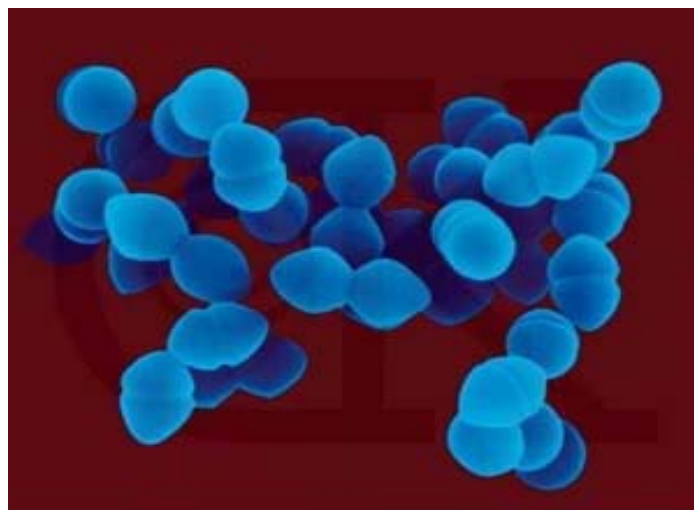


INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA

***Enterococcus aislados en Cuba:
resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética***



**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas**

Autor: Dra. Dianelys Quiñones Pérez, MSc.

Asesores: Dra. Rosa del Campo, Dr C

Dra. Alina Llop, Dr C

Dr. Raúl Díaz, Dr C

Ciudad de La Habana, 2010

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

SUBDIRECCIÓN DE MICROBIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA

***Enterococcus aislados en Cuba:
resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética***

**Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Médicas**

Autor: Dra. Dianelys Quiñones Pérez, MSc.

Asesores: Dra. Rosa del Campo, Dr C

Dra. Alina Llop, Dr C

Dr. Raúl Díaz, Dr C

Ciudad de La Habana, 2010

AGRADECIMIENTOS

Suele dejarse este acápite para el final pensando que es el más fácil, sin embargo, no todos pensamos así. Para mí, es una de las partes más difícil de este ejercicio por no encontrar palabras para describir el infinito e inmenso agradecimiento para aquellas personas que me ayudaron desde que comencé el trayecto de este largo camino.

Mis agradecimientos a la Dra. Rosa del Campo, al Dr. Raúl Díaz y a la Dra. Alina Llop por su labor como asesores de este trabajo. Gracias Dra. Rosa por su ayuda desinteresada e incondicional a pesar de la distancia, por su sensibilidad humana insuperable, gracias por sus deseos y esfuerzo para estar en este acto. Gracias Raully por tus valiosos conocimientos y consejos que me brindaste durante la asesoría de este trabajo. Gracias Dra. Alina por ser un ejemplo de dedicación y consagración a la ciencia en el que me inspiré para llegar hasta aquí, gracias por su ayuda en mi formación profesional durante todos estos años.

Gracias a la Dra. Maria Eugenia Toledo, al Dr. Carlos Fernández, al Dr. Gerardo Martínez, a la Dra. Hilda María García, a la Dra. Maria Espino y al MSc. Emilio Casanueva por la revisión de este documento los cuales me aportaron válidas sugerencias para perfeccionar el mismo.

Mis agradecimientos para Lily, Rafa y Ernesto por irradiarme paz en todo momento y por demostrarme que siempre puedo contar con ellos.

Mi gratitud para mis compañeras del Laboratorio de IRAB por su apoyo durante la realización de este trabajo: Miriam Fina, Gilda, Dainerys, en especial a Miriam Abreu por su dedicación y contribución al trabajo de referencia de *Enterococcus*, en mis períodos de ausencia del laboratorio mientras redactaba este manuscrito.

Gracias a la Dra. Rosabel Falcón, Dra. Ana Margarita Obregón, Lic. Biky, Lic. Mayda, Iraida, Dra. María Teresa por sus alentadoras palabras durante el curso de este trabajo. No puedo dejar de referirme a mis otros compañeros del departamento (del segundo y tercer piso) que me dieron su apoyo de alguna u otra manera, me resulta imposible mencionarlos a todos, mi agradecimientos sinceros para ustedes, también.

Gracias al Dr. Ernesto Montoro por confiar en mi trabajo.

Gracias a la Dra. Rosmary Rodríguez, Dra. Ana Beatriz Pérez, Dra. Clara Savón, por sus enseñanzas y a mis colegas de Epidemiología, Betty, Yohandra y Alexander por su apoyo en el análisis estadístico de los resultados.

Agradezco, además, a mis colegas de la Subdirección Docente, con los que he compartido durante todos estos años, a la Dra. Nereida Cantelar, ejemplo alentador para llegar hasta aquí, a Mandy, Lázaro, Maribel, Telma y Betty por su amabilidad y disposición en todo momento.

Mil gracias a Delmis Alvarez y a Yisel Torres por su amabilidad y apoyo en momentos difíciles de este andar, así como para a Odalys y Anisleidys en la subdirección de Microbiología.

Mis eternos agradecimientos para los profesores Rafael Gómez Luz de la Universidad de Zaragoza en España y Nobumichi Kobayashi de la Universidad de Sapporo en Japón quienes me abrieron su puerta cuando toqué a ella.

Por último, y no menos importante, quiero expresar mis agradecimientos profundos, inmensos y desmedidos para toda mi familia, en especial a mis padres, a mi hermano, a Fito y a Mamina, por apoyarme durante todos estos años de intenso trabajo, por comprender que la labor de un científico no tiene fin y asumir parte de mis responsabilidades, inevitablemente postergadas muchas veces, para poder cumplir este sueño que espero hoy se haga realidad. Gracias a mi adorable Mariam por su amor y la fuerza que me brinda en cada minuto de mi vida.

A todos muchas gracias,

Dianelys

Dedicatoria

A mis padres, por sus enseñanzas y educación

A mi adorable hija y a mi hermano, fuentes de luz, inspiración y amor

A mi esposo, por su apoyo incondicional

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS:

Amp: Ampicilina

ANRA: Alto nivel de resistencia aminoglucosídica

ANRGM: Alto nivel de resistencia a la gentamicina

ANRStr: Alto nivel de resistencia a la estreptomina

ANRKM: Alto nivel de resistencia a la kanamicina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Arb: Arbekacina

ARN: Ácido ribonucleico

But: Butirosina

CIM: Concentración inhibitoria mínima

Cip: Ciprofloxacina

CCs: Complejos clonales

CLSI, siglas en inglés: Clinical Laboratory Standard Institute

Dbk: Dibekamicina

ECP: Electroforesis en campo pulsado

EMAs: Enzimas modificantes de aminoglucósidos

EMDR: *Enterococcus* multidrogorresistente

ERV: *Enterococcus* resistente a la vancomicina

E: Eritromicina

ICC: Infusión de cerebro y corazón

IIH: Infección intrahospitalaria

Km: Kanamicina

Isepa: Isepamicina

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LNRM/IPK: Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del IPK

Liv: Lividomicina

MH: Mueller Hinton

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

***MLST*, siglas en inglés:** Multilocus sequence typing

Net: Netilmicina

Nm: Neomicina

OMS: Organización Mundial de la Salud

***PBP*, siglas en inglés:** Proteínas fijadoras de penicilina

PMNs: Neutrófilos polimorfonucleares

RAN: Resistencia de alto nivel

***PCR*, siglas en inglés:** Reacción en cadena de la polimerasa

Sis: Sisomicina

Spc: Espectinomicina

Str: Estreptomicina

Tei: Teicoplanina

Tm: Tobramicina

Tet: Tetraciclina

TGI: Tracto gastrointestinal

UFC: Unidades formadoras de colonias

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales

UCM: Unidad de Cuidados Medios

UCIP: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos

Va: Vancomicina

CONTROL SEMÁNTICO

Concentración inhibitoria mínima: menor concentración de un antimicrobiano expresada en $\mu\text{g/mL}$ que inhibe el crecimiento de un microorganismo (Olivares, 1999).

CIM₅₀: concentración de un antimicrobiano capaz de inhibir el 50% de una colección de microorganismos (Baquero, 1995).

CIM₉₀: concentración de un antimicrobiano capaz de inhibir el 90% de una colección de microorganismos (Baquero, 1995).

Multirresistencia: resistencia a tres o más familias de antimicrobianos diferentes (Murdoch, *et al.*, 2002).

Clon: linaje genético del que derivan aislamientos con patrón genético-molecular idéntico o al menos tan similar que evidencie la existencia de un ancestro común (Tenover *et al.*, 1995).

Alelo: secuencia de ADN que se encuentra en un lugar específico del cromosoma (Groth y Wetherrall, 2000).

Secuencia tipo (ST): La resultante de las combinaciones alélicas obtenidas en un esquema de Multilocus sequence typing en una bacteria y generalmente compuesta de siete números (Vázquez *et al.*, 2004).

Complejo clonal: Grupos de STs relacionadas entre sí que comparten al menos cinco de los siete alelos analizados (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007).

Single locus variant (SLV, siglas en inglés): STs que se diferencian en un solo alelo (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007).

Double locus variant (DLV, siglas en inglés): STs que se diferencian en dos alelos (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007).

Singletons: ST que no puede asignarse a ningún complejo clonal (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007).

SÍNTESIS

Se estudiaron 501 aislamientos de *Enterococcus* procedentes de 26 hospitales cubanos del periodo 2000-2005 para conocer las especies circulantes, susceptibilidad antimicrobiana y mecanismos implicados, virulencia, diversidad genética y relación filogenética con aislamientos del resto del mundo. Las especies más prevalentes fueron *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*. La resistencia a glicopéptidos (0,4%) y ampicilina (5,4%) se detectó en baja proporción, mientras que se observó un alto porcentaje de resistencia a los aminoglucósidos (gentamicina, 32%; estreptomycin, 27% y kanamicina, 29%) mediada por los genes *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)Ia*, *ant(3'')(9)*. La resistencia a eritromicina (35%) y a tetraciclina (54%) se correlacionó con la presencia de los genes *erm(B)* (71%), *tet(L)* (7%) y *tet(M)* (78%). En el 92% de los aislamientos se evidenció, al menos, un gen de virulencia y *E. faecalis* resultó ser la especie más virulenta. Se detectó una diseminación inter e intrahospitalaria de clones de *Enterococcus* y la resistencia antimicrobiana detectada obedeció a la diseminación de clones resistentes y a la transferencia de elementos genéticos móviles. La caracterización de *E. faecalis* mediante Multilocus sequence typing reveló una relación filogenética estrecha entre los aislamientos de Cuba y los previamente descritos en Europa lo que sugiere la existencia de un ancestro común.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	
I.1 Antecedentes	2
I.2 Hipótesis	5
I.3 Objetivos	5
I.4 Novedad Científica	6
I.5 Valor Teórico	7
I.6 Valor Práctico	7
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
II.1 Reseña histórica	9
II.2 Género <i>Enterococcus</i>	9
II.3 Relevancia clínica	10
II.4 Virulencia	11
II.4.1 Adherencia a los tejidos	11
II.4.2 Invasión de los tejidos	12
II.4.3 Productos secretados	13
II.4.4 Modulación de la inmunidad del huésped	14
II.4.5 Intercambio genético	15
II.5 Susceptibilidad de <i>Enterococcus</i> a los antibióticos	16
II.5.1 Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos	17
II.5.2 Mecanismo de resistencia a los glicopéptidos	19
II.5.3 Mecanismos de resistencia a los betalactámicos	21
II.5.4 Resistencia a las fluoroquinolonas	21
II.5.5 Resistencia a los macrólidos y a las estreptograminas	22
II.5.6 Resistencia a las tetraciclinas	22
II.5.7 Resistencia a las oxazolidinonas	23
	23

II.6 Tratamiento de la infección enterocócica	
II.7 Epidemiología de las infecciones causadas por <i>Enterococcus</i>	26
II.8 Epidemiología molecular de <i>Enterococcus</i>	27
II.8.1 Análisis de macrorestricción de ADN total por electroforesis en campo pulsado (ECP)	28
II.8.2 Análisis mediante <u>Multilocus Sequence Typing</u> (MLST)	30

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño de la investigación.	34
III.1.2 Diseño de los estudios de epidemiología molecular	35
III.2 Procedimientos	35
III.2.1 Identificación de especies de <i>Enterococcus</i>	36
III.2.1.1 Método convencional	36
III.2.1.2 Método automatizado "Mini Api" rapid ID 32 STREP	37
III.2.3 Conservación de las cepas	36
III.2.4 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana	36
III.2.4.1 Método de difusión en agar o Kirby-Bauer	37
III.2.4.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima	39
III.2.4.3 Determinación de la actividad de beta-lactamasa	40
III.2.5 Detección de genes de resistencia a los antimicrobianos	40
III.2.5.1 Electroforesis en gel de agarosa.	42
III.2.6 Determinación de la expresión fenotípica de la virulencia	42
III.2.7 Determinación de la presencia de genes de virulencia	42
III.2.8 Análisis de macrorestricción de ADN total por electroforesis en campo pulsado	43
III.2.9 Análisis mediante MLST de aislamientos de <i>E. faecalis</i>	44
III.3 Análisis estadístico	45
III.4 Aspectos éticos	46
III.5 Metodología general llevada a cabo en el presente trabajo	46

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
IV.1 Especies de <i>Enterococcus</i> identificadas	48
IV.2 Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos estudiados	49
IV.2.1 Análisis de la multirresistencia	57
IV.3 Análisis de los determinantes de resistencia a los antimicrobianos	58
IV.3.1 Genes de resistencia a los aminoglucósidos	58
IV.3.2 Genes de resistencia a los glicopéptidos	61
IV.3.3 Genes de resistencia a la tetraciclina y a la eritromicina	63
IV.4 Análisis de la virulencia	66
V.5 Análisis de la diversidad genética entre los aislamientos de <i>Enterococcus</i>	72
IV.5.1 Estudio 1	72
IV.5.2 Estudio 2	80
IV.6 Estudio 3: Análisis de la estructura poblacional de aislamientos de <i>E. faecalis</i> y su relación filogenética con los aislamientos de otras regiones del mundo	88
V. CONCLUSIONES	102
VI. RECOMENDACIONES	105
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXOS	133

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera el problema de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias patógenas una línea prioritaria de actuación para mejorar la salud humana. Se ha documentado una diseminación mundial de clones bacterianos resistentes y también de genes que confieren resistencia a las drogas antimicrobianas, siendo el género *Enterococcus* un buen ejemplo de ello (Cars *et al.*, 2008).

Desde que el microbiólogo francés Thiercelin empleara por primera vez el término *Enterococcus* en 1899, este patógeno sufre constantes cambios taxonómicos y actualmente es el tercer responsable de las infecciones intrahospitalarias siguiendo a *Staphylococcus aureus* y a *Escherichia coli* (Fisher y Phillips, 2009).

A nivel mundial, la infección enterocócica se cita entre las 10 primeras infecciones adquiridas en el hospital (Velásquez *et al.*, 2002; Di Rosa *et al.*, 2006). Su emergencia como patógeno es un hecho desde finales de la década de los años 80 y está relacionada con el empleo de antimicrobianos de amplio espectro, el uso de técnicas diagnósticas y terapéuticas invasivas, estancias hospitalarias prolongadas, aumento de la población inmunodeprimida, habilidad para adquirir determinantes genéticos de resistencia, adquisición de factores de virulencia y su fácil diseminación en el ambiente hospitalario (Jett *et al.*, 1994; Baldassarri *et al.*, 2005; Sood *et al.*, 2008).

Enterococcus forma parte de la microbiota intestinal del hombre y los animales, es un contaminante fecal de las aguas residuales y puede aislarse en múltiples nichos ecológicos debido a su resistencia a los factores ambientales (Baldassarri *et al.*, 2005). Se han descrito 36 especies distintas, solo 26 se asocian con las infecciones en humanos

(Chen y Zervos, 2009). *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son las especies más comunes, responsables de una amplia variedad de infecciones entre las que se citan infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones del torrente sanguíneo, infecciones del sistema nervioso central, endocarditis, infecciones intrabdominales, hepatobiliares, pélvicas y sepsis neonatal (Baldasari *et al.*, 2006; Sood *et al.*, 2008; Chen y Zervos, 2009).

El tratamiento de elección se basa en la combinación sinérgica de un betalactámico y un aminoglucósido, generalmente la ampicilina y la gentamicina. Los glicopéptidos, en especial la vancomicina, resulta el principal fármaco alternativo (Lester *et al.*, 2008). El género *Enterococcus* tiene como principal característica su resistencia intrínseca a numerosos antimicrobianos y, además, es capaz de adquirir fácilmente determinantes genéticos que codifican resistencias añadidas. Lo anterior limita considerablemente sus opciones terapéuticas, presentando un gran desafío para el control de la infección enterocócica (Sun *et al.*, 2009). La resistencia a los glicopéptidos y betalactámicos se describe principalmente en cepas aisladas en Estados Unidos y Europa, mientras que la resistencia a los aminoglucósidos se señala a nivel mundial (Rafii, 2006). Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, siglas en inglés) de Estados Unidos declaran, en 1990, que *Enterococcus* resistente a la vancomicina (ERV) es un “patógeno emergente” y constituye un dilema terapéutico (Bolyard *et al.*, 1995).

Los avances científicos en el conocimiento de la patogenia de la infección enterocócica han sido notables y demuestran dos formas de adquisición de la infección: la endógena (el microorganismo proviene de la microbiota natural del paciente) y la exógena (adquirido del medio ambiente). Esta última adquiere gran importancia en el origen y agravamiento de las infecciones nosocomiales debido a la diseminación de clones multirresistentes y con capacidad de invasión como: *E. faecium* CC17 y *E. faecalis* CC2 y CC9 (Koiten y Murray, 1993, Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007). Se describen varios factores de virulencia cuya expresión aumenta la patogenicidad de *Enterococcus*, entre los más importantes se citan la hemolisina, la proteasa, la sustancia de agregación y las

proteínas de superficie, aunque se señalan muchas incógnitas sobre la verdadera patogenia de la infección enterocócica (Filipová y Bujdaková, 2005).

Los estudios de epidemiología molecular evidencian la existencia de epidemias intra e interhospitalarias por la diseminación de clones de *Enterococcus* (Gilmore *et al.*, 2002; Malani *et al.*, 2002; Sood *et al.*, 2008). Resulta imprescindible el estudio de la epidemiología y la estructura poblacional de las cepas para detectar y prevenir la transmisión de *Enterococcus* virulentos o resistentes que puedan causar epidemias.

Desde la década de los años ochenta, la técnica de electroforesis en campo pulsado (ECP) se considera la técnica de referencia para evaluar la relación genética entre los diferentes aislamientos de *Enterococcus* (Homan *et al.*, 2002). Recientemente se implanta una nueva herramienta de tipificación basada en el análisis de secuencias nucleotídicas de genes conservados, reconocida internacionalmente como Multilocus Sequence Typing (MLST, siglas en inglés). Esta técnica permite realizar estudios de epidemiología molecular a largo plazo y diferenciar linajes genéticos de *E. faecalis* y de *E. faecium* lo que permite conocer la estructura poblacional de estas especies (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006a), sin embargo, aún existen pocos estudios en *Enterococcus* mediante MLST.

En Cuba, no existían reportes sobre la infección enterocócica, su epidemiología y características microbiológicas de *Enterococcus* circulantes en hospitales cuando la Dirección Nacional de Higiene y Epidemiología del MINSAP notificó que esta bacteria constituía causa de morbilidad y mortalidad en la población cubana (MINSAP: Programa Nacional de Prevención y Control de las IHH, Registro, año 1998). Por tal motivo, en el año 1999 el Laboratorio Nacional de Referencia de Microbiología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (LNRM/IPK) señala la necesidad y oportunidad de iniciar las investigaciones sobre este patógeno en Cuba (Quiñones y Tamargo, 1999).

Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, el presente trabajo se condujo para profundizar en el conocimiento de los aislamientos de *Enterococcus* circulantes en

Cuba, su susceptibilidad antimicrobiana, las bases moleculares de la resistencia, sus factores de virulencia, y llevar a cabo un análisis molecular de aislamientos cubanos que aportarían datos sobre la diversidad genética de ellos y su relación filogenética con aislamientos de otras partes del mundo.

I.2 Hipótesis

Enterococcus, en Cuba, constituye un microorganismo de relevancia clínica que se disemina intra e interhospitalariamente con una expansión clonal de cepas patógenas y resistentes a los antimicrobianos, relacionadas con cepas no autóctonas.

I.3 Objetivos

General

Aportar evidencias sobre los aspectos microbiológicos fenotípicos y genotípicos de *Enterococcus* circulantes en Cuba.

Específicos

1. Determinar las especies de *Enterococcus* circulantes en diferentes hospitales cubanos y su susceptibilidad a diferentes antimicrobianos.
2. Definir los mecanismos de resistencia para la ampicilina, los aminoglucósidos, los glicopéptidos, los macrólidos y la tetraciclina y sus determinantes implicados.
3. Determinar la actividad de proteasas y hemolisinas y la presencia de genes de virulencia en los aislamientos objeto de estudio.
4. Describir la diversidad genética entre los aislamientos de *Enterococcus* circulantes en Cuba.
5. Determinar la estructura poblacional de aislamientos de *E. faecalis* y su relación filogenética con los aislamientos de otras partes del mundo.

I.4 Novedad Científica

- Se demostró, por primera vez en Cuba, la circulación de *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus raffinosus* y *Enterococcus avium* y se brindan aportes al conocimiento mundial sobre los cambios evolutivos en el comportamiento clínico de algunas de estas especies.
- Se mostró una extensa investigación sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus* procedentes de diferentes áreas geográficas de Cuba y las bases genéticas de la resistencia, destacando la existencia en un bajo porcentaje de cepas con resistencia a los glicopéptidos y con una elevada resistencia a los aminoglucósidos.
- Se aportaron resultados novedosos sobre la patogenicidad de *Enterococcus*, que circularon tanto en los hospitales como en la comunidad.
- Se obtuvieron los primeros datos sobre la epidemiología molecular de *Enterococcus* lo que reveló la circulación de clones adaptados al medio hospitalario con diseminación intra e interhospitalaria. Se evidenció, además, dos vías por las cuales la resistencia antimicrobiana de *Enterococcus* aislados en diferentes hospitales del país es tan prevalente: la diseminación de clones resistentes y la transferencia de genes a través de elementos genéticos móviles (plásmidos o transposones).
- Se conoció, por primera vez en Cuba, la estructura poblacional de aislamientos clínicos de *E. faecalis*, su relación filogenética con las secuencias tipo (ST) de otras partes del mundo y se notificaron algunas que no estaban descritas previamente.

I.5 Valor teórico

Se incorporó al conocimiento sobre *Enterococcus*, y su problemática en Cuba, elementos novedosos relacionados con los aspectos clínicos, microbiológicos y epidemiológicos de esta bacteria. Esta investigación constituye el trabajo más completo sobre *Enterococcus* que se ha realizado en Cuba hasta la fecha y constituye un documento de carácter científico que puede ser utilizado como referencia en estudios futuros.

I.6 Valor Práctico

Este trabajo permitió la introducción del diagnóstico de *Enterococcus* en el LNRM/IPK y se activó la vigilancia nacional de este microorganismo y el monitoreo de su resistencia antimicrobiana. Se fortaleció el Programa Nacional de Control y Prevención de las Infecciones Intrahospitalarias al brindar resultados sólidos sobre las implicaciones del *Enterococcus* como patógeno en diversas regiones del país. El conocimiento sobre la resistencia antimicrobiana de *Enterococcus*, añadió valor al análisis de las políticas de uso de antimicrobianos vigentes en Cuba frente a la infección enterocócica. El impacto de la diseminación clonal, en la elevación de las tasas de resistencia a los diferentes antimicrobianos, constituyó una alerta para un uso más racional y controlado de estos en el medio hospitalario, así como para la aplicación de medidas encaminadas al control de la infección y la prevención de las epidemias por los clones resistentes. Este trabajo, permitió al LNRM/IPK introducir las bases científico-técnicas para la detección de ERV y el seguimiento de la diseminación y emergencia de otros fenotipos de resistencia. Se contribuyó, además, con la preparación de microbiólogos del país a través de Jornadas Provinciales, un Taller Nacional y asesorías para una detección oportuna de la infección enterocócica.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Reseña histórica

El microbiólogo francés Thiercelin empleó, por primera vez, el término *Enterococcus* en 1899 para describir unas bacterias aisladas en heces humanas con forma de cocos a las que, en 1906, Andrewer y Morder cambiarían el nombre por el de *Streptococcus faecalis* (Fisher y Phillips, 2009). Sherman, en 1930, clasificó a los estreptococos en cuatro clases: *pyogenes*, *viridans*, *lactis* y *Enterococcus*, y a estos últimos los denominó estreptococos del grupo D, aunque mantuvo la palabra *Enterococcus* para definir a los estreptococos fecales (Sood *et al.*, 2008). En 1984 Schleifer y Kilpper-Bälz, basándose en las diferencias de hibridación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y del ácido ribonucleico (ARN) ribosomal, demostraron que *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* no tenían relación filogenética con el resto de los estreptococos. Por ello, transfirieron estas dos especies a un nuevo género: *Enterococcus*, en el que posteriormente se incluyeron las especies: *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus solitarius*, *Enterococcus pseudoavium*. En la actualidad se registran hasta 36 especies (Chen y Zervos, 2009).

II.2 Género *Enterococcus*

Incluye microorganismos grampositivos con forma ovoide que se presentan aislados, en parejas o en cadenas cortas. Son capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas (10-45 °C) y de soportar 60 °C durante 30 minutos. Se caracterizan por hidrolizar la bilis esculina y la pirrolidonil-β-naftilamida (PYR), por su capacidad de crecer en presencia de un 40% de bilis o en NaCl al 6,5% y por tolerar pHs de hasta 9,5. No tienen citocromo-oxidasa y son catalasa negativos. Reaccionan con el antisuero D de

Lancefield y varias especies lo hacen también con el antisuero Q. No forman endosporas y algunas especies son móviles (Gilmore *et al.*, 2002).

II.3 Relevancia clínica

Enterococcus forma parte de la microbiota bacteriana normal del tracto digestivo, tracto urogenital, tracto respiratorio superior y la piel. Se localiza, especialmente, en colon en una proporción de 10^8 UFC por gramo de heces (Gilmore *et al.*, 2002). También puede encontrarse en la vagina en 24-34% de las mujeres asintomáticas, en la uretra anterior y en la cavidad bucal (Patterson y Zervos, 1990).

Su patogenia está estrechamente relacionada con su nicho ecológico, y su invasión desde los sitios anatómicos de colonización se favorece con factores predisponentes como el uso previo de los antibióticos de amplio espectro (cefalosporinas, quinolonas, clindamicina y metronidazol), la existencia de inmunosupresión, los cateterismos, el sondaje vesical, la diálisis peritoneal, las valvulopatías, el diagnóstico de Diabetes Mellitus y la infección por *Clostridium difficile*, (Zervos *et al.* 1986; Patterson y Zervos, 1990).

Las infecciones enterocócicas con significado clínico son ocasionadas principalmente por las especies *E. faecalis* y *E. faecium*, las cuales se aíslan en un 60-90% y 5-16% de los casos. Las especies *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. solitarius*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. seriolicida* y *E. flavescens*, también se aíslan de infecciones en los humanos aunque de forma ocasional (Acosta-Gnass, 2005; Sood *et al.*, 2008).

Las infecciones del tracto urinario, de heridas quirúrgicas y las bacteriemias o septicemias, son las entidades clínicas más frecuentes producidas por este microorganismo. La endocarditis, por su impacto clínico, es de gran importancia y se produce con mayor frecuencia en los pacientes hemodializados, con cardiopatías previas, afecciones colorrectales y personas sanas de edad avanzada. *Enterococcus* también producen otras infecciones entre las que se encuentran infecciones del tracto

biliar, sepsis ligada a catéter, abscesos intrabdominales como complicación de diverticulitis, apendicitis y peritonitis recurrentes en pacientes quirúrgicos e infecciones pélvicas. También se describe como causante de infecciones asociadas a dispositivos ortopédicos después de artroplastias (Baldassarri *et al.*, 2006).

Los neonatos hospitalizados en las salas de unidades de cuidados intensivo neonatales (UCIN), tienen riesgo de padecer infecciones enterocócicas, no solo los recién nacidos de bajo peso, sino también aquellos de peso normal. La adquisición en muchos casos puede ser vía materna a partir de la colonización del tracto genital y se presentan en forma de meningitis, bacteriemias y septicemias. La meningitis está asociada a infecciones del sistema urinario, defectos anatómicos del sistema nervioso central, intervenciones neurológicas o endocarditis enterocócica (Murray, 1990).

II.4 Virulencia

La virulencia del género *Enterococcus* está mediada por su adherencia e invasión a los tejidos del huésped, la secreción de sustancias tóxicas, la modulación de la respuesta inmune del huésped y la posibilidad de intercambio genético con otras cepas (Jett *et al.*, 1994).

II.4.1 Adherencia a los tejidos

La adherencia es mediada por la producción de diferentes adhesinas, entre las que se encuentran:

- *Sustancia de agregación (Agg)*. Es una proteína localizada en la superficie de la bacteria que favorece la agregación de otras células bacterianas, facilitando así la transferencia de plásmidos que contienen genes de virulencia, como el gen *cyl*, y genes de resistencia a los antibióticos (Clewell, 1993). También facilita la adherencia de *Enterococcus* a células epiteliales renales, intestinales y cardíacas (Baldassarri *et al.*, 2005). Por otro lado, contribuye a evadir las defensas inmunológicas del paciente (Tendolkar *et al.*, 2004), como se comenta en el acápite I.4.4 Modulación de la inmunidad del huésped.

- *Carbohidratos de superficie*. Guzmán y colaboradores evidenciaron la existencia de unos carbohidratos con función de adhesina para *Enterococcus*, así como demostraron que cepas de *E. faecalis* causantes de sepsis urinaria se adherían *in vitro*, de manera más efectiva, a las células epiteliales del tracto urinario y por otro lado las cepas causantes de endocarditis lo hacían a células humanas de corazón (Guzmán *et al.*, 1989; Guzmán *et al.*, 1991).
- *Proteína de superficie (esp)*. Es una proteína localizada en la superficie bacteriana, descrita desde 1999, relacionada con la colonización de *Enterococcus* al tracto urinario por la adhesión al epitelio vesical. También, se relaciona con la formación de biopelículas y la evasión de la respuesta inmune (Gilmore *et al.*, 2002; Fisher y Phillips, 2009), aspecto que, también, se comenta en el acápite I.4.4 Modulación de la inmunidad del huésped.
- *Antígeno A (Efa A)*. Constituye una adhesina de pared celular y se desconocen otros posibles roles que tengan que ver con la patogénesis de la infección enterocócica (Gilmore *et al.*, 2002).
- *Adhesina Ace y Acm*. Son proteínas de superficie celular relacionadas con la adhesión a colágeno y a la endocarditis en *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. Tiene propiedades antigénicas (Nallapareddy *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010).

II.4.2 Invasión de los tejidos

Bryan y colaboradores en 1985 describieron un modelo murino de translocación donde se demostró que *E. faecalis* es capaz de causar una infección sistémica por vía de los ganglios linfáticos después de translocarse a través del epitelio intestinal intacto. De esta manera, la septicemia enterocócica es una de las formas clínicas más frecuentes de presentación de la infección con una alta tasa de mortalidad (42-68%). La infección del tracto urinario (4-21%), también acontece como resultado de la invasión de tejidos, específicamente a vejiga, próstata y riñón (Gilmore *et al.*, 2002). La endocarditis es otro ejemplo de invasión de los tejidos. Desde 1943, *Enterococcus* es reconocido como un agente causal de endocarditis cuando Rantz y Kirby demostraron su presencia en el 20%

de casos de endocarditis infecciosa. En la actualidad se cita a *E. faecalis* como el responsable del 15% de esta entidad clínica la cual cursa con una mortalidad del 25% (Chenoweth y Schaberg, 1990; Murray, 1990).

Enterococcus, una vez en sangre puede invadir, además, a las meninges y tejidos blandos provocando la formación de abscesos (Zervos *et al*, 2009).

II.4.3 Productos secretados

- *Citolisina*. Es una enzima generalmente específica de plásmidos transmisibles aunque también su codificación puede ser en cromosoma y junto al gen *esp* forma parte de las islas de patogenicidad (Schaik *et al.*, 2010). Diferentes experimentos en modelos murinos demostraron acciones inflamatorias y de destrucción de tejidos por actividad tóxica en esta enzima. Tiene, además, actividad hemolítica y está asociada con un mayor riesgo de muerte en bacteriemias nosocomiales y favorece la diseminación de *Enterococcus* en la sangre (Huycke *et al.*, 1991). Varias evidencias sugieren que la citolisina de *E. faecalis* representa una nueva rama en la familia de los lantibióticos, proteínas secretadas por un pequeño grupo de bacterias, con actividad bactericida ante patógenos grampositivos, como por ejemplo *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Propionibacterium* (Schnell *et al.*, 1988).
- *Proteasa*: La capacidad proteolítica de *Enterococcus* fue descrita por primera vez en 1899 al reconocerse su habilidad para hidrolizar gelatina, colágeno, caseína y hemoglobina (Murray, 1990). El efecto potencial de la proteasa incluye la degradación indirecta del tejido conectivo, la invasión del microorganismo y su supervivencia, y la alteración del sistema inmune por bloquear la opsonofagocitosis y facilitar la degradación de las inmunoglobulinas y el complemento (Gilmore *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2008).
- *Hialuronidasa*. Es una enzima hidrolítica, reportada por Rice y colaboradores, que actúa sobre el ácido hialurónico con efectos degradativos, que provocan daño tisular específicamente del tejido conectivo y facilita la diseminación de *Enterococcus* y su toxina en el tejido del hospedero (Rice *et al.*, 2003, Fisher y Phillips, 2009). Se

relaciona, también, con la periodontitis apical al facilitar la migración de las bacterias en el canal radicular hacia la lesión periapical (Kayaoglu y Ørstavik, 2004).

II.4.4 Modulación de la inmunidad del huésped

Se ha demostrado el papel de varios factores de virulencia enterocócicos en la inmunomodulación de la respuesta inmune del hospedero, ya sea por evasión ó exacerbación de esta. Entre estos factores se citan: la sustancia de agregación (AS); proteína de superficie (ESP); cápsula con polisacárido; hemolisinas y proteasas (Shankar *et al.*, 1999; Gilmore *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2003; Tendolkar *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2008; Thurlo *et al.*, 2009).

El papel que juega cada uno de ellos en dicha inmunomodulación se muestra a continuación:

INMUNOMODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE				
Factores de Virulencia	Evasión			Exacerbación
	Alteración del reconocimiento de la bacteria	Bloqueo del proceso de Opsonofagocitosis	Destrucción de efectores de la respuesta inmune	Acción superantigénica
Sustancia de agregación (AS)		X		X
Proteína de superficie (ESP)	X	X		
Cápsula con polisacárido	X	X		
Hemolisinas		X		
Proteasas		X	X	

Beachey y colaboradores notaron que el ácido lipoteicoico se unía de forma reversible a eritrocitos humanos y demostraron su habilidad para estimular la producción de interleuquina-1 β , interleuquina-6, y factor de necrosis tumoral- α en un cultivo de monocitos humanos y, a diferencia de otros microorganismos, el ácido lipoteicoico de varias especies de *Enterococcus* inducía la producción de las tres monoquinas, además

de estimular la producción de interferón (Beachey *et al.*, 1979). Por otro lado, se sugirió que el ácido lipoteicoico enterocócico puede modular la respuesta inflamatoria al igual que las proteínas de superficies enterocócicas como la adhesina de colágeno de *E. faecalis* (Ace); la sustancia de agregación (AS) y la proteína de superficie (ESP) (Ehrenfeld *et al.*, 1986, Franz *et al.*, 2003).

El desencadenamiento de la producción de anticuerpos, es otra forma de inmunomodulación de la respuesta inmune del hospedero y se notifican varios factores de virulencia estimulantes de la producción de anticuerpos protectores como la sustancia de agregación (AS), la cápsula con polisacárido y la adhesina de colágeno de *E. faecalis* (Ace) que desencadenan la producción de anticuerpos As, anticuerpos PSC contra el polisacárido capsular y anticuerpos Ace, respectivamente (McCormick *et al.*, 2001; Theilacker *et al.*, 2004; Nallapareddy *et al.*, 2008).

II.4.5 Intercambio genético

Generalmente los factores de virulencia se encuentran localizados en plásmidos conjugativos. La facilidad con la cual estos determinantes se transfieren horizontalmente entre células en un ambiente natural, como por ejemplo, el tracto gastrointestinal, determina que una cepa no virulenta o menos virulenta, perteneciente a la microbiota normal, pueda adquirir factores de adaptación y de patogenicidad, pasando a ser una cepa virulenta (Clewell, 1993).

A continuación se muestra un resumen de los principales genes de virulencia relacionados con la patogenicidad de *Enterococcus* y su expresión fenotípica.

Genes que codifican para factores de virulencia en *Enterococcus* y sus productos.

Genes	Papel en la virulencia
<i>agg</i>	Proteína de agregación involucrada en la adhesión a células eucariotas.
<i>gelE</i>	Toxina, metaloendopeptidasa extracelular, hidroliza gelatina, colágeno, y otros productos bioactivos.
<i>cyLLv</i>	Precusores de la citolisina, expresión de <i>cyLLv</i> , <i>cyLLs</i> , <i>cyLM</i> , <i>cyLB</i> , <i>cyLA</i> es requerida para la producción de una citolisina activa la cual lisa un amplio espectro de células grampositivas y eucariotas.
<i>cyLLs</i>	
<i>cyLM</i>	Modificación post-transcripcional de la citolisina.
<i>cyLB</i>	Transporte de la citolisina.
<i>cyLA</i>	Activación de la citolisina.
<i>esp</i>	Proteína asociada a la pared celular involucrada en la evasión de la respuesta inmune y puede estar asociada a genes <i>cyl</i> .
<i>efaAfs/efaAfm</i>	Adhesina en pared celular expresada en suero por <i>E. faecalis</i> Adhesina en pared celular expresada en suero por <i>E. faecium</i> .
<i>cpd, cob, ccf, cad</i>	Feromonas sexuales quimiotácticas para leucocitos humanos, y facilitan la conjugación.

Fuente: Eaton TJ, Gasson M. Appl Environ Microbiol. 2001.

II.5 Susceptibilidad de *Enterococcus* a los antibióticos

El género *Enterococcus* presenta de forma intrínseca resistencia a los betalactámicos y también bajo nivel de resistencia a los aminoglucósidos y a la clindamicina (Tannock y Cook, 2002). Hasta finales de los años 60 se caracterizaba por un patrón uniforme de sensibilidad, sin embargo, la utilización masiva de antibióticos ha provocado un aumento en su resistencia a nivel mundial (García, 1997).

La aparición de nuevas resistencias puede deberse a una mutación puntual o a la adquisición de determinantes genéticos exógenos que codifiquen esta resistencia. Las vías de adquisición de material exógeno son transformación, transducción o conjugación de plásmidos o transposones e incluyen resistencia al cloranfenicol, a la eritromicina, a

la tetraciclina, a la penicilina, a las fluoroquinolonas, a los glicopéptidos y altos niveles de resistencia a la clindamicina y a los aminoglucósidos (Kak y Chow, 2002).

Las primeras resistencias, en aislamientos de *Enterococcus*, a los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica, ocurrieron a finales de la década de los años 70. En 1979 se describió la primera cepa con alto nivel de resistencia a la gentamicina y dos años más tarde se aisló la primera cepa de *E. faecalis* productora de penicilinasas. Hasta 1986 no se detectan las primeras cepas de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (Francia e Inglaterra), unos 30 años después de su introducción en la clínica. En la actualidad aumentan considerablemente los porcentajes de resistencia e, incluso, son frecuentes las cepas multirresistentes (Marothi *et al.*, 2005).

II.5.1 Mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos

Los mecanismos de resistencia adquirida a los aminoglucósidos son fundamentalmente tres (Kak y Chow, 2002):

- 1.-Alteración de la diana por mutación. La resistencia se adquiere tras una mutación puntual en los genes que codifican para las proteínas del ribosoma bacteriano, lo que ocasiona un cambio estructural de la subunidad 30S que impide la unión del antibiótico a su diana y no se produce la interrupción de la síntesis proteica. Este mecanismo es típico de la estreptomina y ocurre por una única mutación en la proteína S12 de la subunidad 30S del ribosoma.
- 2.- Alteración de la permeabilidad. El género *Enterococcus* tiene una permeabilidad disminuida a los aminoglucósidos, lo que les confiere una resistencia de bajo nivel. Las cepas sensibles presentan valores de CIM para la estreptomina o la kanamicina alrededor de 125 µg/mL, siendo un poco menor para la gentamicina y la tobramicina. Esta resistencia de bajo nivel se ha relacionado con los ácidos teicoicos de la pared celular, que pueden dificultar el paso de los aminoglucósidos y con dificultades de permeación a través de la membrana interna (Campanile *et al.*, 2006). La dificultad que encuentran los aminoglucósidos para atravesar la membrana bacteriana y alcanzar su diana, se anula cuando se asocia un agente activo frente a la pared celular

(betalactámico o glicopéptido) con un aminoglucósido. Por tanto, la alteración de la permeabilidad tiene una doble vertiente, puede suponer una dificultad de entrada del antibiótico a la célula o una facilidad excesiva para la salida.

3.- Enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs). Es el mecanismo de resistencia más frecuente y de mayor importancia. Confiere resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos tras la adquisición de material genético extrabacteriano, bien en plásmidos, bien en transposones, que codifican para enzimas modificantes de los aminoglucósidos (Kobayashi y Alam, 2006). En las especies *E. faecium*, *E. hirae* y *E. durans* existen acetilasa cromosómica del tipo AAC(6') que no confiere resistencia de alto nivel (RAN) y no es un mecanismo de resistencia adquirido (Del Campo *et al.*, 2005, Kobayashi y Alam, 2006). La modificación enzimática del aminoglucósido lo transforma en un derivado con menor afinidad por el sitio de unión al ribosoma, a la vez que el antibiótico modificado interfiere con el transporte activo de más antibiótico. Existen tres tipos diferentes de enzimas modificantes de los aminoglucósidos: N-acetilasa (AAC), O-fosforilasa (APH), O-nucleotidasas (ANT). Dentro de cada tipo, las enzimas se subclasifican atendiendo al sitio de la molécula de antibiótico donde se produce la modificación y al perfil de sustrato concreto que tiene cada enzima. Cuando existen varias enzimas que modifican una misma posición pero que difieren en el perfil de sustrato, se diferencian con números romanos y cuando presentan el mismo perfil se añade una letra minúscula (Shaw *et al.* 1993). La nomenclatura de los genes sigue el mismo esquema. A continuación se observan las enzimas notificadas en *Enterococcus* y el perfil de sustratos para cada una de ellas.

Enzimas modificantes de aminoglucósidos descritas en *Enterococcus* y sus sustratos

Enzima	Perfil de sustrato
AAC(6')Ii	Tm, Km*
AAC(6')+APH(2'')	Gm, Tm, Km, Dbk, Net, Amk, Isepa, Sis.
APH(3') III	Km, Nm, Liv, But, Amk, Isepa
APH(2'')-Ic	Gm, Tm, Km, Dbk
APH(2'')-Id	Gm, Tm, Km, Dbk
APH(2'')-Ib	Gm, Tm, Km, Dbk, Net, Amk, Isepa, Arb
APH(3'')	Sm
APH(6)	Sm
ANT(3'')(9)	Sm, Spc
ANT(4')(4'')I	Tm, Amk, Net, Km, But, Liv
ANT(6)	Sm

Leyenda: *Resistencia moderada; Tm, tobramicina; Gm, gentamicina; Km, kanamicina; Dbk, dibekamicina; Net, netilmicina; Amk, amikacina; Isepa, isepamicina; Sis, sisomicina; Nm, neomicina; Liv, lividomicina; But, butirosina; Arb, arbekacina; Sm, estreptomicina.

Fuente: Kobayashi N, Alam M. Drug resistance of Enterococci: epidemiology and molecular mechanism, 2006.

II.5.2 Mecanismo de resistencia a los glicopéptidos

Los antibióticos glicopeptídicos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular. La vancomicina se une al extremo terminal D-Ala-D-Ala del N-acetil-murámico pentapéptido impidiendo las reacciones de transglicosilación y transpeptidación, lo que conlleva a la inmadurez del peptidoglicano naciente al no producirse el debido entrecruzamiento. El resultado es que la bacteria no puede aumentar su tamaño y se produce la parálisis de la síntesis de ADN, ARN y proteínas y, al final, la lisis bacteriana en fase exponencial. La clave de la resistencia está en el dipéptido D-alanina-D-lactato que sustituye al dipéptido normal D-alanina-D-alanina. La ruta metabólica de la síntesis de la pared sigue su curso normal y D-alanina-D-lactato se incorpora al peptidoglicano y comienzan las reacciones de transglicosilación y transpeptidación. La existencia de D-

lactato al final del pentapéptido impide la unión de la vancomicina a su diana al no tener analogía estructural y, por tanto, no se inhibe la transglicosilación (Cetinkaya *et al.*, 2000). En la siguiente tabla se describen los diferentes fenotipos de resistencia a la vancomicina en función del nivel de la resistencia a esta y a la teicoplanina, el carácter inducible o constitutivo y la naturaleza intrínseca o adquirida (Kak y Chow, 2002).

Fenotipos de resistencia a glicopéptidos en *Enterococcus*

Fenotipo	Tipo de Resistencia	Especies	CMI (µg/mL)		Expresión	Transferencia genética
			Vancomicina	Teicoplanina		
VanA	Adquirido	<i>E. faecalis</i>	64-≥1000	16 - 512	Inducible	<i>Tn1546</i>
		<i>E. faecium</i>				
		<i>E. durans</i>				
		<i>E. mundtii</i>				
		<i>E. avium</i>				
		<i>E. gallinarum</i>				
		<i>E. casseliflavus</i>				
		<i>E. hirae</i>				
		<i>E. raffinosus</i>				
VanB	Adquirido	<i>E. faecalis</i>	4-≥1000	≤1	Inducible	<i>Tn1547 Tn5382</i>
		<i>E. faecium</i>				
		<i>E. gallinarum</i>				
VanC1	Intrínseca	<i>E. casseliflavus</i>	2 - 32	0,5 - 1	Constitutiva	
VanC2		<i>E. gallinarum</i>			Inducible	-
VanC3		<i>E. flavescens</i>				
VanD	Adquirida	<i>E. faecalis</i>	64 -128	4 - 64	Constitutiva	-
		<i>E. faecium</i>				
VanE	Adquirida	<i>E. faecalis</i>	16	0,5	Inducible	-
VanG	¿?	<i>E. faecalis</i>	<16	<0,5	¿	-

Fuente: Kak V, Chow J. The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance, 2002.

II.5.3 Mecanismos de resistencia a los betalactámicos

Enterococcus es mucho menos sensible a la penicilina que otros cocos gram positivos (*E. faecalis* CMI: 1-8 µg/mL, *E. faecium* CMI: 4-32 µg/mL). Es decir, que presenta una resistencia intrínseca por baja afinidad de las proteínas ligadoras de la penicilina (*PBP*, siglas en inglés), principalmente la tipo 5, mecanismo que se reporta desde 1983 (Raffi, 2006). También existe resistencia intrínseca a otros antibióticos betalactámicos como la ampicilina, las ureidopenicilinas (azlocilina, mezlocilina, piperacilina), las penicilinas antiestafilocócicas, el aztreonam y las cefalosporinas (Cetinkaya *et al.*, 2000).

La mayor prevalencia de la resistencia a la ampicilina en *Enterococcus* ocurre en las especies *E. faecium* y *E. raffinosus* (Zurita *et al.*, 2003) y es el resultado de una hiperproducción de la *PBP5* ó de una disminución de la interacción de la droga con esta proteína debido a una mutación puntual en el gen que codifica para la *PBP* por sustituciones aminoacídicas. En *E. faecalis*, aunque es rara esta resistencia, se involucra, también, la baja afinidad de las *PBP4*, como otro mecanismo posible (Ono *et al.*, 2005).

Con relación a la resistencia adquirida, ésta puede deberse a la producción de beta-lactamasa. La resistencia es constitutiva, de bajo nivel y dependiente del inóculo y se observa para la penicilina, la ampicilina y ureidopenicilinas. El primer caso de *E. faecalis* productor de beta-lactamasa fue descrito en Texas en 1981. Ocho años más tarde en Argentina se notificó otro brote hospitalario asociado a *E. faecalis* productor de beta-lactamasa (Lopardo *et al.*, 1990) y desde entonces no se han descrito más cepas.

II.5.4 Resistencia a las fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas son antibióticos sintéticos introducidos en la práctica clínica a mediados de los años ochenta cuyo mecanismo de acción es su interferencia con la síntesis de ADN inhibiendo la actividad de las enzimas girasa y topoisomerasa IV de ADN (Hidalgo *et al.*, 2008). La resistencia en *Enterococcus* está mediada por la disminución de la acumulación del antibiótico dentro de la bacteria debido a la reducida permeabilidad de la membrana; aumento de la expresión de las bombas de exclusión (*NorA*) y mutaciones en los genes que codifican para las subunidades de las enzimas

girasa (*gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV de ADN (*parC* y *parE*), que tienden a agruparse en dominios muy conservados denominadas regiones determinantes de resistencia a las quinolonas (*QRDR*, siglas en inglés) (Schmitz *et al.*, 2002; Jacoby, 2005).

II.5.5 Resistencia a los macrólidos y a estreptograminas

El principal mecanismo de resistencia en *Enterococcus* a los macrólidos es la producción de una metilasa que actúa en un residuo de adenina del ARN en la subunidad 23S de la subunidad 50S ribosomal lo que reduce la unión no solo de la eritromicina y otros macrólidos, sino también de las lincosaminas y la estreptograminas B, al ribosoma bacteriano (sitio diana). Este mecanismo es mediado por el gen *erm(B)* y raramente por el gen *erm(A)* y el fenotipo es denominado "MLS_B" (Macrólido-lincosaminas-estreptograminas B) (Emaneini *et al.*, 2008).

Otro mecanismo descrito es la existencia de una bomba de eflujo codificado por el gen *mef(A)* que se transmite a través de un plásmido conjugativo y confiere bajos niveles de resistencia a la eritromicina (CIM 2-16 µg/mL) a diferencia del gen *erm(B)* que confiere altos niveles de resistencia (CIM >32 µg/mL) (Kak y Chow, 2002).

La quinupristina-dalfopristina es una combinación de estreptograminas A y B que inhiben la síntesis proteica por su unión a la subunidad 50S ribosomal, con la consiguiente alteración de estas. Es efectiva contra cepas de *E. faecium* resistente a la vancomicina, mientras que la especie *E. faecalis* es intrínsecamente resistente. Su actividad es solo bacteriostática y la resistencia está mediada por los genes *vat(D)* y *vat(E)* que codifican para una acetiltransferasa (Eliopoulos, 2003).

II.5.6 Resistencia a las tetraciclinas

La resistencia a las tetraciclinas está codificada por genes exógenos generalmente localizados en plásmidos o en el cromosoma que provocan un eflujo de la tetraciclina, *tet(K)* y *tet(L)*, o mediante una protección ribosomal que altera el ribosoma para prevenir la unión efectiva de la tetraciclina, *tet(M)*, *tet(O)* y *tet(S)*. El gen *tet(M)* es el

más frecuente detectado en *Enterococcus*, está localizado en el cromosoma y es transportado con frecuencia por el transposon conjugativo *Tn916*, aunque también puede encontrarse en plásmidos. Se describió, además, el gen *tet(U)* en cepas de *E. faecium*, pero la prevalencia de este mecanismo no está bien determinada por el momento (Kak y Chow, 2002).

II.5.7 Resistencia a las oxazolidinonas

La linezolid es un nuevo antibiótico que tiene un mecanismo de acción novedoso, inhibe la síntesis proteica por su interacción con la subunidad 50S pero en un sitio diferente al de otros antimicrobianos anteriores. No presenta resistencia cruzada con otros antimicrobianos (Yaslani *et al.*, 2009), pero en el año 2001 se describió la primera cepa resistente a la linezolid en Estados Unidos y posteriormente han ido apareciendo en otros países como, Alemania, Italia, Austria y Canadá (Johnson *et al.*, 2002; Mutnick *et al.*, 2003; Bonora *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2007; Zhanel *et al.*, 2008). La resistencia se debe a mutaciones en los genes de la subunidad 23S del ARN ribosomal lo que disminuye la afinidad del antibiótico por el ribosoma (Yaslani *et al.*, 2009).

II.6 Tratamiento de la infección enterocócica

El género *Enterococcus* representa un desafío terapéutico debido a su resistencia intrínseca a varios antibióticos. Así, la ampicilina o la vancomicina son los antibióticos farmacoterapéuticos más utilizados en el caso de las cepas sensibles (Arias *et al.*, 2010). La combinación de la ampicilina o la vancomicina con un aminoglucósido es necesaria para alcanzar consistente actividad bactericida para el tratamiento de las infecciones enterocócicas severas, por ejemplo, la endocarditis. Los informes de *Enterococcus* con múltiple resistencia a los antibióticos resaltan el rápido descenso de las opciones terapéuticas para este patógeno (Acosta-Gnass, 2005). Existen varios factores a tener en cuenta para elegir la terapia frente a la infección enterocócica (Malani *et al.*, 2002):

1. Si el aislamiento es susceptible a los betalactámicos, a los aminoglucósidos y a los glicopéptidos.

2. Si la infección es monomicrobiana como la mayoría de las sepsis urinaria enterocócica o polimicrobiana como la mayoría de las infecciones de heridas y abscesos enterocócicos.
3. Si existe compromiso de las válvulas cardíacas.

Infección enterocócica sin compromiso de válvulas cardíacas y susceptibilidad antimicrobiana (Sood *et al.*, 2008)

De manera general, las infecciones no complicadas se resuelven en monoterapia con ampicilina, penicilina o vancomicina. En las infecciones de piel, tejido subcutáneo e intrabdominales o pélvicas, donde es frecuente la infección mixta, también puede añadirse algún antibiótico útil contra gérmenes gramnegativos y anaerobios. De forma alternativa puede usarse la combinación de amoxicilina con ácido clavulánico o piperacilina-tazobactan. En las infecciones del tracto urinario bajo la nitrofurantoína muestra muy buenos resultados terapéuticos, al igual que la fosfomicina aún cuando los aislamientos sean resistentes a la vancomicina.

Endocarditis causada por *Enterococcus* susceptible

El tratamiento de elección es la asociación de un antibiótico betalactámico y un aminoglucósido, habitualmente la ampicilina o penicilina con la gentamicina, aprovechando el importante efecto sinérgico que se produce entre estos dos antimicrobianos (Sepúlveda *et al.*, 2007). La vancomicina también puede usarse en combinación con un aminoglucósido y es recomendada en los pacientes alérgicos a los betalactámicos o en aquellos infectados por cepas resistentes a estos. El tratamiento debe ser mantenido durante seis semanas (Malani *et al.*, 2002).

Infecciones por ERV

En las cepas ERV existen pocas opciones terapéuticas, por lo que se hizo necesario monitorear la susceptibilidad a otros antibióticos como: la tetraciclinas, el cloranfenicol, la fosfomicina, la rifampicina, las fluoroquinolonas, la nitrofurantoína, incluso hasta la eritromicina (Sood *et al.*, 2008). En las infecciones urinarias, de piel y de tejidos blandos

por ERV se recomiendan las fluoroquinolonas y la doxiciclina según los patrones de susceptibilidad.

El cloranfenicol también se ha usado por algunos clínicos con relativo éxito. No obstante, debido a las limitadas opciones terapéuticas existentes, se hizo imprescindible el descubrimiento de nuevos antimicrobianos (Marothi *et al.*, 2005).

La quinupristina-dalfopristina, fue el primer antibiótico aprobado para las infecciones severas por *E. faecium* resistente a la vancomicina, (Sood *et al.*, 2008). Es de gran utilidad en el tratamiento de la endocarditis por ERV que es muy difícil y limitado. También se ha utilizado combinado con la doxiciclina y la rifampicina demostrando muy buen sinergismo *in vitro*.

En los últimos años se han introducido en la práctica clínica tres nuevos antibióticos para el tratamiento del ERV: la linezolid, la daptomicina y la tigeciclina (Werner *et al.*, 2008; Mave *et al.*, 2009). La linezolid es una oxazolidinona, disponible desde el año 2000 para el tratamiento del ERV (Willems y Bonten, 2007) fundamentalmente para bacteriemias e infecciones del tracto urinario (Malani *et al.*, 2002), así como se observan buenos resultados en infecciones de piel, tejidos blandos, meningitis y neumonías (Sader *et al.*, 2002).

La daptomicina es un lipopéptido que inhibe la síntesis de la pared bacteriana, pero actúa en un lugar diferente a la vancomicina. Interfiere con el transporte de la membrana celular y tiene un efecto bactericida más rápido. Su espectro es similar a la vancomicina. Está disponible desde el año 2003 y ha sido de gran utilidad en las infecciones de piel y tejidos blandos (Willems y Bonten, 2007).

La tigeciclina, nuevo miembro de una nueva clase de antimicrobianos (Glicilciclinas), es el antibiótico más novedoso para combatir las cepas ERV, está disponible desde el 2005 y aunque la experiencia clínica es limitada hay estudios que avalan su potente actividad *in vitro* frente a *E. faecalis* y *E. faecium* (Willems y Bonten, 2007).

II.7 Epidemiología de las infecciones causadas por *Enterococcus*

El primer reporte de cepas ERV en Europa marcó un cambio dramático en las perspectivas sobre la infección enterocócica y su epidemiología. Poco después se describió una situación epidémica de estas cepas en los hospitales de Estados Unidos donde en 1993, la prevalencia de ERV se incrementó 20 veces en las UCI. Datos más recientes muestran un incremento a un 30% debido a la dispersión de esta resistencia en el 70-80% de la población de *E. faecium* mientras que en *E. faecalis* no supera el 10% (Willems y Bonten, 2007).

El origen de la infección nosocomial se atribuía en un principio a la propia microbiota intestinal del paciente, posteriormente se demostró la existencia de transmisión de cepas de persona a persona, por medio de fómites, sábanas, puertas así como a través del contacto con las manos del personal médico (Sood *et al.*, 2008). No obstante, el origen de las cepas de *Enterococcus* puede no solo ser humano sino también ambiental y animal. Estudios ecológicos revelaron la presencia de *E. faecalis* y *E. faecium* en quesos, pescado, cerdos y ganado bovino (Del Campo *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 2009).

Una atención especial merecen las cepas de ERV por el impacto clínico-epidemiológico que presenta. En Estados Unidos el principal reservorio de estas cepas son los pacientes hospitalizados portadores en su tracto gastrointestinal de este patógeno, principalmente, los pacientes ingresados en las UCI. La situación en Europa es diferente ya que este patógeno es más frecuente en la comunidad y en los animales de granjas (pollos, cerdos, ganado vacuno) y consecuentemente sus productos, lo que está relacionado al uso de la avoparcina como promotor de crecimiento en veterinaria durante más de 15 años (Homan *et al.*, 2002, Agers *et al.*, 2008).

Sin embargo, en los últimos años se evidencia un cambio en la epidemiología de ERV, tanto en EE.UU. como en Europa (Chen y Zerbos, 2009). *Enterococcus* resistente a la vancomicina se reporta en otras partes del mundo incluida América del Sur, Asia y Australia lo que ilustra la diseminación pandémica de estas cepas resistentes (Willems y

Bonten, 2007). En la siguiente tabla se muestran las medidas de control de la infección frente a ERV (Acosta-Gnass, 2005)

Medidas de control de infección frente a cepas de *Enterococcus* Resistente a la Vancomicina

Medida	Acción
Educación	Educar al personal hospitalario sobre la gravedad de la infección.
Detección precoz	Cultivos de vigilancia periódicos.
Aislamiento por contacto	Habitación individual, uso de guantes y batas.
Lavado de manos	Con jabón antiséptico o uso de alcohol gel.
Objetos no críticos (estetoscopios, termómetros)	Para uso exclusivo del paciente. Desinfección exhaustiva entre pacientes.
Uso de antimicrobianos	Evitar el uso irracional de los antimicrobianos.
Uso de vancomicina	Desaconsejar el uso indiscriminado de la vancomicina, especialmente por vía oral.
Dispositivos invasivos	Disminuir el uso de los catéteres venosos centrales y catéteres urinarios.
Limpieza	Limpieza diaria de la habitación y de las superficies horizontales con desinfectantes (pueden ser clorados).

Fuente: Acosta-Gnass SI. *Enterococcus* [citado el 11 de noviembre de 2009]. Disponible en: <http://www.codeinep.com.ar/control/Enterococcus.pdf>

En ocasiones, es difícil determinar la tasa de mortalidad por infección enterocócica porque, con frecuencia, se trata de infecciones polimicrobianas, no obstante, se reportan cifras de 61% de casos mortales (Fisher y Phillips, 2009).

II.8 Epidemiología molecular de *Enterococcus*

Se han utilizado diferentes métodos de biología molecular para *Enterococcus*, siendo hoy en día una herramienta fundamental la tipificación y la caracterización de las cepas para conocer nuevos datos sobre la epidemiología de las infecciones intrahospitalarias. Entre estos métodos, para estudios epidemiológicos a largo y a corto plazo, se encuentran la ECP y el análisis por MLST (Vázquez y Berrón, 2004; Domínguez *et al.*, 2005).

II.8.1 Análisis de macrorestricción de ADN total por electroforesis en campo pulsado

La ECP es una técnica que se basa en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción y utiliza enzimas de restricción de corte poco frecuente que generan un número relativamente pequeño de fragmentos grandes de ADN. La técnica de ECP, que fue desarrollada por Schartz y Cantor en 1984, permite separar fragmentos de ADN grandes y es una variante de la electroforesis en gel de agarosa, en la cual se cambia de manera periódica (por pulsos) la orientación del campo eléctrico. La duración del campo eléctrico alternado determina el rango de tamaño del ADN que puede ser separado en el gel de agarosa. El ADN blanco sin cortar se obtiene de embeber el microorganismo intacto en moldes de agarosa y luego se lisa enzimáticamente la pared celular y se digieren las proteínas celulares. Posteriormente, el cromosoma íntegro es digerido *in situ*. Tras la electroforesis de pulsos, el gel se tiñe con bromuro de etidio, se visualiza en un transiluminador con luz UV y se efectúa el registro fotográfico para su posterior análisis. El resultado de aplicar ECP al ADN provee un patrón de restricción cromosómico con excelente resolución, generalmente compuesto de 10 a 30 fragmentos diferentes que varían de tamaño desde 10 a 800 Kb (Domínguez *et al.*, 2005).

En función del número de diferencias entre dos patrones o pulsotipos, los aislamientos se pueden clasificar en (Tenover *et al.*, 1995):

Idénticos. Dos aislamientos tienen el mismo patrón de bandas. Corresponden a dos aislamientos de un mismo clon genéticamente igual.

Genéticamente relacionados. La diferencia en el patrón de bandas de dos aislamientos es igual o inferior a tres. Esto es debido a pequeñas evoluciones dentro de un mismo clon y un único cambio genético (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o

ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

Posiblemente relacionados. Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de bandas diferentes puede llegar a ser hasta de seis (inserciones o deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica. Este número de variaciones puede verse entre aislamientos separados por largos periodos (mayor de seis meses), entre aislamientos que proceden de brotes que han afectado a un gran número de personas o entre aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas. En estos casos, antes de llegar a una conclusión debe analizarse las características fenotípicas de los aislamientos, su sensibilidad antibiótica y aplicar otros marcadores genotípicos si fuera necesario.

No relacionados. Cuando los patrones presentan más de siete bandas de diferencia y son el producto de tres o más cambios genéticos independientes. En este caso los dos aislamientos pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica.

Esta clasificación, de la relación genética entre microorganismos, pretende ser solo orientativa. Es preciso individualizar cada situación, tener en cuenta otras características y, sobre todo, la información epidemiológica que deriva de una investigación clínica cuidadosa (Domínguez *et al.*, 2005). Se pueden también analizar los patrones de ECP mediante sistemas informáticos como el *Phoretix* 5.0 o el *bioNumerics* que objetivan el número de diferencias entre dos aislamientos y les asignan una "distancia genética". En estos sistemas se precisa captar la imagen del gel, normalizarlo e identificar las bandas que quieren ser incluidas en el análisis. Son sistemas muy útiles para analizar colecciones que incluyen muchos microorganismos (Domínguez *et al.*, 2005).

II.8.2 Análisis mediante MLST

El MLST es una técnica basada en la secuenciación de fragmentos internos de siete genes metabólicos altamente conservados y conocidos como genes “*housekeeping*” que están repartidos por todo el cromosoma de la bacteria. Por cada fragmento del gen se detectan diferentes secuencias, obteniéndose siete perfiles alélicos para cada aislamiento los que determinan la secuencia tipo (Vázquez y Berrón, 2004).

Se han desarrollado esquemas de MLST para *E. faecium* (Homan *et al.*, 2002) y *E. faecalis* (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006a). Se trata de una tecnología de punta que permite establecer las relaciones de las diferentes líneas clonales (que producen brotes en diferentes países/continentes que adquieren determinantes de resistencia a antimicrobianos o que manifiestan un aumento del nivel de virulencia) y ser capaces de trazar su dispersión global. El desarrollo del MLST consta de tres pasos fundamentales (Vázquez y Berrón, 2004):

- 1.- Amplificación de los fragmentos internos de los genes metabólicos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- 2.- Secuenciación de los productos obtenidos
- 3.- Análisis de los resultados que incluye: comparar las secuencias de los fragmentos en cada gen con los alelos ya descritos; asignar un número a cada alelo en los siete genes para conseguir un perfil alélico y comparar los perfiles alélicos con los existentes en una base de datos centralizada.

Los perfiles de MLST se conservan en una base de datos a la que se accede a través de internet (www.mlst.net), lo que facilita el intercambio de datos epidemiológicos entre diferentes laboratorios. En esta base se registran nuevas variantes de STs que permite el reconocimiento y seguimiento de la dispersión mundial de los diferentes linajes genéticos (Homan *et al.*, 2002).

Se reportan subpoblaciones genéticas específicamente adaptadas al medio hospitalario y distintas de las circulantes en la comunidad o en el reservorio animal (Peset *et al.*, 2000;

Del Campo *et al.*, 2001, Patel, 2003). Se ha explorado la diversidad genética entre cepas colonizantes y virulentas demostrándose la circulación de clones específicos epidémicos principalmente en la UCI o afectando a diferentes instituciones (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006b). La ocurrencia de aislamientos clonales en diferentes pacientes refleja la adquisición de una infección por una cepa epidémica, en lugar de una infección causada por un *Enterococcus* de la propia microbiota del paciente demostrándose la transmisión de paciente a paciente (Gilmore *et al.*, 2002).

La diversidad genética en *Enterococcus* obedece a procesos de recombinación, pero en determinadas circunstancias emergen ciertos complejos clonales (CCs), como CC9 de *E. faecalis*, descrito en España, que por ventaja selectiva predomina sobre el resto y crean una falsa apariencia de clonalidad en la población (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007). Baquero y colaboradores describen en el año 2003 el fenómeno de "capitalismo genético" en *Enterococcus* dado por la capacidad del patógeno de adquirir mecanismos adaptativos como la resistencia antibiótica y factores de virulencia lo que favorece su persistencia en el medio y, a su vez, facilita la adquisición de nuevos mecanismos. Además, aumenta la posibilidad de transmisión a otros CCs, facilitando la dispersión de resistencias (Baquero *et al.*, 2003). Por este motivo, la resistencia a la vancomicina puede encontrarse en líneas genéticas no relacionadas entre si, como sucede con la cepa de origen animal B434, que se agrupa en *E. faecalis* CC21 (Willems y Bonten, 2007).

Gracias a los estudios de epidemiología molecular, realizados por ECP, se conoce hoy que cuando una epidemia por ERV ocurre de forma aguda se trata generalmente de una epidemia de un simple clon o un limitado número de clones. Sin embargo, cuando comienza la transmisión de pacientes a pacientes y las cepas de ERV se establecen de forma endémica se pueden detectar múltiples clones con evoluciones individuales en el tiempo (Chen y Zerbos, 2009). Los estudios de secuenciación han permitido conocer la distribución de secuencias tipo y complejos clonales de *Enterococcus* a nivel mundial lo que facilita el conocimiento de la evolución genética de este patógeno (Fariñas y Torres, 2007). En este sentido, es importante resaltar la circulación de *E. faecium* CC17 responsable de la mayoría de las epidemias enterocócicas intrahospitalarias y disperso

globalmente (Baldassarry *et al.* 2005). Publicaciones adicionales han confirmado la emergencia de subpoblaciones nosocomiales de CC17 en Brasil, Alemania, Italia, Corea, Holanda, Singapur y Suecia (Willems y Bonten, 2007), así como la emergencia de ST78, en Italia, con aislamientos resistentes a la linezolidina (Bonora *et al.*, 2007). Se describen otros CCs en *E. faecalis*, como en CC2 y CC9, que incluyen cepas de origen hospitalario resistentes a la vancomicina y causantes de brotes hospitalarios. Otros CCs podrían estar emergiendo en Europa central, como CC87 en cepas ERV tipo *vanA* y *vanB* (Fariñas y Torres, 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño de la investigación

Se llevó a cabo un estudio descriptivo que incluyó a todos los aislamientos (n=501), pertenecientes al género *Enterococcus*, recibidos en el LNRM/IPK en el período comprendido entre el 3 de enero de 2000 y el 31 de diciembre de 2005.

Los aislamientos se obtuvieron en los Laboratorios de Microbiología de 26 hospitales de Cuba: (hospitales pediátricos 70,4%; clínico-quirúrgicos 15,4 %; generales 11% y materno-infantil 3,2%) correspondientes a nueve provincias (Ciudad de La Habana, Cienfuegos, Sancti Spíritu, Ciego de Ávila, Camaguey, Holguín, Las Tunas, Santiago de Cuba y Guantánamo). La distribución de los aislamientos por provincias y hospitales se muestra en el Anexo I. Se recogieron datos clínico-epidemiológicos de los pacientes infectados a partir de la encuesta diseñada para la vigilancia nacional de *Enterococcus* (Anexo II).

Con respecto a la distribución por servicios, el 15,2% de los aislamientos correspondieron a los servicios de neonatología, unidad de terapia intensiva pediátrica (UTIP) (11,6%), cirugía (11,6%), nefrología (11,7%), consulta externa (10,4%), medicina (9,4%), miscelánea (7%), urología (6%), unidad de terapia intensiva de adulto (UTI) (5,2%), ginecología (3%) y unidad de cuidados intermedios (UCM) (3%) y otros (6%). Todos los aislamientos de consulta externa se consideraron aislamientos comunitarios ya que ningún niño tuvo ingreso hospitalario durante el último año. La distribución de los aislamientos según la procedencia de la muestra se refleja en el Anexo III.

En los 501 aislamientos se llevó a cabo la identificación de especie, la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, la detección de los genes de resistencia en

aislamientos resistentes a los aminoglucósidos, la tetraciclina y la eritromicina, la detección de la actividad de beta-lactamasa en los aislamientos resistentes a la ampicilina, además, se investigó la expresión fenotípica de la virulencia y los genes relacionados con esta.

III.1.2 Diseño de los estudios de epidemiología molecular

Dentro del contexto de las investigaciones a realizar se diseñaron tres estudios independientes de epidemiología molecular:

Estudio 1: Análisis de la diversidad genética, mediante ECP de 97 aislamientos (83 *E. faecalis*, 10 *E. faecium*, 2 *E. casseliflavus*, 2 *E. gallinarum*) aislados durante el período del 1 de octubre de 2000 al 30 de septiembre de 2001, procedentes de 15 hospitales de tres provincias (Ciudad de La Habana, Santiago de Cuba y Las Tunas). Se incluyeron todas los aislamientos (n=97) recibidos en LNRM/IPK durante este período, seleccionando uno por paciente.

Estudio 2: Análisis de la diversidad genética, mediante ECP de aislamientos de *E. faecalis* procedentes de pacientes atendidos en el hospital pediátrico de Holguín entre enero de 2001 y diciembre de 2004. Durante este período se registraron 94 aislamientos de *E. faecalis* en el hospital pediátrico señalado. Debido a que los estudios de epidemiología molecular no tienen establecido un tamaño muestral específico y, teniendo en cuenta la disponibilidad de recursos, se seleccionó alrededor del 50% (n= 55) del total de los aislamientos registrados. La selección se hizo de manera aleatoria y proporcional al número total anual de *Enterococcus* aislados en este hospital, garantizando su representatividad por año y servicio. Aquellos aislamientos pertenecientes a un mismo servicio se seleccionaron mediante un muestreo simple aleatorio.

Estudio 3: Análisis de la relación filogenética entre los aislamientos de *E. faecalis*, mediante MLST. Se recibieron un total de 418 aislamientos de esta especie desde nueve provincias del país en el período de estudio. Teniendo en cuenta que MLST es una técnica altamente costosa lo que limita el número de aislamientos a caracterizar

(Domínguez *et al.*, 2005), por criterios de factibilidad, se estudiaron sólo 23 de ellos. Para la selección de estos se priorizaron las provincias que aportaron el mayor número de aislamientos durante el período de estudio de este trabajo. De esta manera se constituyeron 5 estratos (Provincias de Ciudad de La Habana, Holguín, Santiago de Cuba, Guantánamo y Ciego de Ávila). Dentro de ellas la cantidad de aislamientos que se caracterizaron fue proporcional al número total de *E. faecalis* recibido por provincias: Ciudad de La Habana (152), Holguín (141), Santiago de Cuba (77), Guantánamo (42) y Ciego de Ávila (4). De esta manera la muestra quedó constituida de la siguiente forma: Ciudad de La Habana (8), Holguín (8), Santiago de Cuba (4), Guantánamo (2) y Ciego de Ávila (1). La selección dentro de los estratos se hizo por muestreo aleatorio simple.

III.2 Procedimientos

III.2.1 Identificación de especies de *Enterococcus*

Se procedió al cultivo de los 501 aislamientos coleccionados en placas de agar sangre de carnero al 5% que se incubaron durante 24 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ (Facklam y Collins, 1989). Una vez comprobada la pureza del cultivo, se realizó la identificación de las especies mediante las pruebas bioquímicas convencionales y se complementó con el sistema automatizado "Mini Api" y las galerías rapid ID 32 STREP (BioMérieux, Francia).

III.2.1.1 Método convencional

Se sembró una asada del cultivo puro en los medios bioquímicos para determinar la hidrólisis de la arginina, la fermentación de los carbohidratos (Difco, Alemania) con 1% de manitol, (sorbitol, arabinosa, sacarosa, sorbosa, rafinosa, ribosa, xilosa, melibiosa, trehalosa y piruvato). Todos los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 horas en atmósfera de 5% CO₂ (Facklam y Collins, 1989). También se evaluó la producción de pigmento amarillo en agar Triptona Soya durante 24 horas en aerobiosis y la motilidad en el medio específico de motilidad (Difco, Alemania)((Facklam *et al.*, 2002).

Se utilizaron las siguientes cepas controles: *E. faecalis* ATCC29212, *E. faecium* ATCC6056 y *E. casseliflavus* ATCC25788. Como control negativo para los carbohidratos se utilizó el caldo básico de rojo fenol (Difco, Alemania) sin la adición de azúcares.

III.2.1.2 Método automatizado ‘Mini Api’ rapid ID 32 STREP

Se sembró una asada del cultivo puro en las galerías Api (BioMérieux, Francia) compuestas por 32 cúpulas que contenían un medio reactivo en forma deshidratada, cada una correspondientes a las pruebas bioquímicas a realizar (Anexo IV) y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Posteriormente, se realizó la lectura según las recomendaciones del fabricante.

III.2.3 Conservación de los aislamientos

Todos los aislamientos se conservaron en caldo Triptona de Soja con glicerol (Merck, Alemania) al 15% y se congelaron (-70 °C) para su posterior caracterización convencional y molecular (Facklam y Collins, 1989).

III.2.4 Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

Se determinó la susceptibilidad de todas los aislamientos frente a 12 antimicrobianos: ampicilina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, estreptomina, kanamicina, nitrofurantoína, ciprofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina, eritromicina y tetraciclina siguiendo las recomendaciones del Clinical Laboratory Standar Institute (CLSI, siglas en inglés) (CLSI, 2007).

III.2.4.1 Método de difusión en agar o Kirby-Bauer (CLSI, 2007)

Se aplicó a todos los aislamientos para analizar, de forma cualitativa, la susceptibilidad a los antimicrobianos mencionados anteriormente, con excepción de la moxifloxacina para la que se determinó directamente el valor de la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de dilución en agar (acápite III.2.4.2). Como control de calidad se utilizó la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A continuación se

muestran los antimicrobianos utilizados por el método de difusión en agar mediante discos y criterios de susceptibilidad para *Enterococcus* según los halos de inhibición.

Antimicrobianos utilizados por el método de difusión en agar mediante discos y criterios de susceptibilidad para *Enterococcus* según los halos de inhibición (M2-A9 Disk Diffusion, CLSI, 2007)

Antimicrobianos *	Contenido del disco (µg)	Diámetros de halos de inhibición (mm)		
		R	I	S
Ampicilina	10	≤16	-	≥17
Vancomicina	30	≤14	15-16	≥17
Teicoplanina	30	≤10	11-13	≥14
Gentamicina	120	≤8	7-9	≥10
Estreptomicina	300	≤8	7-9	≥10
Kanamicina**	120	≤8	7-9	≥10
Nitrofurantoina	300	≤14	15-16	≥17
Ciprofloxacina	5	≤15	16-20	≥21
Levofloxacina	5	≤13	14-16	≥17
Eritromicina	15	≤13	14-22	≥23
Tetraciclina	30	≤14	15-18	>19

Leyenda: R, resistente; I, intermedio; S, sensible *Casas Comerciales Oxoid (Inglaterra) y Biolife (Italia). Fuente: CLSI, 2007 **, Sahm et al., 2006

Preparación del inóculo. A partir de un cultivo puro de 18-24 horas de crecimiento en agar sangre, se preparó el inóculo en 3 mL de caldo Mueller Hinton (MH), ajustando la suspensión bacteriana al estándar 0,5 de Mc Farland (1×10^8 UFC).

Siembra de las placas. Se introdujo un hisopo de algodón estéril en un tubo con la suspensión y este se presionó ligeramente contra sus paredes. Con el hisopo se inoculó la superficie del medio de cultivo agar MH y se estrió la placa de forma homogénea. Se colocaron un máximo de 5 discos por placa presionando suavemente sobre la superficie y se incubaron a 37 °C durante 18-24 horas. Se midieron los diámetros de la zonas de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco dando la categoría de: sensible (S),

intermedia (I) o resistente (R) teniendo en cuenta los parámetros establecidos en el documento M2-A9- Disk Diffusion para *Enterococcus* (CLSI, 2007).

III.2.4.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima. Método de dilución en agar (CLSI, 2007)

La determinación del valor de CIM para diversas familias de antimicrobianos se llevó a cabo en todas las cepas incluidas en el estudio siguiendo las normas del documento M7-A7-MIC Testing para *Enterococcus* (CLSI, 2007).

A continuación se muestran los antimicrobianos utilizados y en el Anexo V se muestran los solventes y diluentes para cada uno de ellos.

Antibióticos y rangos utilizados para la determinación de la CIM

Antibiótico	Rango utilizado (mg/L)
Gentamicina	8-4096
Kanamicina	8-4096
Estreptomina	8-4096
Ampicilina	0,5-512
Vancomicina	0,5-512
Teicoplanina	0,5-512
Ciprofloxacina	0,25-256
Levofloxacina	0,25-256
Moxifloxacina	0,5-16
Nitrofurantoina	2-512
Tetraciclina	0,5-512
Eritromicina	0,5-512

Fuente: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 2007.

Partiendo de una solución madre, que correspondió a la máxima concentración de antibiótico, se prepararon disoluciones seriadas a la mitad de la concentración en agua estéril. Dos mL de cada una de las diluciones se mezclaron con 18 mL de agar MH (dilución 1:10) a una temperatura de aproximadamente 56 °C. La mezcla se vertió en

placas Petri de 16 cm de diámetro. A partir de un crecimiento puro en placa se sembró una colonia en el caldo ICC. Tras 18 h a 37 °C se preparó el inóculo en un tubo con 4,5 mL de suero fisiológico, ajustando a 0,5 McFarland y posteriormente se diluyó 1/10 hasta llegar a una suspensión de 10^7 UFC/mL. Con esta solución se llenaron los pocillos del replicador de Steers y se inocularon las placas una vez solidificados (10^4 UFC/gota). Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que se secaron las gotas y se incubaron a 37 °C. Como controles se inocularon placas con el medio sin antibiótico, una al principio y otra al final de la replicación.

La lectura se realizó a las 24 y a las 48 horas, considerando como CIM la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo. Se consideró despreciable la presencia de un velo muy débil o una colonia aislada.

Las pruebas de control de calidad de los métodos empleados para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana se muestran en el Anexo VI.

III.2.4.3 Determinación de la actividad de beta-lactamasa

Esta prueba se realizó en todos los aislamientos resistentes a la ampicilina y se aplicó el método de la cefalosporina cromógena (Hindler, 2005). Se colocó una gota de la solución de nitrocefina (Glaxo Research, Inglaterra) en una lámina portaobjeto y con ayuda de un asa microbiológica plástica estéril se seleccionó una colonia del aislamiento a probar y se realizó una emulsión con el reactivo. Para evitar la evaporación las láminas se colocaron en cámara húmeda. La reacción se consideró positiva cuando el reactivo viró de color amarillo a rosado intenso. Si pasado 30 minutos no se observó variación en la coloración, la prueba se interpretó como negativa. Las cepas controles que se utilizaron fueron *Escherichia coli* ATCC35218 como control positivo y *Neisseria gonorrhoeae* ATCC29216 como control negativo.

III. 2.5 Detección de genes de resistencia a los antimicrobianos

Se investigó la presencia de los genes de resistencia a los aminoglucósidos *aac(6)Ie-aph(2'')Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)Ia*, *ant(3'')(9)*, *aph(2'')-id* y *aph(2'')-ic* en los aislamientos

resistentes a la gentamicina, kanamicina y estreptomina. También se analizó la presencia de los genes de resistencia a los glicopéptidos *van(A)* y *van(B)* en los aislamientos resistentes a la vancomicina y a la teicoplanina; los genes de resistencia a los macrólidos *erm(B)*, *erm(A)*, *erm(C)* y *mef(A)* en los resistentes a la eritromicina y finalmente se investigó la presencia de siete genes de resistencia a la tetraciclina: *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(K)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(T)* y *tet(U)*, en los aislamientos resistentes a este antibiótico.

La presencia de los genes se evaluó mediante la técnica de PCR simple [genes *van(A)* y *van(B)*] y PCR múltiple (resto de los genes), usando cebadores específicos y según protocolos estandarizados (Anexo VII). La mezcla y las condiciones de reacción se muestran en el Anexo VIII (Nishimoto *et al.*, 2005).

La extracción de ADN necesario para los experimentos de PCR y para el resto de estudios moleculares incluidos en este trabajo se realizó mediante el método enzimático de la acromopeptidasa según instrucciones del fabricante (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, EE.UU.) (Anexo IX).

Las cepas controles positivos que se usaron en los experimentos de PCR fueron: *E. faecalis* Delaware para *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*; *E. casseliflavus* SF11300 para *aph(2'')-id*; *E. gallinarum* SF911 para *aph(2'')-ic* (Vakulenko *et al.*, 2003); *E. faecalis* C135 para *vanB*; *E. faecium* RC714 para *vanA*, *aph(3')-IIIa* y *erm(B)* (Del Campo *et al.*, 2001); *S. aureus* RN1389 para *erm(A)*; *S. aureus* RN4220 para *erm(C)*; *Streptococcus pyogenes* 02C1064 para *mef(A)* (Portillo *et al.*, 2000) y para los genes de resistencia a la tetraciclina *E. faecalis* D26045 para *tet(L)*; *S. aureus* S67449 para *tet(K)*; *E. faecalis* M85225 para *tet(M)*; *Streptococcus pneumoniae* Y07780 para *tet(O)*; *Listeria monocytogenes* L09756 para *tet(S)* (Charpentier *et al.*, 1994); *S. pyogenes* L42544 para *tet(T)* y *E. faecium* U01917 para *tet(U)* (Clermont *et al.*, 1997). Como control negativo se utilizó el agua destilada estéril.

III.2.5.1 Electroforesis en gel de agarosa

La visualización de los fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Se disolvió la agarosa en TBEx1 (Tris-HCl pH 8,3, 89 mM; EDTA 2 mM) calentando hasta su completa disolución y se añadió Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) (BioRad, EE.UU.) hasta una concentración final de 0,5 µg/mL. En los pocillos se cargaron 10 µL de la muestra amplificada mezclada con 2 µL de azul de bromofenol. La electroforesis se desarrolló a 100 voltios en TBEx1, y el gel se visualizó con luz ultravioleta (340 nm) en un transiluminador TS-40 (Hoefer, EE.UU.) y se fotografió con una película Polaroid 667 (Polaroid, EE.UU.) (Emanini *et al.*, 2008).

III.2.6 Determinación de la expresión fenotípica de la virulencia

En todos los aislamientos se evaluó la producción fenotípica de hemolisinas y proteasas (Coque *et al.*, 1995).

Producción de hemolisina. A partir de un cultivo puro de 18-24 horas de crecimiento se sembró una asada del microorganismo en forma de estría sobre una placa de agar columbia (Merk, España) con sangre de caballo (5%) y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Se consideraron como positivos los aislamientos que, tras la incubación, se observó una zona clara de beta-hemólisis alrededor de su colonia.

Actividad de proteasa. A partir de un cultivo puro de 18-24 horas de crecimiento se sembró una asada del microorganismo en forma de estría sobre una placa de agar Todd Hewitt suplementada con 30g de gelatina/L (Difco, Alemania) y se incubó a 37 °C durante 24, 48 y 72 horas. Se consideraron positivos aquellos aislamientos que produjeron un halo claro alrededor de la colonia después de la incubación.

III.2.7 Determinación de la presencia de genes de virulencia

El estudio genotípico de virulencia se llevó a cabo mediante la detección de cinco genes que codifican los factores de virulencia: sustancia de agregación (*agg*), gelatinasa (*gelE*), hemolisina (*cylA*), proteína de superficie (*esp*) y feromonas sexuales (*ccf*). Para ello, se

aplicó la técnica de PCR múltiple usando los cebadores descritos en la literatura (Eaton y Gasson, 2001) (Anexo X). La mezcla y condiciones de reacción, para este estudio, se muestran en el Anexo XI. Los productos de la amplificación se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa ya descrita anteriormente (acápite III.2.5.1).

III.2.8 Análisis de macrorrestricción de ADN total por electroforesis en campo pulsado (ECP)

Se llevó a cabo según el protocolo descrito por Coque y colaboradores (Coque *et al.*, 1998). Los reactivos usados para cumplimentar dicho protocolo se muestran en el Anexo XII. Partiendo de cultivos puros recientes de cada una de las cepas en medio caldo ICC se tomaron 200 μL que se centrifugaron 5 minutos para recoger las células y se lavaron con 1 mL de agua destilada. Tras eliminar completamente el agua, se mezclaron con 200 μL de agarosa al 1% disuelta en 0,5 x TBE. La mezcla se añadió a unos moldes adecuados que se enfriaron a 4° C durante 10 minutos. Tras la solidificación, los bloques de agarosa se sacaron de los moldes y se sumergieron en 1 mL de solución de lisis EC y se incubaron a 37 °C durante al menos 18 horas. Una vez realizada la etapa de lisis, se añadió 1 mL de solución EPS y se dejó a 56 °C durante 24 horas, se pasaron los bloques de agarosa a un vial limpio y finalmente se lavaron con 1 mL de TE durante 30 minutos a 56 °C y después dos fases de lavado más durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del último lavado se cambió de nuevo el TE y se mantuvieron con esta solución a 4 °C hasta su uso. La digestión de los bloques de agarosa se realizó en una tercera parte de este la que se pasó a un vial limpio, se incubó durante 1 hora con 200 μL de tampón de la enzima *SmaI* (New England BioLabs, Inc) y se añadieron 10 unidades de *SmaI* en 100 μL de su tampón. Los tubos se sumergieron en un baño a 37 °C durante 2 horas y después se añadieron otras 20 unidades de *SmaI* en 100 μL de su tampón, dejando actuar la enzima a 37 °C durante 24 horas más. Cada tercera parte de los bloques de agarosa sometidos a la digestión se lavaron en 1 mL de TBE 0,5 x a 37 °C durante 30 minutos y se colocaron en los pocillos de un gel de agarosa al 1% disuelta en TBE 0,5x. Los pocillos se llenaron con agarosa, teniendo cuidado de no dejar burbujas. La electroforesis se realizó con TBE 0,5x en un equipo CHEF-DRIII (BioRad, La Jolla,

CA), con las condiciones 5-35 segundos, 14 °C, 6 V/cm² durante 22 horas. Después de la electroforesis el gel se tiñó en un baño de Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) durante 30 minutos y se fotografió en el equipo Image Store 5000 (UVP, EE.UU.). En cada gel se incluyeron dos carriles con marcadores de peso molecular que incluyen 50 líneas diferentes en un rango desde 48,5 hasta 1.018,5 Kb (Lambda Ladder PFG Marker, New England BioLabs, Inc).

Para definir las distintas categorías de relación genética se optó por seguir las recomendaciones del grupo de Tenover (Tenover *et al.*, 1995) tanto en el análisis visual como en el análisis informático con el programa *Phoretix 5.0* (Duck *et al.*, 2003). Estas recomendaciones se basan en que dos aislamientos con ancestro común pueden presentar hasta un máximo de tres bandas diferentes debido a la evolución de cada uno. Así pues, se consideraron aislamientos pertenecientes a un mismo clon aquellos que tuvieron hasta tres bandas de diferencia, entre tres y seis bandas diferentes se clasificaron como aislamientos estrechamente relacionados. Cuando los pulsotipos de dos cepas tuvieron más de siete bandas diferentes, se consideró que no existía ninguna relación genética entre ellas. Este mismo esquema se reprodujo cuando utilizamos el programa *Phoretix 5.0* para conocer la relación genética de los distintos aislamientos en base a un análisis matemático. En esta ocasión se consideró que las cepas que tenían un coeficiente de Dice $\geq 0,9$ eran genéticamente idénticas, mientras que cuando tenían valores entre 0,8 y 0,9 estaban estrechamente relacionadas, y cuando ya los valores corresponden al intervalo 0,7-0,8 posiblemente relacionadas. Por debajo de 0,7 se consideró que las cepas no estaban relacionadas genéticamente.

III.2. 9. Análisis mediante MLST de aislamientos de *E. faecalis*

Para el análisis se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Desarrollo de la PCR. Se amplificaron mediante PCR los fragmentos internos de siete genes metabólicos muy conservados en *Enterococcus* (*gdh*, enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gyd* (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), *pstS* (phosphate ATP binding cassette transporter), *gki* (glucoquinasa), *aroE* (shikimato 5- deshidrogenasa),

xpt (xantina fosforibosiltransferasa) y *yqiL* (acetil-CoA acetiltransferasa), siguiendo el esquema previamente propuesto en la base de datos (<http://efaecalis.mlst.net>). Los cebadores usados y productos de PCR se muestran en el Anexo XIII).

- Secuenciación de ácidos nucleicos. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y las bandas de amplificación obtenidas en cada caso se cortaron del gel y purificaron usando el estuche comercial Wizard SV gel (Promega, EE.UU.) según el protocolo que provee el fabricante. Los fragmentos de PCR purificados se secuenciaron directamente en ambas direcciones usando un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, CA, EE. UU.).
- Análisis filogenético. A cada nueva secuencia o alelo identificado para cada uno de los siete genes que integraron el esquema se les asignó un número en función del orden de aparición y en concordancia con la base de datos de MLST para *E. faecalis*. Posteriormente, a las combinaciones de los siete alelos se les asignó un perfil alélico o secuencia tipo (ST) utilizando los genes en el siguiente orden: *gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yqiL*. Las ST se agruparon en complejos clonales (CCs) mediante el programa informático *eBURST* versión 3 (<http://www.mlst.net>). La relación filogenética entre los aislamientos se analizó por la construcción de un dendograma usando el programa *MEGA4* (Tamura *et al.*, 2007).

III. 3 Análisis estadístico

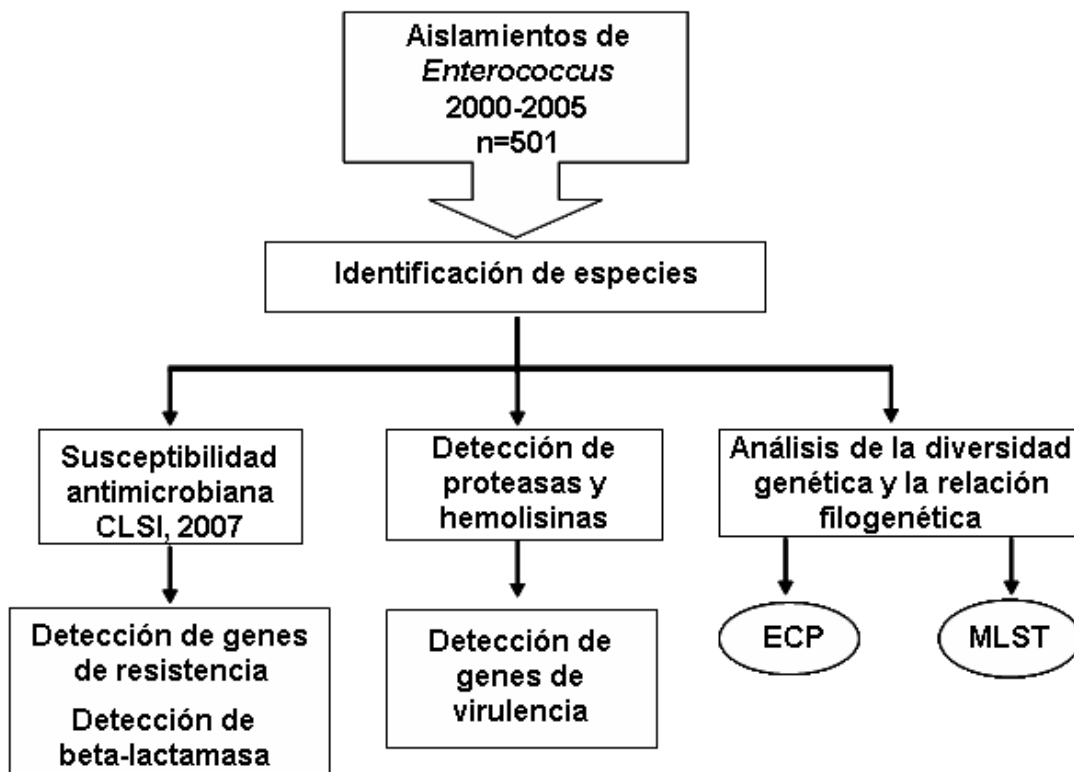
Los resultados obtenidos se procesaron utilizando el programa *Microsoft Office Excel* 2003 expresándolos en tablas y figuras. Se utilizaron medidas de estadística descriptiva como la frecuencia y el porcentaje para el análisis y la presentación de los resultados. Con el programa de Estadística *EPIDAT* versión 3.1 se realizó el cálculo de la significación estadística (X^2) de Pearson para dos o más categorías en las distintas tablas de contingencia evaluando la significación entre las distintas especies de *Enterococcus* y las diferentes STs de *E. faecalis*, en relación a la susceptibilidad antimicrobiana y la distribución de los genes de virulencia.

III.4 Aspectos éticos

Todos los aislamientos pertenecientes al género *Enterococcus* recibidos en el LNRM/IPK durante el período de estudio se acompañaron de una encuesta (Anexo II) donde se registraron los datos clínico-epidemiológicos de cada paciente. Esta información fue recogida por el personal de Microbiología de cada hospital a partir de la orden del cultivo bacteriológico y los datos fueron confidenciales para este personal y los médicos que indicaron el estudio microbiológico. No se requirió la firma de un consentimiento informado ya que no procedía. También se garantizó la confidencialidad de las cepas en el LNRM/IPK para lo cual los hospitales de procedencia de las mismas fueron codificados en el Anexo I. Se mantuvieron bajo custodia del investigador principal quien garantizó su uso únicamente con fines científicos.

III. 5 Metodología general llevada a cabo en el presente trabajo

Flujograma de Trabajo



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Especies de *Enterococcus* identificadas

La identificación a nivel de especie es imprescindible para el estudio de la epidemiología y de la diseminación nosocomial de este patógeno (Kulski *et al.*, 1998). En la figura 1 se refleja la proporción de cada una de las especies de *Enterococcus* detectadas entre los 501 aislamientos estudiados. La especie *E. faecalis* fue la más frecuente (83,4%), seguida por *E. faecium* (10,4%). En menor proporción se detectaron *E. avium* (1,8 %), *E. gallinarum* (1,6%), *E. casseliflavus* (0,8%), *E. raffinosus* (0,8%), *E. durans* (0,6 %) y *E. hirae* (0,6%), incluidas, en este estudio, dentro de la categoría de *Enterococcus* spp. (6,2%).

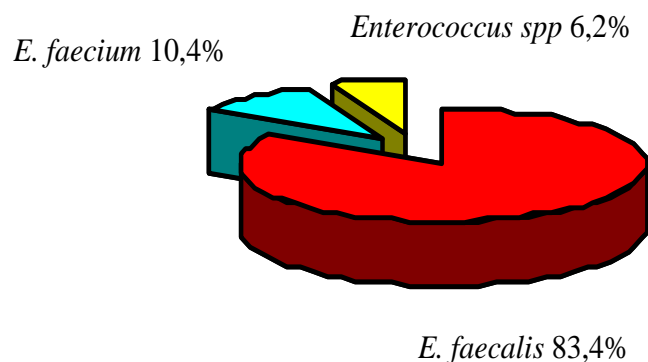


Figura 1. Proporción de especies de *Enterococcus* identificadas entre los 501 aislamientos estudiados.

En dos estudios puntuales desarrollados en hospitales de Ciudad de La Habana *E. faecalis* y *E. faecium* constituyeron, también, las especies más frecuentes (González *et al.*, 2005; Nodarse, 2005).

La distribución de especies encontrada es similar a los reportes internacionales pues *E. faecalis* y *E. faecium* son las especies de mayor importancia clínica mientras que *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. durans* y *E. hirae* corresponden a menos del 5% de los aislamientos enterocócicos (Silva *et al.*, 2006; Martínez-Odriozola *et al.*, 2007; Zervos *et al.*, 2009). El predominio de *E. faecalis* sobre el resto de las demás especies pudo obedecer a su mayor patogenicidad (Rahangdale *et al.*, 2008), pero también a una mejor adaptación al huésped humano. No obstante, actualmente se observa una mayor prevalencia de *E. faecium* en algunos países, específicamente los aislamientos del complejo clonal CC17, relacionado con un incremento marcado de su resistencia antimicrobiana y la adquisición de islas de patogenicidad (Lester *et al.*, 2008; Sood *et al.*, 2008).

La manifestación clínica de la expresión de los factores de virulencia descritos en *Enterococcus* es incierta todavía (Low *et al.*, 2001; Kapoor *et al.*, 2005). De hecho, se describe la presencia de estos factores de virulencia tanto en aislamientos de origen clínico como de origen alimentario (Lopes *et al.*, 2006; Maietti *et al.*, 2007; Willems y Bonten, 2007). Los resultados del presente trabajo revelaron que especies muy poco patógenas como *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* pueden también ser causantes de meningitis, septicemia e infección de herida quirúrgica. En los últimos años se señalan infecciones del torrente sanguíneo y meningitis provocadas por esas especies, lo que sugiere un cambio evolutivo en el comportamiento clínico de las mismas o la adquisición de factores de virulencia (Kurup *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2004, Ersoy *et al.*, 2007).

IV.2 Análisis de la susceptibilidad antimicrobiana

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos investigados, los porcentajes acumulativos de inhibición y los valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ en los 501 aislamientos de *Enterococcus*.

Tabla 1. Porcentajes acumulativos ($\mu\text{g/mL}$), valor de CIM_{50} y CIM_{90} y porcentajes de resistencia (R) a diferentes antimicrobianos de 501 aislamientos de *Enterococcus*. Cuba. 2000-2005.

Antibióticos	Porcentajes acumulativos de inhibición ($\mu\text{g/mL}$):													CIM_{50}	CIM_{90}	R %
	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048			
Gentamicina	-	-	-	-	18	34	45	52	55	67	77	89	100 ^a	64	2048	32,5
Estreptomycin	-	-	-	-	-	-	11	21	30	42	57	73	100 ^a	512	2048	27,0
Kanamycin	-	-	-	-	-	-	-	3	19	35	51	71	100 ^a	512	2048	29,4
Vancomycin	40	62	81	96	97	98	98	98	98	100 ^b				1	4	0,4
Teicoplanin	43	55	72	88	99,8	99,8	100							1	8	0,2
Ampicillin	10	34	65	79	95	97	98	99	100 ^c					2	8	5,4
Ciprofloxacin	30	43	83	84	86	89	95	97	100 ^c					2	32	16,6
Levofloxacin	30	57	73	92	94	97	98	100						1	4	8,4
Moxifloxacin	59	96	98	98	100									0,5	1	4,0
Nitrofurantoin		6 ^d	15	32	38	58	77	97	98	98,4	100			16	64	3,2
Tetracycline	0,5	1	11	31	46	62	71	82	100					16	128	54,3
Erythromycin	9	29	46	64	75	83	94	97	100					4	32	35,5

Leyenda: a, $\geq 2048 \mu\text{g/mL}$; b, $\geq 256 \mu\text{g/mL}$; c, $\geq 128 \mu\text{g/mL}$; d, $\leq 1 \mu\text{g/mL}$.

La primera descripción de cepas de *Enterococcus* con alto nivel de resistencia a aminoglucósidos (ANRA) ocurrió en la década de los años 70. Desde entonces esta resistencia aumenta considerablemente y se disemina a nivel mundial (Kobayashi y Alam, 2006). El 32,5% de los aislamientos presentaron un alto nivel de resistencia a la gentamicina (ANRGm), mientras que para la estreptomina (ANRStr) y la kanamicina (ANRkm) fueron de 27 y 29%, respectivamente. Porcentajes superiores de ANRGm se notifican en México (56,7%), la India (66%), Polonia (53%) e Irán (52%) (Calderón *et al.*, 2003; Kapoor *et al.*, 2005; Feizabadi *et al.*, 2006; Emaneidi *et al.*, 2008). En un estudio multicéntrico llevado a cabo en hospitales de América Latina (1997-2002), se observa un incremento de ANRGm (de 13 a 21%) y de ANRStr (de 29 a 34,5%), lo que evidencia que en esta región, al igual que en el resto del mundo, el incremento de ANRA en *Enterococcus* es un serio problema que se convierte en endémico en varios países (Sader *et al.*, 2002; Mondino *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2004).

Los altos porcentajes de ANRStr (27%) y ANRkm (29%) detectados en la presente investigación son, también, un reflejo de la situación internacional. En Chile se describen cifras de 32,4% de ANRStr y 28% de ANRkm (Sepúlveda *et al.*, 2007) y en Argentina 48,5% de ANRStr (Toledo *et al.*, 2004). En Europa, la prevalencia de cepas de *Enterococcus* con ANRA en los años 2001-2007 oscila desde 13% en Islandia a 67% en Alemania según los resultados del sistema de vigilancia EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, denominación en inglés) (EARSS, 2005).

El aumento de la prevalencia de ANRA plantea un problema terapéutico, ya que los aminoglucósidos constituyen el tratamiento de elección en la infección enterocócica grave como las endocarditis, las septicemias o las meningitis, especialmente combinados con un betalactámico para lograr un efecto bactericida sinérgico contra dicha infección (Mannu *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006). Por tanto, debe llevarse a cabo un uso racional de este grupo de antimicrobianos y considerarse regímenes de tratamiento alternativos para evitar el aumento de la resistencia antimicrobiana.

Los primeros datos de la vigilancia de *Enterococcus*, expresados en este trabajo, revelaron un 5,4% de resistencia a la ampicilina (CIM=16-128 µg/mL) similar a los datos publicados en los hospitales chilenos (1,6%) (Silva *et al.*, 2006) y en los hospitales colombianos (10%) (Arias *et al.*, 2002). Sin embargo, en Holanda se notifica un incremento de un 4% en el año 1994 a un 20% en el año 2005 a expensas de la dispersión de *E. faecium* CC17 (Top *et al.*, 2008) y en la India se constata un porcentaje de resistencia más alto (44%) (Rahangdale *et al.*, 2008).

La ampicilina es un antibiótico de primera línea en el tratamiento de la infección enterocócica, principalmente en las infecciones urinarias causadas por *E. faecalis* (Malani *et al.*, 2002). En 1982 se describe la primera epidemia por *Enterococcus* resistente a la ampicilina causada por una hiperproducción de *PBP5* con menor afinidad por los betalactámicos. En la actualidad se describe la transmisión, entre cepas, de grandes fragmentos de ADN que contienen el gen de una *PBP5* alterada (Galloway-Peña *et al.*, 2009). En ningún aislamiento resistente a la ampicilina se detectó la actividad de beta-lactamasa, al igual que lo descrito por otros autores (Feizabadi *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2004; Christiansen *et al.*, 2007). Este mecanismo enzimático es muy raro en *Enterococcus* (0,1%) (Jones, 2001) por lo que el mecanismo de resistencia, en los aislamientos resistente detectados, está relacionado con una alteración de la *PBP5*, ya sea por una hiperproducción o una mutación puntual a nivel de gen que codifica para esta.

De acuerdo con los resultados encontrados en este trabajo, la resistencia para la ampicilina en los aislamientos de *Enterococcus* caracterizados es muy baja y no constituye hoy un problema terapéutico, sin embargo, tal y como demuestran las publicaciones europeas y americanas (Willems y Bonten, 2007; Top *et al.*, 2008; Galloway-Peña *et al.*, 2009) es importante mantener la vigilancia ya que la diseminación mundial de *E. faecium* CC17 resistente a la ampicilina podría implicar un mayor uso de la vancomicina en Cuba.

En relación a los glicopéptidos, se detectó un bajo porcentaje de resistencia (0,4%), comportamiento que pudo obedecer al uso controlado y racional de la vancomicina y la

teicoplanina que se realiza en los centros sanitarios de Cuba (Comunicación personal, Mabel González Alemán, Hospital “William Soler”, 2008). A estos resultados se suman los hallazgos comunicados por Nodarse, en un hospital cubano, sobre la ausencia de resistencia a vancomicina en 50 aislamientos de *Enterococcus* (Nodarse, 2005). En América Latina y Argentina, también, se observan tasas bajas de prevalencia de ERV (Low *et al.*, 2001; Panesso *et al.*, 2010). En Canadá, a pesar de su cercanía con Estados Unidos, el porcentaje de ERV es bajo (6,7%) (Zhanel *et al.*, 2008). Todas estas diferencias epidemiológicas pueden ser explicadas por las políticas de uso de antibióticos de cada país.

En China se detecta un incremento de la resistencia a la vancomicina entre 1998 y 2004 de 0,5 a 17% (Chiang *et al.*, 2007). En Europa la proporción de ERV es baja (1-3%), aunque se registran mayores porcentajes en Grecia, Irlanda y Portugal (EARSS, 2005). En 1998 la Unión Europea decide prohibir el uso de la avoparcina, glicopéptido estructuralmente similar a la vancomicina, que se utiliza como un promotor del crecimiento en los animales. Esta decisión se toma tras demostrar que existe un problema de resistencia a los glicopéptidos en las cepas clínicas debido a su resistencia cruzada con la avoparcina (Sørum *et al.*, 2006) y también la transmisión de cepas de origen animal al hombre. Recientemente se comunica la detección de *E. faecium* resistente a la vancomicina en Alaska en heces de gaviotas, lo que demuestra la gran capacidad de transmisión de este patógeno a una de las áreas más remotas de América del Norte y pone en evidencia el papel de las aves migratorias en la diseminación de aislamientos resistentes a los antimicrobianos (Drobni *et al.*, 2009).

Con respecto a las fluoroquinolonas, se observaron valores de resistencia para la ciprofloxacina de 16,6%, levofloxacina de 8,4% y moxifloxacina de 4%. Estos datos coincidieron con los descritos en otros países que reflejan una mejor actividad *in vitro* de la moxifloxacina frente a *Enterococcus* (Saravolatz y Leggett, 2003; Hidalgo *et al.*, 2008). Se obtuvieron valores de CIM₅₀ y de CIM₉₀ para la moxifloxacina de 0,5-1 µg/mL, los que contrastan con lo notificado por Velásquez en 2002 y Zhanel en 2008, quienes identifican una CIM₉₀ de 32 y 16 µg/mL, respectivamente (Velásquez *et al.*,

2002; Zhanel *et al.*, 2008). La resistencia detectada para la ciprofloxacina fue similar a la publicada en trabajos previos (Schaberg *et al.*, 1992; Tankovic *et al.*, 1996). No obstante, porcentajes superiores de resistencia se describen en Irán (42%) y Colombia (30%) (Feizabadi *et al.*, 2003; Hidalgo *et al.*, 2008). Desde la última década se acrecienta la preocupación mundial sobre el aumento y la rápida diseminación de la resistencia adquirida a las fluoroquinolonas en el género *Enterococcus*, que supera cifras del 30% en Latinoamérica (Andrade *et al.*, 2006).

El uso global de fluoroquinolonas afecta su actividad (Tankovic *et al.*, 1996). En Cuba se utiliza, principalmente, la ciprofloxacina cuyo consumo se cuadruplica en el año 2000 con respecto al año 1999 (Lara *et al.*, 2003). El principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas en *Enterococcus* son las mutaciones puntuales en la región QRDR constituida por los genes (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*). Estos genes codifican las subunidades de las topoisomerasas, y participan en los procesos de duplicación del ADN (Tankovic *et al.*, 1996; Leavis *et al.*, 2006). No obstante, se describe el gen *qnr* en *E. faecalis*, cuyo producto protege a la girasa de ADN de la inhibición por las fluoroquinolonas, mecanismo que se describe únicamente en las enterobacterias (Hidalgo *et al.*, 2008). Este hecho magnifica el fenómeno de esta resistencia en *Enterococcus* ya que tiene un fuerte carácter transmisible.

También la nitrofurantoína fue activa contra la mayoría de las cepas estudiadas, por lo que pudiera constituir una buena opción terapéutica para la infección urinaria enterocócica. De manera general, la resistencia a este antimicrobiano no es alta a nivel internacional, incluso se demuestra su buena actividad *in vitro* frente a ERV (Zhanel *et al.*, 2003). Sin embargo, en Turquía y la India se notifican porcentajes elevados de resistencia de 24% y 35%, respectivamente (Yildirim *et al.*, 2007; Rahangdale *et al.*, 2008).

Se detectó un elevado nivel de resistencia para la tetraciclina (54%). Este resultado es similar a lo descrito en Polonia (40%) y Kuwait (60%) (Piekarska *et al.*, 2002; Udo *et al.*, 2003). La resistencia a la tetraciclina se detecta con frecuencia en aislamientos clínicos, a pesar de ser este un fármaco no empleado en el tratamiento de la infección

enterocócica (Mondino *et al.*, 2003; Zhanel *et al.*, 2003). También existe resistencia a este antibiótico en aislamientos procedentes de animales y de la colonización intestinal de voluntarios sanos (Aarestrup *et al.*, 2000; Del Campo *et al.*, 2003; Poeta *et al.*, 2007).

Un 35% de los aislamientos caracterizados en este estudio fueron resistentes a la eritromicina, resultado que coincide con los trabajos realizados en Bélgica (32%), Kuwait (63%) e Irán (45%) (Franz *et al.*, 2001; Udo *et al.*, 2003; Emaneini *et al.*, 2008). En Chile, también se señala niveles de resistencia moderados (Silva *et al.*, 2006). El mecanismo de resistencia a los macrólidos más frecuente en *Enterococcus* es la metilación mediante la proteína Erm(B) de un residuo de adenina del ARNr 23S en la subunidad 50S, disminuyendo la unión al ribosoma no solo de los macrólidos sino también de las lincosamidas y las estreptograminas del grupo B, dando lugar al fenotipo conocido como MLS_B (Emaneini *et al.*, 2008).

La resistencia elevada para la tetraciclina y la eritromicina que se identificó en esta investigación pudo ser consecuencia del consumo de estos fármacos en Cuba (Lara *et al.*, 2003), ya que se realiza una presión selectiva positiva sobre las cepas resistentes a ellos. Otro factor importante a tener en cuenta, es que los genes que codifican estas resistencias están localizados en elementos genéticos móviles como los plásmidos y los transposones que diseminan fácilmente estos genes entre los aislamientos (Franz *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2009).

En este trabajo se analizaron, además, los diferentes fenotipos de resistencia (resistotipos) según la especie de *Enterococcus* y se observaron diferencias estadísticamente significativas para la especie *E. faecalis* que presentó mayor resistencia para los aminoglucósidos ($X^2=17,8921$; $p=0,0001$) y las fluoroquinolonas ($X^2=11,8778$; $p=0,0026$), mientras que en la especie *E. faecium* se observó mayor resistencia para la ampicilina ($X^2=209,72$; $p=0,0000$) (Figura 2).

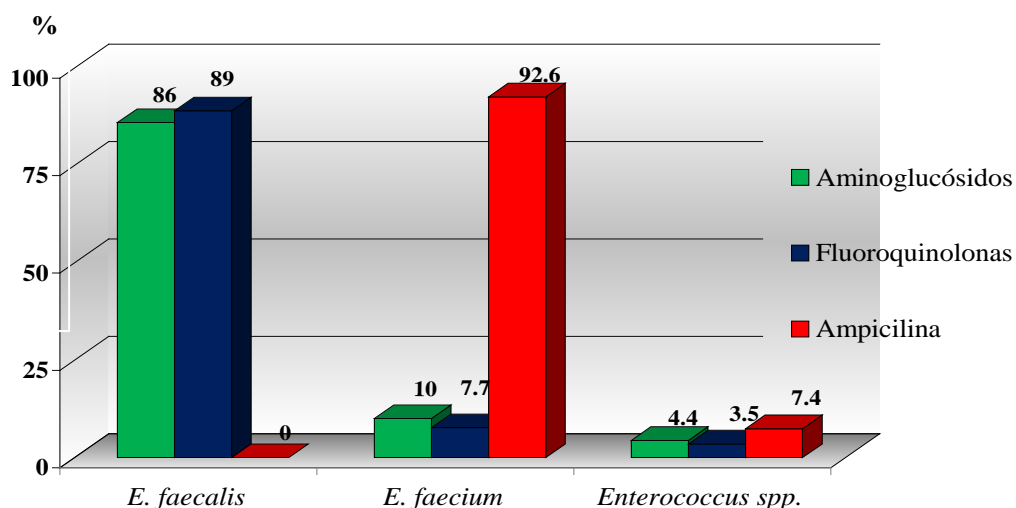


Figura 2. Porcentaje de resistencia para aminoglicósidos, fluoroquinolonas y ampicilina según la especie.

Los datos internacionales también señalan que la especie *E. faecalis* presenta, con mayor frecuencia, resistencia a los aminoglicósidos que *E. faecium* (EARSS, 2005; Feizabadi *et al.*, 2008; Sood *et al.*, 2008). Los resultados del presente trabajo avalaron estas investigaciones y fueron similares a los descritos por Johnson y colaboradores (2003) en Inglaterra, quienes detectan un 40 y 25% de RAN para la gentamicina en *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. Situación similar se describe en países como Argentina y la India, donde las cepas con ANRGm y ANRStr corresponden mayoritariamente a *E. faecalis* (Ronconi *et al.*, 2002; Kapoor *et al.*, 2005). No obstante, *E. faecium*, *E. hirae* y *E. durans* presentan, de forma intrínseca, moderado nivel de resistencia a la gentamicina y a otros aminoglicósidos por la expresión constitutiva del gen cromosomal *aac(6')-Ii*, *aac(6')-Ih* y *aac(6')-Id*, respectivamente (Del Campo *et al.*, 2005; Kobayashi y Alam, 2006).

Con respecto a la familia de los betalactámicos, la literatura internacional describe que *E. faecium* es desde 4 a 16 veces menos susceptible que *E. faecalis* por la presencia de una *PBP5* de subclase B1, una proteína de muy baja afinidad para la unión del antibiótico al sitio diana en la pared bacteriana (Rafii *et al.*, 2006; Taneja *et al.*, 2006a). Esto pudiera justificar las diferencias significativas encontradas en el presente trabajo en

cuanto a la resistencia a ampicilina entre las especies estudiadas, lo que coincide con otro reporte en Cuba (González *et al.*, 2005) y con la situación internacional, donde la resistencia a este antimicrobiano prevalece en *E. faecium* y se reportan cifras próximas al 80% (Piekarska *et al.*, 2002; Christiansen *et al.*, 2007; Sood *et al.*, 2008; Top *et al.*, 2008). Estudios epidemiológicos recientes revelan una diseminación de *E. faecium* CC17 con alto nivel de resistencia para la ampicilina y las fluoroquinolonas en los cinco continentes (Lester *et al.*, 2008; Drobni *et al.*, 2009). En Cuba no se ha notificado ninguna cepa de *E. faecalis* resistente a la ampicilina, siendo estas cepas descritas únicamente en brotes hospitalarios limitados en EE.UU. y Argentina (Patterson y Zervos, 1990; Sader *et al.*, 2002). *E. faecalis* presentó mayor resistencia a las fluoroquinolonas, lo que coincide con los estudios realizados en el Líbano (34%) y en Bélgica (27,7%) (Franz *et al.*, 2001; Zouain y Araj, 2001). Sin embargo, se señala que la prevalencia de la resistencia de *E. faecium* a las fluoroquinolonas se eleva hasta un 89% (Karlowsky *et al.*, 2004).

IV.2.1 Análisis de la multirresistencia

La emergencia de aislamientos multirresistentes es un grave problema hospitalario con implicaciones graves en el control de la infección, ya que se reducen considerablemente las opciones terapéuticas; mucho más si la multirresistencia invalida a antibióticos de primera línea como los betalactámicos, los glicopéptidos o los aminoglucósidos (Jones, 2001).

De los 501 aislamientos incluidos en esta investigación, un 35% presentó multirresistencia para los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas, la tetraciclina y la eritromicina. Es importante destacar que los aislamientos multirresistentes, especialmente, con resistencia a los betaláctamicos y ANRA, estuvieron asociados con los procesos infecciosos más graves como septicemia, bacteriemia relacionada a catéter, infección de herida quirúrgica e infecciones intra-abdominales. Igualmente las dos aislamientos ERV también presentaban ANRGm, ANRKM y ANRStr. Estas resistencias simultáneas eliminan el sinergismo necesario entre la ampicilina o la vancomicina y los aminoglucósidos para lograr el efecto bactericida (Sahm y Torres, 2006) lo que demanda

la introducción de nuevos antimicrobianos, como la quinupristina-dalfopristina y la linezolid.

El porcentaje de multirresistencia detectado en la presente investigación fue similar al publicado en Estados Unidos en 1999 (35%) y en Chile (30%) (Murdoch *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2006). Porcentajes inferiores se describen en Kuwait (23,5%) e Irlanda (18%) (Udo *et al.*, 2003; Murchan y Cunney, 2006). La multirresistencia a los antibióticos es un problema universal y una de las principales características del género *Enterococcus*, tanto en las cepas colonizadoras de la microbiota intestinal como en las patógenas asociadas a infecciones (Marothi *et al.*, 2005).

IV.3 Análisis de los genes de resistencia a los antimicrobianos

IV.3.1 Genes de resistencia a los aminoglucósidos

Acorde con los resultados obtenidos en los experimentos de PCR con cebadores específicos, en los aislamientos con ANRA el mecanismo de resistencia enzimático fue el responsable de la misma al detectar la presencia de genes codificantes de EMAs en estos aislamientos. En la figura 3 se ejemplifican algunos de ellos.

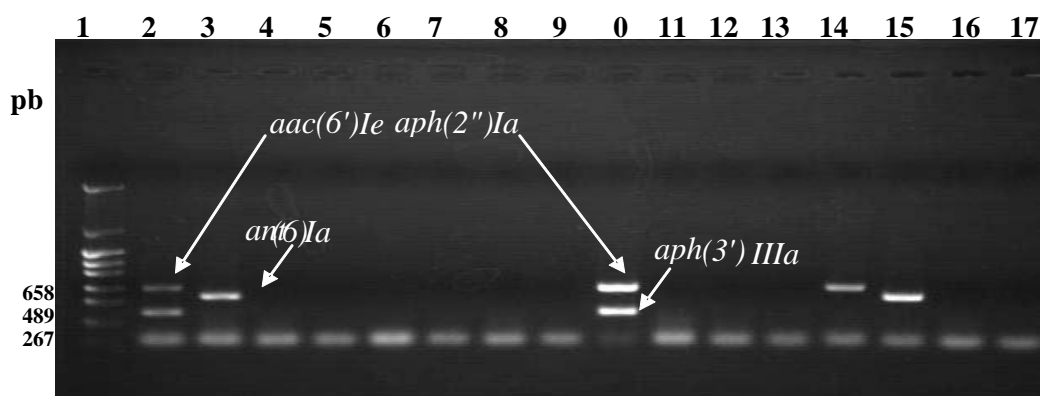


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación de los genes de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2 control positivo: *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* y *aph(3')-IIIa*; línea 3 control positivo: *ant(6)-Ia*; líneas 10 y 14: producto amplificado *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* de 675 pb; línea 11: producto amplificado *aph(3')-IIIa* de 354 pb; línea 15: producto amplificado *ant(6)-Ia* de 548 pb; líneas: 16 y 17 controles negativos; líneas 4-9 y 11-13: resultados negativos.

En la figura 4, se muestra la distribución de los genes de las diferentes EMAs y su expresión fenotípica.

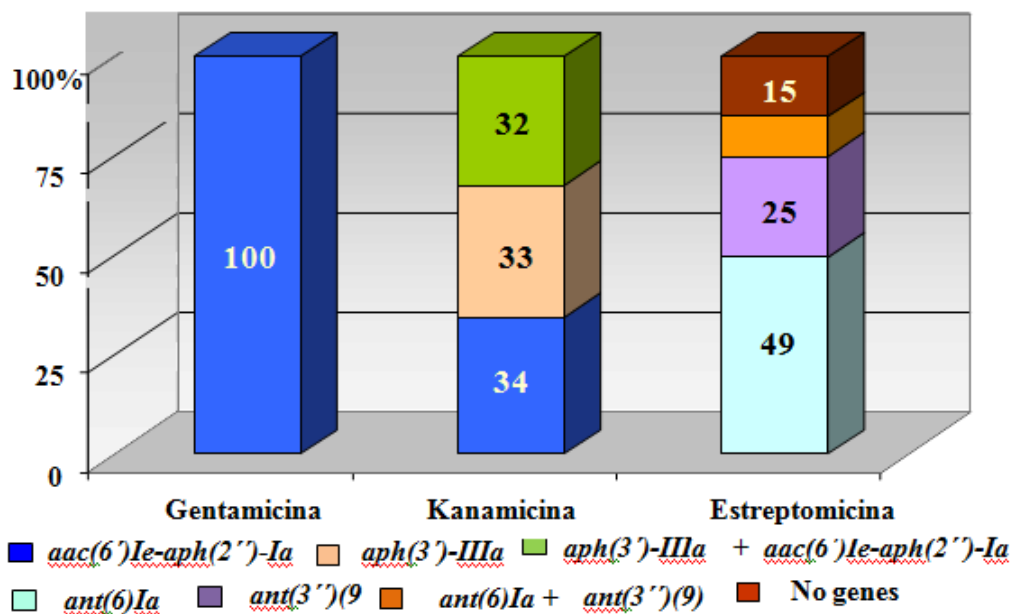


Figura 4. Distribución de los genes codificantes de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) y su implicación en la resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos (ANRA).

Todas las cepas que fenotípicamente presentaban ANRGM portaron el gen *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*, que codifica la enzima bifuncional AAC(6')-APH(2''). Esta enzima confiere resistencia a todos los aminoglucósidos, excepto a la estreptomicina y es la mayor responsable de los fracasos terapéuticos con el uso de estos antimicrobianos (Kobayashi y Alam, 2006). Del mismo modo, el gen responsable es el más difundido en relación con los aislamientos con ANRGM (Del Campo *et al.*, 2000; Kobayashi y Alam, 2006; Emaneini *et al.*, 2008). En ninguna de las cepas con ANRGM se detectaron los genes *aph(2'')-Id* y *aph(2'')-Ic*. La existencia de estos genes se describen en aislamientos de *Enterococcus* causantes de infecciones humanas y recientemente en aislamientos de origen alimentario o animal (Donabedian *et al.*, 2003; Udo *et al.*, 2004), aunque su diseminación es todavía escasa.

En el caso de las cepas con ARN^{Km} el 35% de ellas presentó el gen de la enzima bifuncional, en otro 33% se evidenció el gen *aph(3')-IIIa* y en el 32% restante coexistieron ambos genes. Emaneini y colaboradores describen, en 2008, resultados similares al identificar el gen *aph(3')-IIIa* en un 37% de sus aislamientos y muestran la coexistencia *aph(3')-III + aac(6')Ie-aph(2'')Ia* en un 28 y 49% de los aislamientos de *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente. El gen *aph(3')-IIIa* está también muy diseminado, lo que justifica los altos niveles de resistencia detectados para la kanamicina en este patógeno (Kobayashi y Alam, 2006).

En las cepas con ANR^{Str} predominó el gen *ant(6)-Ia* (49%), seguido en frecuencia por el gen *ant(3'')(9)* que se detectó en 25% de las mismas, mientras que en otro 10% se observó la coexistencia de ambos genes. Estos porcentajes son superiores a los descritos por Del Campo y colaboradores, en España, quienes detectan la presencia del gen *ant(6)-Ia* en el 32% de las cepas resistentes a la estreptomicina (Del Campo *et al.*, 2000). En el 15% de ellas no se pudo identificar ningún mecanismo enzimático responsable de ANR^{Str} (correlación negativa entre el patrón fenotípico de susceptibilidad y el resultado de la PCR) por lo que una posible mutación en los genes, que codifican para la síntesis de la proteína S12 de la subunidad 30S del ribosoma (otro de los mecanismos descrito para la resistencia a la estreptomicina en *Enterococcus*) (Kobayashi y Alam, 2006), podría ser el mecanismo de resistencia implicado.

Diversos estudios ponen de manifiesto la facilidad con la que el género *Enterococcus* presenta varios mecanismos de resistencia al mismo tiempo. Esto es especialmente válido en el caso de los aminoglucósidos y los genes que codifican EMAs. La ocurrencia de estas combinaciones varía según la región geográfica y los hospitales y se relaciona, generalmente, con el uso continuado de estos antimicrobianos en los hospitales. En este estudio, el 67% de los aislamientos con ANRA portó más de un tipo de gen codificante de EMAs, lo que se correspondió con los hallazgos de Del Campo y colaboradores en España (71%) (Del Campo *et al.*, 2000).

Las combinaciones más frecuentes detectadas fueron: *aac(6')*-*aph(2'')* + *aph(3')*-*IIIa* + *ant(6)-Ia*: 19%; *aac(6')*-*aph(2'')* + *ant(6)-Ia*: 17%; *aac(6')*-*aph(2'')* + *aph(3')*-*IIIa* + *ant(3'')(9)*: 2%; *aac(6')*-*aph(2'')* + *aph(3')*-*IIIa*: 10%.

Kobayashi y colaboradores también señalan la combinación de genes *aac(6')*-*aph(2'')* + *aph(3')* + *ant(6)-Ia* como la que se detecta más frecuente en *E. faecalis* (Kobayashi *et al.*, 2001). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación difieren de lo descrito por este mismo autor (43,5%) y de otros (23,5%) para la combinación *aac(6')*-*aph(2'')* + *aph(3')* (Del Campo *et al.*, 2000; Kobayashi y Alam, 2006). Cuando el gen *ant(6)-Ia* coexiste con el gen *aph(3')* el ANR_{Km} se asocia con el ANR_{Str} (Del Campo *et al.*, 2000), fenómeno que también se observa en en las cepas cubanas caracterizadas.

Estos hallazgos reducen la posibilidad de utilizar los aminoglucósidos para infecciones enterocócicas severas en el país. Los genes de resistencia a los aminoglucósidos se pudieron detectar en las diferentes especies de *Enterococcus* identificadas en este trabajo (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. gallinarum* y *E. durans*) lo que evidenció una amplia diseminación de este mecanismo enzimático entre las especies.

IV.3.2 Genes de resistencia a los glicopéptidos

Se detectaron dos cepas resistentes a la vancomicina y una de ellas también a la teicoplanina. Tras realizar experimentos de PCR con cebadores específicos, se corroboró que la resistencia glicopeptídica estuvo mediada por el gen *vanA* en la cepa con resistencia a ambos glicopéptidos (CIM ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$ para la vancomicina, CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ para la teicoplanina) y por el gen *vanB* en la cepa que solo presentaba resistencia fenotípica para la vancomicina (CIM ≥ 256 $\mu\text{g/mL}$). Esto evidencia que las cepas son resistentes por una modificación del sitio diana de actuación de los glicopéptidos lo cual propicia una baja afinidad por estos antibióticos. Resultados comparables se obtienen en Chile donde se detecta este mecanismo de resistencia mediado, igualmente, por ambos genes (Fica *et al.*, 2007). Espino y colaboradores en el 2005 reportan un aislamiento de ERV portador del gen *vanA* en un hospital cubano por lo que este genotipo, aunque raro todavía en Cuba, podría prevalecer en el futuro.

Los genes *vanA* y *vanB* son los principales genes de resistencia adquirida a los glicopéptidos y están diseminados en prácticamente todos los nichos ecológicos donde se puede encontrar *Enterococcus*: la microbiota intestinal de los hombres y los animales, las aguas residuales y los alimentos (Torres *et al.*, 1994; Bates, 1995; Agers *et al.*, 2008).

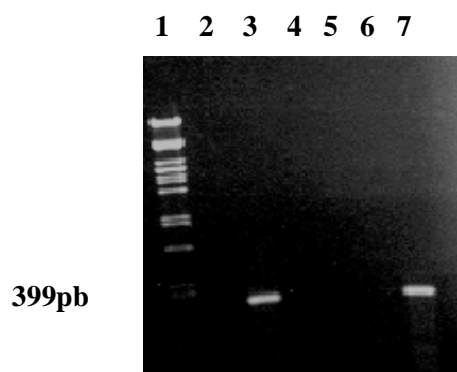


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *vanA*.

Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: control negativo; línea 3: *vanA* control positivo; líneas 4-6: reacciones negativas; línea 7: producto amplificado de 399 pb del gen *vanA*.

La distribución geográfica de los determinantes de resistencia a los glicopéptidos es muy diversa. Así, en Australia solamente prevalecen cepas con el gen *vanB*, mientras que en América y Europa es mucho más frecuente el gen *vanA* (Christiansen *et al.*, 2007, Zhanel *et al.*, 2008, Panesso *et al.*, 2010). En Canadá, un estudio nacional sobre patógenos en la UCI señala que el 88% de las cepas ERV portan el gen *vanA* (Zhanel *et al.*, 2008). En Arabia Saudita y Turquía, se describe una situación similar al circular, también, el gen *vanA* (Khan *et al.*, 2008; Kilic *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta la facilidad de diseminación de los genes *van*, la baja tasa de resistencia detectada para los glicopéptidos en la presente investigación y la masiva afluencia de turismo a Cuba, cabe la posibilidad de que las cepas resistentes a los glicopéptidos pudieran ser importadas. El conocimiento de los tipos de genes que mediaron la resistencia glicopeptídica en las cepas cubanas constituyó un hallazgo relevante desde que estos pudieran predecir el comportamiento futuro de dicha resistencia y pueden ser indicadores de posibles brotes epidémicos (Taneja *et al.*, 2006b).

IV.3.3 Genes de resistencia a la tetraciclina y a la eritromicina

Tetraciclina

Un total de 272 cepas de las 501 estudiadas presentaron resistencia fenotípica a la tetraciclina (54,3%). La resistencia estuvo mediada por los dos mecanismos descritos con más frecuencia: el gen *tet(M)* en el 78% y el gen *tet(L)* en el 7% de las cepas. Estos dos genes codifican a las proteínas encargadas de las alteraciones en el ribosoma para impedir la unión del antibiótico [gen *tet(M)*] y las proteínas de la pared bacteriana que provocan la expulsión del antibiótico [gen *tet(L)*]. En este estudio coexistieron ambos mecanismos en el 15% de las cepas resistentes (Figura 6).

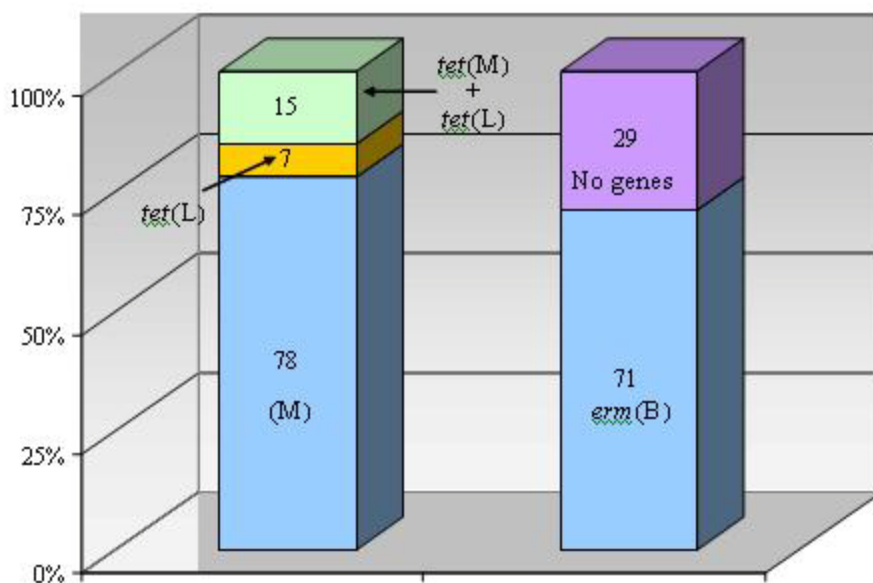


Figura 6. Distribución de genes *erm(B)*, *tet(M)* y *tet(L)* en aislamientos de *Enterococcus* con resistencia a la tetraciclina y la eritromicina.

La presencia del gen *tet(M)* suele ser el mecanismo más frecuente de resistencia a la tetraciclina en el género *Enterococcus* y también se detecta en otros géneros bacterianos (Roberts, 2005). Se describe en los aislamientos obtenidos de los humanos, los animales, los alimentos y del ambiente, en porcentajes superiores (95-100%) a los encontrados en la presente investigación (Charpentier *et al.*, 1994; Aarestrup *et al.*, 2000). Curiosamente, los primeros datos de prevalencia de este gen en Estados Unidos entre

1953 y 1954 son mucho menores (Atkinson *et al.*, 1997). El gen *tet(L)* es menos prevalente y su tasa de detección varía entre 10-42% (Charpentier *et al.*, 1994; Aarestrup *et al.*, 2000; Huys *et al.*, 2004) y los resultados del presente trabajo ratifican este hecho. Sin embargo, la tasa de detección de este gen en los aislamientos de los animales y del ambiente es diversa y depende del estudio (0-80%) (Aarestrup *et al.*, 2000; Petterson y Dalsgard, 2003).

Se describen otros genes relacionados con la resistencia a la tetraciclina en *Enterococcus* como los genes *tet(K)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(U)* y el gen *tet(T)* (Zilhao *et al.*, 1988; Clermont *et al.*, 1997; Roberts, 2003) pero ninguno se detectó en los aislamientos cubanos. Sin embargo, se observó la coexistencia de los genes *tet(M)* y *tet(L)* en el 10% de las cepas resistentes a la tetraciclina, resultado similar al descrito por Zilhao y colaboradores en Francia donde un 36% de los aislamientos portaron ambos genes (Zilhao *et al.*, 1988). En un estudio realizado en Japón se señala un mayor porcentaje (45%) de asociación de varios genes *tet* (Charpentier *et al.*, 1994). En la figura 7, se muestra el producto de amplificación de los genes *tet(M)* y *tet(L)* en algunos de los aislamientos resistentes a la tetraciclina.

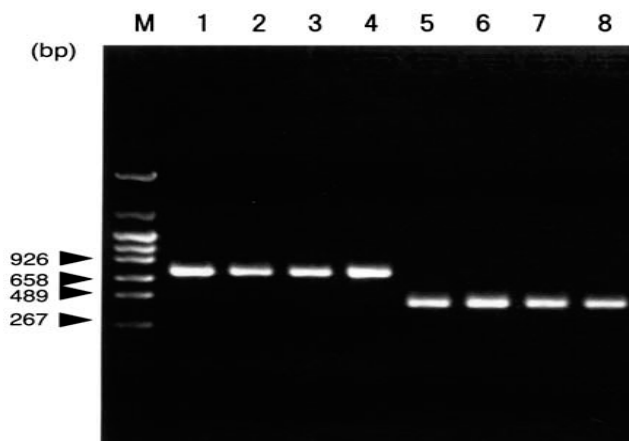


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de los genes *tet(M)* y *tet(L)*.

Línea 1: marcador de peso molecular; líneas 2-5: producto amplificado de *tet(L)* de 740 pb; líneas 6-9: producto amplificado de *tet(M)* de 435 pb.

No se observó diferencias en cuanto al valor de CIM para tetraciclina en las cepas que portaban uno o ambos genes, como describe Charpentier y colaboradores en un estudio

previo en 1994. La presencia de ambos genes puede favorecer la persistencia del fenotipo de resistencia en *Enterococcus*, además de mediar la diseminación de los genes *tet* entre *Enterococcus* u otras especies bacterianas a través de plásmidos o transposones (Nishimoto *et al.*, 2005).

Eritromicina

Ciento setenta y ocho aislamientos fueron resistentes a la eritromicina. El determinante genético de resistencia más frecuente fue el gen *erm(B)* que se detectó en el 71% (Figura 6). La presencia de este gen confiere el fenotipo de resistencia MLS_B constitutivo que afecta a los macrólidos, a las lincosaminas y a la estreptogramina B. En el 29% restante no se pudo filiar el mecanismo de resistencia responsable. En la figura 8 se muestra el producto de amplificación del gen *erm(B)* de algunos de los aislamientos resistentes a la eritromicina.

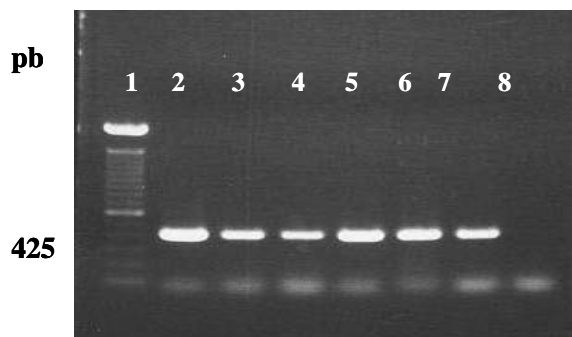


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen *erm(B)*.

Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: control positivo; líneas 3-7: amplificado *erm(B)* de 425 pb; línea 8: control negativo.

Se evidenció, por tanto, que el mecanismo más implicado en la resistencia a la eritromicina fue la metilación del ARNr 23S en la subunidad 50S ribosomal debido a la acción de las metilasas Erm(B). Basados en estos resultados, y en trabajos publicados que muestran una alta prevalencia del gen *erm(B)* en *Enterococcus* resistentes a la eritromicina, se puede decir que este mecanismo de resistencia es universal y está muy diseminado (Schmitz *et al.*, 2002; De Leener *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2007). Todo ello

puede deberse a la facilidad en la transferencia del gen *erm(B)* al estar insertado en el transposon *Tn917*, presente en numerosos aislamientos enterocócicos de origen humano y animal (Seral *et al.*, 2000). No obstante, también existen otros genes implicados en la resistencia a eritromicina como *erm(A)*, *erm(C)* y *mef(A/E)*, pero tienen mucha menor importancia (Portillo *et al.*, 2000). Estos últimos genes no se detectaron en ningún aislamiento cubano, por lo que en el 29% de estos pudo ocurrir una mutación en genes relacionados con la síntesis proteica ribosomal, que es otro mecanismo descrito (Kak y Chow, 2002; Del Campo *et al.*, 2003). La presente investigación evidenció a las cepas cubanas de *Enterococcus* como un reservorio importante del gen *erm(B)*, que pueden diseminarlo a otros cocos grampositivos localizados en los mismos nichos ecológicos, como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus* spp. en los que los macrólidos son importantes en la terapéutica (Kak y Chow, 2002; Luna *et al.*, 2002).

IV.4 Análisis de la virulencia

El estudio del género *Enterococcus* siempre ha presentado dos grandes vertientes: su implicación clínica y la resistencia a los antibióticos. En los últimos años se han añadido los estudios que analizan los mecanismos patogénicos de este género. Por el momento, no existen datos sobre la presencia de factores de virulencia en los aislamientos enterocócicos cubanos, por lo que, en primer lugar, se investigó la expresión fenotípica de proteasas y hemolisinas en los 501 aislamientos incluidos en este estudio.

Los resultados obtenidos muestran que 266 aislamientos (53%) fueron productores de proteasa, 60 (12%) de hemolisina y finalmente en 30 aislamientos se observó producción simultánea de ambos factores (6%) (Figura 9). La producción de proteasa se asocia con la severidad de la endocarditis enterocócica e infecciones asociadas con los biomateriales (Vergis *et al.*, 2002, Baldassarri *et al.*, 2006). La actividad de proteasa en los aislamientos cubanos fue superior a los hallazgos de Creti y colaboradores (34,5%) y Salah y colaboradores (37,5%) (Creti *et al.*, 2005; Salah *et al.*, 2008). A pesar del número elevado de aislamientos con este factor de virulencia, ninguno ocasionó endocarditis ni infecciones asociadas con dispositivos, por lo que serán necesarios otros

estudios, más profundos, para dilucidar bien el verdadero papel de este factor en la patogenia de la infección enterocócica.

La hemolisina codificada por el gen *cylA*, es una proteína citolítica que se asocia con una mayor severidad de la infección enterocócica (Elsner *et al.*, 2000), sin embargo algunos autores no la consideran esencial en la patogenicidad de *Enterococcus*, por detectarse en bajos porcentajes y estar presente en aislamientos de diferentes nichos ecológicos (Coque *et al.*, 1995; Eaton y Gasson, 2001; Martín-Platero *et al.*, 2009). En este trabajo, 31 aislamientos (52%) con actividad hemolítica fueron causantes de procesos infecciosos severos como septicemias, meningitis e infección de herida quirúrgica. También se observó la producción de hemolisina en 16 aislamientos (27%) colonizadores del TGI y vagina. El porcentaje de aislamientos productores de hemolisinas fue inferior al descrito por Elsner y colaboradores en Alemania en el año 2000 (16%) y por Baldassarri y colaboradores en Italia en el 2005 (18%). En Bélgica, Inglaterra y Jordania se notifican porcentajes superiores donde se observa actividad hemolítica de las cepas de *Enterococcus* entre 21-44% (Eaton y Gasson, 2001; Franz *et al.*, 2001; Salah *et al.*, 2008).

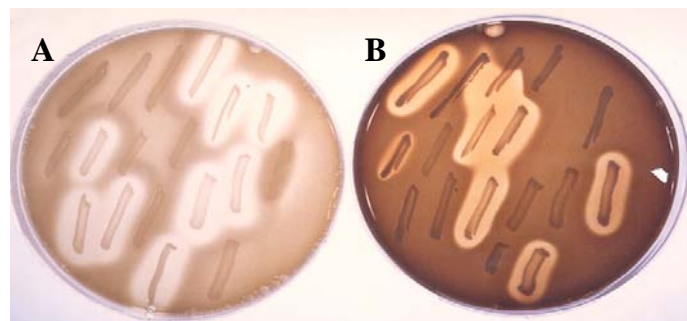


Figura 9. Representación de la actividad de proteasa (A) y actividad de hemolisina (B) en *Enterococcus*.

De los aislamientos que presentaron actividad hemolítica, el 47% presentó ANRGm, 41% ANRStr y 3% resistencia a la ampicilina. Hallazgos similares se encontraron en las cepas con actividad de proteasa donde 29,5; 25 y 3,5% mostraron estas resistencias,

respectivamente. Diversos autores describen, la asociación existente entre los factores de virulencia y la resistencia antimicrobiana, considerando dicha resistencia como un factor más de patogenicidad en *Enterococcus* (Franz *et al.* 2001). Generalmente, estas asociaciones se traducen, en una mayor invasividad y un mayor riesgo de muerte por septicemias relacionado, muchas veces, con la evasión de la respuesta inmune del huésped por parte de la bacteria (Huycke y Speigel, 1991; Vergis *et al.*, 2002).

Una vez estudiada la producción fenotípica de proteasa y hemolisina, se determinó la presencia de cinco genes de virulencia descritos en *Enterococcus* (Figura 10).

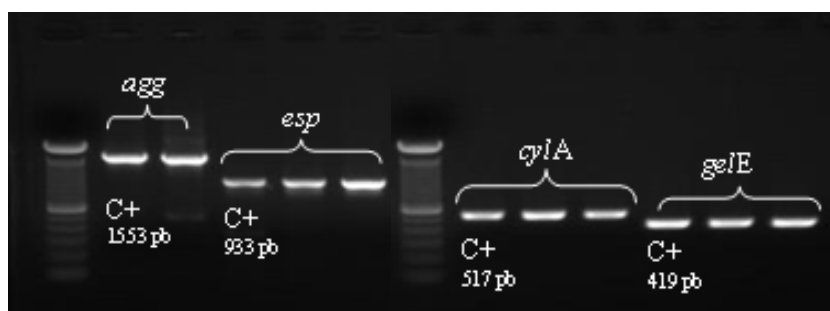


Figura 10. Amplificación de genes de virulencia en *Enterococcus*. Líneas 1 y 7: marcador de peso molecular; línea 2: control positivo *agg*; línea 3: producto amplificado *agg* de 1553 pb; línea 4: control positivo *esp*; líneas 5-6: producto amplificado *esp* de 933 pb; línea 8: control positivo *cylA*; líneas 9-10: producto amplificado *cylA* de 517 pb; línea 11: control positivo *gelE*; líneas 12-13: producto amplificado *gelE* de 419 pb.

Se observó que el 92% de los aislamientos portaban, al menos, un gen de virulencia, lo que evidenció la gran distribución de estos en los aislamientos cubanos. El 56% de ellos demostraron, además, su virulencia clínicamente, ya que se asociaron con infecciones importantes como: septicemias, endocarditis, meningitis, infecciones de heridas quirúrgicas e infecciones intra-abdominales.

Como se observa en la figura 11, el gen más frecuente fue *ccf* que codifica para las feromonas sexuales que activan la conjugación de los plásmidos, especialmente pCF10 relacionado con la resistencia a la tetraciclina (Dunny, 2001) y después se corroboró que el 75% de estos aislamientos que portaban el gen eran resistentes para este

antimicrobiano. Este plásmido es importante en la diseminación de los genes de virulencia y resistencia en *Enterococcus* (Dunny, 2001) por lo que su alta frecuencia entre los aislamientos cubanos indica que la posible ruta de diseminación de estos genes de virulencia pueda ser a través de plásmidos conjugativos. Mediante esta vía, los genes más frecuente detectados en cepas de origen clínico, son también transferidos a cepas de origen ambiental o animal, situación descrita internacionalmente (Abriouel *et al.*, 2003; Mannu *et al.*, 2003).

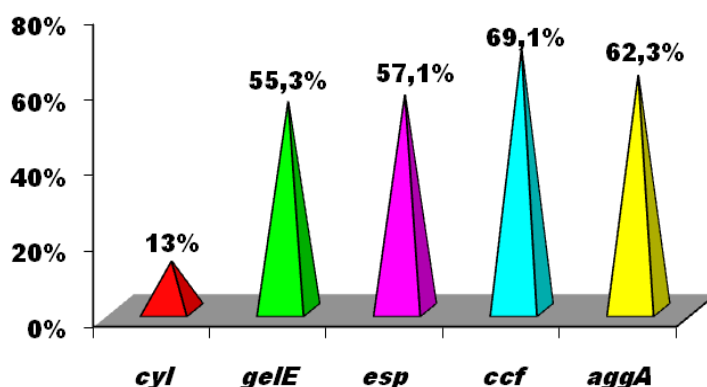


Figura 11. Frecuencia de genes de virulencia en 501 aislamientos de *Enterococcus*.

El segundo lugar lo ocupó el gen *aggA* (62,3%), codificante de una proteína de agregación que facilita la adherencia de *Enterococcus* a células epiteliales renales, intestinales y cardiacas. Esta proteína también altera las defensas inmunológicas del huésped, al interferir con el proceso de fagocitosis y por la acción superantigénica que se le confiere, lo que resalta las implicaciones clínicas de este hallazgo (Kayaoglu y Ørstavik, 2004; Baldassarri *et al.*, 2005). Porcentajes superiores del gen *aggA* se observan en Inglaterra (78%) (Eaton y Gasson, 2001) y Japón (82,7%) (Seno *et al.*, 2005) mientras que Bittencourt y Suzart (2004) en Brasil señalan una incidencia menor (36,8%). El gen *esp* ocupó el tercer lugar y se aisló en el 57% de las cepas, similar al hallazgo de Bittencourt y Suzart (2004) y Salah y colaboradores (2008) quienes lo detectan en un 58% de las cepas. Este gen codifica para una proteína de superficie relacionada con la colonización y la adhesión a las células epiteliales. Su expresión también es necesaria para la formación de biopelículas y la evasión de la respuesta

inmune y se considera actualmente como el mayor marcador de patogenicidad en los aislamientos clínicos de *Enterococcus* (Tendolkar *et al.*, 2004; Bittencourt y Suzart, 2004; Shankar *et al.*, 2006). El 74% de los aislamientos que portaban el gen *esp* causaron infecciones severas lo que ratifica su relación con la patogenicidad de este microorganismo y pudiera justificar el alto porcentaje de su detección. La presencia del gen *esp* prevaleció en la especie *E. faecalis* (81,5%). Este gen se puede transferir también por conjugación, aspecto que hay que tener en cuenta para analizar la ganancia de los factores de virulencia mediante el intercambio genético, principalmente, por cepas no patógenas (Oancea *et al.*, 2004).

En el 55,3% de los aislamientos se confirmó la presencia del gen *gelE*, mientras que las pruebas fenotípicas detectaron su expresión en un 53% de ellas. En Brasil, en 2004, se registra este gen en una frecuencia menor (45,3%) (Bittencourt y Suzart, 2004). Sin embargo, Eaton y Gasson en Inglaterra detectan porcentajes superiores a los de este trabajo (89% en aislamientos clínicos de *E. faecalis*) (Eaton y Gasson, 2001).

El gen *cylA*, codificante de la hemolisina, fue el de menor incidencia en este trabajo lo que coincide con el reporte de Bittencourt y Suzart quienes lo identifican en un 16,8% (Bittencourt y Suzart, 2004), así como con los hallazgos de Salah y colaboradores, quienes lo notifican en un 19% de aislamientos procedentes de infección dentaria (Salah *et al.*, 2008). No obstante, porcentaje superior (44%) se detecta por Eaton y Gasson en el 2001.

En el 3% de los aislamientos portadores del gen *gelE* no se observó actividad de proteasa, hallazgo similar se encontró en el 8% de los aislamientos portadores del gen *cylA*, los cuales no produjeron hemolisina fenotípicamente. Los genes silentes se describen en investigaciones previas y puede obedecer a bajos niveles o baja regulación de su expresión, a factores ambientales que afectan la expresión genética y las condiciones para el desarrollo de las pruebas fenotípicas que son muy diferentes a las del organismo humano (Finlay y Falkow, 1997; Eaton y Gasson, 2001; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006b).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($X^2=124,7462$, $p=0.0000$) en cuanto a la distribución de los genes de virulencia entre las especies. *E. faecalis* fue la especie que mostró más factores de virulencia ya que el 39% de sus aislamientos presentó, al menos, cuatro genes de virulencia a diferencia de *E. faecium* donde el 44% de las cepas portaba dos genes (Figura 12). Estos resultados son similares a varios estudios que evidencian a *E. faecalis* como la especie más virulenta (Eaton y Gasson, 2001; Vergis *et al.*, 2002, Cariolato *et al.*, 2008; Fisher y Phillips, 2009).

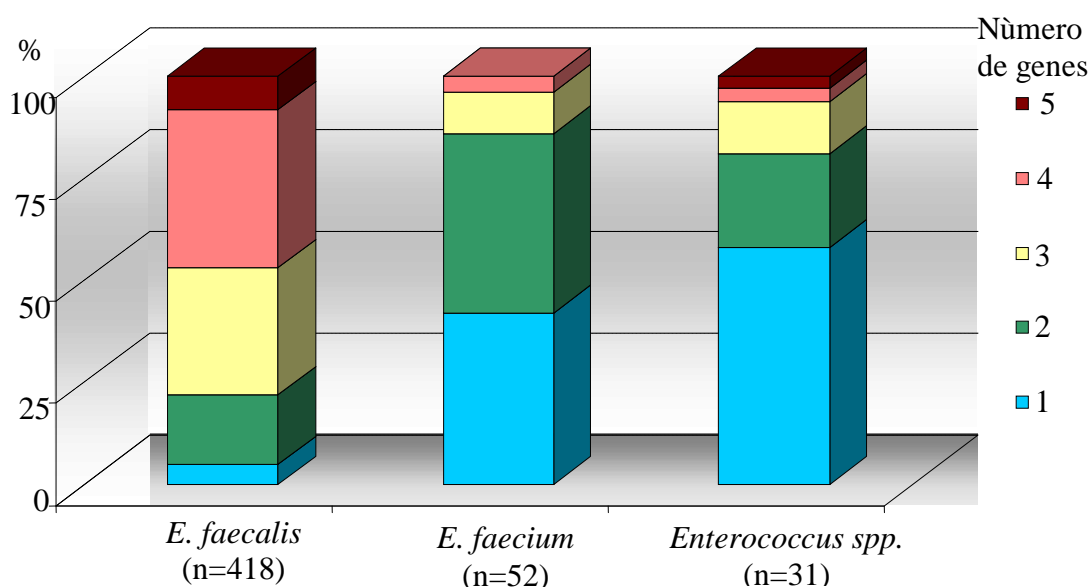


Figura 12. Distribución de simple o múltiples genes de virulencia en las especies *E. faecalis*, *E. faecium* y *Enterococcus spp.*

El gen *ccf* se detectó en las diferentes especies estudiadas, a diferencia de lo publicado anteriormente que solo incluía a la especie *E. faecalis* (Eaton y Gasson, 2001). Pueden ocurrir variaciones regionales en cuanto a la distribución de los genes de virulencia entre las especies enterocócicas que justifiquen las diferencias encontradas entre los países. Eaton y Gasson plantean que la presencia de determinantes de virulencia en *E. faecium*, principalmente el gen *esp*, puede ser significativo en la evolución de la patogénesis de esta especie por lo que numerosas investigaciones están por desarrollarse para profundizar en los mecanismos patogénicos de *E. faecium* (Eaton y Gasson, 2001).

A pesar de que existen muchas incógnitas sobre el papel de varios factores de virulencia en la patogencia de la infección enterocócica, es un hecho la capacidad de algunos de ellos de inmunomodular la respuesta inmune del huésped (Gilmore *et al.*, 2002; Vergis *et al.*, 2002, Thurlo *et al.*, 2009) lo que provoca consecuencias clínicas fatales para los pacientes al facilitarse la translocación de *Enterococcus* a través del epitelio intestinal hacia el sistema linfático mesentérico y diseminarse de manera sistémica (Gilmore *et al.*, 2002).

Los hallazgos sobre la virulencia de las cepas cubanas de *Enterococcus* nos llevan a reflexionar acerca de la necesidad de extender estos estudios correlacionados con la resistencia antimicrobiana a los aislamientos enterocócicos de otros orígenes como una medida de control y detección de la circulación de cepas patogénicas en diferentes ecosistemas.

IV.5 Análisis de la diversidad genética entre los aislamientos de *Enterococcus*

IV.5.1 Estudio 1

Una vez que se analizó la susceptibilidad antimicrobiana y la presencia de factores de virulencia en los 501 aislamientos que conforman este trabajo, se consideró estudiar la relación genética entre algunos de ellos, pertenecientes a diferentes especies, mediante ECP.

El análisis de los resultados de este primer estudio mostraron que ocho de los 10 aislamientos de *E. faecium* y los dos aislamientos de *E. gallinarum* presentaban pulsotipos o patrones genéticos diferentes por ECP. Dos cepas de *E. faecium* y *E. casseliflavus* mostraron un pulsotipo idéntico por lo que se consideraron dos aislamientos del mismo clon (Figura 13).

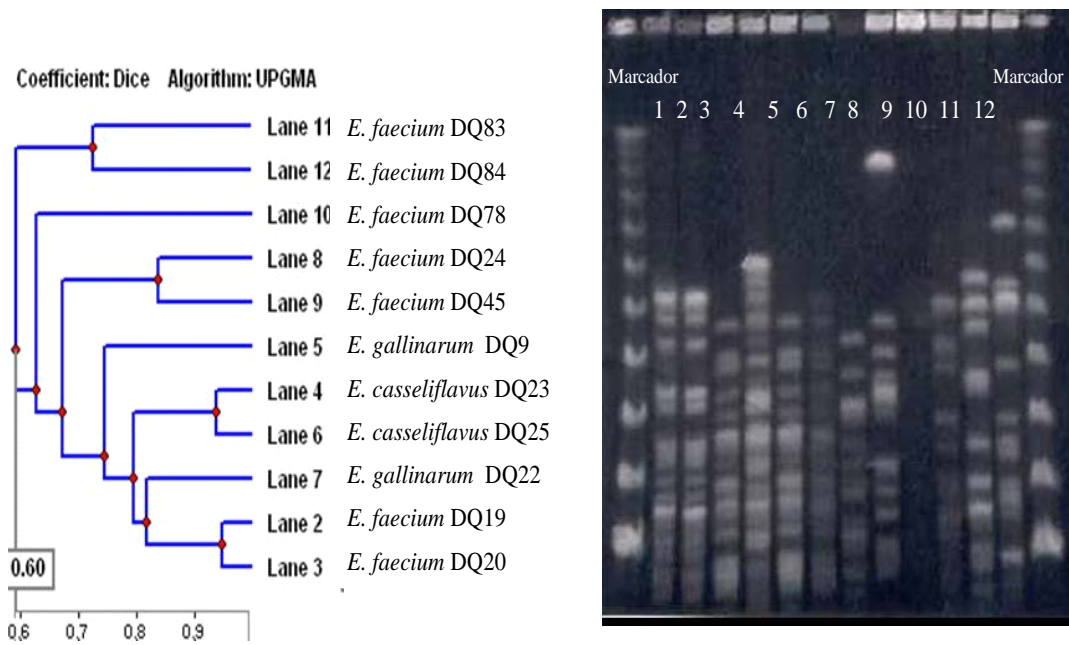


Figura 13. Relación clonal entre los aislamientos de *E. faecium*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* analizada mediante el software Phoretix 5.0.

El segundo análisis se planteó para estudiar la relación genética entre los aislamientos de *E. faecalis*. Los resultados mostraron una elevada diversidad entre los 83 aislamientos de *E. faecalis* caracterizados, donde se detectaron 49 pulsotipos diferentes (1,7 aislamientos/pulsotipo) (Figura 14). En la tabla 2 se muestran los datos de los clones, su distribución según el área geográfica y el hospital, así como su correlación con los patrones fenotípicos y genotípicos de la resistencia antimicrobiana. Los clones más prevalentes fueron: I, C, D y A, seguidos por los clones E, H y el Q. Dentro de los clones mayoritarios, A y D poseían multirresistencia antimicrobiana. Por otra parte, mediante estos análisis se pudo demostrar la diseminación inter e intrahospitalaria de clones de *E. faecalis*: el clon C estuvo representado en los hospitales 2, 3 y 4, el A en los hospitales 1 y 7, y el D se detectó en los hospitales 4 y 6.

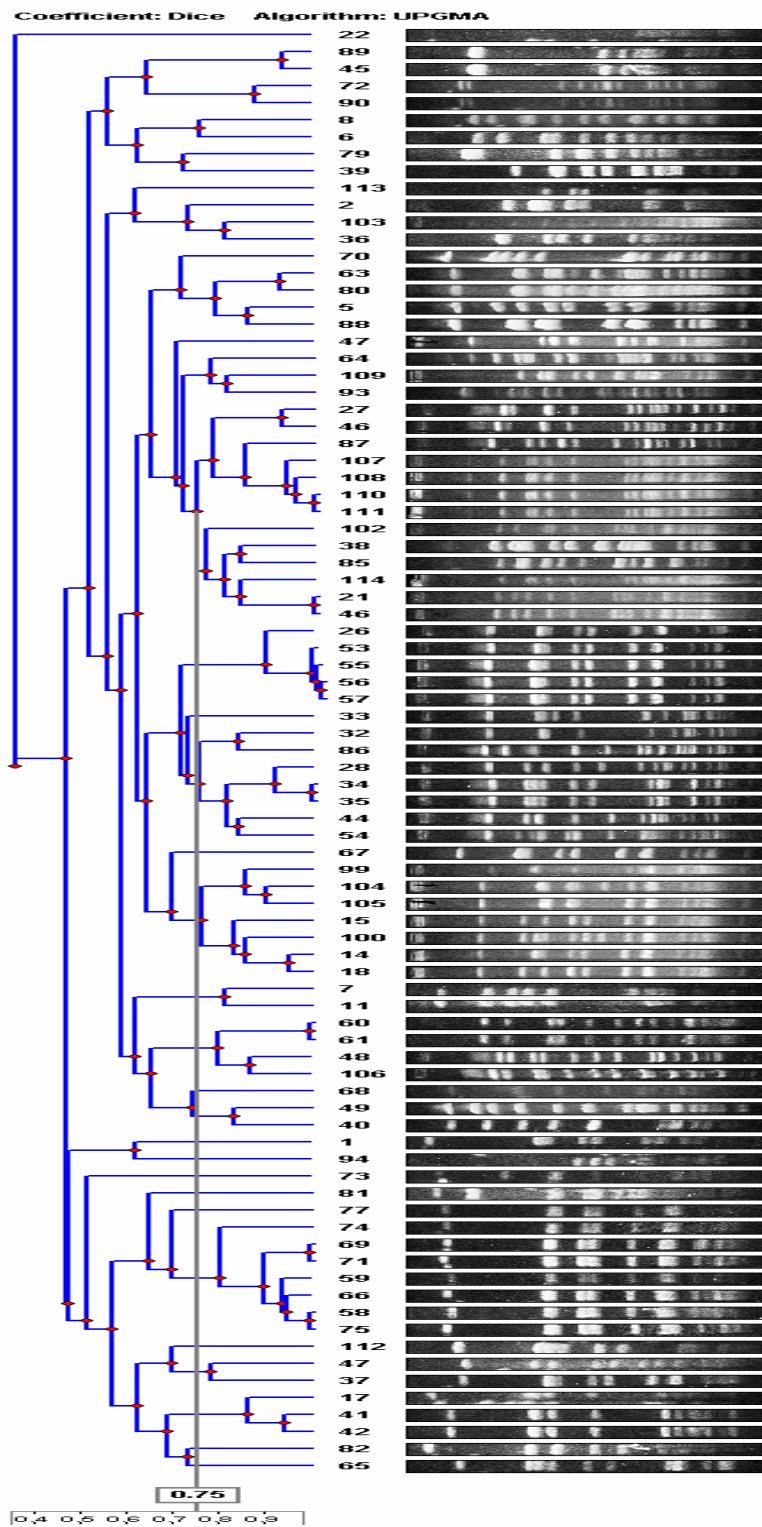


Figura 14. Relación clonal detectada en los aislamientos de *E. faecalis* mediante ECP y posterior análisis con el software Phoretix 5.0.

Los clones identificados de *E. faecium* y *E. casseliflavus* también se diseminaron entre distintos hospitales y presentaron multirresistencia (Tabla 2).

Se constató la diseminación de tres clones de *E. faecalis* (clones A, C, L) en las áreas de la región occidental (Ciudad de La Habana) y la región oriental (Las Tunas y Santiago de Cuba). La distancia geográfica que existe entre estas dos regiones no parece ser un problema para la alta persistencia y amplia diseminación clonal. Al analizar los patrones fenotípicos y genotípicos de la resistencia antimicrobiana en los clones identificados se observó que en *E. faecalis*, siete de ellos (clones J, K, L, N, O, AA/AA', AC/AC') estuvieron formados por cepas con idénticos fenotipos y genotipos de resistencia, mientras que el resto mostró variabilidad en dichos patrones. Como hallazgo interesante se detectaron dos aislamientos con idénticos pulsotipos (clon G), pero uno de ellos portaba el gen *vanB* que confiere resistencia a la vancomicina, lo que pudo representar una adquisición puntual después de su proceso de diseminación. Además, el clon D agrupó a cinco aislamientos con fenotipo de resistencia variable: tetraciclina, ANRGm, ANRStr, ANRkm, eritromicina y ciprofloxacina. Otro ejemplo de variabilidad y evolución individual de un mismo clon fue el clon A formado por cuatro aislamientos y variabilidad en la susceptibilidad para ANRStr, eritromicina y ciprofloxacina. El clon Q mostró un resistotipo similar con genotipo diferente en uno de sus aislamientos. Respecto a *E. faecium*, el clon UM-A mostró un resistotipo único en sus dos aislamientos, mientras que los dos aislamientos del clon *E. casseliflavus* (clon CAS-A) mostraron diferencias en la resistencia para la ampicilina, la gentamicina, la kanamicina, la eritromicina y la tetraciclina. La variabilidad fenotípica y genotípica que observamos dentro de los aislamientos de un mismo clon pudo ser debido a que primero ocurre una diseminación del clon entre los diversos hospitales o los servicios hospitalarios, y después cada aislamiento evoluciona de forma diferente en cada ambiente según sea la presión antibiótica, además de la eventual adquisición de los plásmidos o transposones con los genes de resistencia.

Tabla 2. Datos de los clones detectados según la especie enterocócica y su correlación con los fenotipos y los genotipos de resistencia (Estudio 1).

Provincia	Hospital	Muestra (n°)	Clon	Cepa (n°)	Fenotipo de resistencia	Genes de resistencia
<i>E. faecium</i>						
Santiago de Cuba	1	LCR	UM-A	1	Amp, Str, Gm, Km, E, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'') Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)</i>
	2	Sec. Uretral	UM-A	1	Amp, Str, Gm, Km, E, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'') Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)</i>
	2	Sec. Oído	UM-B	1	Tet	<i>tet(M)</i>
	2	Catéter	UM-C	1	Gm, Km, Amp, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, tet(M)</i>
C. de La Habana	7	Sec.TE	UM-D	1	Gm., Km, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, tet(M)</i>
	4	Orina	UM-E	1	Amp, Str, Gm, Km, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, tet(M), No*</i>
	4	Orina	UM-F	1	Tet	<i>tet(M)</i>
	4	Sangre	UM-G	1	Amp, Va, Tei, E, Tet	<i>vanA, tet(M), No**</i>
	7	Sec. Vesicular	UM-H	1	Tet, Cip	<i>tet(M)</i>
	7	Sec.TE	UM-I	1	Cip	ND
	<i>E. casseliflavus</i>					
Santiago de Cuba	2	Sec. Herida	CAS-A	1	Amp, Gm, Km, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, tet(M)</i>
	3	LCR	CAS-A	1	E, Cip	No**
<i>E. gallinarum</i>						
Santiago de Cuba	15	LCR	GALL-A	1	Sensible	ND
	2	Sec. Oído	GALL-B	1	Cip	ND

Continuación...

Provincia	Hospital	Muestra (n°)	Clon	Cepa (n°)	Fenotipo de resistencia	Genes de resistencia
<i>E. faecalis</i>						
Las Tunas		Pus Abs.	L	1	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6)Ia, ant(3'')-9, erm(B), tet(M)</i>
Santiago de Cuba		Orina	A	1	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)</i>
		Catéter / Sec. Herida	A / A''	2	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)</i>
		Orina	B	1	E, Tet	<i>erm(B), tet(L)</i>
		Sec. Herida	B	1	Gm, E, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'') Ia , erm(B), tet(L)</i>
		Pus Abs. (2) / Catéter	C	3	Sensible	ND
		Pus Abs.	C	1	Tet	<i>tet(M)</i>
		Catéter	AV	1	Tet	<i>tet(M)</i>
		Catéter	AU	1	Sensible	ND
		Catéter	AW	1	Str, Tet	<i>tet(M), No*</i>
		Catéter	A'	1	Gm, Km, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, tet(M)</i>
C. de La Habana		Sec.TE	A'	1	Gm, Km, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, tet(M)</i>
		Orina	C'	1	Sensible	ND
		Sangre	D	1	Tet	<i>tet(M)</i>
		Orina	D	1	Str, Gm, Km, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, tet(M), No*</i>
		Sec.TE	D	1	Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, erm(B), tet(M)</i>
		Cat. gástrico	D	1	Gm, Km, E, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, erm(B), tet(M)</i>
		Sangre	D	1	Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, erm(B), tet(M)</i>
		Pus Abs.	E'	1	Cip	ND
		Sangre	E'	2	Str, Tet, Cip	<i>tet(L), No*</i>
		Sangre	F	1	Tet	<i>tet(M)</i>
		Orina	F'	1	Str, Gm, Km, E, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)</i>
		Orina	G	1	Tet	<i>tet(L)</i>
		Orina	G'	1	Gm, Km, Va	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, vanB</i>

Continuación...

Provincia	Hospital	Muestra (n°)	Clon	Cepa (n°)	Fenotipo de resistencia	Genes de resistencia	
		4	Orina	H	2	Sensible	ND
		12	Sec. Miring.	H'	1	Cip	ND
		4	Sangre	I	2	Tet, Cip	tet(M)
		4	LCR/TE/Orina (2)	I'	4	Tet	tet(M)
		4	Sangre	J	2	Tet, Cip	tet(M)
		4	Sec. Herida / Orina	K	2	Str, Gm, Km, E, Tet	aac(6')-aph(2')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)
		4	Orina	L'	1	Str, Gm, Km, E, Tet	aac(6')-aph(2'), aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B) tet(M)
		4	Sangre	M	1	E, Tet	erm(B), tet(L)
		4	Sangre	M	1	Gm, Km, E, Tet	aac(6')-aph(2')Ia, erm(B), tet(L)
		4	Sangre / Orina	N	2	Gm, Km, E, Tet, Cip	aac(6')-aph(2')Ia, erm(B), tet(M)
		5	Sangre / Orina	O	2	Gm, Km, E	aac(6')-aph(2')Ia, erm(B)
		5	Sangre	P	1	Tet, Cip	tet(M)
		5	Sangre	P'	1	Tet	tet(M)
		7	Sec. Vulva	Q	1	Str, Gm, Km, E, Tet	aac(6')-aph(2')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)
		7	Sec. Uretral	Q'	1	Str, Gm, Km, E, Tet,	aac(6')-aph(2')Ia, aph(3')-IIIa,, erm(B), tet(M), No*
		7	Catéter	Q''	1	Str, Gm, Km, E, Tet	aac(6')-aph(2')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, tet(M), No**
		9	Espuito	R	1	Tet, Cip	tet(M)
		10	Sec. Vaginal	S	1	Cip	ND
		10	Sec. Vaginal	T	1	E, Cip	No**
		9	Espuito	U	1	Sensible	ND
		11	Espuito	V	1	Str, E, Tet, Cip	tet(M), No*, No**
		4	Orina	W	1	E, Tet, Cip	tet(M), No**
		13	Sec. Herida	X	1	Tet, Cip	tet(M)
		4	Orina	Y	1	Gm, Km, E, Tet	aac(6')-aph(2')Ia, erm(B), tet(M)
		4	Orina	Z	1	Gm, E, Tet	aac(6')-aph(2')Ia, erm(B), tet(M)
		4	Orina	AA/AA'	2	Tet	tet(M)
		14	Pus Abs.	AB	1	E, Tet	erm(B), tet(M)
		4	Orina	AC /AC'	2	Str, Gm, Km, E, Tet	aac(6')-aph(2') Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)
		4	Sec. Herida	AD	1	Tet	tet(M)
		4	Orina	AE	1	Tet	tet(M)
		4	Orina	AF	1	Tet	tet(M)

Continuación...

Provincia	Hospital	Muestra (n°)	Clon	Cepa (n°)	Fenotipo de resistencia	Genes de resistencia	
		4	C. umbilical	AG	1	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>ant(3'')-9</i> , <i>erm(B)</i> , <i>tet(M)</i>
		4	Orina	AH	1	Str, Km, E, Cip	<i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>ant(3'')-9</i> , <i>erm(B)</i>
		4	Orina	AI	1	E, Tet, Cip	<i>erm(B)</i> , <i>tet(M)</i>
		4	Orina	AJ	1	Tet	<i>tet(M)</i>
		4	Orina	AK	1	Tet	<i>tet(M)</i>
		4	Orina	AL	1	E, Tet	<i>tet(M)</i> , No**
		4	Orina	AM	1	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>erm(B)</i> , <i>tet(M)</i>
		4	Sangre	AN	1	Str, Gm, Km, E, Tet, Cip	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>tet(M)</i> , No**
		4	Sangre	AO	1	Gm, Km, E	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, No**
		7	Pus Abs.	AP	1	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>ant(6) Ia</i> , <i>tet(M)</i> , No**
		7	Sec. S levin	AQ	1	Tet	<i>tet(M)</i>
		7	Orina	AR	1	Sensible	ND
		7	Orina	AS	1	Sensible	ND
		7	Pus Abs.	AT	1	Str, Km, E, Tet	<i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(6)</i> , No**

Leyenda: 1, hospital pediátrico (VII); 2, hospital pediátrico (VIII); 3, hospital general (VI); 4, hospital pediátrico (I); 5, hospital materno infantil (I); 6, hospital materno infantil (II); 7, hospital clínico quirúrgico (I); 8, hospital general (V); 9, hospital clínico quirúrgico (III); 10, hospital materno infantil (IV); 11, hospital materno infantil (III); 12, hospital pediátrico (II); 13, hospital pediátrico (III); 14, hospital clínico quirúrgico (II); 15, hospital clínico quirúrgico (V); Pus Abs., pus de absceso; Sec. Herida, secreción de herida; Sec. TE, secreción de tubo endotraqueal; Cat. Gástrico, catéter gástrico; Sec. Miring., secreción de miringotomía; LCR, líquido cefalorraquídeo; Sec. Vulva, secreción de vulva; Sec. Uretral, secreción de uretra; Str, estreptomina; Gm, gentamicina; Km, kanamicina; E, eritromicina; Tet, tetraciclina; Cip, ciprofloxacina; Va, vancomicina; Tei, teicoplanina; ND, genes de resistencia no determinados; No*, ausencia de genes de resistencia a la estreptomina; No**, ausencia de genes de resistencia a la eritromicina.

IV.5.2 Estudio 2

Una vez evidenciada la estructura clonal de las diferentes especies de *Enterococcus* circulantes en 15 hospitales cubanos, se planteó estudiar el grado de clonalidad en los aislamientos de *E. faecalis* procedentes de un único hospital para analizar la diseminación intra-hospitalaria de los clones enteocócicos, mientras que en el anterior se pretendía estudiar la diseminación inter-hospitalaria.

En este segundo estudio, el análisis de los resultados moleculares reveló una gran diversidad genética, incluso, mayor que la del estudio anterior y se detectaron 54 pulsotipos diferentes entre los 55 aislamientos de *E. faecalis* (1,01 aislamientos/pulsotipo) (Figura 15).

En la tabla 3 se muestran los clones detectados, sus datos epidemiológicos y los fenotipos y genotipos de resistencia. El clon principal (clon G) estuvo formado por seis aislamientos (11%) con fenotipos y genotipos de resistencia diferentes y se detectó en la unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP), en el servicio de otorrinolaringología y en la comunidad.

El clon I, formado por tres aislamientos, se identificó inicialmente en el servicio de urología y un año más tarde en la UCIP, este mostró multirresistencia antibiótica con variaciones en los patrones de resistencia. Siete clones agruparon aislamientos tanto del hospital como de la comunidad. Un hallazgo interesante fue la detección de dos clones (O y P) con aislamientos que persistieron durante más de tres años, uno de ellos en el servicio de neonatología y el otro en la comunidad (Tabla 3).

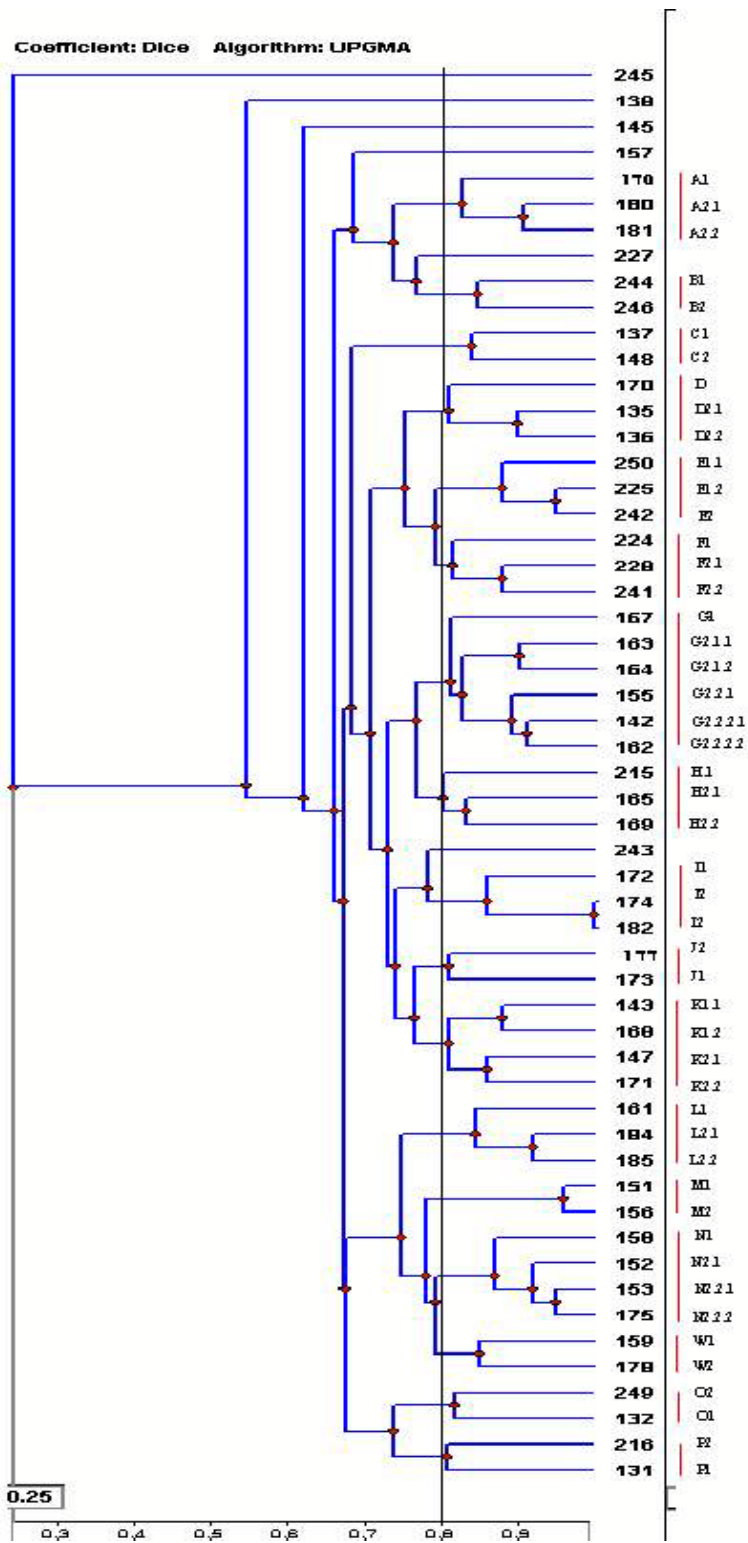


Figura 15. Relación clonal entre los 55 aislamientos de *E. faecalis* procedentes del Hospital Pediátrico Holguín.

Tabla 3. Datos de los clones de *E. faecalis* detectados en el Hospital Pediátrico de Holguín.

Servicio	Año	Muestra	Pulsotipo	Cepa	Fenotipo de resistencia	Genes de resistencia
Cirugía	2002	L. periton.	A1	179	E, Tet	<i>erm(B), tet(M)</i>
Cirugía	2002	Orina	A2.1	180	E, Tet	<i>erm(B), tet(M)</i>
UCIP	2002	Sangre	A2.2	181	Str, Gm, Km E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'') Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)</i>
Cirugía	2004	Sec. Oído	B1	244	Tet	<i>tet(M)</i>
Otorrino	2004	Pus Abs.	B2	246	Sensible	ND
Comunidad	2001	Frotis Perianal	C1	137	Gm, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, erm(B), tet(M)</i>
Urología	2001	Orina	C2	148	Str,Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, erm(B), tet(M), No*</i>
Cirugía	2001	Sec. Herida	D1	170	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6)Ia, erm(B), tet(M)</i>
UCIP	2001	Sangre	D2.1	135	Tet	<i>tet(M)</i>
Cirugía	2001	Sec. Herida	D2.2	136	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, tet(M), No**</i>
Comunidad	2003	Sec. Vaginal	E1.1	225	Str, Gm, Km,Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, tet(M), No*</i>
Respiratorio	2004	Sec. Oído	E1.2	242	Str, Gm, Km, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIIa, ant(6) Ia, tet(M)</i>
Neurocirugía	2004	Catéter	E2	250	Sensible	ND
Comunidad	2003	Orina	F1	224	Tet	<i>tet(M)</i>
UCM	2003	Catéter	F2.1	228	Str, Gm	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, ant(6)Ia</i>
Cirugía	2004	Sec. Abdom.	F2.2	241	Tet	<i>tet(M)</i>
Comunidad	2001	Sec. Herida	G1	167	Gm, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, tet(M), No**</i>
Comunidad	2001	Sec. Vaginal	G2.1.1	163	Tet	<i>tet(M)</i>
UCIP	2001	Sec. TE	G2.1.2	164	Gm, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, tet(M)</i>

Continuación...

Servicio	Año	Muestra	Pulsotipo	Cepa	Fenotipo de resistencia	Genes de resistencia
Otorrino	2001	Sec. Oído	G2.2.1	155	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIa, erm(B), tet(M), No*</i>
UCIP	2001	Sec. TE	G2.2.2.1	142	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIa, ant(6) Ia, erm(B), tet(M)</i>
Otorrino	2001	Sec. Oído	G2.2.2.2	162	Gm, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, tet(M)</i>
UCIP	2001	LCR	H2.1	165	Gm, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, erm(B), tet(M)</i>
Cirugía	2001	Sec. Herida	H2.2	169	Tet	<i>tet(M)</i>
Miscelánea	2003	Sec. Herida	H1	215	Tet	<i>tet(M)</i>
Urología	2001	Orina	I1	172	Gm, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'') Ia, erm(B), tet(M)</i>
UCIP	2002	Sec. Herida	I2	174	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')Ia, aph(3')-IIa, ant(6) Ia, tet(M), No**</i>
Urología	2002	Orina	I2	182	Str, Gm, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'') Ia, erm(B), tet(M), No*</i>
Urología	2002	Orina	J1	173	Tet	<i>tet(M)</i>
Comunidad	2002	Sec. Vaginal	J2	177	Sensible	ND
Urología	2201	Orina	K1.1	143	Tet	<i>tet(M)</i>
Neonatología	2002	Sec. Herida	K1.2	168	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'') Ia, aph(3')-IIa, ant(6) Ia, tet(M), No**</i>
UCM	2001	Sangre	K2.1	147	Sensible	ND
Comunidad	2002	Sec. Vaginal	K2.2	171	Sensible	ND
UCIP	2002	Sangre	L1	161	Tet	<i>tet(M)</i>
Cirugía	2002	Sec. Herida	L2.1	184	Tet	<i>tet(M)</i>
Neonatología	2002	Sangre	L2.2	185	Sensible	ND
UCIP	200	Sec. TE	M1	151	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'') Ia, aph(3')-IIa, ant(6) Ia, tet(M), No**</i>
UCIP	2001	Frotis perianal	M2	156	Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'') Ia, aph(3')-IIa, erm(B), tet(M),</i>

Continuación...

Servicio	Año	Muestra	Pulsotipo	Cepa	Fenotipo de Resistencia	Genes de resistencia
Urología	2002	Orina	N1	158	Str, Gm, Km, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>tet(M)</i>
Neonatología	2001	Sangre	N2.1	152	E, Tet	<i>erm(B)</i> , <i>tet(M)</i>
Neonatología	2001	Sec. Herida	N2.2.1	153	Tet	<i>tet(M)</i>
Comunidad	2002	Sec. Oído	N2.2.2	175	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>tet(M)</i> , No**
Urología	2001	Orina	W1	159	Km, Tet	<i>aph(3')-IIIa</i> , <i>tet(M)</i>
Miscelánea	2001	Orina	W2	178	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>erm(B)</i> , <i>tet(M)</i>
Neonatología	2001	Catéter	O1	132	Str, Gm, Km, E, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>erm(B)</i> , <i>tet(M)</i> , No*
Neonatología	2004	Sangre	O2	249	Str, Gm, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>ant(6) Ia</i> , <i>tet(M)</i>
Neonatología	2001	Pus Abs.	P1	131	Sensible	ND
Comunidad	2004	Sec. Vagina.	P2	216	Tet, Str, Gm, Km, E,	<i>tet(M)</i> , <i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>erm(B)</i>
Gastroenterol.	2001	Frotis perianal	Q	138	Tet	<i>tet(M)</i>
UCIP	2001	Sec. Herida	R	145	Tet	<i>tet(M)</i>
Urología	2002	Orina	S	157	Str, Gm, Km, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>ant(6) Ia</i> , <i>tet(M)</i>
Neonatología	2003	Sangre	T	227	Tet	<i>tet(M)</i>
Cirugía	2004	L. periton.	U	243	Gm, Km, Tet	<i>aac(6')-aph(2'')</i> Ia, <i>aph(3')-IIIa</i> , <i>tet(M)</i>
Maxilofacial	2004	Canal Dental	V	245	Sensible	ND

Leyenda: Otorrino, otorrinolaringología; UCIP, unidad de cuidados intensivos pediátricos; UCM, unidad de cuidados medios; Gastroenterol, gastroenterología; L. periton, líquido peritoneal; Sec. Oído, secreción de oído; Sec. Abdom., secreción abdominal; LCR, líquido cefalorraquídeo; Pus Abs., pus de absceso; Sec. Herida, secreción de herida; Sec. Vaginal, secreción vaginal; TE, tubo endotraqueal; E, eritromicina; Tet, tetraciclina; Str, ANR-estreptomicina; Km, ANR-kanamicina; Gm, ANR-gentamicina; ND, genes de resistencia no determinados; No*, ausencia de genes de resistencia a estreptomicina; No**, ausencia de genes de resistencia a eritromicina.

En este segundo estudio, la multirresistencia antimicrobiana se observó en 27 aislamientos agrupados en 13 clones. De 28 aislamientos que portaban el gen de la enzima bifuncional, solo tres presentaron un único patrón de ECP (patrón Q, S, U). El resto de los aislamientos pertenecieron a 13 clones diseminados en la UCIP y los servicios de urología, cirugía y neonatología. Se observó diferencias en cuanto a la presencia del gen *aac(6')-aph(2'')Ia* en algunos aislamientos pertenecientes a un mismo clon (clon A, D, F, H, K, N y W), así como para la presencia de los genes *aph(3)-IIIa* y *ant(6)Ia* en los clones (clon A, D, K, I, G, N y O). Otros aislamientos agrupados en el clon C y los clones E, F, M y W, también mostraron diferencias en cuanto a la presencia de los genes *aph(3)-IIIa* y *ant(6)Ia*.

En aislamientos de al menos siete clones, se observaron variaciones en la presencia del gen *tet(M)*, por lo que la diseminación de este gen, probablemente sea debida a la propagación de los plásmidos o transposones, independientemente de la diseminación de los clones, como se describe previamente (Murray, 1991; Nichimoto *et al.*, 2005). Situación similar se detectó para el gen *erm(B)*, donde se observaron diferencias en la presencia de este gen en los aislamientos de un mismo clon.

Cuando se analizó de forma conjunta los resultados de la clonalidad obtenidos en ambos estudios, se observó una gran diversidad clonal en las cepas de *E. faecalis*, por lo que durante el período de estudio, no se detectó ningún clon dominante de esta especie en los hospitales estudiados. Otros estudios previamente publicados evidencian una situación similar (Hällgren *et al.*, 2003; D'azebedo *et al.*, 2008). Esta gran diversidad genética en *Enterococcus* aislados en Cuba y, especialmente, en la especie *E. faecalis*, pudo estar relacionada con su marcada plasticidad genética lo que facilita la supervivencia y persistencia de este patógeno en el ambiente hospitalario, lugar donde pueden afrontar continuos cambios adaptativos (Willems y Bonten, 2007). Esa diversidad obedece a procesos de recombinación genética que ocurren en este patógeno (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007). Otros autores como Peset en España (Peset *et al.*, 2000) y Hällgren en Suecia (Hällgren *et al.*, 2003) notifican una baja diversidad genética en los aislamientos

enterocócicos, pero en relación con situaciones de brotes epidémicos, escenario que aún no se ha detectado en los hospitales cubanos.

Los resultados de ambos estudios sugieren que un número determinado de clones de *Enterococcus* se diseminaron entre los pacientes de una misma sala, entre salas diferentes de un mismo hospital y entre hospitales, expandiéndose algunos de ellos entre el extremo occidental y oriental de Cuba. El 55,3% de los clones detectados en ambos estudios circularon entre diferentes UCIs. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la infección cruzada es más frecuente entre los pacientes ingresados en este tipo de sala, la que se revela como el principal origen de una diseminación clonal de *Enterococcus* en varios países (Kulski *et al.*, 1998, Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006b). La diseminación de las cepas entre los servicios y dentro de un mismo servicio pudo deberse a la transmisión de la bacteria a través de las manos del personal médico y paramédico, al contacto directo entre los pacientes, o a la adhesión o supervivencia de *Enterococcus* sobre las superficies inanimadas. Se publican varios trabajos que muestran la ocurrencia de brotes de *Enterococcus* por diseminación de clones inter o intrahospitalarios (Hällgren *et al.*, 2003; Titze de Almeida *et al.*, 2004; D'azebedo *et al.*, 2008).

Enterococcus con multirresistencia antimicrobiana pueden persistir años en la microbiota fecal de los portadores sanos y poseen un potencial alto para diseminarse en otros nichos, especialmente el ambiente hospitalario cuando este portador sano ingresa en el Hospital (Torell *et al.*, 2003). Esta propagación de *Enterococcus*, resistentes a los antimicrobianos en diferentes nichos, plantea un problema de contaminación ambiental, ya que a través de las aguas residuales de los hospitales estas cepas, que han evolucionado dentro del hospital y han acumulado resistencias y factores de virulencia, son vertidas al medio ambiente (Elsner *et al.*, 2000). Este hecho puede constituir una hipótesis para explicar la diseminación de clones (en particular, del clon O y P detectados en el segundo estudio) entre el hospital y la comunidad y su persistencia por largo tiempo.

Desde inicios de los años 90 se reportó la diseminación de clones multirresistentes de *Enterococcus* (Murray *et al.*, 1991). El análisis de la correlación entre los clones, los fenotipos y los genotipos de resistencia en ambos estudios, sugiere que los altos porcentajes de aislamientos con ANRGm estuvieron influenciados por la diseminación de clones resistentes a dicho antibiótico, así como por una transmisión horizontal de la resistencia a través de plásmidos o transposones, esta última vía se considera la causa más frecuente de diseminación de los genes de resistencia a los aminoglucósidos (Feizabadi *et al.*, 2008). La transmisión horizontal de la resistencia, también, fue la vía de adquisición del gen *vanB* en uno de los aislamientos resistente a la vancomicina, así como para varios aislamientos resistentes a la eritromicina que portaron el gen *erm(B)*. La diseminación del gen *erm(B)* se describe, por De Leener y colaboradores en el 2005, entre los aislamientos de origen animal y humano. Con respecto a la diseminación de la resistencia a la vancomicina, si bien, la transmisión horizontal de los genes *van* contribuye al incremento de la circulación de ERV, los estudios epidemiológicos demuestran que la diseminación clonal es la causa principal de su emergencia mundial (D'azebedo *et al.*, 2008; Chen y Zerbos, 2009).

La detección de diferentes clones circulantes en Cuba sugiere una transmisión cruzada que pudo mantener la persistencia de estos en diferentes servicios hospitalarios y constituir un riesgo para la ocurrencia de epidemias. En segundo lugar, los niveles de resistencia a los diferentes antimicrobianos en los aislamientos estudiados estuvieron influenciados por la diseminación de clones resistentes y la transferencia de elementos genéticos móviles. La selección hospitalaria de cepas multirresistentes a antibióticos parece ser el paso previo a una diseminación clonal que contribuye a elevar dicha tasa de resistencia y afecta a lugares geográficamente distantes sin que exista relación física aparente entre ellos. Por tanto, se hace necesario un estricto cumplimiento de las medidas de higiene y control de la infección en las instituciones hospitalarias, así como la continua vigilancia epidemiológica para detectar cambios en la susceptibilidad antimicrobiana que nos ayude a prevenir la selección o la posible dispersión de clones especialmente resistentes y virulentos.

IV.6 Estudio 3: Análisis de la estructura poblacional de aislamientos de *E. faecalis* y su relación filogenética con los aislamientos de otras regiones del mundo

En el año 2006 se propone el esquema de MLST para el estudio de la estructura poblacional de *E. faecalis* (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006a). Hasta junio del presente año, se registran, en la base de datos de MLST (<http://efaecalis.mlst.net>), 364 STs de *E. faecalis* procedentes de 20 países de diferentes continentes (América, Europa y Asia).

Es necesario conocer la epidemiología de la estructura poblacional de cada especie enterocócica, ya que para *E. faecium* se ha demostrado que la mayor parte de los brotes epidémicos hospitalarios son debidos a las cepas que se agrupan en el complejo clonal CC17 (Leavis *et al.*, 2006), mientras que en el caso de *E. faecalis*, CC2 y CC9 son los mayores responsables de las infecciones severas y epidémicas (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006a). Por tanto, se consideró oportuno, como parte de este trabajo, emprender, estudios de MLST en los aislamientos de *E. faecalis* circulantes en Cuba y así contribuir a la epidemiología global de esta especie.

En la tabla 4 se muestran los perfiles alélicos obtenidos para cada aislamiento, la secuencias tipo resultante, los complejos clonales detectados y los datos clínico-epidemiológicos de los mismos.

Se detectaron trece STs diferentes entre los 23 aislamientos caracterizados, cinco de ellas no habían sido descritas (ST115, ST116, ST117, ST118 y ST225). Las ST64-CC8 y ST16-CC58 agruparon a cuatro aislamientos cada una, mientras que la ST21-CC21 y ST6-CC2 agruparon a tres aislamientos, y otras nueve STs estuvieron representadas por un solo aislamiento.

Tabla 4. Datos clínico-epidemiológicos de los 23 aislamientos de *E. faecalis* tipados mediante MLST.

Cepa	Perfil alélico	ST	CC	Muestra	Año	Procedencia	Provincia
DQ195	12, 7, 3, 7, 6, 1, 5	6	2	Sec.TE	2003	Hospital	C. Habana
DQ203	12, 7, 3, 7, 6, 1, 5	6	2	Sangre	2003	Hospital	C. Habana
DQ210	12, 7, 3, 7, 6, 1, 5	6	2	Sec.HQ	2003	Hospital	S. de Cuba
DQ132	10, 1, 11, 6, 5, 1, 4	64	8	Catéter	2001	Hospital	Holguín
DQ152	10, 1, 11, 6, 5, 1, 4	64	8	Sangre	2001	Hospital	Holguín
DQ199	10, 1, 11, 6, 5, 1, 4	64	8	Sangre	2003	Hospital	C. Habana
DQ320	10, 1, 11, 6, 5, 1, 4	64	8	Sangre	2005	Hospital	C. Habana
DQ118	1, 7, 9, 1, 1, 1, 1	21	21	Sec.HQ	2002	Hospital	S. de Cuba
DQ120	1, 7, 9, 1, 1, 1, 1	21	21	Catéter	2002	Hospital	S. de Cuba
DQ295	1, 7, 9, 1, 1, 1, 1	21	21	Sec.HQ	2005	Hospital	Holguín
DQ256	5, 1, 1, 3, 7, 7, 6	16	58	Sec.Vag	2004	Comunidad	Guantánamo
DQ269	5, 1, 1, 3, 7, 7, 6	16	58	LCR	2004	Hospital	S. de Cuba
DQ297	5, 1, 1, 3, 7, 7, 6	16	58	LA	2005	Hospital	Holguín
DQ314	5, 1, 1, 3, 7, 7, 6	16	58	Sec.Vag	2005	Comunidad	Holguín
DQ138	14, 2, 18, 10, 16, 2, 12	59	N	FP	2001	Hospital	Holguín
DQ213	3, 6, 23, 12, 9, 10, 7	40	40	Sangre	2003	Hospital	C. Habana
DQ165	27, 2, 16, 28, 26, 2, 1	81	N	LCR	2002	Hospital	Holguín
DQ243	2, 3, 13, 11, 3, 2, 2	23	25	LP	2004	Hospital	Holguín
DQ190	1, 1, 11, 1, 21, 1, 2	115	N	LCR	2003	Hospital	C. de Ávila
DQ287	17, 2, 22, 1, 14, 14, 1	116	116	Catéter	2004	Hospital	C. Habana
DQ298	1, 1, 9, 6, 1, 1, 1	117	21	Sangre	2005	Hospital	C. Habana
DQ261	15, 2, 33, 16, 17, 15, 35	118	N	Sec.Vag	2004	Comunidad	Guantánamo
DQ317	39, 2, 49, 45, 47, 2, 48	225	N	Sec.HQ	2005	Hospital	C. Habana

Leyenda: Sec.TE: secreción de tubo endotraqueal; Sec.HQ: secreción de herida quirúrgica; Sec. Vag, secreción vaginal; LA: líquido amniótico; LCR: líquido cefalorraquídeo, FP: frotis perianal, LP: líquido peritoneal.

Los resultados de este estudio demostraron una amplia diseminación de STs de *E. faecalis* entre las regiones Occidental y Oriental de Cuba (ST6, CC2; ST16, CC58; ST21, CC21 y ST64, CC8). El uso de antimicrobianos pudo favorecer la selección de estas subpoblaciones enterocócicas con resistencia antimicrobiana y virulencia.

Mediante el programa informático *eBURST* (<http://www.mlst.net>), las STs detectadas se agruparon en siete complejos clonales, CC2 (ST6), CC8 (ST64), CC21 (ST21 y ST117), CC25 (ST23), CC40 (ST40), CC58 (ST16), CC116 (ST116) y en tres singletons (ST81, ST118, y ST225) (Figura 16).

Los estudios realizados en *E. faecium*, una especie estrechamente relacionada con *E. faecalis*, ponen de manifiesto que en la estructura poblacional existe un fenómeno descrito como especificidad de origen, es decir, aislamientos procedentes de determinados orígenes epidemiológicos se agrupan en líneas genéticas concretas (Freitas *et al.*, 2009a). Así, se detectan complejos clonales, presentes solamente en determinados hospedadores y, a su vez, todos los aislamientos de *E. faecium* causantes de epidemias o brotes nosocomiales se agrupan dentro del CC17, especialmente, circunscrito al ser humano. Este fenómeno no se repite en *E. faecalis*, de tal manera que aislamientos de diversos orígenes o diferentes huéspedes pueden agruparse en una misma ST y CC, como sucede con el CC58 detectado, también, en Cuba que está presente tanto en el medio hospitalario como en la comunidad. Esto coincide con varios informes como el de Kawalec y colaboradores en Polonia, Ruiz-Garbajosa y colaboradores en España y el de Freitas y colaboradores en Portugal (Kawalec *et al.*; 2007; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2009b).

En la figura 16 se puede observar la relación de SLV o DLV entre las STs cubanas y las reportadas en otros países. Dos STs, la ST115 y ST59 representaron un SLV de la ST191 y ST33, respectivamente; esta última reportada, previamente en España. La ST6 constituyó un DLV de la ST2 que pertenece al CC2 descrito, por primera vez, en España. La ST64 representó una SLV de la ST8, secuencia fundadora del CC8. La ST116, una nueva ST descubierta en Cuba, fue un SLV de la ST45 y ST39 que se describen en cepas de pacientes hospitalizados en España. La ST117 constituyó un DLV de la ST21 perteneciente al CC21 (uno de los CCs más importantes y frecuentes en España) que incluye aislamientos de origen animal, aislamientos de pacientes hospitalizados y voluntarios sanos de la comunidad (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006a).

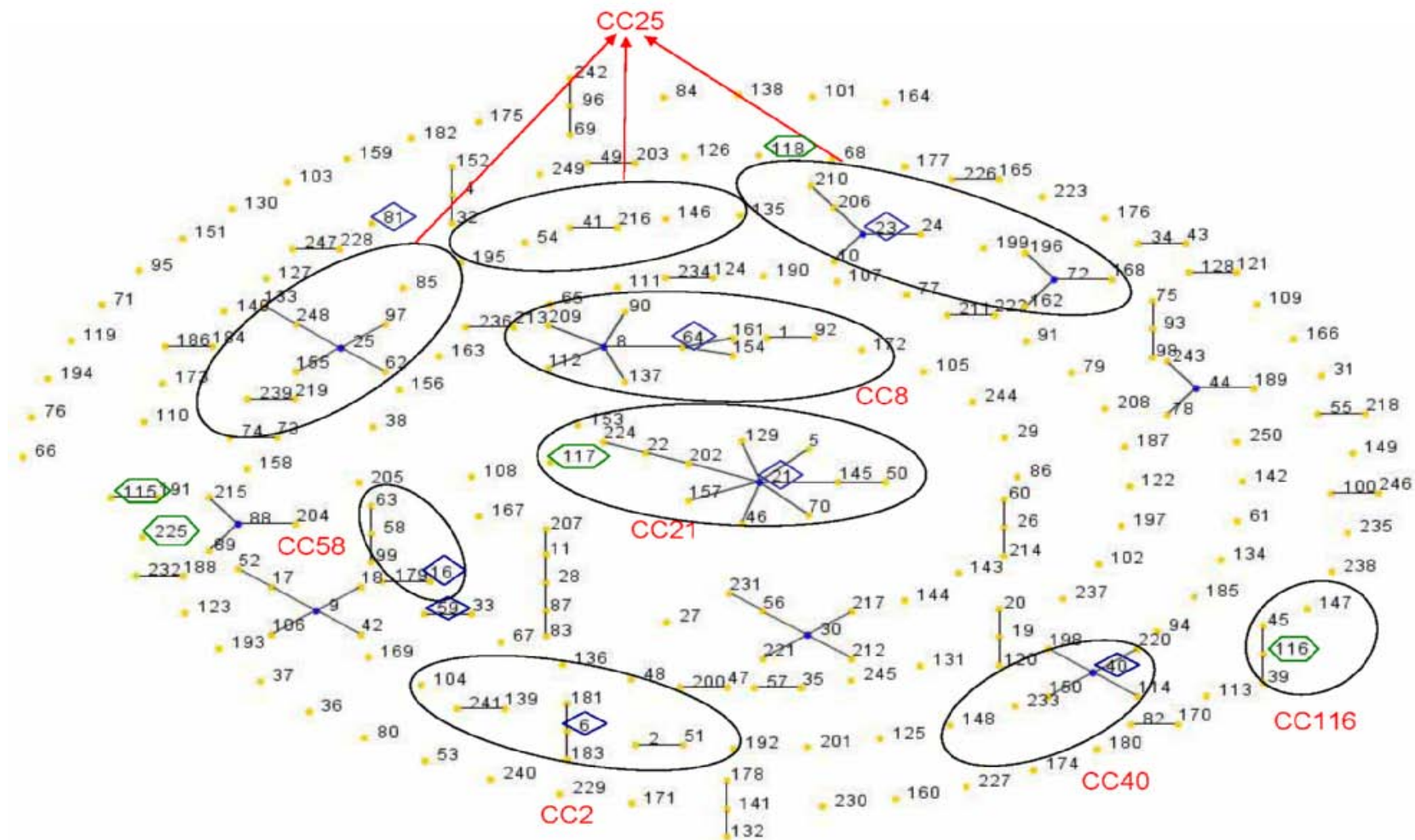


Figura 16. Distribución de los complejos clonales (CC) y las secuencias tipo (STs) en la especie *E. faecalis*. Número: representa la secuencia tipo; Óvalos: complejos clonales detectados en Cuba; Números en hexágonos: nuevas secuencias tipos mundiales identificadas en aislamientos cubanos; Números en rombo: otras secuencias tipo previamente descritas y, también, detectadas en Cuba.

Al analizar la susceptibilidad antimicrobiana de las STs detectadas en Cuba (Tabla 5) se observó ANRGM, con mayor frecuencia, en la ST6-CC2, ST16-CC58 y la ST64-CC8 (Riesgo relativo >1.5, $p \leq 0.05$) mientras que ningún aislamiento agrupado en la ST21-CC21 fue resistente a este aminoglucósido. Los genes de resistencia *aac(6')-aph(2'')Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)Ia*, *ant(3'')(9)*, se detectaron frecuentemente en los aislamientos agrupados en la ST6, ST16, ST64, ST23, ST115 y la ST118. La resistencia a las fluoroquinolonas se observó en la ST6-CC2, ST64-CC8 y la ST59. El 69% de las STs identificadas fueron multirresistentes, y dentro de estas resaltan la ST16 y ST64 que portaron gran variedad de genes de resistencia y de virulencia. Estas características pudieron contribuir a su persistencia y transmisión en el ambiente hospitalario, así como a la diseminación de la ST16 en el hospital y la comunidad.

La mayoría de los aislamientos de *E. faecalis* examinados portaron los genes *esp* (82,6%) y *ccf* (69,6%) mientras que los genes *gelE* (39%), *agg* (34,8%) y el gen *cylA* (34,8%), se detectaron con una frecuencia variable (Tabla 6). El gen *cylA* se relacionó significativamente con la ST64-CC8 y la ST16-CC58 que incluyeron el 35% de todos los aislamientos estudiados (Riesgo relativo >1,5, $p \leq 0.05$). Hace unos años se sugiere que el gen *esp* puede servir como un marcador para la presencia de islas de patogenicidad que albergan múltiples factores de virulencia en *E. faecalis* y *E. faecium* (Shankar *et al.*, 2002). Posteriormente, este mismo autor informa sobre una expansión clonal de *E. faecalis esp*-positivo en aislamientos de origen porcino en Dinamarca pertenecientes a la ST16 y la ST40 (Shankar *et al.*, 2006). Los resultados de la presente investigación coinciden con este hallazgo ya que los aislamientos correspondientes con la ST16 y la ST40 portaron este gen de virulencia. De manera general, los estudios que correlacionan determinantes de resistencia antibiótica y genes de virulencia dentro de los CCs de *E. faecalis* son escasos por lo que es imposible aseverar sobre su distribución mundial.

Tabla 5. Secuencias tipo (ST), genes de resistencia y susceptibilidad antimicrobiana en 23 aislamientos de *E. faecalis* tipados.

ST	Genes de resistencia a aminoglucósidos				Genes de resistencia a tetraciclina		Gen de resistencia a eritromicina	CIM (ug/mL)					
	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>ant(3'')-(9)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>erm(B)</i>	Gm	Km	Str	Tet	E	Cip
6	+	-	+	-	+	-	-	≥4096	2048	≥4096	32	2	16
6	+	-	+	-	+	-	+	≥4096	2048	2048	128	16	32
6	-	+	+	-	+	-	-	128	≥4096	2048	64	4	32
64	+	+	-	-	+	-	+	≥4096	≥4096	64	≥256	32	2
64	-	-	-	-	+	-	+	64	128	128	≥256	64	≤0.5
64	+	-	-	+	+	-	+	≥4096	≥4096	2048	≥256	128	≤0.5
64	-	-	+	-	+	-	+	32	64	≥4096	128	32	4
21	-	+	-	-	+	-	-	32	2048	64	64	2	1
21	-	+	-	-	+	-	-	32	≥4096	32	32	≤1	1
21	-	-	-	-	+	-	-	16	64	128	64	16	2
16	+	+	-	+	+	-	+	2048	≥4096	2048	128	16	≤0.5
16	+	+	+	-	+	-	-	≥4096	≥4096	≥4096	128	2	1
16	+	+	+	-	+	-	-	≥4096	≥4096	≥4096	64	8	≤0.5
16	+	+	-	-	+	-	-	≥4096	≥4096	512	32	8	1
59	+	-	-	-	-	+	-	2048	2048	2048	128	16	16
40	-	+	-	-	+	-	+	32	2048	≥4096	≥256	32	2
81	-	+	-	-	+	-	+	8	2048	128	64	64	2
23	+	+	+	+	+	-	-	2048	2048	2048	64	2	1

Continuación ...

ST	Genes de resistencia a aminoglucósidos				Genes de resistencia a tetraciclina		Gen de resistencia a eritromicina	CIM (ug/mL)					
	<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>ant(6)-Ia</i>	<i>ant(3'')-(9)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>erm(B)</i>	Gm	Km	Str	Tet	E	Cip
115	+	+	-	+	+	-	+	≥4096	4096	≥4096	128	64	1
116	-	-	-	-	-	-	+	16	64	64	≤2	32	1
117	-	-	-	-	-	-	-	32	64	32	≤2	≤1	2
118	-	+	+	-	-	+	+	128	2048	2048	32	128	1
225	-	-	-	-	-	+	+	32	16	128	16	128	≤0.5

Leyenda: CIM, concentración inhibitoria mínima; Gm, gentamicina; Km, kanamicina; Str, estreptomicina; Tet, tetraciclina; E, eritromicina; Cip, ciprofloxacina.

Tabla 6. Secuencias tipo y genes de virulencia en los 23 aislamientos de *E. faecalis* tipados.

Genes de virulencia	Cepas y Secuencias tipo																						
	DQ195	DQ203	DQ210	DQ132	DQ152	DQ199	DQ320	DQ118	DQ120	DQ295	DQ256	DQ269	DQ297	DQ314	DQ138	DQ213	DQ165	DQ243	DQ190	DQ287	DQ298	DQ261	DQ317
	6	6	6	64	64	64	64	21	21	21	16	16	16	16	59	40	81	23	115	116	117	118	225
<i>agg</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>gelE</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>cylA</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>esp</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>ccf</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Los aislamientos comunitarios incluidos en este estudio se obtuvieron de muestras vaginales, los que mostraron multirresistencia y portaron algunos genes de virulencia. Este hallazgo podría constituir un riesgo para la ocurrencia de infecciones endógenas en el paciente a partir del sitio primario de colonización, sobre todo, si el paciente sufre una instrumentación del tracto urinario, cateterización vesical, litiasis vesical (Felmingham *et al.*, 1992). Esto es una evidencia más de la diseminación de *Enterococcus* multirresistente y virulento en la comunidad en Cuba y refuerza la necesidad de desarrollar investigaciones sobre el impacto de la transmisión horizontal de genes de resistencia y virulencia en *Enterococcus*.

El dendograma que se muestra a continuación refleja la relación filogenética de las diferentes STs de *E. faecalis* en Cuba y STs representativas (ST8, ST9, ST25, ST28 y ST104) pertenecientes a CCs prevalentes en varias regiones del mundo (Figura 17). Se encontraron relaciones filogenéticas importantes entre los aislamientos cubanos y de otros países, principalmente, del continente europeo.

La ST16, ST6, ST21 y la ST40, detectadas en este trabajo, son un ejemplo de diseminación de líneas genéticas de *E. faecalis* ya que se encuentran en numerosas partes del mundo como España, Polonia, Holanda, Hungría, Dinamarca y EE.UU. (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Kawalec *et al.*, 2007). Los aislamientos que se agrupan en la ST16 se aíslan de pacientes hospitalizados y no hospitalizados, así como de animales, mientras que cepas pertenecientes a la ST40 se identifican en pacientes hospitalizados, en manipuladores de alimentos en España y en los animales en Holanda (Shankar *et al.*, 2006). El CC40 (ST40) se describe inicialmente en Europa, con un probable origen en Polonia o países vecinos, según la hipótesis de Kawalec y colaboradores (2007). Las ST23, ST59 y la ST81 también se notifican en Polonia, España y Holanda (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006a; Kawalec *et al.*, 2007).

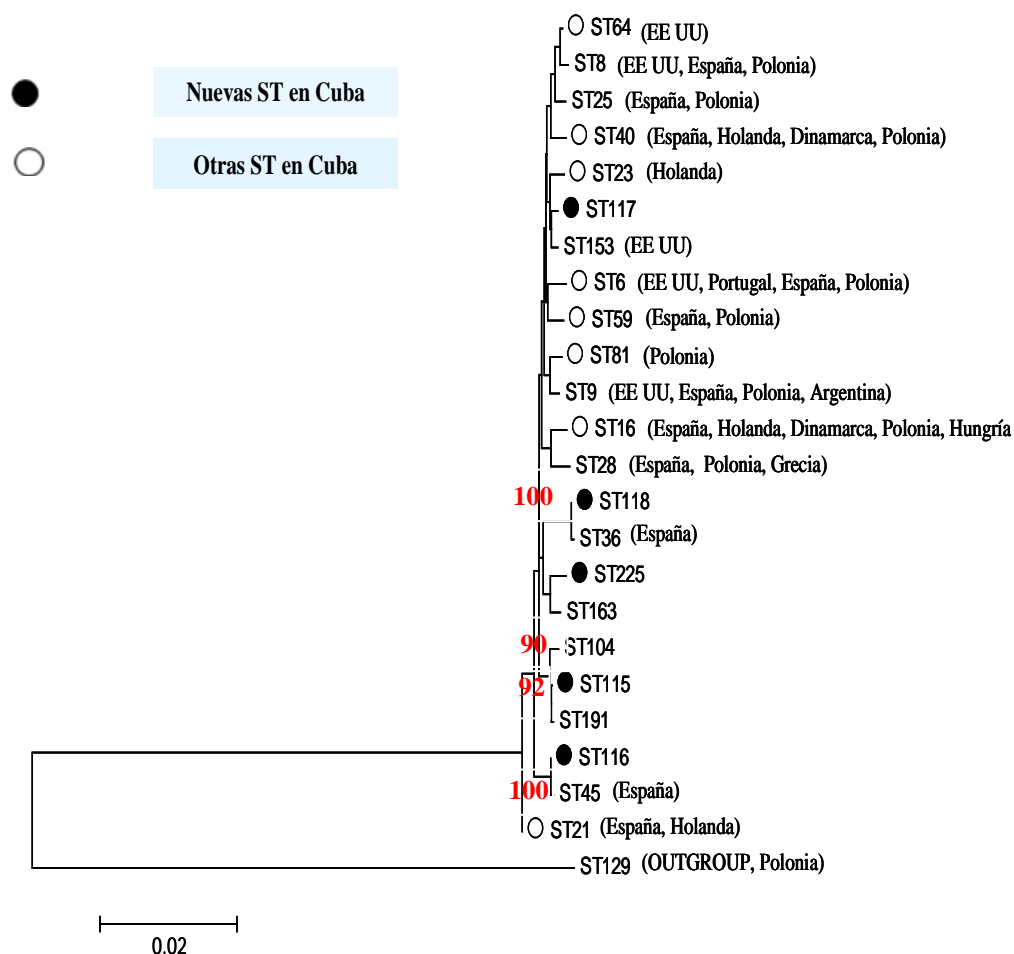


Figura 17. Relación filogenética de secuencias tipo de *E. faecalis* aisladas en Cuba y secuencias tipo representativas en el mundo.

Ruiz-Garbajosa y colaboradores describen cuatro CCs mayoritarios entre los aislamientos de *E. faecalis* de origen clínico en España: CC9, CC2, CC21 y CC10. Los dos primeros se definen como complejos clonales de alto riesgo por su especial adaptación al ambiente hospitalario que incluyen aislamientos resistentes a la vancomicina (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006a). Un año después, Kawalec y colaboradores informan la circulación del CC2 en Polonia donde un tercio de sus aislamientos fueron resistentes a la vancomicina (Kawalec *et al.*, 2007). En la presente investigación se detectó la circulación del CC2 en Cuba pero ningún aislamiento incluido en este complejo resultó resistente a la vancomicina. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que los clones se extienden originalmente como clones vancomicina susceptibles y más tarde adquieren el gen mediante la transmisión horizontal, como se

demuestra previamente en España, Portugal, Polonia (Novais *et al.*, 2004; Kawalec *et al.*, 2007) y como se detectó en la presente investigación (Acápite IV.5).

Del total de STs de *E. faecalis*, detectadas en Cuba, la mayoría se notifican en el continente europeo (61 %, en Polonia, 46% en Holanda, 38% en España y Francia, 31% en Dinamarca, 15% en Portugal, 8% en Grecia y Hungría) lo que evidencia una relación filogenética muy estrecha entre las STs cubanas y europeas.

Si se tiene en cuenta que *Enterococcus* habita en el tracto gastrointestinal humano y que es un patógeno con gran capacidad para adaptarse a diferentes ecosistemas, se puede teorizar sobre la influencia de la migración europea a América en la relación filogenética detectada entre las STs cubanas y europeas desde que se conoce que América fue colonizada por los europeos y por sus microorganismos también (Cunha, 2008). No obstante, otros factores a considerar son: el intercambio y comercio entre Cuba y Europa, factores tecnológicos e industriales y la adaptación microbiana (Valdés, 1998). Un estudio de diversidad genética de *E. faecalis* revela la circulación de STs de esta especie desde el año 1900 y su dispersión en diferentes regiones del mundo lo que evidencia la diseminación de este patógeno desde épocas remotas (McBride *et al.*, 2007).

Cinco STs (ST115, ST116, ST117, ST118 y ST225) constituyeron nuevas STs a nivel mundial donde la alta diversidad de sus perfiles alélicos (Tabla 10) sugirió que no estaban relacionadas genéticamente entre ellas. La falta de información sobre la estructura poblacional de *E. faecalis* a nivel mundial, y en particular en los países de Centroamérica y el Caribe, hizo difícil plantear de que se traten de aislamientos cubanos autóctonos y, aún más arriesgado, teorizar sobre la diseminación regional de estas nuevas STs detectadas en Cuba.

Los hallazgos de este estudio, constituyen las primeras evidencias sobre el posible origen y evolución genética de *E. faecalis* aislado en Cuba y brinda los primeros datos sobre su estructura poblacional lo que permitió compararla con reportes mundiales y conocer la circulación, en el país, de CCs dispersos de manera global.

Se precisa de la incorporación de un mayor número de países que estudien la estructura poblacional de *E. faecalis* para enriquecer la base de datos internacional de MLST en esta especie y poder establecer comparaciones con un mayor número de STs de alcance global. En la medida en que se incremente el número de aislamientos caracterizados a nivel internacional, así como la disponibilidad de datos con relación a los aislamientos cubanos procedentes de otras regiones del país, será posible aplicar métodos de construcción filogenética más complejos, que permitan no solo hablar de una relación filogenética estrecha sino de un posible origen de estos con mayor certeza y soporte estadístico.

El presente trabajo es el primero donde se caracterizan aislamientos de *Enterococcus* de diferentes áreas geográficas de Cuba. A pesar de que los aislamientos analizados son procedentes de 26 hospitales de nueve provincias del país y quizás no son representativos de la situación real de este, es meritorio señalar que nunca antes se había realizado un estudio similar en Cuba. De cualquier manera, en las provincias no incluidas en el estudio, la situación podría ser más grave aún. Por tanto, este trabajo constituye un acercamiento a la problemática de la infección por *Enterococcus* en Cuba que motiva a la realización de estudios futuros que caractericen un mayor número de aislamientos de este agente biológico reconocido como patógeno humano desde hace solo dos décadas.

A manera de resumen se puede decir que los aislamientos de *Enterococcus* circulantes en diversas áreas geográficas de Cuba fueron genéticamente diversos aunque circularon clones multirresistentes y patógenos. A pesar de que la resistencia a los glicopéptidos y a la ampicilina fue baja, la resistencia a los aminoglucósidos, la ciprofloxacina, la norfloxacina, la tetraciclina y la eritromicina estuvo diseminada entre los aislamientos que persistieron en los hospitales y se diseminaron entre los pacientes de un mismo hospital o diferentes hospitales y entre estas instituciones y la comunidad. La multirresistencia a los diversos antimicrobianos, y la virulencia en los aislamientos cubanos, son factores a tener en cuenta en la repercusión clínica de esta bacteria, la que no era reconocida antiguamente como un verdadero patógeno y en la actualidad es uno de los principales microorganismos asociados a infecciones nosocomiales a nivel mundial. Los hallazgos del presente trabajo son relevantes en una era en que la resistencia antimicrobiana en el género *Enterococcus* se incrementa cada día cuando la

disponibilidad de antibióticos desciende cada vez más mientras aparecen nuevos mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.

V. CONCLUSIONES

1. *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* constituyeron las especies de mayor impacto clínico en la casuística cubana, detectándose, además, la circulación de otras especies minoritarias, lo que refuerza la importancia de *Enterococcus* como patógeno en Cuba.
2. La resistencia antimicrobiana detectada en aislamientos cubanos es equivalente a la situación internacional y alerta sobre posibles fracasos terapéuticos ante el uso de los aminoglucósidos. Los bajos porcentajes de resistencia para la ampicilina y los glicopéptidos los ratifica como antibióticos de elección en la infección enterocócica. No obstante, la resistencia adquirida a los glicopéptidos mediada por los genes *vanA* y *vanB* demandan una vigilancia continua y estricta del *Enterococcus* resistente a la vancomicina en el país.
3. Se evidenció que las alteraciones en la *PBP5* son la causa de la resistencia a la ampicilina. La protección ribosomal que impide la unión efectiva del antimicrobiano constituyó el mecanismo de resistencia principal para la tetraciclina y la eritromicina, mientras que la modificación de los aminoglucósidos, por acción enzimática, fue la causa de la resistencia para estos.
4. *Enterococcus faecalis* fue la especie más virulenta y se demostró la circulación de cepas patógenas tanto en hospitales como en la comunidad, lo que revela la importancia clínica de este género en ambientes extrahospitalarios.
5. *Enterococcus*, circulante en Cuba, mostró elevada diversidad genética, aunque circularon clones multirresistentes que contribuyeron a la diseminación de la resistencia antibiótica unido a la transmisión horizontal de genes de resistencia.

6. La elevada relación filogenética entre linajes cubanos de *E. faecalis* y los circulantes en Europa sugirió un posible ancestro común, mientras que se hizo difícil teorizar sobre el origen y la diseminación de las cinco nuevas secuencias tipo ante el escaso conocimiento de la estructura poblacional de esta especie a nivel mundial.

VI. RECOMENDACIONES

- ✓ Dar continuidad a la vigilancia microbiológica de *Enterococcus* causante de infecciones en Cuba y emprender la búsqueda activa de ERV en los hospitales y la comunidad.
- ✓ Investigar sobre la asociación de factores de virulencia e infección enterocócica severa para esclarecer el rol de estos en la patogénesis de dicha infección y extender los estudios de virulencia a aislamientos de origen ambiental.
- ✓ Continuar los estudios de epidemiología molecular para monitorear la evolución de los clones circulantes y detectar nuevos clones emergentes multirresistentes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup FM, Agerse A, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;37:127–37.
- Abriouel H, Omar NB, Molinos AC, López RL, Grande MJ, Martínez-Viedma P, *et al*. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int J Food Microbiol*. 2003;88:269-90.
- Acosta-Gnass SI. *Enterococcus* [citado el 11 de noviembre de 2009]. Disponible en: <http://www.codeinep.com.ar/control/Enterococcus.pdf>.
- Agers I, Lester C, Porsbo N, Iben O, Emborg H, Olsen K, *et al*. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. *J Antimicrob Chemother*. 2008;26:1-2.
- Andrade SS, Sader HS, Jones RN, Pereira AS, Pignatari AC, Gales AC. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101:741-8.
- Arias C, Reyes J, Zuñiga M, Cortés L, Cruz C, Rico C, *et al*. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in Enterococci and Staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *J Antimicrob Chemother*. 2002;51:59-68.

- Arias C, Contreras G, Murray B. Management of Multi-Drug Resistant Enterococcal Infections. Clin Microbiol Infect. [Internet] 2010 [citado el 22 de Marzo de 2010]; 23. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1198-743X.2010.03214.x/abstract>.
- Atkinson B, Abu-Al-Jaibat A, LeBlanc D. Antibiotic resistance among enterococci isolated from clinical specimens between 1953 and 1954. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41:1598-600.
- Baldassarri L, Creti R, Arciola C, Montanaro L, Orefici L, Arciola CR. Pathogenesis of implant infections by enterococci. Int J Artif Organs. 2005;28:1101-9.
- Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G. Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. Int J Artif Organs. 2006;29:402-6.
- Baquero F. Bases teóricas de la determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos. En: Casal M, editor. Métodos de estudio de la actividad de los antimicrobianos. Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba; 1995.p. 11-24.
- Baquero F, Coque T, Cantón R. Antibiotics, complexity and evolution. AMS news. 2003;69:547-52.
- Bates J, Jorderns J, Griffiths D. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. J Antimicrob Chemother. 1995;34:507-16.
- Beachey EH, Dale JB, Simpson WA, Evans JD, Knox KW, Ofek I, et al. Erythrocyte binding properties of streptococcal lipoteichoic acids. Infect Immun. 1979;23:618-25.
- Bittencourt E, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina Brazil. J Med Microbiol. 2004;53:1069-73.

- Bolyard EA, Tablan OC, Williams WW, Pearson ML, Shapiro CN, Deitchman SD et al.. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1995;16:105-13.
- Bonora MG, Ligozzi M, Luzzani A, Solbiati M, Stepan E, Fontana R. Emergence of linezolid resistance in *Enterococcus faecium* not dependent on linezolid treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006; 25:197-8.
- Bonora MG, Oliosio D, Lo Cascio G, Fontana R. Phylogenetic analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* genotypes associated with outbreaks or sporadic infections in Italy. *Microb Drug Resist.* 2007;13:171-7.
- Bryan CS, Reynolds KL, Brown JJ. Mortality associated with enterococcal bacteremia. *Surg Gynecol Obstet.* 1985;160:557-61.
- Calderón E, Arredondo JL, Aguilar F, García P. In vitro antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *Enterococcus* species. *Salud Pública Mex.* 2003;45:96-101.
- Campanile F, Borbone S, Santagatio M, Carretto E, Bongiorno D, Barbarini D, et al. Looking for a human or animal origin of vancomycin-resistant enterococci. En: Kobayashi N, Pandalai SG, editores. *Drug resistance of Enterococci: epidemiology and molecular mechanism.* Trivandrum: Research Signpost; 2006. p. 47-60.
- Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control.* 2008;19:886-92.
- Cars O, Högberg LD, Murray M, Nordberg O, Sivaraman S, Lundborg CS, et al. Meeting the challenge of antibiotic resistance. *Br Med J.* 2008;337:1438.
- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:686-707.

- Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin P. Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene tet(S) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38:2330–5.
- Chen A, Zerbos M. *Enterococcus*: antimicrobial resistance in enterococci, epidemiology, treatment, and control. En: Mayera DL. editor. *Antimicrobial Drug Resistance*. New York: Humana Press; 2009. p. 715-33.
- Chenoweth C, Schaberg D. The epidemiology of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;9:80-9.
- Chiang PC, Wu TL, Su JY, Huang YC, Chiu YP, Chia JH, et al. Unusual increase of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* but not *Enterococcus faecalis* at a university hospital in Taiwan. *Chang Gung Med J*. 2007;30:493-503.
- Choi SH, Lee SO, Kim TH, Chung JW, Choo EJ, Kwak YG, et al. Clinical features and outcomes of bacteremia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: analysis of 56 cases. *Clin Infect Dis*. 2004;38:53-61.
- Christiansen KJ, Turnidge JD, Bell JM, George NM, Pearson JC; Australian Group on Antimicrobial Resistance. Prevalence of antimicrobial resistance in *Enterococcus* isolates in Australia, 2005: report from the Australian Group on Antimicrobial Resistance. *Commun Dis Intell*. 2007;31:392-7.
- Clark NM, Hershberger E, Zervosc MJ, Lynch JP. Antimicrobial resistance among gram-positive organisms in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care*. 2003;9:403-12.
- Clermont D, Chesneau O, Céspedes G, Horaud T. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of tet(T) isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:112-6.
- Clewell D. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell*. 1993;73:9-12.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI document M100-S17. Table 2D *Enterococcus* spp. M2-A9- Disk Diffusion. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI document M100-S17. Table 2D *Enterococcus* spp. M7-A7- MIC Testing. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
- Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Prevalence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis.* 1995;171:1223–9.
- Coque TM, Seetulsingh P, Singh KV, Murray BE. Application of molecular techniques to the study of nosocomial infections caused by enterococci. En: Woodford N, Johnson A, editores. *Methods in Molecular Medicine.* Totowa, N.J: Humana Press; 1998.p. 469-93.
- Creti R, Montanaro L, Orefici G, Arciola C. Patogénesis of implant infection by enterococci. *Int J Artif Organs.* 2005;28:1101-9.
- Cunha S. The history of the dissemination of microorganisms. *Estud Av [Internet].* 2008 [citado el 29 de Julio de 2010];22(64):doi: 10.1590/S0103-40142008000300011. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-0142008000300011&script=sci_arttext&tlng=en
- D’azevedo P, Furtado G, Medeiros E, Santiago K, Silbert S, Pignatari A. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2008;50:195-8.

- De Leener E, Martel A, De Graef EM, Top J, Butaye P, Haesebrouk F, et al. Molecular analysis of human, porcine, and poultry *Enterococcus faecium* isolates and their *erm(B)* genes. *Appl Environm Microbiol.* 2005;7:2766-7.
- Del Campo R, Tenorio C, Rubio C, Castillo J, Torres C, Gómez-Lus R. Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant *Enterococcus* spp. in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;15:221-6.
- Del Campo R, Tenorio C, Zarazaga M. Detection of a single *vanA*-containing *E. faecalis* clone in hospitals of different regions in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:746-7.
- Del Campo R, Ruiz-Garbajosa P, Sánchez Moreno P, Baquero F, Torres C, Cantón R, et al. Antimicrobial resistance in recent fecal enterococci from healthy volunteers and food handlers in Spain: genes and phenotypes. *Microb Drug Resist.* 2003;9:47-59.
- Del Campo R, Galán JC, Tenorio C, Ruiz-Garbajosa P, Zarazaga M, Torres C, et al. New *aac(6')-I* genes in *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans*: effect on beta-lactam/aminoglycoside synergy. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:1053-5.
- Di Rosa R, Creti R, Venditti M, Amelio R, Arciola C, Montanaro L. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinasa in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;256:145-50.
- Domínguez MA, Coll P, Coque T, Domínguez M, Vázquez J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en microbiología clínica.* España: SEIM; 2005. p. 31-9.
- Donabedian SM, Thal LA, Hershberger E et al. Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1109-13.

- Drobni M, Bonnedahl J, Hernandez J, Haemig P, Olsen B. Vancomycin-resistant enterococci, Point Barrow, Alaska, USA. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:838-9.
- Duck WM, Steward CD, Banerjee SN, McGowan JE, Tenover FC. Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3035-42.
- Dunny GM. Peptide pheromone-induced transfer of plasmid pCF10 in *Enterococcus faecalis*: probing the genetic and molecular basis for specificity of the pheromone response. *Peptides.* 2001;22:1529-39.
- Eaton TJ, Gasson M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:1628-35.
- Ehrenfeld EE, Kessler RE, Clewell DB. Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J Bacteriol.* 1986;168:6-12.
- Eliopoulos G. Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion reviews of anti-infective agents. *Clin Infect Dis.* 2003;36:473-81.
- Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth RA. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *Eur J Clin Microb Infect Dis.* 2000;19:39-42.
- Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from hospital in Teheran. *Polish J of Microbiol.* 2008;57:173-8.
- Ersoy Y, Durmaz R, Firat M, Cizmeci Z, Otlu B. Genotyping and evaluation of antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* species from Turkey. *J Infect.* 2007;1:151-7.

- Espino M, Couto MJ, Rojas N, Fiol N, Torriente M. Análisis de episodios de sepsis en una unidad de cuidados intensivos neonatal. *Rev Panam Infectol.* 2005;7:22-8.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Annual report 2005: On-going surveillance of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. The Netherlands: EARSS; 2005.
- Facklam RR, Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microb.* 1989;27:731-4.
- Facklam RR, Carvalho M, Teixeira L. History, taxonomy, Biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococi. En: Gilmore M, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, editores. *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, DC: ASM Press; 2002. p. 1-39.
- Fariñas M, Torres C. Enterococo ¿Un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25:500-2.
- Feizabadi M, Aliahmadi A, Mobasheri F, Asgharzadeh A, Asadi S, Etemadi G. Phenotypic characteristics and population genetics of *Enterococcus faecalis* cultured from patients in Tehran during 2000-2001. *Can J Microbiol.* 2003;49:645-9.
- Feizabadi M, Maleknejad P, Asgharzadeh A, Asadi S, Shokrzadeh L, Sayadi S. Prevalence of aminoglycoside-modifying enzymes genes among isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Iran. *Microb Drug Resist.* 2006;12:265-8.
- Feizabadi M, Shokrzadeh L, Sayady S, Asadi S. Transposon Tn5281 is the main distributor of the aminoglycoside modifying enzyme gene among isolates of *Enterococcus faecalis* in Tehran hospitals. *Can J Microbiol.* 2008;54:887-90.
- Felmingham D, Wilson AP, Quintana A, Grüneberg R. *Enterococcus* species in urinary tract infection. *Clinical Infect Dis.* 1992;15:295-301.

- Fica A, Jemenao MI, Bilbao P, Ruiz G, Sakurada A, Pérez de Arce E, et al. Emergency of vancomycin-resistant *Enterococcus* infections in a teaching hospital in Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2007;24:462-71.
- Filipová M, Bujdánková H. Factors of virulence and mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* with high-level gentamicin resistance. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2005;54:65-74.
- Finlay B, Falkow S. Common themes in bacterial pathogenesis revisited. *Microbiol Mol Rev.* 1997;61:136–69.
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009;155:1749-57.
- Franz C, Silbrthorn A, Yousif N, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel W. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Env Microbiol.* 2001;67:4385-9.
- Franz C, Stiles M, Schleiferc K, Holzapfel W. Enterococci in foods a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol.* 2003;88:105-122.
- Freitas A, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Coque T, Peixe L. Dispersion of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates Belonging to Major Clonal Complexes in Different Portuguese Settings. *Applied Environment Microbiol.* 2009a;75:4904–8
- Freitas A, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Coque T, Peixe L. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2009b;63:1104-11.
- Galloway-Peña J, Nallapareddy S, Arias C, Eliopoulos G, Murray B. Analysis of Clonality and Antibiotic Resistance among Early Clinical Isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis.* 2009;200:1566–73.

- García J. El resurgimiento de los grampositivos: razones, significado clínico y posibilidades de control. *Rev Clin Esp.* 1997;2:3-11.
- Gilmore M, Coburn PH, Nallapareddy R, Murray B. Enterococcal virulence. En: Gilmore MS, editores. *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance.* Washington, DC.: AMP Press; 2002. p. 301-37.
- González L, Morffi J, Nadal L, Vallin C, Contreras R, Roura G. Frecuencia de aislamiento de *Staphylococcus spp* meticilina resistentes y *Enterococcus spp* vancomicina resistentes en hospitales de Cuba. *Rev Cubana Farm.* 2005;39:173-8.
- Groth D, Wetherrall J Molecular tools in epidemiological investigations. En: Thompson RC, editor. *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases.* New York: Oxford University Press: 2000.p. 5-19.
- Guzmán CA, Pruzzo C, Lipira G, Calegari L. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect Immun.* 1989;57:1834-8.
- Guzmán CA, Pruzzo M, Plate M, Guardati M, Calegari L. Serum-dependent expression of *Enterococcus faecalis* adhesins involved in the colonization of heart cells. *Microb Pathol.* 1991;11:399-409.
- Hällgren A, Saeedi B, Nilsson M. Genetic relatedness among *Enterococcus faecalis* with transposon-mediated high-level gentamicin resistance in Swedish intensive care units. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:162-67.
- Hidalgo M, Reyes J, Cárdenas AM, Díaz L, Rincón S, Vanegas N, et al. Perfiles de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos clínicos de cocos Gram-positivos provenientes de hospitales colombianos, 1994-2004. *Biomédica.* 2008;28:284-94.
- Hindler J. β -lactamase test. En: Isenberg HD, editor. *Clinical microbiology procedures handbook.* Washington, DC.: American Society for Microbiology; 2005. p. 531-7.

- Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2002;40:1963-71.
- Huycke M, Spiegel C, Gilmore M. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35:1626-34.
- Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. Appl Environ Microbiol. 2004;70:1555–62.
- Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infect Dis. 2005;41 Suppl1:S120-6.
- Jett B, Huycke M, Gilmore M. Virulence of enterococci. Clin Microbiol Rev. 1994;7:462-78.
- Johnson AP, Tysall L, Stockdale MV, Woodford N, Kaufmann ME, Warner M, et al. Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from two Austrian patients in the same intensive care unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21:751–4.
- Johnson AP, Henwood C, Mushtaq S, James D, Warner M, Livermore DM. Susceptibility of Gram-positive bacteria from ICU patients in UK hospitals to antimicrobial agents. J Hosp Infect. 2003; 54:179-87.
- Jones RN. Resistance patterns among nosocomial Pathogens: trends over the past few years. Chest. 2001;119 Suppl2:397S-404.
- Kak V, Chow J. Acquired antibiotic resistances in enterococci. En: Gilmore M, Clewell D, Courvalin P, Dunny G, Murray B, Rice L, editores. The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington DC.: ASM Press; 2002. p. 355-72.

- Kapoor L, Randhawa V, Deb M. Antimicrobial resistance of Enterococcal blood isolates at a pediatric care hospital in India. *Jpn J Infect Dis.* 2005;58:101-3.
- Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Volturo GA. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004;10:3-7.
- Kawalec M, Pietras Z, Danilowicz E, Jakubczak A, Gniadkowski M, Hryniewicz W, et al. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: the characterization of epidemic clones. *J Clin Microbiol.* 2007;1:147-53.
- Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15:308-20.
- Khan Van der Wal M, Farrell DJ, Cossins L, Van Belkum A, Alaidan A, et al. Analysis of VanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Arabian hospitals reveals the presence of clonal cluster 17 and two new Tn1546 lineage types. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:279-83.
- Kilic A, Bedir O, Tunç T, Beşirbellioğlu B, Eyigün CP, Başustaoğlu AC. An outbreak of vanA genotype *Enterococcus faecium* in pediatric clinic of a training hospital. *Mikrobiyol Bul.* 2009;43:365-72.
- Kobayashi N, Mahbub M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiol Infect.* 2001;126:197-204
- Kobayashi N, Alam M. Prevalence and genetic diversity of aminoglycoside modifying enzymes in enterococci. En: Kobayashi N, Pandalai SG, editores. Drug resistance of enterococci: epidemiology and molecular mechanism. Trivandrum: Research Signpost; 2006. p. 209-27.

- Koiten V, Murray BE. The nosocomial transmission of enterococci. *Curr Opin Infect Dis.* 1993;6:498-505.
- Kulski J, Wilson R, Grubb W. Antibiotic resistance and genomic analysis of enterococci in an intensive care unit and general wards. *Pathology.* 1998;30:68-72.
- Kurup A, Tee WS, Loo LH, Lin R. Infection of central nervous system by motile *Enterococcus*: first case report. *J Clin Microbiol.* 2001;39:820-2.
- Lara MC, Cires M, García AJ. Consumo de antimicrobianos en APS. *Rev Cubana Med Gen Integr.* 2003;19:1-2.
- Leavis H, Willems R, Top J, Bonten M. High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1059-64.
- Lester C, Sandvang D, Olsen S, Schønheyder H, Jarløv J, Bangsbo J, Hansen D, et al. Emergence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in Danish hospitals. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1203-6.
- Lopardo H, Casimir L, Hernández C, Ruboglio EA. Isolation of three strains of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990;9:402-5.
- Lopes Mde F, Simões AP, Tenreiro R, Marques JJ, Crespo MT. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *Int J Food Microbiol.* 2006;112:208-14.
- Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of Enterococci: Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001;32:133-45.

- Luna V, Heiken M, Judge K, Ulep C, Van Kirk N, Luis H, et al. Distribution of *mefA* in Gram-positive bacteria from healthy Portuguese children. *Antimicrob Agent Chemother.* 2002;46:2513-7.
- Maietti L, Bonvini B, Huys G, Giraffa G. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. *Syst Appl Microbiol.* 2007;30:509-17.
- Malani PN, Kauffman C, Zervos MJ. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. En: Gilmore M, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, editores. *The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.* Washington, DC.: ASM Press; 2002. p. 385-401.
- Mannu L, Paba E, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupre I. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *E. faecium* strains of dairy animal and clinical origin. *Inter J Food Microbiol.* 2003;88:291-304.
- Marothi YA, Agnihotri H, Dubey D. Enterococcal resistance: an overview. *Indian J Med Microbiol.* 2005;23:214-9.
- Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2009;11:24-32.
- Martínez-Odrizola P, Muñoz-Sánchez J, Gutiérrez-Macías A, Arriola-Martínez P, Montero-Aparicio E, Ezpeleta-Baquedano C, et al. Análisis de 182 episodios de bacteriemia por enterococo: estudio de la epidemiología, microbiología y evolución clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;2:503-7.
- Mave V, Garcia J, Islam T, Hasbun R. Vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: is daptomycin as effective as linezolid? *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:175-80.

- McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering RC Jr, Gilmore MS, et al (2007) Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. PLoS ONE 2(7): e582. doi:10.1371/journal.pone.0000582.
- McCormick J, Hirt H, Waters Ch, Tripp T, Dunny G, Schlievert P. Aggregation Substance Are Not Protective in the Rabbit Model of *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis. Infect Immun. 2001;69:3305-14.
- Ministerio de Salud Pública. Programa nacional de prevención y control de las infecciones intrahospitalarias. Cuba: MINSAP; 1998.
- Mondino S, Castro AC, Mondino PJ, Carvalho G, Silva M, Teixeira LM. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals. Microb Drug Resist. 2003;9:167-74.
- Murchan S, Cunney R. The rise in antimicrobial resistance in invasive isolates of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* in Ireland and comparisons with Europe. EPI-Insight. 2006;7:1-4.
- Murdoch DR, Stanley M, Lizzie J, Janet S, Monahan AL, Barth R. Sequential emergence of antibiotic resistance in enterococcal bloodstream isolates over 25 years. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46:3676–8.
- Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev. 1990;3:46–65.
- Murray B, Sigh K, Markowitz S, Lopardo H, Patterson J, Zervos M, et al. Evidence for clonal spread of a single strain of betalactamase-producing *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* to six hospitals in five states. J Infect Dis. 1991;163:780-85.
- Mutnick AH, Enne V, Jones RN. Linezolid resistance since: SENTRY antimicrobial surveillance program. Ann Pharmacother. 2003;37:769-74.

- Nallapareddy S, Singh K, Murray B. Contribution of the Collagen Adhesin Acm to Pathogenesis of *Enterococcus faecium* in Experimental Endocarditis. *Infect Immun.* 2008;76:4120–8.
- Nishimoto Y, Kobayashi N, Alam M, Ishino M, Uehara N, Watanabe N. Analysis of the prevalence of tetracycline resistance genes in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese hospital. *Microb Drug Resist.* 2005;11:146-53.
- Nodarse R. Susceptibilidad *in vitro* a vancomicina de cepas de enterococos aisladas. *Rev Cubana Med Mil.* [Internet] 2005. [citado el 13 de febrero de 2010];34. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-572005000400012&lng=en&nrm=iso
- Novais C, Coque TM, Sousa JC, Baquero F, Peixe L. Local genetic patterns within a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clone isolated in three hospitals in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48:3613–7.
- Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugatives transfer of the virulence gene, esp, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:232-5.
- Olivares J. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos. *MCM Pediatría* 1999;2:71-80.
- Ono S, Muratani T, Matsumoto T. Mechanisms of Resistance to Imipenem and Ampicillin in *Enterococcus faecalis* *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2954–8.
- Panesso D, Reyes J, Rincón S, Díaz L, Galloway-Peña J, Zurita J, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1562-9.

- Park SY, Shin YP, Kim CH, Park HJ, Seong YS, Kim BS, Seo SJ, Lee IH. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *J Immunol.* 2008;181:6328-36.
- Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:13–21.
- Patterson JE, Zervos M. High-level gentamicina resistance in *Enterococcus*: microbiology, genetic basis and epidemiology. *Rev Infect Dis.* 1990;2:644-52.
- Peset V, Tallon P, Sola C. Epidemiological, microbiological, clinical, and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:742–9.
- Petterson A, Dalsgard A. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environ Microbiol.* 2003;5:395–402.
- Piekarska KM, Lawrynowicz M, Magdziak A, Bareja E, Rudecka A, Wyrebiak A, et al. Drug sensitivity of *Enterococcus* spp. strains isolated from clinical material or from healthy persons. *Med Dosw Mikrobiol.* 2002;54:305-15.
- Poeta P, Costa D, Igrejas G, Rodríguez J, Torres C. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol.* 2007;125:368-74.
- Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:967-71.
- Quiñones D, Tamargo I. *Enterococcus*: una emergencia en la actualidad. *Bol Epidemiol IPK.* 1999;9:171-2.

- Rafii F. Betalactam resistance in enterococci. En: Kobayashi N, Pandalai SG, editores. Drug resistance of Enterococci: epidemiology and molecular mechanism. Trivandrum: Research Signpost; 2006. p. 101-15.
- Rahangdale VA, Agrawal G, Jalgaonkar SV. Study of antimicrobial resistance in enterococci. Indian J Med Microbiol. 2008;26:285-7
- Reyes J, Hidalgo M, Diaz L, Rincon S, Moreno J, Vanegas N, et al. Characterization of macrolide resistance in gram-positive cocci from Colombian hospitals: a country wide surveillance. Inter J Infect Dis. 2007;11:329-36.
- Rice L, Carias L, Rudin S, Vael C, Goznes H, Konstabel C, et al. A potencial virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. J Infect Dis. 2003;187:508-12.
- Roberts M. Tetracycline therapy: update. Clin Infect Dis. 2003;36:462–7.
- Roberts M. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Lett. 2005;245:195-203.
- Ronconi MC, Merino LA, Fernández G. Detección de *Enterococcus* resistentes a altos niveles de aminoglucósidos y resistentes a glucopéptidos en lactuca sativa (lechuga). Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002;20:380-3.
- Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres CT, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. J Clin Microbiol. 2006a;44:2220-8.
- Ruiz-Garbajosa P, Cantón R, Pintado V, Coque TM, Willems R, Baquero F. Genetic and phenotypic differences among *Enterococcus faecalis* clones from intestinal colonisation and invasive disease. Clin Microbiol Infect. 2006b;12:1193–8.

- Ruiz-Garbajosa P, Coque TM, Cantón R, Willems R, Baquero F, del Campo R. Los complejos clonales de alto riesgo CC2 y CC9 están ampliamente representados en cepas hospitalarias de *Enterococcus faecalis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25:513-8.
- Sader HS, Jones RN, Silva J. The SENTRY Participants Group (Latin American). Skin and soft tissue infections in Latin American medical centers: four-year assessment of the pathogen frequency and antimicrobial susceptibility patterns. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;44:281-8.
- Sahm D, Torres C. High-content aminoglycoside disks for determining aminoglycoside-penicillin synergy against *Enterococcus faecalis*, Dic. 2006 [Internet]. [citado el 4 de enero de 2010]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?artid=266262>
- Salah R, Dar-Odeh N, Abu DO, Shehabi A. Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental Diseases. *BMC Oral Health*. 2008;8:17-24.
- Saravolatz LD, Leggett J. Gatifloxacin, gemifloxacin, and moxifloxacin: the role of 3 newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1210-5.
- Schaberg DR, Dillon WI, Terpenning MS, Robinson KA, Bradley SF, Kauffman CA. Increasing resistance of enterococci to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:2533-5
- Schaik W, Top J, Riley D, Boekhorst J, Vrijenhoek J, Schapendonk C, et al. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics* 2010, 11:239. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/239>
- Schmitz FJ, Higgins PG, Mayer S, Fluit AC, Dalhoff A. Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002;21:647-59.

- Schnell N, Entian K, Schneider U, Gotz F, Zahner H, Kellner R, et al. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature*. 1988; 333:276-9.
- Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*. 2005;59:79-87.
- Sepúlveda M, Bello H, Domínguez M, Mella S, Zemelman R, González G. Identificación molecular de enzimas modificantes de aminoglucósidos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas en hospitales de la Octava Región de Chile. *Rev Méd Chile*. 2007;135:566-72.
- Seral C, Castillo F, García C, Rubio MC, Gómez-Lus R. Presencia del transposon conjugativo Tn1545 en cepas de *Streptococcus pneumoniae* con los genes *mef(A)*, *erm(B)*, *tet(M)*, *cat_{pc194}* y *aph3'-III*. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2000;18:506-11.
- Shankar V, Baghdayan A, Huycke M, Lindahl G, Gilmore M. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*. 1999;67:193–200.
- Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature*. 2002;417:746-50.
- Shankar N, Baghdayan S, Willems R, Hammerum AM, Jensen L. Presence of pathogenicity island genes in *Enterococcus faecalis* isolates from pigs in Denmark. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4200–3.
- Shaw K, Rather P, Hare R, Miller G. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*. 1993;57:138-63

- Silva J, Asserella L, Bolados N, Herrera H, Leyton L. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas en hospitales del norte de Chile. Rev Chil Infect. 2006;23:226-31.
- Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. PLoS Pathog. 2010;6(1):e1000716. doi:10.1371/journal.ppat.1000716.
- Sood S, Malthotra M, Das B, Kapil A. Enterococcal infection and antimicrobial resistance. Indian J Med Res. 2008;128:111-21.
- Sørum M, Johnsen PJ, Aasnes B, Rosvoll T, Kruse H, Sundsfjord A, et al. Prevalence, persistence, and molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci in Norwegian poultry and poultry farmers 3 to 8 years after the ban on avoparcin. Appl Environ Microbiol. 2006;72:516-21.
- Sun J, Song X, Kristiansen B, Kjæreng A, Willems R, Eriksen H, et al. Occurrence, Population Structure, and Antimicrobial Resistance of Enterococci in Marginal and Apical Periodontitis. J Clin Microbiol. 2009; 47: 2218–25.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:2562-6.
- Swenson JM, Ferraro MJ, Sham DF. Multilaboratory evaluation of screening methods for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. J Clin Microbiol. 1995;33:3008–18.
- Tambić T, Tambić A, Kalenić S, Gilić V, Krakar B, Payerl-Pal M, et al. Monitoring bacterial resistance to antibiotics in the Croatian Republic. Lijec Vjesn. 2000;122:160-4.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA4) software versión 4.0. Mol Biol Evol. 2007;24:1596-9.

- Taneja N, Khuddaier B, Biswal M. Drug resistance in enterococci. En: Kobayashi N, Pandalai SG, editores. Drug resistance of Enterococci: epidemiology and molecular mechanism. Trivandrum: Research Signpost; 2006a. p. 61-78.
- Taneja N, Khuddaier B, Biswal M. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. En: Kobayashi N, Pandalai SG, editores. Drug resistance of Enterococci: epidemiology and molecular mechanism. Trivandrum: Research Signpost; 2006b. p. 79-99.
- Tankovic J, Mahjoubi F, Courvalin P, Duval J, Leclercq R. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis* and role of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene. Antimicrob Agents Chemother. 1996;30:2558–61.
- Tannock G, Cook G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. En: Gilmore M, Clewell D, Courvalin P, Dunny G, Murray B, Rice L, editores. The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington, DC.: ASM Press; 2002. p. 101-24.
- Tendolkar P, Baghdayan A, Gilmore M, Shankar N. Enterococcal surface protein, esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 2004;72:6032-9.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33:2233–9.
- Theilacker C, Krueger WA, Kropec A, Huebner J. Rationale for the development of immunotherapy regimens against enterococcal infections. Vaccine 2004;6Suppl 1:S31-8.
- Thurlow L, Chittezhram V, Fleming S, Hancock L. *Enterococcus faecalis* Capsular Polysaccharide Serotypes C and D and Their Contributions to Host Innate Immune Evasion. Infect Immun. 2009;77:5551–7.

- Titze de Almeida R, Rollo M, Nogueira C, Rodriguez I, Filho E, Nascimento R. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from Brazilian intensive care units. *Braz J Infect Dis.* 2004;8:197-205.
- Toledo C, Perez ME, Rocchi M, Gribaudo G, Mangiaterra S, Monterisi A. Isolation of enterococci species causative of infections and sensitivity to antimicrobial drugs. *Rev Argent Microbiol.* 2004;36:31-5.
- Top J, Willems R, Van der Velden S, Asbroek M, Bonten M. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2008;46:214–9.
- Torell E, Kühn I, Olsson-Liljequist B. Clonality among ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in Sweden and relationship with ciprofloxacin resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9:1011-9.
- Torres C, Regeira M, San Martin M. Van A-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from sewage. *J Antimicrob Chemother.* 1994;33:553-61.
- Udo E, Al N, Phillips O, Chugh T. Species prevalence and antibacterial resistance of enterococci isolated in Kuwait hospitals. *J Med Microbiol.* 2003;52:163-8.
- Udo EE, Al-Sweih N, John P, Jacob LE, Mohanakrishnan S. Characterization of high-level aminoglycoside-resistant enterococci in Kuwait hospitals. *Microb Drug Resist.* 2004;10:139-45.
- Vakulenko SB, Donabedian SM, Voskresenskiy AM. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:1423–6
- Valdés L. Enfermedades emergentes y reemergentes. Ciudad de La Habana: MINSAP; 1998.

- Van de Klundert JAM, Vliegenthart JS. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editores. Diagnostic molecular microbiology principles and applications. Washington, DC: Press; 1993. p. 547–55.
- Vázquez J, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:113-20.
- Velásquez J, Lizaraso F, Nicola Z, Pamno O, Sánchez L. Vigilancia de la resistencia de *Enterococcus* spp. a la vigilancia y evaluación in vitro de nuevas alternativas terapéuticas. *Rev Per Soc Med Intern*. [Internet]. 2002. [citado el 22 de diciembre de 2009];15(2). Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/spmi/v15n2/biblio_vigil_resis.htm.
- Vergis EN, Shankar N, Chow JW, Hyden MK, Snyderman DR, Zervos MJ. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis*. 2002;35:570-5.
- Werner G, Bartel M, Wellinghausen N, Essig A, Klare I, Witte W, et al. Detection of resistance mutations to linezolid in *Enterococcus* spp. by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Clin Microbiol*. 2007;45:3421-3.
- Werner G, Gfroer S, Fleige C, Witte W, Klare I. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from German intensive care unit patient. *J Antimicrob Chemother*. 2008;10:1182-3.
- Willems R, Bonten M. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20:384-90.
- Yasliani S, Mobarez A, Doust H, Satari M, Teymorneyad O. Linezolid vancomycin resistant *Enterococcus* isolates from clinical samples in Theran hospitals. *Indian J Med Sci*. 2009;63:297-302.

- Yildirim M, Sencan I, Ozdemir D, Oksüz S, Yilmaz Z, Sahin I. Vancomycin and high-level aminoglycoside resistant *Enterococcus* carriage and the risk factors related to resistance in hospitalized patients. *Mikrobiyol Bul.* 2007;41:271-7.
- Zervos MJ, Mikesell T, Schaberg D. Heterogeneity of plasmids determining high-level resistance to gentamicina in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;30:78-81.
- Zervos MJ, Chow JW, Chen A, Muder RR. *Enterococcus* species. Dic. 2009 [Internet] [citado el 30 de Julio de 2010]. Disponible en: <http://www.antimicrobe.org.desoto.hfhs.org:2048/b03rev.asp>
- Zhanel GG, Laing NM, Nichol KA, Palatnick LP, Noreddin A, Hisanaga T, et al. Antibiotic activity against urinary tract infection (UTI) isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE): results from the 2002 North American Vancomycin Resistant Enterococci Susceptibility Study (NAVRESS). *J Antimicrob Chemother.* 2003;52:382-8.
- Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, Weshnoweski B, Vashisht R, Tailor F, et al. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) Study, 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1430-7.
- Zilhao R, Papadopoulou B, Courvalin P. Occurrence of the Campylobacter resistance gene tetO in *Enterococcus* and *Streptococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32:1793-6.
- Zouain MG, Araj GF. Antimicrobial resistance of enterococci in Lebanon. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17:209-13.
- Zurita J, Ayabaca J, Pavón L, Espinosa Y, Narváez I. Se detectan *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina en dos hospitales de Quito. *Rev Ecuatoriana Med Crít.* 2003;2:1-7.

Anexo I. Distribución de aislamientos estudiados por tipo de hospital y provincias, período 2000-2005.

Provincias	Tipo de Hospital - (Codificación)	Aislamientos
C. Habana	Pediátrico (I)	54
	Pediátrico (II)	34
	Pediátrico (III)	15
	Clínico Quirúrgico (I)	31
	Clínico Quirúrgico (II)	10
	Clínico Quirúrgico (III)	17
	Materno Infantil (I)	12
	Materno Infantil (II)	2
	Materno Infantil (III)	1
	Materno Infantil (IV)	1
Total		177
Cienfuegos	Pediátrico (IV)	7
	General (I)	1
Total		8
Sancti Spíritus	Clínico Quirúrgico (IV)	4
Total		4
Ciego de Ávila	General (II)	5
	General (III)	4
Total		9
Camagüey	Pediátrico (V)	3
Total		3
Holguín	Pediátrico (VI)	156
	General (IV)	12
Total		168
Las Tunas	General (V)	1
Total		1
Santiago de Cuba	Pediátrico (VII)	40
	Pediátrico (VIII)	22
	Clínico Quirúrgico (V)	15
	General (VI)	11
Total		88
Guantánamo	General (VII)	12
	General (VIII)	13
	Pediátrico(IX)	18
Total		43
Total de cepas estudiadas		501

Anexo II. Encuesta. Sistema de Registro y Vigilancia Nacional de *Enterococcus*, IPK.

Número de entrada: _____ Fecha: _____

No. HC: _____ Edad: _____

Nombre y Apellidos: _____

Tipo de Hospital: _____

Servicio de ingreso: _____

Días de estadía hospitalaria: _____

Tipo de muestra: _____

Diagnóstico clínico del paciente: _____

Resultados microbiológicos:

Identificación de especie: _____

Susceptibilidad antimicrobiana: _____

Otros datos de interés:

Anexo III. Distribución de los 501 aislamientos estudiados según la procedencia de la muestra.

Procedencia clínica	No. de aislamientos	Porcentaje
Sangre	95	18,90
Heces	73	14,60
Orina	67	13,00
Herida quirúrgica	40	7,98
Vagina	33	6,58
Oído	23	4,59
Punta de Catéter	18	3,79
Vulva	19	3,79
Piel	15	2,99
Faringeo	15	2,99
Uretra	13	2,59
LCR	11	2,19
Nasal	11	2,19
Espuito	11	2,19
Líquido peritoneal	10	1,99
Secreción endotraqueal	9	1,79
Loquios	9	1,79
Otros	29	5,78
Total	501	100,00

Leyenda. Otros, secreción de gastrostomía (5), tejidos (4), sonda de levín (4), drenaje hepático (4), prepucio (4), fístula perianal (3), líquido amniótico (3), canal radicular dental (2).

Fuente: LNRM/IPK

Anexo IV. Reacciones bioquímicas presentes en las galerías Rapid ID 32 STREP para la identificación de especies del género *Enterococcus*.

	Componentes Activos	Reacc/ Enzimas
1	L- arginina	Arginina dihidrolasa
2	Resorufina- β - D glucopiranosida	β GLU cosidasa
3	Resorufina- β - D-galactopiranosida	β GAL actosidasa
4	Resorufina- β - D-glucaronida	β GlucURonidasa
5	4- nitrofenil- α D-galactopiranosida	α GAL actosidasa
6	4- nitrofenil- β D-galactopiranosida-2-CHA	Fosfatasa alcalina
7	D-ribosa	Ribosa (acidificación)
8	D- manitol	Manitol (acidificación)
9	D- sorbitol	Sorbitol (acidificación)
10	D- lactosa (oriGm bovino)	Lactosa (acidificación)
11	D- trealosa	Trealosa (acidificación)
12	D-rafinosa	Rafinosa (acidificación)
13	D- sacarosa	Sacarosa (acidificación)
14	L- arabinosa	L-arabinosa(acidificación)
15	D- arabitol	D- arabitol(acidificación)
16	Piruvato sódico	Producción de acetona
17	L- alanil-L-fenilalanil-L-prolina- β naftilamida	Alafenil-fenil-prolina-arilamidasa
18	2- naftil- β D- galactopiranosida	β GALactosidasa
19	α ciclo dextrina	Ciclo dextrina (acidificación)
20	Ácido piroglutámico β - naftilamida	Ácido piroglutámico arilamidasa
21	6- bromo-2-naftil-N- acetil- β D- glucosaminida	N- acetil- β - glucosaminidasa
22	L-glicil- L- triptófano- β - naftilamida	Glicil-L-triptófano-rilamidasa
23	Hipurato sódico	Hidrólisis de hipurato
24	GlicóGmo	GlicóGmo (acidificación)
25	Pululano	Pululano (acidificación)
26	D- maltosa	Maltosa (acidificación)
27	D- melodiosa	Melobiosa (acidificación)
28	D- melecitosa	Melezitosa (acidificación)
29	metil- β -D-glucopiranosida	metil- β -D-glucopiranosida (acidificación)
30	D- tagatosa	Tagatosa (acidificación)
31	4- nitrofenil- β D- monopiranosida	B Manosidasa
32	Urea	Ureasa

Anexo V. Antibióticos estudiados, solventes y diluentes (CLSI, 2007).

Antibiótico	Solvente	Diluyente
Gentamicina	Agua destilada	Agua destilada
Kanamicina	Agua destilada	Agua destilada
Estreptomicina	Agua destilada	Agua destilada
Ampicilina	Solución fosfato (pH8), 0,1 mol/L	Solución fosfato (pH6), 0,1 mol/L
Vancomicina	Agua destilada	Agua destilada
Teicoplanina	Agua destilada	Agua destilada
Ciprofloxacina	Agua destilada	Agua destilada
Levofloxacina	Agua y NaOH 0,1mol/L	Agua destilada
Moxifloxacina	Agua destilada	Agua destilada
Nitrofurantoína	Solución fosfato pH8, 0,1 mol/L	Solución fosfato (pH8), 0,1 mol/L
Tetraciclina	Agua destilada	Agua destilada
Eritromicina	Etanol 95%	Agua destilada

Anexo VI. Control de calidad realizado durante las prueba de susceptibilidad antimicrobiana (CLSI, 2007)

I. Empleo de las cepas de referencia para el control de la susceptibilidad antimicrobiana

II. Control de calidad de los reactivos usados

III. Control de calidad de la preparación del inóculo para realizar las pruebas

IV. Frecuencia de ensayos con cepas patrones

V. Control de la interpretación de los resultados

I. Cepas de referencia para el control de la susceptibilidad antimicrobiana

1. Conservación a (-80 °C) en Caldo Triptona de Soja con glicerol al 15%
2. Cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: se usó para el método de difusión en agar o Kirby-Bauer
3. Cepa de referencia de *E. faecalis* ATCC 29212: se usó para el método de dilución en agar
4. Cultivo
 - a) Las cepas se cultivaron en Agar sangre de carnero al 5%, incubación 24 horas a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂
 - b) Se inocularon cinco colonias en caldo Mueller Hinton
 - c) Se subcultivaron en Agar sangre de carnero al 5% para obtener colonias aisladas
 - d) Se les aplicó el método de susceptibilidad respectivo para cada una según las normas utilizando los mismos materiales y métodos que se utilizarían para las cepas clínicas
 - e) Se conservaron entre 4-8 °C no más de tres semanas para los controles diarios de calidad
 - f) El análisis de los halos de inhibición para ambas cepas de referencia se hizo acorde a los límites aceptables del control de calidad para ambos métodos (CLSI, 2007).

II. Control de calidad de los reactivos usados

1. Medios de cultivos
2. Discos de antibióticos
3. Droga en polvo

Se tuvo en cuenta en todos ellos la fecha de caducidad y se rotuló la fecha de apertura de los frascos

1. Medios de cultivos

- a) Preparación del medio agar Mueller-Hinton de acuerdo a las recomendaciones del fabricante
- b) Se midió el pH para cada lote de medio de agar Mueller-Hinton. El agar debe tener un pH 7, 2 - 7, 4
- c) Se añadió el medio en las placas de Petri hasta un nivel aproximado de 4 mm
- d) Se realizó el control de esterilidad de cada lote de agar Mueller Hinton incubando una placa representativa durante 24 horas a 37 °C
- e) Las placas con Mueller Hinton de más de siete días de preparación no se usaron para las pruebas de difusión en agar y las placas de agar Mueller Hinton con antibiótico para el método de dilución en agar se usaron dentro de los 5 días de preparadas

2. Discos de antibióticos

- a) Almacenamiento en refrigeración a 8 °C de los discos de uso rutinario y en freezer a -20 °C el resto de los discos. Los discos de beta-lactámicos se mantuvieron siempre en freezer para mantener su potencia
- b) Los discos se sacaron del refrigerador o freezer 2 horas antes de su uso a fin de lograr un equilibrio en la temperatura antes de ser abiertos los frascos y evitar la condensación

3. Droga en polvo

- a) Para pesar la droga se usó una balanza analítica calibrada, con precisión
- b) Se tuvo en cuenta la potencia del antibiótico para preparar las soluciones madres, las que se distribuyeron en volúmenes pequeños en viales que se conservaron a -70°C
- c) El resto de volumen de las soluciones descongeladas y usadas se desechó

III. Control de calidad de la preparación del inóculo para realizar las pruebas

- a) El inóculo se preparó según la turbidez estándar 0,5 de la escala de McFarland comprobando la densidad correcta con ayuda de un Espectrofotómetro cuando las condiciones lo permitieron y en algunas ocasiones se realizó una comparación visual con el estándar
- b) El patrón estándar 0,5 de la escala de McFarland se conservó a temperatura ambiente protegida de la luz por no más de un mes

IV. Frecuencia de ensayos con cepas patrones

- a) Para las pruebas de difusión en agar o Kirby-Bauer, los ensayos con cepas patrones se realizaron diariamente por 10 días, después se continuó una vez por semana mientras duró la aplicación del método de difusión en agar
- b) Para el método de dilución en agar, los ensayos con cepas patrones se realizaron una vez por semana

V. Control de la interpretación de los resultados

- a) Los resultados finales en ambos métodos se analizaron por más de un investigador (equipo de trabajo)

VI. Otros aspectos relacionados con el Método de Dilución en Agar

- A) Para seleccionar los rangos de CIM a evaluar para cada antibiótico se tuvo en cuenta:**

- Los puntos de corte que se establecen en las norma para evaluar si *Enterococcus* es sensible, presenta susceptibilidad intermedia o es resistente
- Concentración inhibitoria mínima esperable para la cepa patrón de referencia que se utilizaría como control de calidad de la prueba (*E. faecalis* ATCC 29212)

B) Otros controles

- Control de la viabilidad de la cepa: se comprobó inoculando la cepa a estudiar en el medio base sin antibiótico
- Control de pureza: se inoculó una segunda placa control de viabilidad al finalizar la prueba para confirmar que no hubo contaminación durante la realización de la misma

Anexo VII. Secuencia nucleotídica de los cebadores usados para la detección de genes de resistencia a los antimicrobianos, tamaño de su producto y referencia bibliográfica.

Gen	Cebadores (5' 3')	Producto (pb)	Referencias
<i>vanA</i>	AT GGC AAGT CAGGT GAAGAT GG TCCACCTCGCC AACAAC TAACG	399	Clark <i>et al.</i> , 2003
<i>vanB</i>	GT GAC AAACCGGAGGC GAGGA CCGCCATCCTCC TGC AAAAAA	433	Clark <i>et al.</i> , 2003
<i>aac(6)Ie-aph(2')Ia</i>	CAAGAGCAAT AAGGGCATA C CAATAGT TTC AATAGGATAA	675	Van de Klundert <i>et al.</i> , 1993
<i>aph(3)-IIIa</i>	GCCGAT GT GGATT GC GAAAA GCT TGATCCCC AGTAAGT CA	354	Van de Klundert <i>et al.</i> , 1993
<i>ant(6)-Ia</i>	ACT GGC TT AATCAAT TT GGG GCCT TT CCGCCACC TCACC G	548	Swenson <i>et al.</i> , 1995
<i>ant(9)-Ia</i>	TGAT TT GCT GGTT ACGGT GAC CGCT AT GT TCT CTT GCT TT TG	284	Clark <i>et al.</i> , 1999
<i>aph(2'')-id</i>	GACC AGGT AGAAAAGGC AAT AGAGCAG AT ACCAATCC AT AT AACC AT AT TCCTT	642	Vakulenko <i>et al.</i> , 2008
<i>aph(2'')-ic</i>	TGACT CAGTTC CC AGAT AGC ACT GT TCGC ACCAAA	837	Vakulenko <i>et al.</i> , 2008
<i>erm(B)</i>	GAAAAGR TACTCAACCAAAAT A AGTAACGGT ACTT AAAT TGT TT AC	425	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
<i>erm(A)</i>	TCT AAAAAGCAT GT AAAAGAA CTT CGATAGT TT ATT AATAT TAGT	506	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
<i>erm(C)</i>	TCAAAACATAAT AT AGAT AAA GCT AATATT GT TT AAATC GT CAAT	330	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
<i>mef(A)</i>	AGTATCATT AATCAC TAGTGC TTCTTC TGGT ACT AAAAGTGG	346	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996
<i>tet(M)</i>	GAC AAAGGTACAACGAGGACGGA TCCCT CTATT ACCGTATCCCAT	435	Nishimoto <i>et al.</i> , 2005
<i>tet(L)</i>	CCACCT GCGAGTAC AA ACT GG TCGGCAGT ACT TAGCT GGT GA	740	Nishimoto <i>et al.</i> , 2005
<i>tet(K)</i>	CGATAGGAAC AGC AGT AT ATGG TT AGCCC ACCAGAAAACAAACC	615	Nishimoto <i>et al.</i> , 2005
<i>tet(O)</i>	GGTGC AATT GCAGAACCAGG CCAGTTC TGACATT TT AAAACGG	520	Nishimoto <i>et al.</i> , 2005
<i>tet(S)</i>	GACTGTGAATCT AAATT TGA AACC GSACAATT TCGTGAGTT ACT GT	740	Nishimoto <i>et al.</i> , 2005
<i>tet(t)</i>	TAGCAC AT GTTGAT GCAGGT TATCATCCCTTAC AT TT GTC	498	Nishimoto <i>et al.</i> , 2005
<i>tet(U)</i>	CAAAAGAAAT CGAT ACGTGG CGT CTGCAGATTCCTTAAAAGTC	294	Nishimoto <i>et al.</i> , 2005

Anexo VIII. Mezcla y condiciones de la reacción de la PCR para la detección de genes de resistencia a los antimicrobianos (Nishimoto *et al*, 2005).

Mezcla de la reacción

H ₂ O	74,5 µL
Cebador (67ρM/µL)	3 µL
Cebador (67ρM/µL)	3 µL
Buffer Taq pol.	10 µL
Taq pol.5U/µL	0,5 µL
DNTPs	8 µL
ADN	1 µL
Volumen final	100 µL

Programa de la PCR

Se usó el Termociclador (Eppendorf, modelo Mastercycler personal, Alemania), con las siguientes condiciones

94 °C	1 minuto - desnaturalización	} 30 ciclos
55 °C	1 minuto- hibridación	
72 °C	2 minutos- extensión	

Posteriormente se aplicó

94 °C	1 minuto - desnaturalización	} 1 ciclo
55 °C	1 minuto- hibridación	
72 °C	5 minutos- extensión	

Anexo IX. Extracción enzimática de ADN mediante acromopeptidasa (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, EE.UU.).

Reactivos

1- TNE (Tris-HCl pH 7,5, 10 mmol/L, NaCl, 0.1 mol/L EDTA 1mmol/L).

2- Solución de Acromopeptidasa (10000 U/mL).

Se disolvió 100 mg del producto en 10mL de agua destilada estéril en un tubo de centrifuga. Después de mezclar a temperatura ambiente, se centrifugó a baja velocidad.

El sobrenadante se transfirió a un vial y se conservó a -20 °C.

3- Tris-HCL 1mol/L (pH6.7)

Procedimiento

1- Se tomaron de 4 a 5 colonias de una placa de agar sangre y se resuspendieron en 100µL de buffer TNE en un vial.

2- Se centrifugó el vial (10000 rpm, 1 minuto) y se eliminó el sobrenadante.

3- Se resuspendió el precipitado en 10µL de la solución de Acromopeptidasa, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente.

4- Se adicionaron 50µl de Tris-HCL 1mol/L (pH6,7) a la muestra y se centrifugó (10000 rpm,1 minuto).

5- El sobrenadante se usó como una muestra de ADN extraído de la bacteria. Se uso 1µL de ADN para una reacción de PCR.

Anexo X. Secuencia de los cebadores utilizados en la detección específica de cada gen de virulencia y tamaño de su producto (Eaton y Gasson, 2001).

Gm	Cebador	Secuencia (5'→3')	Producto (pb)
<i>esp</i>	TE 34	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933
	TE 36	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	
<i>ccf</i>	TE 53	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG	543
	TE 54	AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	
<i>agg</i>	TE3	AAGAAAAAGTAGACCAAC	1553
	TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA	
<i>cylA</i>	TE17	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517
	TE18	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	
<i>geIE</i>	TE9	ACCCCGTATCATTGGTTT	419
	TE10	ACGCATTGCTTTTCCATC	

Anexo XI. Mezcla y condiciones de la reacción de la PCR para la detección de genes de virulencia (Eaton y Gasson, 2001).

Mezcla de la reacción

H ₂ O	78,5 µL
Cebador (50ρM/µL)	1 µL
Cebador (50ρM/µL)	1 µL
Buffer Taq pol.	10 µL
Taq pol. 5U/µL.	0,5 µL
DNTPs	8 µL
ADN	1 µL
Volumen final	100 µL

Programa de la PCR

Se usó el Termociclador (Eppendorf, modelo Mastercycler personal, Alemania), con las siguientes condiciones.

Ciclo Inicial:

94 °C-----2 minuto - desnaturalización	} 1 ciclo
55 °C-----2 minuto- hibridación	
72 °C-----15 segundos- extensión	

Seguido por:

94 °C----- 1 minuto	} 29 ciclos
94 °C----- 1 minuto	
56 °C-----1 minuto	
72 °C-----2 minutos	
72 °C-----2 minutos	

Anexo XII. Reactivos usados en el protocolo de trabajo de Electroforesis en Campo Pulsado.

1- Solución de lavado TE: 10mM Tris-HCl (pH 7,6), 1mM EDTA (pH 8)

2- TBE 10X: 45mM tris-borato, 1mM EDTA (pH 8)

3- Solución de lisis (EC): 6mM Tris-HCl (pH 7,6), 1M NaCl, 100mM EDTA (pH 8), 0,5% Brij-58, 0,2% deoxicolato, 0,2% sarcosil (lauril sarcosina sódica), 1mg/mL lisozima.

4- Solución EPS: 0,5M EDTA (pH 9,5), 1% sarcosil, 50 µg/mL proteinasa K.

5- Proteinasa K: Se disuelve en agua destilada a una concentración de 50 mg/mL y se guarda en alícuotas de 200 µL

Anexo XIII. Secuencia de los cebadores utilizados en el tipado mediante MLST para cada gen metabólico y tamaño de su producto (<http://efaecalis.mlst.net>).

Genes	Secuencias (5'-3')	Amplicón (pb)
<i>gdh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gyd-1</i>	CAAAGCTTAGCTCCAATGGC	395
<i>gyd-2</i>	CATTTTCGTTGTCATACCAAGC	
<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC	583
<i>pstS-2</i>	ATTACATCACGTTCTACTTGC	
<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
<i>gki-2</i>	ACCATTAAAGCAAATGATCGC	
<i>aroE-1</i>	TGGAAAACCTTACGGAGACAGC	459
<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAGC	
<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456
<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	
<i>yiqL-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
<i>yiqL-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	

BIBLIOGRAFIA DEL AUTOR RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS

- Quiñones D, Gómez-Lus R, Del Campo R. Patogenicidad de especies de enterococo de importancia clínica en Cuba. *Rev Latinoam Microbiol.* 2000;44(4):77.
- Quiñones D. Enterococo. Cap. 20. En: Llop A, Valdés-Dapena M, Suazo J, editores. Libro de Texto de Microbiología y Parasitología Médica. Tomo I, ECMC, La Habana 2001. p. 179-91.
- Quiñones D, Duran E, González I, Gómez-Lus R. Identificación de *Enterococcus spp.* procedentes de servicios hospitalarios cubanos. *Rev Latinoam Microbiol.* 2002;(44):78
- Quiñones D, Gómez-Lus R, Del Campo R. Resistencia antimicrobiana en cepas de *Enterococcus spp.* causantes de infecciones nosocomiales en Cuba. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;22(3):129.
- Quiñones D, Faraldo B, Marrero D. Primer reporte sobre infecciones enterocócicas en servicios pediátricos de Cuba. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;23(3):D-08.
- Quiñones D, Rubio M, Goñi P, Del Campo R, Llop A., Gómez-Lus R. Fenotipos de resistencia antimicrobiana y genes de resistencia en cepas de *Enterococcus spp.* con importancia clínica en Cuba. *Rev Española de Quimioterapia* 2003;16(supl. 1):263.
- Quiñones D, Del Campo R, Gómez-Lus R. Distribución clonal de especies de *Enterococcus* en servicios hospitalarios cubanos y su impacto en la resistencia antibiótica. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;23(3): D-08.
- Quiñones D, Del Campo R, Goñi P, Gómez-Lus. Clonal Distribution of Enterococci species in cuban hospitals and its impact in antibiotic resistance. *Int J Infect Dis.* 2004;8(supl.1):S95.
- Quiñones D, Del Campo R, Goñi P, Gómez-Lus R. Epidemiología molecular de especies de *Enterococcus* procedentes de centros hospitalarios cubanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:S1.
- Quiñones D, Goñi P, Rubio MC, Duran E, Gómez-Lus R. Enterococci spp. isolated from Cuba: Species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2005;51(1):63-7.
- Quiñones D, Goñi P, Rubio M, Baquero F, Gómez-Lus R, Del Campo R First report of genetic relatedness and antibiotic resistance mechanisms in clinical isolates of *Enterococcus* from Cuba. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(8):793-7.
- Quiñones D. Epidemiology of antibacterial resistance in *Enterococcus spp.* from Cuba and other Latin American countries. En: Kobayashi N, Pandalai SG, editores. Drug

resistance of enterococci: epidemiology and molecular mechanism. Trivandrum: Research Signpost; 2006. p. 1-25.

- Quiñones D, Marrero D, Llop A, Kobayashi N. Genetic diversity and antibiotic resistance determinants of *Enterococcus faecalis* isolates causing pediatric infections in Cuba. J Pediatric Infect Dis. 2009;4:267-74.
- Quiñones D, Marrero M., Falero B., Llop A., Kobayashi N., Del Campo R. Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas en Cuba. Rev Cub Med Trop. 2008; 60:23-9.
- Quiñones D, Marrero D, Llop A., Kobayashi N, Del Campo R. Molecular epidemiology and antibiotic resistant genes of *Enterococcus faecalis* causing pediatric infection in Cuba. Clin Microbiol Infect. 2008;14 (7):S332.
- Quiñones D, Kobayashi N, Nagashima S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. Microb Drug Resist. 2009;15(4):287-93.

BIBLIOGRAFIA DEL AUTOR NO RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS

- Padrón N, **Quiñones D**. Tratamiento de la Infección por *Helicobacter pylori*: Comentario al respecto. Rev Cubana de Investigaciones Biomédicas. 1999; 18(3):236-40.
- **Quiñones D**, Tamargo I, Borroto S, Fuentes K, Pérez M. Influencia del Sitio de Procedencia de Muestra en la Detección de portadores Nasofaríngeos de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2000;20(3):92-5.
- Tamargo I, Toraño G, Pérez M, Fuentes K, Llop A, **Quiñones D**. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* circulantes en Cuba. Rev Latinoam Microbiol. 2000;42:603.
- Toraño G, **Quiñones D**, Hernández I, Hernández T, Tamargo I, Borroto S. Portadores nasofaríngeos de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina entre niños cubanos que asisten a círculos infantiles. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2001;19(8):367-70.
- Toraño G, Hernández I, Hernández T, **Quiñones D**, Borroto S. Primeras evidencias de portadores nasofaríngeos de *S. aureus* resistentes a la metilina entre niños cubanos que asisten a círculos infantiles. Rev Latinoam Microbiol. 2002;44(4):298.
- Tamargo I, Fuentes K, Toraño G, **Quiñones D**, Hernández I, Perez M. Nasopharyngeal carriage and vaccination of *Haemophilus influenzae* B in healthy cuban children. Int J Infect Dis 2004;8(S1):S72.

- **Quiñones D**, Marrero D, Cordobés MC, Herrera C, Del Campo R-. Faecal carriage of antibiotic-resistant Enterococci in hospitalized children in Cuba. *Int J Infect Dis*. 2006;10(S 1):S06.
- Cruz-Leal Y, Canaan L, Blanco F, Carmenate T, Chang J, **Quiñones D**, Tamargo I, Cremata J, Verez-Bencomo V, Guillen G . Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitative Determination of Capsular Polysaccharide in Culture Supernatants of *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2006;44(2):101-8.
- Tamargo I, Llanes R, Toraño G, Hernández I, Pérez M, Llop A, **Quiñones D**, Martínez G, Aguilar A, Gutiérrez O, Valdés A, Battle MC, Cruz Y. Informe Regional Sireva II: Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. Tecnologías Esenciales de Salud. THR/EV – 2008/001. Washington, DC: OPS 2008.
- Watanabe S, Kobayashi N, **Quiñones D**, Nagashima S, Uehara N, Watanabe N. Genetic diversity of Enterococci harboring the high-level gentamicin resistance gene *aac(6 0)-Ie-aph(2 00)-Ia* or *aph(2 00)-Ie* in a Japanese Hospital. *Microb Drug Resist*. 2009;15(3):185-94.
- Kobayashi N, **Quiñones D**, Watanabe S, Hayakawa S, Nagashima S, Watanabe N. Genetic diversity of the low-level vancomycin resistance gene *vanC-2/vanC-3* and identification of a novel *vanC* subtype (*vanC-4*) in *Enterococcus casseliflavus*. *Microb Drug Resist*. 2009;15(1):1-9

TRABAJOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTIFICOS

1. VII Congreso Cubano de Microbiología, IV Congreso Nacional de Medicina Tropical. Junio, 2009, Cuba 1- Epidemiología molecular y genes de resistencia a antibióticos en *Enterococcus faecalis* causantes de infecciones pediátricas en Cuba. 2- Patogenicidad y susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus* spp. aislados de pacientes VIH-SIDA.
2. 26 Congreso Mundial de Quimioterapia e Infección. Junio, 2009. Toronto, Canadá. Phenotype and genotype of antimicrobial resistance in *Enterococcus* in Cuba. Report from National Surveillance Program 2000-2006.
3. 18 th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, España. 2008. Molecular epidemiology and antibiotic resistant genes of *Enterococcus faecalis* causing pediatric infection in Cuba.

4. Pediatría 2008. Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas en Cuba.
5. Convención CPHEM 2008. Vigilancia nacional de *Enterococcus* en hospitales cubanos. Aspectos clínicos-microbiológicos y de epidemiología molecular. C. de La Habana, Cuba.
6. Taller Nacional de Resistencia Bacteriana, IPK, 2007. Actualización en el diagnóstico microbiológico del Género *Enterococcus* y situación actual de la resistencia antimicrobiana.
7. VI Jornada Internacional de Infectología Pediátrica, C. de La Habana, Cuba. 2006. Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia in *Enterococcus* causante de infecciones pediátricas en Cuba. La Habana,
8. 14 Congreso Científico Internacional CNIC 2005, C. de La Habana, Cuba. Caracterización clínica-microbiológica y susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus spp.* causantes de infecciones pediátricas en cuba.
9. 11th Internacional Congreso on Infectious Diseases, México. 2004. Clonal Distribution of Enterococci species in Cuban hospitals and its impact in antibiotic resistance.
10. XI Congreso de la Sociedad Española de Infectología y Microbiología Clínica. Bilbao, España 2004. Epidemiología molecular de especies de procedentes de centros hospitalarios cubanos.
11. XVII Congreso Latinoamericano y X Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Argentina. 2004. Epidemiología molecular de *Enterococcus* causantes de infecciones en Cuba.
12. V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica, Varadero, Cuba, 2004. Primer reporte sobre infecciones enterocócicas en servicios pediátricos de Cuba.
13. XXVIII Congreso de la Asociación Mexicana para el Estudio de las Infecciones Nosocomiales, México 2003. - Distribución clonal de especies de *Enterococcus* en servicios hospitalarios cubanos y su impacto en la resistencia antibiótica. - Primer reporte sobre infecciones enterocócicas en servicios pediátricos de Cuba.
14. VII congreso Nacional de la Sociedad Española de Quimioterapia. Zaragoza, España 2003. Fenotipos de resistencia antimicrobiana y genes de resistencia en cepas de *Enterococcus spp.* con importancia clínica en Cuba.
15. IV Congreso Panamericano de Control de Infecciones Y Epidemiología Hospitalaria, México, Nov 2002. Producción de bacteriocinas, hemolisinas y actividad de proteasas en *Enterococcus* de importancia clínica en Cuba.

16. II Taller Internacional “Estrategias para el control de infección Intrahospitalarias con Recursos limitados en Países de América Latina Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. C. de La Habana, Cuba, 2002 Panorama Internacional de la Resistencia en *Enterococcus*. Situación en Cuba.
17. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical. La Habana, Cuba. 2002. Identificación de *Enterococcus* spp procedentes de servicios hospitalarios cubanos.

DISTINCIONES CIENTIFICO-TECNICAS RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS

I- Resultados Relevantes del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK)

- 2004: *Enterococcus*, patógeno emergente. Evidencias clínico-microbiológicas en Cuba. Autora
- 2007: "Del fenotipo al genotipo en la resistencia antimicrobiana de enterococo: aspectos moleculares que influyen en su diseminación“ Autora
- 2009: Infección Enterocócica en niños: un problema en Cuba? Autora

II- Logros Científico-Técnicos de la Academia de Ciencias de Cuba

- Logro de la Academia de Ciencias de Cuba, 2008. Del fenotipo al genotipo en la resistencia antimicrobiana de *Enterococcus*: aspectos moleculares que influyen en su diseminación" Autora

III- Premio Internacional

- Ignaz phillip Semmelweis” Primer lugar en Investigaciones en Control de Infecciones Intrahospitalarias en XXVIII Congreso Anual de la asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. México. 2003 Autora

IV- Premios

- Primer Premio en el XV Forum Provincial de Ciencia y Técnica. Jul. 2003. Holguín. *Enterococcus*, patógeno emergente en Cuba.
- Tercer Premio “Joven Ciencia 2003”. Patogenicidad de especies de *Enterococcus* causantes de infecciones en Cuba.
- Primer Premio en la XII Jornada Provincial Clínico Quirúrgica de Pediatría, Holguín Junio 2008. Factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas.
- Trabajo Destacado en el XVI Forum Provincial de Ciencia y Técnica, C. de La Habana. 2008. Bases genéticas de la resistencia antimicrobiana en *Enterococcus* y aspectos moleculares que influyen en su diseminación.
- Mención Provincial en el Concurso XXXV Premio Anual de la Salud 2010. Molecular Epidemiologic Analysis of *Enterococcus faecalis* Isolates in Cuba by Multilocus Sequence Typing.

TUTORIAS DEL AUTOR RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS

1. Tema de Tesis para la obtención del título: Especialista de I grado en Microbiología. Caracterización de *Enterococcus* spp. aislados de infecciones en niños. Holguín 2001-2002. Holguín 2003.
2. Tema de Tesis para la obtención del título de Licenciada en Biología.
Determinación de genes de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en *Enterococcus* procedentes de pacientes VIH/SIDA. Facultad de Biología, 2005
3. Tema de Tesis para obtención del título de Máster en Enfermedades Infecciosas
Factores de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas. Holguín 2008.
4. Tema de Tesis para la obtención del título: Especialista de I grado en Microbiología. Caracterización de *Enterococcus* procedente de muestras clínicas y ambientales. Holguín 2010.