de todo el mundo	1927-2019
<i>gyd</i>	12	98	Varios países	1997-2019

<i>psts</i>	84	2	México	2009-2012
<i>psts</i>	123	10	Arabia Saudita y México	2015 y 2016
<i>adk</i>	1	964	Varios países de todo el mundo	1927-2019
<i>adk</i>	5	178	Varios países	1946-2019

En la tabla se indica la cantidad de secuencias tipo (ST), país de origen y año de aislamiento reportados previamente para cada uno de los alelos identificados en éste proyecto (base de datos <https://pubmlst.org/efaecium/> -Jolley *et al.*, 2018-).

Con respecto al alelo 92 del gen *ddl*, una de las STs (ST1301) fue identificada en el año 2015 en un laboratorio de referencia de resistencia antimicrobiana en Dinamarca (DANMAP, 2016).

En el caso del alelo 123 del gen *psts*, la mayoría de los aislamientos reportados, fueron cepas colonizantes de personas originarias de Arabia Saudita; los aislamientos presentaban un genotipo *vanA* y tenían resistencia a glucopéptidos. Cabe resaltar que un aislamiento fue reportado en Chiapas, México, obtenido de alimentos de origen animal, sin embargo solo está registrado el perfil alélico pero aún no tiene definida la ST, por lo tanto no se puede llevar a cabo un análisis con el algoritmo e-BURST para conocer si existe alguna relación entre éste aislamiento y las STs 1654 y 1661.

En cuando al alelo 84 del gen *psts*, las dos STs (ST757 y ST1303) que lo contienen, provienen de aislamientos de pacientes hospitalizados en México, información obtenida de la base de datos <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018). Es interesante ver, que ambas STs 757 y 1303 se relacionan con la ST1654 identificada en éste estudio, lo cual se puede observar en la representación gráfica obtenida por medio del algoritmo goe-BURST (figura 13). La ST757 solo es diferente en un alelo respecto a la ST1654, y entre ésta última y la ST1303 son diferentes en dos de sus alelos (fig.14).

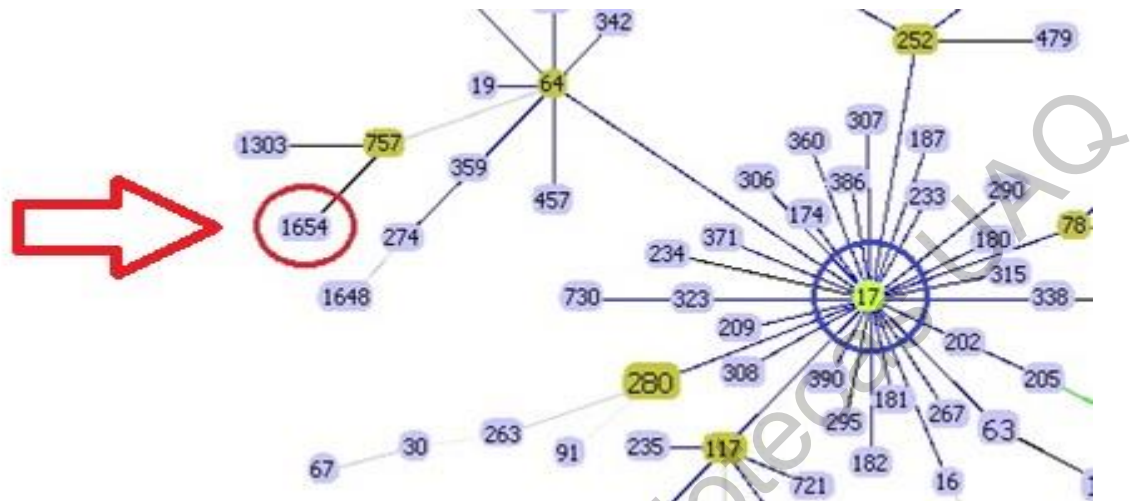


Figura 13. Relación de la ST1654 con las ST757 y ST1301 por medio del algoritmo goe-BURST 1.2.1. (<http://www.phyloviz.net/goeburst/> -Francisco *et al.*, 2009-).

ST	atpA	ddl	gdh	purK	gyd	pstS	adk	clonal complex
757	7	1	1	1	1	84	5	CC17
1303	7	1	1	1	14	84	5	
1654	7	92	1	1	1	84	5	

Figura 14. Perfiles alélicos de la ST1654, ST757 y ST1303. Imagen obtenida de <https://pubmlst.org/efaecium/> (Jolley *et al.*, 2018).

Debido a que la combinación de alelos obtenidas en este proyecto no corresponden a ninguna ST aislada en otra parte del mundo, los polimorfismos presentes que dan como resultado esos números de alelos poco comunes [92 (gen *ddl*), 123 (gen *pstS*) y 84 (gen *pstS*)], pudieron surgir de manera independiente en los distintos países o Estados de la República (para el caso del alelo 84-*pstS*, que únicamente ha sido aislado en México) en donde han sido identificados. Posiblemente la variación genética ya sea por mutaciones o por recombinación, pudo ser la causa del surgimiento de nuevos alelos o combinaciones de los mismos y por lo tanto de nuevas STs.

Con más estudios (en donde se utilice la técnica de MLST) en otros hospitales de México y Querétaro, se podrían aislar otras STs que pudieran estar relacionadas con las identificadas en éste proyecto o incluso encontrarse las mismas STs (ST1654 y ST1661) en otros hospitales tanto de ésta Ciudad como del país, pues como ya se mencionó, solo existen dos estudios que se han apoyado con ésta técnica para la caracterización de *E. faecium*, lo cual no es suficiente para poder tener un panorama más amplio sobre la epidemiología de este microorganismo en el país. Al realizar la caracterización genética tanto por medio de la técnica de PFGE como por la técnica de MLST, se podrán identificar el tipo de cepas predominantes, enriquecer la base de datos con aislamientos adquiridos en el país, comparar con otras STs a nivel mundial y profundizar más en relación al cómo éstas cepas se están diseminando, así como conocer si son clonales o policlonales o si están asociadas a algún brote de infección, buscando de ese modo medidas para su control y erradicación.

Al analizar las dos STs obtenidas en este trabajo con los algoritmos e-BURST y goeBURST-1.2.1, se pudo determinar una relación existente entre la ST1654 y la ST1661 con el CC17. El análisis con el algoritmo eBURST, se utiliza para discernir la relación y los patrones de descendencia evolutiva entre aislados con genotipos similares; modelo que muestra la forma en que cómo los clones bacterianos emergen y se diversifican para formar complejos clonales, derivados de un ancestro común o ancestro fundador (Feil, *et al.*, 2004; Spratt *et al.*, 2004; Francisco *et al.*, 2009). Del mismo modo, el algoritmo goe-BURST que es una versión optimizada del algoritmo e-BURST, busca la relación filogenética entre las diferentes STs identificando patrones alternativos de descendencia para varias especies bacterianas, con base en las semejanzas entre sus locus o alelos. Por medio de éste algoritmo, existe la opción de seleccionar antes del análisis, la relación entre STs con variantes de un solo locus o alelo, o con variantes de doble locus o de tres locus o alelos (SLV, DLV y TLV, respectivamente, por sus siglas en inglés) (Francisco *et al.*, 2009). De ese modo, al conocer el complejo clonal con el que se encuentran asociadas, se puede comprender mejor sobre los aspectos epidemiológicos de estas cepas (ST1654 y ST1661). Las cepas pertenecientes al CC17 son cepas adaptadas a hospitales, las cuales suelen presentar fenotipos y genotipos de resistencia antimicrobiana así como características

asociadas a su virulencia y patogenicidad, pudiendo convertirse en bacterias infecciosas de alto riesgo para las personas hospitalizadas (Silveira *et al.*, 2013; Franyó *et al.*, 2018; De Been *et al.*, 2013; Arias & Murray, 2012; Lee *et al.*, 2019).

Entonces, de manera general, dos STs nuevas fueron obtenidas en este proyecto, las cuales fueron identificadas de aislamientos adquiridos en los dos hospitales, por lo que se incrementa la sospecha de una diseminación entre los mismos, posiblemente por una contaminación cruzada. Esta hipótesis ha sido propuesta en distintos hospitales en donde se ha observado una diseminación de las clonas similar, tal es el caso de Bocanegra y col. (2015), quienes reportaron la prevalencia de un cluster con aislamientos 100% similares en un hospital de Monterrey, los cuales fueron altamente predominantes en 5 salas diferentes durante un muestreo de 14 meses. En el estudio de Zarate y col., 2007, se llevó a cabo el análisis de la relación filogenética por medio de la técnica de PFGE, del mismo modo la diseminación clonal se atribuye a la contaminación cruzada. Otros estudios muestran la gran prevalencia de este tipo de contaminación en hospitales debido *E. faecium* (Ministerio de Salud Pública, 2005; Bazet *et al.*, 2005; Pidot *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2017). En la investigación realizada por Corredor (2019), se analizó la clonalidad de *E. faecium* en un hospital de Bogotá por medio de la técnica de MLVA (multi-locus de número variable de repeticiones en tándem), en donde también se asoció la diseminación de clones con la contaminación cruzada por parte del personal de salud. Además, la colonización por VREfm también se ha visto incrementada con el uso de antibióticos de amplio espectro y la estancia hospitalaria prolongada (Furtado *et al.*, 2005 y Braun *et al.*, 2009). Y en tres hospitales pediátricos en Polonia, se aislaron 90 cepas (57 colonizantes), de las cuales se identificaron 4 clones por medio de la técnica de PFGE, los 4 clones fueron encontrados en los tres hospitales, lo que sugiere que existe contaminación ambiental y proveniente de los otros dos hospitales, y una transmisión horizontal dentro del mismo hospital. El incremento en la colonización por VREfm inició en una ICU, posteriormente en la unidad de urología y al final en otras unidades (Kaminska *et al.*, 2019).

De esta manera, una explicación a los resultados de este trabajo es que, es muy factible que las dos STs (1654 y 1661), las cuales únicamente han sido aisladas de dos hospitales de

Querétaro, se hayan estado diseminando o empezado a diseminar en otros hospitales del Estado, tal vez debido a contaminación cruzada por parte de los mismos pacientes, del personal médico sanitario, o inclusive, de estudiantes del área de salud (ya que ambos hospitales son sede para la realización de prácticas clínicas de distintas instituciones educativas), quienes posiblemente no han tenido el cuidado necesario para evitar la contaminación de nuevas áreas, hospitales o personas al no tener una higiene adecuada de sus manos, equipo de trabajo y/o vestimenta, o porque ellos mismos pueden albergar en su cuerpo a VREfm colonizante, que generalmente ha sido aislado de muestras como hisopados rectales o heces fecales, debido a que el tracto gastrointestinal es considerado el principal reservorio, facilitando la colonización a nivel perianal, inguinal y de otras partes del cuerpo por su eliminación fecal (Cantón y Ruíz, 2013; Ponessa *et al.*, 2006). Por ello resulta fundamental insistir en el lavado y desinfección de manos después de ir al baño o después de estar en contacto con pacientes. De la misma manera, los pacientes, deberán ser responsables del lavado de sus manos, principalmente cuando son dados de alta, ya que una de las medidas fundamentales para el control de VREfm es el lavado de manos en cinco momentos (Marcade *et al.*, 2014; Valdezate, *et al.*, 2012; Ulrich & Gastmeier, 2017). También es muy importante que se tomen en cuenta otras medidas de prevención y control de la colonización e infección por *E. faecium*, como la limpieza y desinfección constante tanto del equipo de trabajo como de las áreas hospitalarias (Schmidt-Hieber *et al.*, 2007), llevar a cabo la detección temprana de colonización o infección por VREfm (Ulrich & Gastmeier, 2017), el aislamiento de pacientes infectados (Marcade *et al.* 2014; Valdezate, *et al.* 2012) y cierre de las áreas afectadas (Worth *et al.*, 2007).

Publicaciones en México sobre brotes debido a VREfm en niños y neonatos utilizando técnicas moleculares, solo existen dos, el de Áviles y col. (2012) y el de Ochoa y col. (2013), ambos realizados en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG). En el primer estudio, se realizó una investigación retrospectiva sobre dos brotes ocasionados por VREfm que ocurrieron entre agosto y octubre de 2009; uno de los brotes sucedió en la unidad de cuidados intensivos (UCI) y el segundo en la sala de oncología. Se aislaron 14 cepas de 5 niños, y se determinó por medio de la técnica de PFGE, que ambos

brotos de infección fueron causados por el mismo clon. Una muestra fue obtenida a partir de tejido suave, tres de secreciones endo-traqueales, cinco de sangre, y cinco de orina; todos los pacientes habían estado bajo tratamiento antimicrobiano y la mayoría de ellos bajo el uso de equipos de ventilación mecánica, tubos pleurales, catéteres urinarios, entre otros. Todas las cepas tuvieron el genotipo *vanA* (Áviles *et al.*, 2012). En el segundo estudio (Ochoa *et al.*, 2013) se llevó a cabo la caracterización genética de VREfm de 12 cepas (aisladas de orina y sangre), por medio de las técnicas de PFGE y MLST, en donde se encontró una relación filogenética del 44% entre las cepas y se identificaron cuatro STs (ST412, ST757, ST203 y ST612) todas pertenecientes al CC17. De acuerdo a los resultados que obtuvieron por PFGE, 4 clones de VREfm MDR fueron identificados en el HIMFG pero no fueron relacionados a brotes, debido a que fueron aislados en distintos periodos de tiempo.

En otros países también se han reportado varios casos de colonización e infección por VREfm en niños y neonatos. La mayoría han sido aislamientos obtenidos de neonatos internados en unidades de cuidados intensivos (UCIN) (Bohme *et al.*, 2012; Lee W. G. *et al.*, 2012; Werner *et al.*, 2012; Cilo *et al.*, 2014; Moles *et al.*, 2015; López Urrutia *et al.*, 2018; Kaminska *et al.*, 2019), sin embargo, también han ocurrido aislamientos en otras unidades de centros pediátricos. Kamhuka y col. (2013), identificaron 15 cepas colonizantes de VREfm, un caso de bacteremia y dos de infecciones en vías urinarias en niños de entre 5 semanas y 15 años de edad internados en las áreas de hematología y oncología de un hospital en Canadá, también VREfm fue encontrado en artículos como monitores para bebé, estéreos, teclados de computadora y juguetes. El análisis por PFGE reveló la presencia de tres clusters. La mayoría de los aislamientos (tanto los obtenidos de las muestras clínicas como de las muestras ambientales y juguetes) formaron parte de 2 clusters, los cuales mostraron una relación filogenética muy cercana. Pese a que la mayoría de los aislamientos fueron colonizantes, en neonatos o niños pequeños la colonización por éste tipo de bacterias incrementa el riesgo de infección, lo cual es muy preocupante porque las opciones terapéuticas se vuelven cada vez más limitadas debido a la MDR que suele presentar esta bacteria en ambientes hospitalarios. Por ejemplo en una investigación de Cilo

y col. (2014), se aisló VREfm de un total de 17 muestras obtenidas por hisopado rectal (colonizantes) de recién nacidos prematuros de un hospital en Turquía en una UCI, sin embargo, estudios adicionales de muestras de sangre, orina y de heridas mostraron también la presencia de infección por ésta bacteria en cinco de los pacientes, lo que nos alerta sobre la importancia de mantener una vigilancia epidemiológica constante entre los pacientes colonizados.

De manera general, casos de infección y colonización por VREfm en las UCI, han sido publicados en artículos de países como Corea, Alemania, España y Polonia, en donde se ha reportado la identificación de VREfm en niños menores de 6 meses y en algunos neonatos prematuros (32 días de gestación y bajo peso al nacer –Moles *et al.*, 2015-), utilizando la técnica de PFGE y en algunos casos la de MLST. De los resultados por MLST se identificaron STs pertenecientes al CC17, las ST18, ST192, ST17 (fundador del CC17), siendo más frecuentemente aisladas las ST18 y ST192, las cuales son variantes de doble locus de la ST17 (Lee W. G. *et al.*, 2012; Werner *et al.*, 2012; Cilo *et al.*, 2014; Moles *et al.*, 2015; López Urrutia *et al.*, 2018). La mayoría de los tipos de cepas nosocomiales de *E. faecium* que están asociadas con brotes, pertenecen al CC17 (Galloway-Peña *et al.*, 2009; Freítas *et al.*, 2010). La diseminación de éste complejo clonal parece haber precedido la aparición de resistencia a la vancomicina, como lo demuestra su predominio en los hospitales de todo el mundo (Klare *et al.*, 2005 & Leavis *et al.*, 2006). Por otro lado, la mayoría de los aislamientos analizados en los artículos aquí citados, incluidos los de éste proyecto, tuvieron el genotipo *vanA* (Aviles *et al.*, 2012; Lee W. G. *et al.*, 2012; Ochoa *et al.*, 2013; Cilo *et al.*, 2014), solo uno presentó genotipo *vanB* (Werner *et al.*, 2012). El genotipo *vanA* es el que presenta una mayor resistencia a la vancomicina además de resistencia a la teicoplanina. Como ya fue señalado, en este proyecto la mayor prevalencia de VREfm fue en primer lugar, en la sala de TI (63%) y en segundo lugar de la sala de IP (53%), solo aislándose en un 12% de la UCIN, esto durante el primer periodo de muestreo; durante el segundo periodo de muestreo, del mismo modo la mayoría se aislaron de la sala de TI y en el caso de los tres aislamientos de VREfm infectante (periodo 2016-17) se aisló de tres niños que estaban internados en las salas de nefrología, terapia intensiva y del área

de infecciones respiratorias agudas, con lo que se puede observar que recién nacidos prematuros con bajo peso, así como niños con padecimientos graves pueden ser más susceptibles a ser colonizados con VREfm.

Es importante considerar, que los factores ambientales son determinantes e incluso más trascendentales que la lactancia materna en el establecimiento de la microbiota intestinal de los recién nacidos. En los lactantes con peso extremadamente bajo al nacer, la hospitalización en unidades de cuidados intensivos neonatales, caracterizada por una terapia antibiótica prolongada, nutrición parenteral, alimentación oral tardía e intubación, parece afectar la composición de la microbiota intestinal y en lugar de ser colonizados por las bacterias típicas como los lactobacilos y las bifidobacterias, suelen ser colonizados por bacterias de importancia clínica como *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus* (Fanaro *et al.*, 2003). Las condiciones higiénicas y los procedimientos antimicrobianos influyen fuertemente en el patrón de colonización intestinal, por lo tanto, es fundamental mantener una vigilancia constante sobre la colonización e infección de bacterias adaptadas a hospitales, así como mantener muy firmes y actualizados los protocolos de limpieza y desinfección de las diferentes áreas, equipos y material hospitalario.

Respecto a la resistencia antimicrobiana, de los aislamientos nosocomiales de *E. faecium* obtenidos en el primer periodo, 91 % fueron clasificados como MDR y 9% como XDR (de los Santos *et al.*, 2015), los cuales corresponden a los PRes. I a VII analizados en el presente trabajo (tabla 9). De manera similar, los aislamientos de VREfm del segundo y tercer periodo (PRes. VIII al XIV del presente trabajo -tabla 9-) se categorizaron como 95% MDR y 5% resultaron XDR incluyendo a los 3 aislamientos del tercer periodo en esta última categoría. Por lo tanto, del total de los 25 aislamientos, 20 cepas resultaron MDR y 5 XDR. El 100% de los aislamientos tuvieron genotipo *vanA*.

En Querétaro existen pocos estudios, y todos los reportes de investigación existentes han sido realizados en la facultad de medicina de la UAQ. La primera investigación en donde se aisló a *E. faecium* resistente a vancomicina en Querétaro fue la de Leo-Amador y col.

(2011). Las muestras fueron adquiridas en el HGRN°1 del IMSS entre el periodo de diciembre 2008 y abril 2010. En esta investigación se identificaron 20 cepas de *E. faecium*, de las cuales 12 fueron resistentes a vancomicina y presentaron fenotipos VanA y VanB. También se encontró una alta resistencia a estreptomicina y gentamicina ($\geq 70\%$), a fluoroquinolonas (65%), a quinupristina/dalfopristina (40%), a nitrofurantoina (35%) y, a linezolid (35%).

Se ha observado en algunos estudios y dentro del mismo cepario del LEIMC, que generalmente los *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina muestran una multiresistencia a antibióticos (De los Santos Aguilar *et al.*, 2015; Benavides *et al.*, 2017; Leo-Amador *et. al*, 2011). Respecto a otros antibióticos (diferentes de la vancomicina o glucopéptidos), todos los aislamientos obtenidos del mismo hospital, durante el primer y segundo periodo, presentaron resistencia a aminoglucósidos, la mayoría a las fluoroquinolonas y penicilinas, seguido de la estreptomicina. El 100% fueron susceptibles a glicilciclinas. Respecto al segundo hospital, los tres aislamientos resultaron con resistencia a la mayoría de los antimicrobianos, excepto a las glicilciclinas y lipopéptidos. Esta información puede contribuir a que en ambos hospitales de donde fueron obtenidas las muestras, se tome en cuenta la resistencia antimicrobiana que *E. faecium* ha ido desarrollando dentro de cada hospital, para tener así un mayor control del tipo de antibióticos que deberán suministrarse en casos de infección debido a éste microorganismo. En cuanto a la distribución de estas cepas en los dos clusters del dendrograma obtenido por PFGE, se esperaba que se agruparan de acuerdo a sus PRes., debido a que si están genéticamente relacionadas, pudieran tener los mismos genes de resistencia ya sea por la replicación de las bacterias o por la transferencia horizontal. Sin embargo, la agrupación estuvo relacionada con el periodo de tiempo en que fueron aisladas, con excepción de las tres infectantes que como ya se indicó, se agruparon con las del segundo periodo, a pesar de que pertenecían a otro hospital.

Esta situación de resistencia antimicrobiana es muy preocupante, porque aunque *E. faecium* fue aislado únicamente de tres pacientes infectados con las cepas 2H, 3H y 4H, y generalmente en Querétaro, se le ha aislado como bacteria colonizante aparentemente

inocua (Ortega *et al.*, 2015), no se deben disminuir las medidas de control ni el uso responsable de los antibióticos, pues el hecho de mostrar multiresistencia y de seguir apareciendo aunque sea con baja incidencia, puede convertirse en un problema serio de salud, si la bacteria comenzara a diseminarse y causar infecciones. Casos de IAAS debido a *E. faecium* MDR han sido reportados, desde infecciones menos severas a aquellas muy graves como ha ocurrido en pacientes con bacteremias llevándolos incluso a la muerte (Kuo *et al.*, 2014; Freitas *et al.*, 2016; Franyó *et al.*, 2018; Melegh *et al.*, 2018; Cuellar *et al.*, 2007; Reina *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2010). En Querétaro sólo existe un estudio en donde fueron reportados casos de infección por VREfm (Leo Amador *et al.*, 2011) y el actual proyecto, que incluye a las tres cepas infectantes aisladas de muestras de orina del HENyM (2H, 3H y 4H).

No obstante, es necesario seguir realizando este tipo de muestreos considerando todos los grupos de edad, tanto de personas hospitalizadas como de la comunidad, para que se pueda tener una información más global y representativa de *E. faecium* en Querétaro, porque las bacterias se están volviendo cada vez más resistentes a diversos antibióticos. Además los neonatos y niños pequeños aun no desarrollan por completo sus sistema inmunológico por lo que son más susceptibles a adquirir una infección por VREfm junto con los adultos mayores y las mujeres embarazadas, es por ello, que se debe seguir previniendo su diseminación a otros hospitales o incluso a la comunidad pues pacientes dados de alta podrían seguir albergado a este microorganismo. Se sabe que el mayor reservorio para la colonización con VREfm, es el intestino; de acuerdo con Estrada-Román y col. (2017) las personas colonizadas pueden alojar a la bacteria durante un periodo de entre 3 y 15 meses (Guías de prevención y control de Enterococo resistente a vancomicina, 2005).

También es importante resaltar que antibióticos como el linezolid (Oxazolidinona), la daptomicina (Lipopéptido) y la quinupristina-dalfopristina (Streptograminas) que aun suelen funcionar contra *E. faecium* MDR (Cercenado, 2011), ya han ido perdiendo efecto, como se puede observar en la tabla 9, algunas de las cepas presentan resistencia a éstos

antibióticos. De acuerdo con Hegstad y col. (2010), el incremento en la MDR en *E. faecium*, se debe a que tiene una gran propensión a la transferencia horizontal de genes, así como a la plasticidad y recombinación genética (De Been *et al.*, 2015). Sin embargo, como ya se indicó, en estas cepas no se detectó resistencia a las glicilciclinas de la cual la tigeciclina es un derivado y se sigue utilizando también como un antibiótico contra *E. faecium* MDR.

En relación a los determinantes de virulencia, en proyectos anteriores se llevó a cabo el análisis del fenotipo y genotipo de las distintas poblaciones de los aislamientos de este estudio. Respecto al fenotipo, se analizó la actividad hemolítica, la producción de gelatinasa y biofilm; en cuanto al genotipo, se investigó la presencia de los genes *Esp* y *GelE*. Los resultados obtenidos de los aislamientos del primer periodo (cluster 1-figura 7), muestran una presencia del 52% y 5% de los genes *Esp* y *GelE*, respectivamente. El gen *Esp* se asocia a la producción de biofilm, y el *GelE* con la actividad gelatinasa. Del análisis del fenotipo se obtuvo un 41.5% con actividad gelatinasa, 54.7% con actividad α -hemolítica y el 20% tuvo una producción moderada de biofilm (Gerardo-Domínguez, 2018). En los aislamientos del segundo periodo (cluster 2), el 13% fueron positivos a *GelE* y ninguna fue positiva al gen *Esp*; además el 46% presentaron actividad α -hemolítica, 3% β -hemolítica, 5% actividad gelatinasa y el 51% una producción débil de biofilm (Flores *et al.* 2017). En ninguno de los 3 aislamientos infectantes se identificaron los genes *GelE* y *Esp*, dos tuvieron actividad α -hemolítica y solo uno presentó actividad gelatinasa.

Como se puede observar en los resultados de los determinantes de virulencia, en algunos casos no existió una relación entre la presencia de los genes y la expresión de los mismos en el fenotipo. Por ejemplo, en la investigación realizada por Flores y col. (2017), a pesar de la ausencia del gen *esp*, algunos aislamientos seguían produciendo biofilm de una manera débil. Lo mismo ocurrió con los tres aislamientos infectantes, que a pesar de no tener los genes, algunos tuvieron actividad α -hemolítica y gelatinasa. Esto puede deberse a la existencia de otros genes implicados en la producción del mismo fenotipo, por ejemplo, además del gen *Esp*, el gen *GelE* también ha sido asociado con la producción del biofilm, así como las proteínas Ebp (endocarditis y producción de biofilm asociados a pilis), el Epa

(antígeno polisacárido enterococal) y el glicolípido DGLcDGA (alfa-diglicosil diacilglicerol) (Panesso, 2010; Arias & Murray 2013). También puede ocurrir lo contrario, se ha observado que en condiciones de laboratorio la expresión de características de virulencia pueden llegar a perderse, cuando originalmente habían sido expresadas en ambientes más hostiles como ocurre dentro del cuerpo del huésped (Méthot & Alizon, 2014).

Por otro lado también es importante analizar el papel que tiene los factores de virulencia en la patogénesis bacteriana. Anteriormente se consideraba que la presencia de un genotipo y fenotipo de virulencia estaba directamente relacionado con la patogenicidad de un microorganismo, es decir, si los tenía presentes, automáticamente la bacteria ocasionaría el desarrollo de un proceso infeccioso. En la actualidad, esas concepciones han ido cambiando, ahora la patogenicidad es considerada como una característica dinámica de la interacción entre el huésped y los microorganismos, lo cual debe analizarse bajo términos ecológicos y evolutivos (Méthot & Alizon, 2014). Por lo tanto, de acuerdo con estos autores, la enfermedad se puede definir como una alteración en el equilibrio de las funciones o características elementales del cuerpo debido a cambios ecológicos, pudiendo afectar las relaciones microbianas, convirtiendo de ese modo, a las bacterias comensales o mutualistas en patógenos, o viceversa. Por ejemplo, Klemm y col. (2007) reportaron que incluso bacterias genéticamente idénticas (clones), como *Escherichia coli* uropatógena puede ocasionar enfermedad en un determinado ambiente, mientras que en otro es inofensiva.

A pesar de que 22 de los aislamientos recuperados de heces analizados en éste estudio presentaron algunos genes de virulencia, no fueron asociados con procesos infecciosos, lo cual apoya las nuevas concepciones sobre virulencia y enfermedad, es decir, que pese a la presencia de genes de virulencia en su ADN, en primer lugar, no necesariamente dichos genes se van a expresar y en segundo lugar, el hecho de que los genes estén presentes o se expresen, no significa que se va a desarrollar la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad, como ya fue señalado, depende de otros factores como los factores ambientales y factores relacionados al huésped (sistema inmune, microbioma, entre otros).

Sin embargo, nunca se debe subestimar la presencia de VRE_{fm} colonizante en los intestinos de neonatos, debido a que la colonización en recién nacidos prematuros se ha asociado a un posterior proceso de infección (Kamhuka *et al.*, 2013; Cilo *et al.*, 2014), lo cual dependerá del estado de salud del neonato, del tratamiento antimicrobiano, del uso de equipo hospitalario como catéteres, tubos pleurales o tubos de alimentación, entre otros, y de la cantidad de días de estancia hospitalaria, así como de otros factores. Por lo tanto, el hecho de aislar a la bacteria de los intestinos de recién nacidos sin signos de infección, es alarmante y se deben tomar las medidas necesarias para evitar que la bacteria se disemine y pueda ocasionar infección, porque los recién nacidos aún no desarrollan completamente su sistema inmune ni las barreras físicas de protección en sus intestinos, incrementando el riesgo de bacteremia, la cual tiene una tasa muy elevada de morbilidad y mortalidad, principalmente en neonatos de bajo peso (Siana *et al.*, 2019). Por otro lado, Ziakas y col. (2013), encontraron que el riesgo de bacteremia es de un 8.7% en pacientes colonizados con VRE en una UCI y de solo el 2.3% en pacientes no colonizados.

En el caso de los tres niños que si desarrollaron infección debido a VRE_{fm}, no tenían en su genoma los genes de resistencia *Esp* ni *GelE*, pero si se identificó por lo menos en uno de los aislamientos la actividad gelatinasa. Sin embargo, tampoco se encontró una asociación entre la presencia de los genes, su expresión en el fenotipo y el desarrollo de la enfermedad.

Debido a lo anterior, es fundamental considerar no sólo las características de virulencia en las bacterias, pues el desarrollo de la enfermedad no depende solo de su presencia o ausencia, sino también del ambiente que están colonizando, del estado inmunológico del paciente, que además se sabe que en ocasiones la respuesta inmune puede hacer más daño que los agentes infecciosos (Long & Graham, 2011). También es importante tomar en cuenta la presencia de otro tipo de enfermedades, o si el paciente se encuentra bajo algún tratamiento antibiótico o terapia inmunosupresora, que pudiera estar alterando el equilibrio en el microbioma y reconocer la función que tiene la microbiota en el huésped. De acuerdo con Casadevall & Pirofski (2015), la microbiota tiene un papel fundamental en la fisiología del huésped, en el sistema inmunitario, en la homeostasis y en la susceptibilidad a las enfermedades. Algunas de estas bacterias nos protegen de adquirir enfermedades,

favoreciendo funciones, como las funciones digestivas, además debido a la competencia que existe entre ellas, algunas se benefician entre sí, mientras otras se inhiben. Por ejemplo, Dinleyici y col. (2013) reportaron los beneficios que aportan las bacterias probióticas en la conservación de la salud y en la mejora de los pacientes con infecciones estomacales. También existe evidencia del daño que la microbiota puede ocasionar al huésped cuando las relaciones entre los microorganismos que la conforman han sido alteradas y modificadas por cambios ambientales (Blaser, 2014; Sommer & Backhed, 2013; y Cryan & Dinan, 2012).

No obstante, pese a todo lo anterior, no se le debe restar importancia a la identificación de la presencia o ausencia de los genotipos y fenotipos de virulencia y al análisis de la resistencia antimicrobiana, porque de ese modo, al tener mayor información sobre el microorganismo y sus características, se podrá contribuir a una mejor toma de decisiones para su prevención y control. Se sabe por ejemplo, que ante el mismo nivel de “virulencia” las bacterias que tienen mayor resistencia a antibióticos pueden ser un mayor problema de salud (Méthot & Alizon, 2014).

VII. CONCLUSIONES

Con la técnica de PFGE, los 25 aislamientos analizados en este proyecto, tuvieron una relación genética del 60% y el dendrograma mostró dos clusters principales, cada uno con porcentajes de similitud mayores al 90%. El aislamiento de cepas con un alto porcentaje de similitud respecto a los patrones de restricción del ADN obtenidos, sugiere que pudo existir una contaminación cruzada por parte de los mismos pacientes, del personal médico sanitario, o inclusive, de estudiantes del área de salud, diseminando la bacteria en distintas áreas de los dos hospitales y en periodos de tiempo diferentes.

Respecto a la técnica de MLST, se obtuvieron dos STs nuevas, la ST1654 y la ST1661, las cuales de acuerdo a los resultados del análisis con los algoritmos e-BURST y goe-BURST-1.2.1, están relacionadas al CC17, principal complejo que alberga a las STs MDR de origen hospitalario. En México existen muy pocos estudios para la caracterización genética de *E. faecium* que incluya la técnica de MLST, éste sería el segundo estudio realizado con ésta técnica en el país y el primero en Querétaro en donde se utilicen ambas técnicas (PFGE y MLST).

Es muy importante por lo tanto, continuar investigando a VREfm-MDR, debido a que existe muy poca información sobre sus características moleculares en México, información que podría contribuir a conocer más sobre su epidemiología, enriqueciendo así la base de datos. Al poder identificar brotes de infección clonales o policlonales, así como las STs y el complejo clonal al que pertenecen, se podrá conocer más sobre su comportamiento y distribución, tanto en Querétaro como en todo el país.

PERSPECTIVAS

Para la obtención de un panorama más profundo, se recomienda realizar la secuenciación completa del genoma de las cepas identificadas en este proyecto. En primer lugar para comparar las cepas de la misma ST, pero aisladas de hospitales diferentes y tener así la certeza de que efectivamente son clones y de que está ocurriendo una contaminación cruzada entre hospitales. Y en segundo lugar, para identificar algunos genes característicos y descritos en cepas representativas del CC17, como pueden ser las islas de patogenicidad.

Identificar la presencia de genes de virulencia no considerados en éste estudio, así como de algunos otros genes de resistencia para asociarlos con el análisis fenotípico de susceptibilidad antimicrobiana ya realizado y con los determinantes de virulencia, para así poder integrar todo en un mismo dendrograma para su análisis filogenético.

Para enriquecer proyectos como éste, se recomienda considerar otro tipo de estudios como:

- Hacer análisis de fómites en los hospitales, obtención de muestras de la materia fecal y de las manos del personal médico sanitario, para considerar riesgos asociados a contaminación cruzada debido a ellos.
- Buscar por medio de los expedientes, a los pacientes considerados en este proyecto, para realizarles un nuevo análisis y ver si todavía albergan a VREfm, esto con la finalidad de conocer más sobre el posible riesgo de diseminación a la comunidad en general, una vez que los pacientes han sido dados de alta.

VIII. REFERENCIAS

- Alatorre-Fernández P., Mayoral-Terán C., Velázquez-Acosta C. *et al.* (2016). A polyclonal outbreak of bloodstream infections by *Enterococcus faecium* in patients with hematologic malignancies. *American Journal of Infection Control*. 7 pp. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2016.10.002>.
- Abis Encyclopedia. Regnum Prokaryotae. (s. f.). [Encyclopedia]. Recuperado a partir de http://www.tgw1916.net/images/Enterococcus_faecium.jpg
- Alvarez-Cisneros, Y. M., Fernández, F. J., Wachter-Rodarte, C., Aguilar, M. B., Sáinz Espuñes, T. del R., & Ponce-Alquicira, E. (2010). Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2475-2481. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4109>
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2008). Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 6(5), 637-655. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.637>
- Arias, A.C., Panesso, D., Singh, K.; Rice L.; Murray, B. (2009). Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; vol. 53, n°10, p.4240–4246.
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature reviews. Microbiology*, 10(4), 266-278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
- Arshadi M., Douraghi M., Shokoohizadeh L., Moosavian S.M. & Pourmand M.R. (2017). High prevalence of diverse vancomycin resistance *Enterococcus faecium* isolates in clinical and environmental sources in ICU wards in southwest of Iran. *Microbial Pathogenesis*. doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.045.
- Arrieta Bolaños, E. (2008). Genómica de agentes infecciosos: avances y perspectivas en microbiología clínica. *Revista médica de la Universidad de Costa Rica*. Volumen 2, número 1, artículo 10. San Pedro Costa Rica. 14 pp.

- Aviles M., Moreno S., Nava A., Nava M. (2012). Characterization of Two Outbreaks of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in a Pediatric Care Center in Mexico City. *American Journal of Infection Control*, 40, 31-176.
- Bazet C., Blanco J., Seija V., Palacio, R. (2005). Enterococos resistentes a vancomicina. Un problema emergente en Uruguay. *Rev Med Uruguay*; 21: 151-158.
- Benavides-Correa F., Netro Báez, E. L., Solís S. Juan Carlos, *et al.* (2017). Categorización del grado de multiresistencia de aislamientos nosocomiales de *Enterococcus faecium*. Exposición de cartel llevada a cabo en el Segundo foro de investigación del congreso de actualización médica, Querétaro, Qro.
- Bhardwaj, S., Dhawale, K. B. J., Patil, M., & Divase, S. (2013). *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, the nosocomial pathogens with special reference to multi-drug resistance and phenotypic characterization. *Int J Pharm Sci Pract*, 2, 1-10.
- Blaser, M.J. (2014). The microbiome revolution. *J Clin Invest*. 124:4162–4165. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI78366>.
- Bocanegra-Ibarias P., Flores Treviño, S., Camacho Ortíz, A., *et al.* (2015). Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from two hospitals in Mexico: First detection of VanB-phenotype-*vanA* genotype. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.09.011>.
- Böhme H., *et al.* (2012). Cross-transmission rates of enterococcal isolates among newborns in a neonatal intensive care unit. *Pediatric Reports*; 4 (15): 54-56.
- Braun J. S., Fica C. A., Andrighetti B. D., Porte T. L. & Triantafilo V. V. (2009). Estudio de factores de riesgo para colonización por enterococo resistente a vancomicina en el Hospital Militar de Santiago. *Rev Chil infectología*. 26(4):374–5. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S071610182009000500014>.
- Buultjens, A. H., Lam, M. M., Ballard, S., Monk, I. R., Mahony, A. A., Grabsch, E. A., ... Stinear, T. P. (2017). Evolutionary origins of the emergent ST796 clone of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *PeerJ*, 5, e2916. <https://doi.org/10.7717/peerj.2916>

- Cantón, R. & Ruiz-Garbajosa P. (2013). Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 31(8): 543–551.
- Cardozo-Bernal, A. M., Ramón, L. F., Poutou-Piñales, R. A., Carrascal-Camacho, A. K., & Zambrano, D. C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 18(2), 203-222.
- Carter, G.P.; Buultjens A. H., Ballard S. A. *et al.* (2016). Emergence of endemic MLST non-typeable vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkw314. 5 pp.
- Casadevall A. & Pirofski L. (2000). Host-pathogen interactions: the basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infect Immun* 68:6511–6518. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.68.12.6511-6518.2000>.
- Casadevall A. & Pirofski L. (2015). What Is a Host? Incorporating the Microbiota into the DamageResponse Framework. *Infect Immun.* 83 (1), 2-7. IAI Journals.ASM.org. iai.asm.org.
- Castillo-Rojas G., Mazari-Hiriart M., Sergio Ponce de Leon S., *et al.* (2013). Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains Isolated from Water and Clinical Samples: Antimicrobial Susceptibility and Genetic Relationships. *PLOS ONE* www.plosone.org. 8 (4). 10 pp.
- Chan, V. L. (2003). Bacterial genomes and infectious diseases. *Pediatric research*, 54 (1), 1.
- Cilo B. D., *et al.* (2014). Investigation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* outbreak in neonatal intensive care unit. *Int J Clin Exp Med*; 7(12):5342-5347.
- Corredor Obregón, N. C. (2019). Caracterización clínica y molecular de un brote por *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina en el hospital universitario Mayor-Méderi, Bogotá 2016. Universidad del Rosario Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud Universidad CES. Facultad de Medicina. 71 pp.

- Cuellar-Rodríguez, J., Galindo-Fraga, A., Guevara, V., Pérez-Jiménez, C., Espinosa-Aguilar, L., Rolón, A. L., Martínez-Gamboa, A. (2007). Vancomycin-resistant enterococci, Mexico city. *Emerging infectious diseases*, 13(5), 798.
- Cuenca, F. F., Cerero, L. L., & Hernández, Á. P. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 20-25.
- Cryan J. F. & Dinan T. G. (2012). Mind - altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 13:701–712. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3346>.
- DANMAP (2016). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Capítulo 8: Resistance in human clinical bacteria. 102 pp.
- De Been, M., van Schaik, W., Cheng, L., Corander, J., & Willems, R. J. (2013). Recent recombination events in the core genome are associated with adaptive evolution in *Enterococcus faecium*. *Genome biology and evolution*, 5(8), 1524-1535.
- De Been M.; Pinholt M. & Top J. *et al.* (2015). Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*; 53: 3788–97.
- De los Santos Aguilar, J. A., Gerardo Domínguez, S., Ortega Ramírez, M. G., Vallejo Ugalde Carlos, Silva Reyes Elizabeth, Meré Espinosa Verónica, García Gutiérrez María Carlota. (2015). Patrones de resistencia a antimicrobianos de aislamientos nosocomiales de *Enterococcus* spp. resistentes a Vancomicina (ERV). *Revista Electrónica de Difusión y Divulgación científica tecnológica y de innovación del Estado de Querétaro*, 8-10.
- Dinleyici, E. C., Dalgic, N., Guven, S., Ozen, M., Kara, A., Arica, V. & Tanir, G. (2013). The effect of a multispecies synbiotic mixture on the duration of diarrhea and length of hospital stay in children with acute diarrhea in Turkey: single blinded randomized study. *European journal of pediatrics*, 172(4), 459-464.
- Dunny, G. M., Hancock, L. E., & Shankar, N. (2014). Enterococcal biofilm structure and role in colonization and disease.

- Estrada-Román A., Mendo-López R., Astocondor L., Zervos M. & Coralith García C. (2017). Colonización por Enterococo resistente a vancomicina en pacientes internados en un hospital de Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 34(4):666-71.
- Fanaro S., *et al.* (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta paediatr Suppl*. 441: 48-55.
- Feil E. J., Li B. C., David M. Aanensen D. M. *et al.* (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *Journal of Bacteriology*. 186 (5). 1518–1530.
- Feizabadi, M. M., Sayadi, S., Shokrzadeh, L., Parvin, M., & Yadegaryni, A. D. (2008). Increase in prevalence of vancomycin resistant isolates of *Enterococcus faecium* at Labbafinejad hospital. *Clin Infect Dis*, 3(2), 123-126.
- Fernández Escartín, E. (2008). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Flores Monzón B., Flores Robles S., Campos Guillén, J. *et al.* (2017). Identificación de factores de virulencia en aislamientos nosocomiales de *Enterococcus spp.* resistentes a vancomicina. Exposición de cartel llevada a cabo en el XLII Congreso Nacional de Infectología y Microbiología Clínica. Puebla, Puebla.
- Francisco A. P., Bugalho M., Ramírez M. & Carrico J. A. (2009). Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics*. BioMed Central. 10:152. 15 pp.
- Franyó D., Balázs Kocsi, Virág Lesinszki, Judit Pászti, Anita Kozák, Evelin Erzsébet Bukta, Judit Szabó & Zsuzsanna Dombrádi (2018). Characterization of Clinical Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated in Eastern Hungary. *Microbial Drug Resistance. Epidemiology*. DOI: 10.1089/mdr.2018.0074
- Freitas A.R., Tedim A.P., Novais C., Ruiz-Garbajosa P., Werner G., Laverde Gomez J.A., *et al.* (2010). Global spread of the *hyl(Efm)* colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob Agents Chemother*; 54:2660-5.

- Freitas A.R., Tedim A.P., Francia M.V., *et al.* (2016). Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). *J Antimicrob Chemother.* Doi:10.1093/jac/dkw312
- Furtado G. H. C., Martins S. T., Coutinho A. P., Wey S. B. & Medeiros E. A. S. (2005). Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil. *Brazilian J Infect Dis.* 9(1) : 64–9. doi: /S1413-86702005000100011.
- Galloway-Peña, J. R., Nallapareddy, S. R., Arias, C. A., Eliopoulos, G. M., & Murray, B. E. (2009). Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *The Journal of infectious diseases*, 200(10), 1566-1573.
- Galloway-Peña, J., Roh, J. H., Latorre, M., Qin, X., & Murray, B. E. (2012). Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PloS one*, 7(1), e30187.
- Gerardo Domínguez S. (2018). Evaluación fenotípica de factores de virulencia en *Enterococcus spp.* de cepas endémicas del Estado de Querétaro (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Qro.
- Ghasemi, E., Mansouri, S., & Shahabinejad, N. (2016). Vaginal Colonization and susceptibility to Antibiotics of Enterococci During Late Pregnancy. *Arch Clin Infect Dis.*, 11(4), e35428.
- Gilmore, M. S., Lebreton, F., & van Schaik, W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current opinion in microbiology*, 16(1), 10-16.
- Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 866-875.
- Gutiérrez Manjarrez, F. A., Cacho Díaz, B., & García Ramos, G. (2010). *Enterococcus faecium*, agente etiológico de meningitis bacteriana aguda: caso reporte y revisión de la literatura. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 11(1), 107-110.

- Hassan, A. K., Aftab, A., & Riffat, M. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 509-514.
- Hegstad, K.; Mikalsen, T. & Coque, T. (2010). Metal-Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect*;16: 541–54.
- Herrera S., Sorlí L., Pérez-Sáez M.J., Ruiz-Garbajosa P., Barrios C., Plasencia V., Montero M., Terradas R., Crespo M., Castells X., Cantón R., Pascual J., Horcajada J.P. (2016). Characterization and rapid control of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) outbreak in a renal transplant unit in Spain: The environment matters. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2016.04.002>.
- Homan, W. L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., ... Willems, R. J. (2002). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 1963-1971.
- Jahansepar A., Mohammad Ahangarzadeh Rezaee, Alka Hasani, Yaeghob Sharifi, Marjan Rahnamaye Farzami, Alireza Dolatyar & Mohammad Aghazadeh (2018). Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens in the Northwest of Iran. *Microbial Drug Resistance. Epidemiology*. doi: 10.1089/mdr.2017.0380
- Jolley, K. A, Bray J. E. and Maiden M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; peer review: 2 approved]. [Wellcome Open Res, 3:124](https://doi.org/10.1186/s12874-018-0488-1).
- Jones, M. L., Martoni, C. J., Parent, M., & Prakash, S. (2012). Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *British Journal of Nutrition*, 107(10), 1505-1513.
- Kaminska W., et al. (2019). Genetic typing of *Enterococcus faecium* VRE strains isolated in three hospitals in Warsaw and Siedlce in 2015-2016. *PRZEGL EPIDEMIOLOGI*; 73 (1):49-60.

- Kamhuka L. N., *et al.* (2013). Successful control of a vancomycin resistant Enterococci (VRE) outbreak on a pediatric ward-do not forget the toys. *Oral Abstracts/American Journal of Infection Control* 41: S5.
- Klare I., Konstabel C., Mueller-Bertling S., Werner G., Strommenger B., Kettlitz C., *et al.* (2005). Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 24:815-25.
- Klemm P, Hancock V, Schembri M. (2007). Mellowing out: adaptation to commensalism by *Escherichia coli* asymptomatic bacteria strain 83972. *Infect Immun*; 75:3688-95; PMID:17502385; <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01730-06>.
- Kristich J. C., Louis B. Rice & Cesar A. Arias (2014). Enterococcal infection-Treatment and Antibiotic Resistance. En Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y., *et al.*, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston, Massachusetts.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., ... Jain, S. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental diabetes research*.
- Kuo, A.-J., Su, L.-H., Shu, J.-C., Wang, J.-T., Wang, J.-H., Fung, C.-P., ... Wu, T.-L. (2014). National surveillance on vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Taiwan: emergence and widespread of ST414 and a Tn1546-like element with simultaneous insertion of IS1251-like and IS1678. *PloS one*, 9(12), e115555.
- Laverde, G.J., Van, S.W., Freitas, A., Coque, T., Weaver, K., Francia, M., Witte, W., Werner, G. (2011). A multiresistance megaplasmid pLG1bearing a *hyl*(Efm) genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*; Vol. 301, n° 2, p.165-175.
- Leavis H.L., *et al.* (2006). Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Current opinion in Microbiology*. 9:454-460.
- Lebreton, F., Willems, R. J., & Gilmore, M. S. (2014). *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization.

- Lee T., Pang S., Abraham S. y Coombs G. W. (2019). Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 16; 36-47.
- Lee W. G. *et al.* (2012). Characterization of a Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Outbreak Caused by 2 Genetically Different Clones at a Neonatal Intensive Care Unit. *Ann Lab Med*; 32:82-86. <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2012.32.1.82>
- Leo-Amador, G. E., Borbolla-Ramos, A., Morales-Lara, J. A., Pérez-González, H. A., Hernandez-Montiel, H. L., & Solis-s, J. C. (2011). Infection or colonization and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp at a regional hospital in Queretaro, Mexico. *American journal of infection control*, 39(7), 615-616.
- Long GH & Graham AL (2011). Consequences of immunopathology for pathogen virulence evolution and public health: malaria as a case study. *Evolutionary Applications* ISSN 1752-4571. Blackwell Publishing Ltd 4; 278–291. doi:10.1111/j.1752-4571.2010.00178.x
- López-Urrutia L., *et al.* (2018). Brote por *Enterococcus faecium* ST17 resistente a glucopéptidos en una Unidad de Neonatología. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 36 (3):198–202.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., ... Olsson-Liljequist, B. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3), 268-281.
- Mandigan, M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., & Clark D. P. (2009). *Brock Biología de los microorganismos* (12ª Edición). Pearson Educación. Addison Wesley.
- Marcobal, A., & Muñoz, R. (2007). MLST (Multilocus sequence typing): un método molecular para la caracterización inequívoca de cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum* (pp. 34-35). Presentado en Avances en ciencias y técnicas enológicas: Transferencia de tecnología de la red GIENOL al sector vitivinícola, Junta de Extremadura.

- Marcadé G., Micol J. B., Jacquier H., Raskine L., Donay J. L., Nicolas-Viaud S., Rouveau M., Ribaud P., Dombret H., Leclercq R., & Cambau E. (2014). Outbreak in a haematology unit involving an unusual strain of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* carrying both *vanA* and *vanB* genes. *J Antimicrob Chemother.*; 69 (2):500-5. DOI: 10.1093/jac/dkt376
- Mascio C. T., Alder J. D. & Silverman J. A. (2007). Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(12):4255–4260.
- Melegh S., Adrienn Nyul, Krisztina Kovács, Tamás Kovács, Ágoston Ghidán, Zsuzsanna Dombrádi, Judit Szabó, Brigitta Berta, Virág Lesinszki, Judit Pászti, Ákos Tóth, & Gyula Mestyán (2018). Dissemination of VanA-Type *Enterococcus faecium* Isolates in Hungary. *Microbial Drug Resistance. Epidemiology*. DOI: 10.1089/mdr.2017.0296
- Méthot P. O. & Alizon S.. (2014). What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. *Virulence* 5:8, 775--785.
- Milena A. B. S. (2007). Algoritmo para análisis filogenético: UPGMA. Tesis Propuesta como cumplimiento de los requisitos para optar al título de Ingeniera de sistemas. Universidad del Norte División de Ingenierías Departamento de Ingeniería de Sistemas Barranquilla.
- Ministerio de Salud Pública (MSP) (2005). *Guías de prevención y control de Enterococo resistente a vancomicina (ERV)*. 21 pp.
- Mira, M.-U., Deana, M., Zora, J., Vera, G., Biljana, M., & Biljana, R. (2014). Prevalence of different enterococcal species isolated from blood and their susceptibility to antimicrobial drugs in Vojvodina, Serbia, 2011-2013. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 819-824.
- Moles L., et al. (2015). Preterm infant gut colonization in the neonatal ICU and complete restoration 2 years later. *Clin Microbiol Infect*. 21(10):936.e1-936.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.003>

- Nasaj, M., Mousavi, S. M., Hosseini, S. M., & Arabestani, M. R. (2016). Prevalence of virulence factors and vancomycin-resistant genes among *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from clinical specimens. *Iranian journal of public health*, 45(6), 806.
- Nassonova, E. (2008). Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application. *Cell and Tissue Biology*, 2(6), 557.
- Ochoa, S. A., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L. B., Saldaña, Z., Cázares-Domínguez, V., Aquino-Jarquín, G. (2013). Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC microbiology*, 13(1), 291.
- Oliveira Salge, P. A., Marques Palos A. K., Aparecida Prado M. (2017). Infecciones relacionadas con la asistencia a la salud en unidades de terapia intensiva neonatal: una revisión integradora. Revista electrónica trimestral de enfermería: Enfermería Global (EG). N° 45. <http://dx.doi.org/10.6018/eglobal.16.1.238041>.
- Ortega Ramírez María Guadalupe, Vallejo Ugalde Carlos, De los Santos Aguilar Jorge, Vázquez, F., Zaldívar Lelo de Larrea, G., Ávila Morales, J., García Gutiérrez María Carlota (2015). Factores de riesgo para la colonización por *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina en una unidad de neonatología. *Revista Electrónica de Difusión y Divulgación científica tecnológica y de innovación del Estado de Querétaro (Nthe)*, 11(1), 104.
- Panesso, D., Reyes, J., Rincón, S., Díaz, L., Galloway-Peña, J., Zurita, J., & Arias, C. A. (2010). Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: a Prospective, Multicenter Study in South American Hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(5), 1562-1569. <https://doi.org/10.1128/JCM.02526-09>
- Pidot, S. J., Gao, W., Buultjens, A. H. *et al.* (2018). Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Sci. Transl. Med.* 10, eaar6115.
- Ponessa, A. *et al.*, (2006). Enterococos vancomicina resistentes: colonización en pacientes hospitalizados, en Rosario, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 40 (4), 499-502.

- Prescott, L. M., Harley J. P., & Klein D. A. (2004). *Microbiología* (5ª Edición). Mc GrawHill.
- Reina-Bautista, E., Camacho-Moreno, G., Arzate-Barbosa, P., & Colsa-Ranero, D. (2013). Perfil fenotípico de resistencia de enterococos en el Instituto Nacional de Pediatría, en la Ciudad de México. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 26(106), 369-372.
- Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H. R., González-Díaz, E., & Morfín-Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, 34(1).
- Sana F. *et al.*, (2019). Pattern of Blood Stream Infections and their antibiotic susceptibility profile in a Neonatal intensive care unit of a tertiary care hospital; a current perspective. *J Pak Med Assoc.* 69 (11), 1668-1672.
- Schmidt-Hieber M., Blau I. W., Schwartz S., Uharek L., Weist K., Eckmanns T., Jonas D., Rüden H., Thiel E., & Brandt C. (2007). Intensified strategies to control vancomycin-resistant enterococci immunocompromised patients. *Int J Hematol.*; 86 (2):158-62. DOI: 10.1532/IJH97.E0632.
- Silveira, E., Freitas, A. R., Antunes, P., Barros, M., Campos, J., Coque, T. M., ... Novais, C. (2013). Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69 (4), 899-906.
- Sommer F. & Backhed F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11:227-238. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2974>.
- Spratt B. G., Hanage W. P., Li B., *et al.* (2004). Displaying the relatedness among isolates of bacterial species-the eBURST approach. *FEMS Microbiology Letters* 241. 129-134.

- Tedim A. P., Ruíz-Garbajosa P., Rodríguez M. C., *et al.* (2016). Long-term clonal dynamics of *Enterococcus faecium* strains causing bloodstream infections (1995–2015) in Spain. *J Antimicrob Chemother* doi:10.1093/jac/dkw366. 1-8 pp.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*, 33 (9), 2233.
- Unique Biotech Limited. (2005). [Comercial]. Recuperado a partir de <https://www.indiamart.com/proddetail/enterococcus-faecium-4758151362.html>.
- Ulrich N. & Petra G. (2017). Where is the difference between an epidemic and a high endemic level with respect to nosocomial infection control measures? An analysis based on the example of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in hematology and oncology departments. *GMS Hygiene and Infection Control*, Vol. 12, ISSN 2196-5226.
- Valdezate S., Miranda C., Navarro A., Freitas A. R., Cabrera J. J., Carrasco G., Coque T.M., Jiménez-Romano E., Saéz-Nieto J. A. (2012). Clonal outbreak of ST17 multidrug-resistant *Enterococcus faecium* harbouring an Inc18-like:Tn1546 plasmid in a haemo-oncology ward of a Spanish hospital. *J Antimicrob Chemother.*; 67 (4), 832-6. DOI: 10.1093/jac/dkr545
- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Björkroth, K. J., De Vuyst, L. (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (3), 1381-1391.
- van Hal S.J.; Ip, C.L.C.; Ansari A. A. *et al.* (2016). Evolutionary dynamics of *Enterococcus faecium* reveals complex genomic relationships between isolates with independent emergence of vancomycin resistance. *Microb Genomics*; 2: doi:10.1099/mgen.0.000048.
- Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Swings, J., Klare, I., Goossens, H. (2008). Genotypic Diversity, Antimicrobial Resistance, and Virulence Factors of Human Isolates and Probiotic Cultures Constituting Two Intraspecific

- Groups of *Enterococcus faecium* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (14), 4247-4255. <https://doi.org/10.1128/AEM.02474-07>
- Werner, G., Fleige, C., Geringer, U., van Schaik, W., Klare, I., & Witte, W. (2011). IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infectious Diseases*, 11, 80-80. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-80>
- Werner, G., Klare, I., Fleige, C., *et al.* (2012). Vancomycin-resistant *vanB* -type *Enterococcus faecium* isolates expressing varying levels of vancomycin resistance and being highly prevalent among neonatal patients in a single ICU. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 1 (21), 1-11.
- Willems, R. J., Hanage, W. P., Bessen, D. E., & Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 35 (5), 872-900.
- Willems, R. J., & Van Schaik, W. (2009). Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *Future microbiology*, 4 (9), 1125-1135.
- Willems R. J. L., Top J., van Santen M., *et al.* (2005). Global Spread of Vancomycinresistant *Enterococcus faecium* from Distinct Nosocomial Genetic Complex. *Emerging Infectious Diseases*. www.cdc.gov/eid. 11 (6), 821-28.
- Willems, R.J., Homan, W., Top, J., van Santen-Verheuvél M., Tribe D., Manzióros, X. (2001). Variant *Esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet*.; 357(9259):853 5.
- Worth L. J., Thursky K. A., Seymour J. F., & Slavin M. A. (2007). Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* infection in patients with hematologic malignancy: patients with acute myeloid leukemia are at high-risk. *Eur J Haematol*.; 79 (3), 226-33. DOI:10.1111/j.1600-0609.2007.00911.x.
- Yang, J., Jiang, Y., Guo, L., Ye, Li., Ma, Y., & Luo, Y. (2016). Prevalence of diverse clones of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST78 in a Chinese hospital. *Microbial Drug Resistance*, 22 (4), 294-300.

- Yamanaka, H., Takagi T., Ohsawa, M., Yamamoto, N., Kubo, N., Takemoto T., Sasano, S., Masuyama, R., Ohsawa, K. (2014). Identification and Characterization of Vancomycin-resistant *Enterococcus* species Frequently Isolated from Laboratory Mice; *Journal Experimental Animals*; 63 (3), 297304.
- Ziakas P. D. *et al.* (2013). Trends and Significance of VRE Colonization in the ICU: A Meta-Analysis of Published Studies. *PLoS ONE* 8(9): e75658. doi:10.1371/journal.pone.0075658.
- Zárate M. A., Gales A., Jordá-Vargas L., Yahni D., Relloso S., Bonvehi P., Monteiro J., Campos-Pignatari A., Smayevsky J. (2007). Contaminación ambiental durante un brote de enterococo resistente a vancomicina en un hospital de Argentina. 25 (8). 508-512 DOI: 10.1157/13109987.

IX. ANEXOS

Técnicas de tipificación molecular

Con los avances en la biología molecular se han desarrollado diversas técnicas que se utilizan para la tipificación molecular, como la técnica de RFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción), la ribotipia (análisis de las subunidades de ARN como la 16S, por ejemplo), la PFGE (electroforesis en gel con campos pulsados) y la MLST (técnica de tipificación y secuenciación multilocus). Ésta última se basa en el análisis de las secuencias de genes conservados o housekeeping (por su término en inglés). Estas técnicas contribuyen a la identificación de las distintas cepas de una misma especie (Marcobal & Muñoz, 2007). Por medio del estudio de Marcobal & Muñoz, la técnica de MLST fue la mejor (comparada contra la ribotipia y la de RFLP) para la discriminación y caracterización precisa e inequívoca de cepas de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*, porque presentan un grado de diversificación suficiente para obtener una alta discriminación entre los dos microorganismos. En *O. oeni* todos los perfiles alélicos o ST, difirieron en varios genes, excepto en las ST-11 y ST-13, que solo difirieron en un gen. En el caso de *L. plantarum*, se identificaron 14 perfiles alélicos o ST que se diferenciaron en varios genes, excepto en las ST-5 y ST-6 que solo diferían en un gen.

También la tipificación molecular de los microorganismos puede contribuir a una mayor comprensión de la capacidad de patogenicidad o virulencia en los mismos. Por ejemplo, al identificar los complejos clonales representativos de hospitales como el CC17 en una determinada región geográfica, nos podría reflejar cierta capacidad de transmisión del patógeno así como su capacidad de virulencia que contribuya a una mayor sobrevivencia a condiciones ambientales más amplias, posiblemente por una transferencia genética horizontal entre las distintas cepas de la misma especie o entre diferentes especies, aumentando así su patogenicidad. De acuerdo con Arrieta, B. (2007), dichos factores de virulencia pueden identificarse mediante estudios de genómica en las cepas patógenas, lo cual en diversos estudios, ha reflejado una relación de la expresión de ciertos complejos de genes con las condiciones de crecimiento de los microorganismos y con su desenlace clínico (Arrieta Bolaños, 2007). Por ejemplo, en *Shigella* y *E. coli* se ha demostrado que la

delección de ciertos fragmentos genómicos, favorecen la virulencia en estas bacterias (Chan, 2003).

La técnica de PFGE, como ya se mencionó, es otra de las técnicas más utilizadas para la caracterización molecular de los microorganismos. Es un tipo de electroforesis que separa fragmentos de ADN dentro de un rango de tamaño más amplio, que van desde kilo bases (40-50 kb) hasta mega bases (Mb) (Goering, 2010).

Técnica PFGE

De acuerdo con Goering (2010), la técnica de PFGE, es considerada la prueba de oro para la identificación de las interrelaciones entre microorganismos como las bacterias. Esta técnica tiene algunas variantes, la que se utilizará en este proyecto de investigación es la variante CHEF (siglas en inglés) o electroforesis de campo eléctrico homogéneo restringido al contorno (contour-clamped homogeneous electric field).

Con ésta técnica se pueden separar por medio de la electroforesis en gel de agarosa, fragmentos de restricción de ADN desde 10 Kb hasta 10 Mb (Nassonova, 2008). El equipo de la PFGE consiste en una cámara de electroforesis que tiene los electrodos alrededor de la zona en donde se coloca el gel (figura 1), los cuales generan diversos pulsos programados que ayudan a la separación de una más amplia diversidad de fragmentos de ADN en cuanto a su tamaño.

Con la técnica PFGE-CHEF se deben programar los parámetros a un ángulo de 120° , con pulsos crecientes que comienzan con 4 segundos para finalizar con 40 segundos (durante las horas programadas de corrimiento) con la finalidad de que migren en primer lugar, los fragmentos más pequeños que son los que requieren menos tiempo para hacerlo y al final se deje un tiempo mayor para la migración de los fragmentos más grandes. Otros parámetros que deben programarse son el voltaje a 6 V/cm, la temperatura a 14°C y dejar corriendo el gel durante aproximadamente 22 horas (Cardozo-Bernal *et al.*, 2013). Es importante mencionar que el protocolo a seguir, dependerá del microorganismo o cepa a estudiar, así como deberá estandarizarse la técnica para la bacteria y estudio en particular.

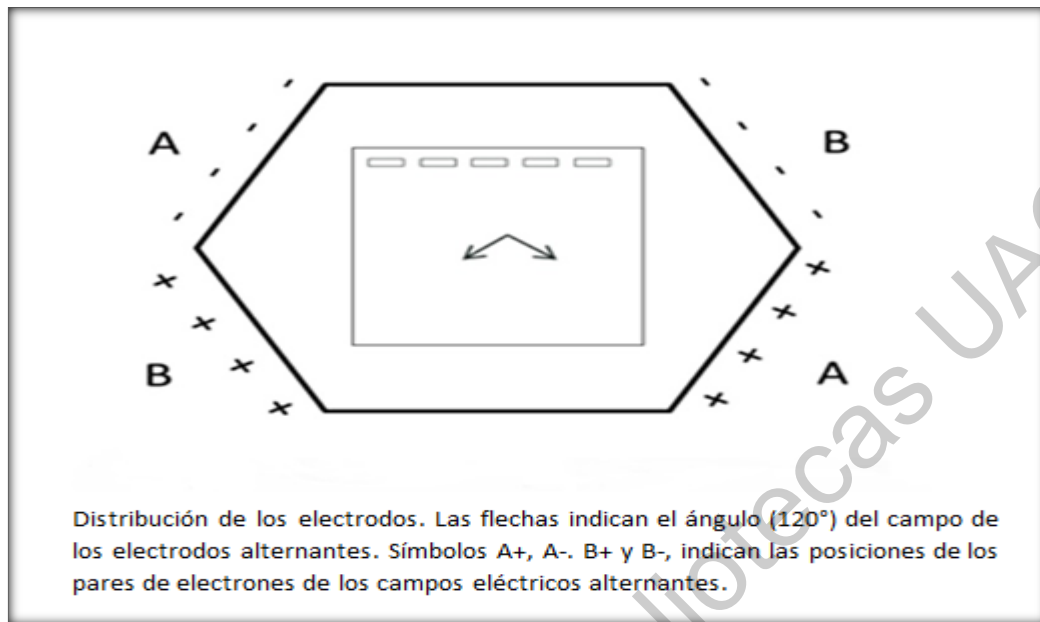


Figura 1. Electroforesis en gel con campos pulsados-CHEF (Cardozo-Bernal *et al.*, 2013).

La PFGE-CHEF es realizada con un arreglo de 24 electrodos, alrededor del gel de agarosa, produciendo un gradiente electroforético muy homogéneo, causando que las moléculas de ADN, sean reorientadas sobre un ángulo de 120° . Esta configuración produce una migración del ADN equidistante hacia la derecha e izquierda del centro del gel que resulta en la separación de carriles verticales bien definidos. Como sucede con todos los métodos de electroforesis, el éxito en la técnica CHEF, depende de factores como el grosor del gel de agarosa, la concentración de agarosa, la composición del buffer, y la fuerza del campo eléctrico. También es importante la selección de las enzimas de restricción adecuadas, la concentración de las bacterias suspendidas y el buen funcionamiento del equipo de electroforesis PFGE (Goering, 2010).

La técnica de PFGE, consiste en inocular las bacterias en agarosa, lisar las células y fragmentar el ADN con enzimas de restricción que cortan los sitios de reconocimiento distribuidos de manera poco frecuente a lo largo de todo el genoma bacteriano. Los cubos de agarosa formados que contienen los fragmentos del ADN se insertan en los pocillos del gel de agarosa para el corrimiento electroforético produciendo un patrón de bandas de acuerdo al número de pares de bases del ADN de cada fragmento obtenido. Los patrones de

dichas bandas de ADN se comparan entre sí para determinar si existe entre ellos, alguna relación genética. La endonucleasa de restricción más utilizada para bacterias Gram positivas, es la *SmaI*. La interpretación visual del patrón de bandas producido por la electroforesis de la técnica PFGE, es sugerido para un grupo de aislamientos pequeño: menor o igual a 30 aislamientos bacterianos (Tenover *et al.*, 1995).

Los criterios para la interpretación visual de los fragmentos de restricción en el gel de agarosa obtenidos por PFGE se muestran en la tabla 1. En la figura 2, se muestran los posibles eventos genéticos (ganar o perder algún sitio de restricción, inserción o deleción de pares de bases en la secuencia de ADN) que deben considerarse al momento de la interpretación de los resultados, para evitar así errores en la misma.

Tabla 1. Criterios de investigación de los patrones de restricción por medio de la PFGE, modificada de (Tenover *et al.*, 1995).

Categoría	Número de diferencias genéticas.	Diferencias en el número de fragmentos de restricción observados en el gel.	Interpretación epidemiológica.
Idénticos	0	0	El aislamiento es parte del mismo brote.
Cercanamente relacionados	1	2-3	El aislamiento forma parte probablemente del mismo brote.
Posiblemente relacionados	2	4-6	El aislamiento forma parte posiblemente del mismo brote.
Significativamente diferentes	≥ 3	≥ 7	El aislamiento no es parte del mismo brote.

De manera visual, las cepas con patrones de PFGE idénticos se consideran del mismo tipo epidemiológico. Si los aislamientos tienen un evento genético diferente se consideran subtipos epidemiológicamente relacionados. Los aislamientos que se diferencian por dos eventos genéticos también están potencialmente relacionados, mientras que tres o más diferencias cromosómicas ya representan una diferencia epidemiológicamente significativa (aislamientos no relacionados) (Figura 2 y tabla 1). De acuerdo con Goering, (2010), la interpretación del gel además de ser visual, puede llevarse a cabo por medio de un software diseñado para ello (base de datos PulseNet), los cuales permiten una mejor interpretación de las posibles relaciones entre los aislamientos, además del análisis de un mayor número de cepas.

La similitud entre todos los pares de bandas de ADN, suele expresarse por medio de una correlación del coeficiente Sorensen-Dice (estadístico para comparar la similitud basada en datos de presencia/ausencia entre dos muestras) y el algoritmo para el análisis filogenético UPGMA (por sus siglas en inglés: unweighted pair group method using arithmetic averages) para la construcción del dendrograma o árbol filogenético (Milena S., 2007; Ochoa *et al.*, 2013).

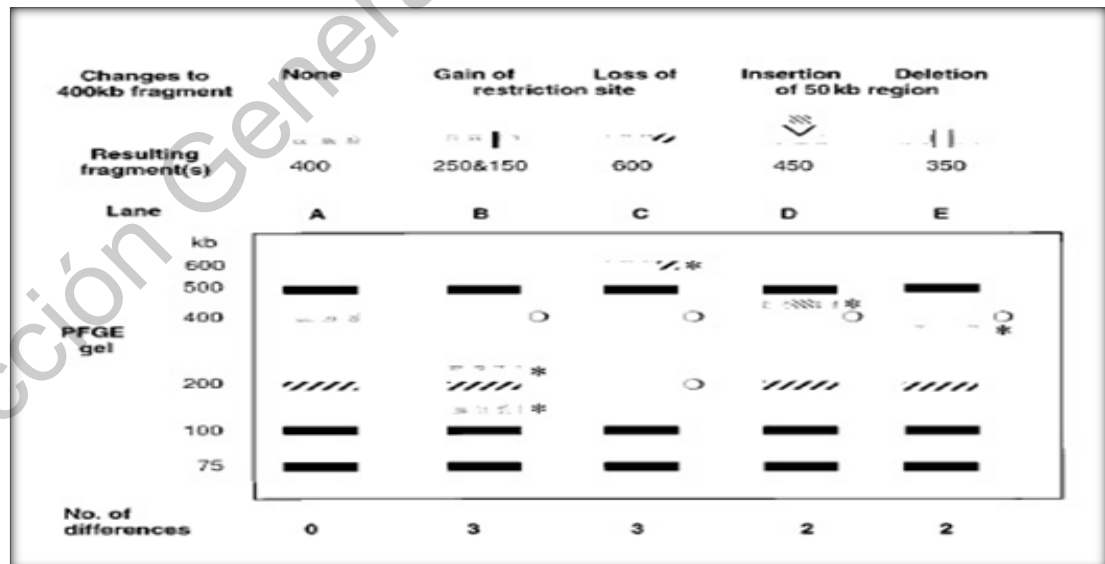


Figura 2. Patrones de restricción de ADN por medio de la técnica de PFGE como resultado de diversos eventos genéticos (Tenover *et al.*, 1995). **A.** Patrón de referencia. **B.** Se gana un sitio de restricción. **C.** Se pierde un sitio de restricción. **D.** Inserción de un fragmento de ADN en otro ya existente. **E.** Delección de un fragmento de ADN de otro ya existente.

Técnica MLST

La técnica de tipificación y secuenciación multilocus se basa en la secuenciación de genes conservados también conocidos como housekeeping, los cuales codifican proteínas importantes para las funciones vitales de las células, debido a ello las tasas de mutación en estos genes son muy bajas, es por ello que resultan ser buenos indicadores muy estables sobre la presencia de nuevas mutaciones (Marcobal & Muñoz, 2007).

Los fragmentos de los genes conservados (housekeeping) los cuales se muestran en la tabla 2, son amplificados por medio de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), utilizando el ADN de las cepas bacterianas de estudio. Posteriormente se asigna un número alélico ante una nueva mutación (dichos números alélicos ya existen en bases de datos). La combinación de esos números de alelos se conoce como perfil alélico (cantidad de polimorfismos diferentes encontrados en cada uno de los genes conservados) y un perfil alélico nos indica la secuencia tipo (ST) correspondiente. La identificación de un nucleótido nuevo es considerado un alelo distinto, y si son nuevos alelos se les asigna un número que después es ingresado a la base de datos existente (Marcobal & Muñoz, 2007).

Tabla 2. Genes conservados o housekeeping para la determinación de la relación filogenética de cepas de *E. faecium* por medio de la técnica de MLST (Homan *et al.*, 2002).

Gen	Nombre
<i>adk</i>	Adenilato quinasa
<i>atpA</i>	ATP sintasa, subunidad alfa (ATP synthase, alpha subunit)
<i>ddl</i>	D-alanina:D-alanina ligasa

<i>gyd</i>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
<i>gdh</i>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<i>purk</i>	Subunidad ATPasa de fosforibosilamino imidazol carboxilasa
<i>psts</i>	Transportador del casete de unión de ATP-fosfato (phosphate ATP-binding cassette transporter)

De acuerdo con Gilmore y col. (2013), la técnica de MLST para *E. faecium*, consiste en la secuenciación de fragmentos internos de los 7 genes conservados o housekeeping (de entre 395 y 583 nucleótidos): el *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purk*, *gyd*, *psts* y el *adk* (tabla 2). Estos genes fueron seleccionados de acuerdo a una serie de características: en primer lugar, que fueran genes conservados (con un papel importante en las funciones de la célula y por lo tanto con una tasa de mutación muy baja) de tal forma, que las pequeñas variaciones evolutivas en los nucleótidos fueran mínimas y así poder comparar e identificar si los aislamientos pertenecen a la misma cepa o son cepas diferentes; en segundo lugar, que los genes conservados tuvieran polimorfismos (descartando las secuencias monomórficas) para de ese modo, poder realizar las comparaciones antes mencionadas entre los aislamientos bacterianos, y en tercer lugar, que no estuvieran cerca de genes de resistencia o de genes que codifican para proteínas de membrana, pues las secuencias próximas a ellos suelen tener mucha variación en sus nucleótidos (Lebreton & Gilmore, 2014).

Una ventaja de la técnica de MLST, es la gran cantidad de datos sobre los perfiles de *E. faecium* previamente identificados (sitio web <https://pubmlst.org/efaecium/> desarrollado por Jolley *et al.*, 2018), contribuyendo a una nomenclatura de complejos clonales (miles de STs). El principal complejo clonal en donde se incluyen aislamientos de *E. faecium* de

origen hospitalario, es el CC17. Se cree que las cepas pertenecientes a este complejo clonal, evolucionaron de cepas provenientes y relacionadas con animales, las cuales son muy diferentes a las encontradas en el cuerpo humano (cepas comensales) (Gilmore *et al.*, 2013).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Definición de variables y unidades de medida.

Tabla 3. Definición de las variables y unidades de medida.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Perfil de multifármaco resistencia (MDR)	Resistencia a por lo menos un agente antimicrobiano de tres o más categorías (Magiorakos <i>et al.</i> , 2012).	Se efectuó la clasificación de los perfiles o patrones de resistencia, basada en los criterios de la CDC (centro de control de enfermedades, por sus siglas en inglés) (Magiorakos <i>et al.</i> , 2012).	Cualitativa	Nominal Policotómica
Perfiles de PFGE	Se definieron de acuerdo a un porcentaje de similitud mayor al 80%, esto con base a los resultados obtenidos en el dendrograma por medio del coeficiente DICE y el algoritmo UPGMA.	Se determinaron los perfiles con base en el coeficiente Dice y el algoritmo UPGMA.	Cualitativa	Nominal Policotómica

<p>Secuencias tipo (ST)</p>	<p>El resultado de la combinación de los números de alelos de cada gen conservado o house-keeping, se conoce como perfil alélico (el cual previamente ha sido registrado en la base de datos localizada en : http://pubmlst.org/efaecium/ -Jolley <i>et al.</i>, 2018-). Con dicho perfil alélico se podrá determinar la Secuencia Tipo (ST).</p>	<p>Se analizaron los perfiles alélicos en la base de datos : http://pubmlst.org/efaecium/ (Jolley <i>et al.</i>, 2018).</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Nominal policotómica</p>
<p>Hospital de origen</p>	<p>Hospital en donde se obtuvieron las muestras.</p>	<p>Las muestras fueron obtenidas en dos hospitales de la Ciudad de Querétaro.</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Nominal dicotómica</p>

Preparación de soluciones stock

Las soluciones stock fueron preparadas en el momento en que iban a ser utilizadas. Se prepararon con agua inyectable estéril. Las soluciones stock fueron esterilizadas por autoclave y los detergentes (brij58, desoxicolato y sarcosil) mediante filtración.

Las enzimas se prepararon en agua inyectable estéril y las alícuotas correspondientes se almacenaron a -20°C .

Tabla 4. Solución de Suspensión.

Solución stock	Concentración inicial	Concentración final	100 ml de solución
Tris-HCl	2 M (pH=7.6)	10 mM	0.5 ml
NaCl	5 M	1 M	20 ml
H ₂ O			79.5 ml

Tabla 5. Solución de Lisis.

Solución Stock	Concentración inicial	Concentración final	100 ml de solución
Tris-HCl	2 M (pH=7.6)	6 mM	0.3 ml
NaCl	5 M	1 M	20 ml
EDTA	0.5 M (pH=9-9.5)	100 mM	20 ml
Brij58	10 %	0.5 %	5 ml
Desoxicolato	10 %	0.2 %	2 ml
Sarcosil	20 %	0.5	2.5 ml
Lisozima	2 mg/ml	100 $\mu\text{g/ml}$	5 ml
Rnasa	10 mg/ml	20 $\mu\text{g/ml}$	0.2 ml
H ₂ O			45 ml

Tabla 6. Solución de Desproteínización.

Solución Stock	Concentración inicial	Concentración final	100 ml de solución
EDTA	0.5 M (pH=9-9.5)	0.5 M	94 ml
Sarcosil	20 %	1 %	5 ml
Proteinasa K	20 mg/ml	200 µg/ml	1 ml

Dirección General de Bibliotecas UAQ