



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

***“EVOLUCIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE ENTEROCOCCUS FAECIUM  
VANCOMICINA RESISTENTE (EfmVR)”***

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**CLAUDIA MAYORAL TERÁN**

**TUTOR PRINCIPAL: *DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL***  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**  
***DRA. PATRICIA A. VOLKOW FERNÁNDEZ*** – FACULTAD DE MEDICINA  
***DR. MIGUEL ÁNGEL CEVALLOS GAOS*** – CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, MARZO DEL 2024.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Evolución de la patogenicidad de *Enterococcus faecium* vancomicina resistente (EfmVR)

Esta investigación se realizó en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana del Departamento de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Medicina bajo la tutoría de la Dra. Yolanda López Vidal con financiamiento de PAPIIT-DGAPA IV 200321, IT202024 y Fundación Gonzalo Río Arronte S.590.

## *Agradecimientos*

En primer lugar, a la Dra. Yolanda López Vidal, por enseñarme que se puede superar cualquier reto si uno lo desea. Al Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos por estar presente desde el inicio hasta el fin de mi viaje en el posgrado y por todo el apoyo que me otorgó. A la Dra. Patricia A. Volkow por siempre creer en mí y en mi capacidad como médico e investigador. A mi familia y en especial a mis padres y a mi esposo por impulsarme a continuar en el camino, a pesar de lo difícil que pudo ser y a todos mis compañeros y colegas de viaje, que me compartieron conocimiento y experiencias valiosas para mi formación. Por último, a la UNAM y Facultad de Medicina que como instituciones me han ayudado a formarme como profesionalista.

## *Dedicatoria*

Dedico el siguiente trabajo a mi madre y a mi hija, que con sus palabras y su sonrisa me alentaron a concluir esta etapa de mi vida profesional.

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>5</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>6</b>
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	8
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>11</b>
<b>INFECCIONES ASOCIADAS AL CUIDADO DE LA SALUD (IACS)</b> .....	<b>11</b>
<b>ENTEROCOCCUS Y SUS GENERALIDADES</b> .....	<b>14</b>
<b>E. FAECIUM COMO COMENSAL</b> .....	<b>16</b>
<b>FACTORES DE VIRULENCIA DE E. FAECIUM</b> .....	<b>17</b>
<b>RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE EFM</b> .....	<b>20</b>
<b>IACS CAUSADAS POR EFM</b> .....	<b>30</b>
<b>TRATAMIENTO PARA INFECCIONES CAUSADAS POR EFM</b> .....	<b>31</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>33</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 GENERAL</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2 ESPECÍFICOS</b> .....	<b>34</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE DE LOS AISLAMIENTOS</b> .....	<b>38</b>
<i>Identificación fenotípica</i> .....	38
<i>Identificación genotípica</i> .....	38
<b>PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA DE LOS AISLAMIENTOS</b> .....	<b>39</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DE GENES DE FACTORES DE VIRULENCIA</b> .....	<b>40</b>
<b>CLADOGRAMA DE LOS PERFILES METABÓLICOS</b> .....	<b>40</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DE LA RELACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLAMIENTOS HOSPITALARIOS</b> .....	<b>40</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DE LOS ST Y CC DE CADA CEPA</b> .....	<b>41</b>
<b>FILOGENIA DE LOS AISLAMIENTOS</b> .....	<b>42</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES</b> .....	<b>42</b>
<b>PERFIL DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>43</b>
<b>PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA</b> .....	<b>46</b>
<b>PERFIL METABÓLICO</b> .....	<b>46</b>
<b>RELACIÓN GENÉTICA DE LOS AISLAMIENTOS POR PFGE</b> .....	<b>47</b>
<b>TIPIFICACIÓN POR SECUENCIA MULTILOCUS</b> .....	<b>48</b>
<b>ANÁLISIS FILOGENÉTICO</b> .....	<b>49</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>

<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>57</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>64</b>
<b>ANEXO A - TABLAS</b> .....	<b>65</b>
<i>Tabla 2. Información general de la colección de Efm</i> .....	65
<i>Tabla 3. Características fenotípicas de la colección de Efm</i> .....	67
<i>Tabla 4. Características genotípicas de la colección de Efm</i> .....	69
<i>Tabla 5. Perfil de resistencia antimicrobiana de la colección de Efm</i> .....	71
<b>ANEXO B – FIGURAS</b> .....	<b>74</b>
<i>Figura 3. Cladograma colección Efm</i> .....	74
<i>Figura 4. Filogenia de 1348 secuencias concatenadas de Efm de la base de datos de PubMLST</i> .....	75
<i>Figura 5. Filogenia de 34 secuencias concatenadas de nuestra colección de aislamientos de Efm</i> .....	76
<i>Figura 6</i> .....	77
<b>ANEXO C – GRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>
<i>Gráfica 1</i> .....	78
<i>Gráfica 2</i> .....	79
<i>Gráfica 3</i> .....	79
<i>Gráfica 4</i> .....	80
<i>Gráfica 5</i> .....	80
<i>Gráfica 6</i> .....	81
<i>Gráfica 7</i> .....	81
<i>Gráfica 8</i> .....	82
<i>Gráfica 9</i> .....	82
<i>Gráfica 10</i> .....	83
<i>Gráfica 11</i> .....	83
<i>Gráfica 12</i> .....	84
<i>Gráfica 13</i> .....	84
<i>Gráfica 14</i> .....	85
<b>ANEXO D – METODOLOGÍA</b> .....	<b>86</b>
<b>CONDICIONES DE PCR</b> .....	<b>86</b>
<i>Identificación de especie</i> .....	87
<i>Genotipo Van</i> .....	87
<i>Factores de virulencia</i> .....	87
<i>MLST</i> .....	88
<b>MEDIOS Y SOLUCIONES</b> .....	<b>89</b>
<i>Medios</i> .....	89
<i>Soluciones</i> .....	89
<b>ANEXO E (ARTÍCULO PUBLICADO)</b> .....	<b>91</b>



## Índice de tablas

<i>Tabla 1</i>	48
<i>Tabla 2</i>	63
<i>Tabla 3</i>	65
<i>Tabla 4</i>	67
<i>Tabla 5</i>	69

## Índice de figuras

<i>Figura 1</i>	35
<i>Figura 2</i>	36
<i>Figura 3</i>	72
<i>Figura 4</i>	73
<i>Figura 5</i>	74
<i>Figura 6</i>	75

## Índice de gráficas

<i>Gráfica 1</i>	78
<i>Gráfica 2</i>	79
<i>Gráfica 3</i>	79
<i>Gráfica 4</i>	80
<i>Gráfica 5</i>	80

<i>Gráfica 6</i>	<i>81</i>
<i>Gráfica 7</i>	<i>81</i>
<i>Gráfica 8</i>	<i>82</i>
<i>Gráfica 9</i>	<i>82</i>
<i>Gráfica 10</i>	<i>83</i>
<i>Gráfica 11</i>	<i>83</i>
<i>Gráfica 12</i>	<i>84</i>
<i>Gráfica 13</i>	<i>84</i>
<i>Gráfica 14</i>	<i>85</i>

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CC	Complejo clonal
Efm	<i>Enterococcus faecium</i>
Efs	<i>Enterococcus faecalis</i>
EfmVR	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina
EGM	Elementos Genéticos Móviles
IACS	Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud
IN	Infecciones Nosocomiales
MLST	Multi-Locus Sequence Typing (Tipificación por Secuencias Multi-Locus)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (Electroforesis en Gel por Campos Pulsados)
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
ST	Sequences Type (Tipo de Secuencias)

## ANTECEDENTES

### Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud (IACS)

Las infecciones bacterianas han sido por cientos de años una de las principales causas de morbi – mortalidad en el humano a nivel mundial. Si bien, desde la época antigua se ocupaban diferentes sustancias como tratamiento y/o prevención de infecciones, no fue hasta el siglo XX que se realizó el descubrimiento de la penicilina como antimicrobiano y posteriormente, se llevó a cabo el desarrollo de nuevos antimicrobianos que hasta en la actualidad se siguen utilizando<sup>1</sup>. El desarrollo de diferentes familias de antimicrobianos fue sin duda un gran aporte en la ciencia y para la salud pública; sin embargo, el uso excesivo de los antibióticos generó un nuevo problema a nivel global. La presión selectiva por el uso excesivo de antimicrobianos generó el desarrollo de microorganismos multidrogo resistentes; lo cual, ha incrementado la tasa de Infecciones Nosocomiales (IN) o también conocidas como Infecciones Asociadas a Cuidados de la Salud (IACS), principalmente en pacientes inmunosuprimidos<sup>2,3</sup>.

Las IACS son infecciones que aparecen por primera vez en un periodo de tiempo igual o mayor a las 48 hrs después del ingreso hospitalario. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades identificó que cerca de 1.7 millones de pacientes hospitalizados adquieren IACS anualmente; mientras, son tratados por otras enfermedades, y más de 98,000 pacientes mueren por IACS<sup>4</sup>. De acuerdo con el reporte del año 2022 por la OMS, se menciona que en países de alto ingreso se estima que 7 de cada 100 pacientes ingresados en un hospital de cuidados intensivos adquieren una infección nosocomial, cifra que aumenta a 15 pacientes por cada 100 en países de ingresos mediano o bajo. Tomando en cuenta los datos anteriores, se estima que más del 24% de los

pacientes que adquieren IACS desarrollan septicemia; de los cuáles, alrededor del 52.3% mueren cada año. Estas cifras tienden a duplicarse o triplicarse cuando los patógenos causantes presentan multidrogo resistencia<sup>5</sup>. En México, se estima que 450,000 casos de IACS causan 32 muertes por cada 100,000 habitantes por año. En 2018 por CONAMED - OPS, menciona que en el 2015 las unidades médicas adscritas a la Red de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificaron 61,969 casos de IACS y 3,624 defunciones asociadas. En el Subsistema Automatizado de Egresos Hospitalarios en el mismo año, registraron 14,317 egresos con una tasa estimada de IACS de 1.6 por 100 egresos. En promedio los pacientes con IACS, permanecieron hospitalizados 21.5 días y casi 20% egresó por defunción. Por entidad Federativa, el Estado de México, la Ciudad de México, Guanajuato y Tlaxcala tuvieron el mayor número de casos de IACS. El tipo de IACS con mayor porcentaje en México fue la bacteriemia con un total de 14,856 casos (24%)<sup>6</sup>. En el último informe realizado por la Secretaría de Salud del Gobierno de México, se obtuvo la información del mes de enero al mes de agosto del 2022, reportando en la plataforma de la RHOVE un total de 36,425 de IACS; de los cuales, la ciudad de México (CDMX) ocupa el primer lugar con 6,932 casos de IACS, seguido por el estado de Jalisco, de México y Veracruz con 4,759; 2,829 y 2,416 casos respectivamente. El tipo de IACS reportadas con más frecuencia fueron: Neumonía asociada a ventilador, infecciones de vías urinarias asociadas a catéter urinario, bacteriemia asociada a catéter y bacteriemia primaria. Los diez principales patógenos aislados son: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter. baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus haemolyticus*<sup>7</sup>.

Actualmente panorama de salud mundial respecto a las IACS ha cambiado significativamente con el paso de los años, siendo cada vez más preocupante el desarrollo de microorganismos multidrogo resistentes a una gama amplia de familias de antibióticos. En el 2008, Rice *et al*, reportaron a un grupo de microorganismos como los principales causantes del aumento de las IACS a nivel global. Estos microorganismos pertenecen al grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomona aeruginosa* y especies de *Enterobacter*)<sup>8</sup>. Los patógenos ESKAPE presentan características en común que los hace prevalecer en ambientes hospitalarios, son oportunistas, es decir, que afectan principalmente a pacientes que están cursando por un proceso de inmunosupresión<sup>9</sup>. Los patógenos ESKAPE también han desarrollado resistencia a múltiples grupos de antimicrobianos, lo que complica el tratamiento profiláctico de los pacientes infectados<sup>10</sup>. Otra característica muy importante en los patógenos ESKAPE, es la plasticidad genómica que han logrado desarrollar en los últimos años, y por lo cual se explica el desarrollo de su multidrogo resistencia y la capacidad de persistir en diferentes ambientes<sup>9</sup>.

En marzo del 2021, la Organización Panamericana de Salud y la OMS, reportaron una lista de patógenos multidrogo resistentes prioritarios con el apoyo de la División de Enfermedades infecciosas de la Universidad de Tübingen en Alemania. En este reporte se definieron tres niveles de prioridad: crítica, elevada y media de acuerdo con las siguientes características:

- Grado de letalidad de las infecciones que causan
- Si el tratamiento requiere o no hospitalización prolongada
- La facilidad de transmisión entre diferentes tipos de huésped (humanos y animales)

- Si se puede prevenir o no la infección que causan
- Opciones terapéuticas disponibles
- Desarrollo o no de nuevos antimicrobianos de los que puedan ser blanco

En el caso de la prioridad crítica se contemplaron los siguientes aspectos: que sean peligrosas en hospitales, hogares de cuidado crónico y entre pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos invasivos. En los niveles de prioridad elevada y media, se incluyen patógenos cuya farmacorresistencia va en ascenso y que pueden estar relacionados con enfermedades adquiridas en la comunidad.

Los patógenos incluidos en la prioridad crítica son: *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y Enterobacterias resistentes a carbapenémicos. Los patógenos incluidos en la prioridad elevada son: *E. faecium* resistente a vancomicina, *S. aureus* resistente a meticilina, *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina, *Campylobacter spp.* y *Salmonella spp.* resistentes a fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas y fluoroquinolonas.

Los patógenos que se encuentran en la prioridad media son: *Streptococcus pneumoniae* con susceptibilidad disminuida a penicilina, *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina y *Shigella spp.* resistente a fluoroquinolonas<sup>10</sup>.

### ***Enterococcus* y sus generalidades**

*E. faecium* (Efm) es uno de los patógenos ESKAPE, que se ha relacionado con el desarrollo de bacteriemia y que está dentro de los patógenos con prioridad de atención por la OMS. En 1899, Thiercelin describieron al género *Enterococcus*<sup>11</sup>; sin embargo, se clasificó primero dentro del

género *Streptococcus* del grupo D y 1984 fue reclasificado dentro del género *Enterococcus* debido a su alta frecuencia en pacientes con diarrea y su origen intestinal<sup>12</sup>. Taxonómicamente el género *Enterococcus* es clasificado de la manera siguiente:

Phylum: *Firmicutes*<sup>13</sup>

Clase: *Bacilli*<sup>13</sup>

Orden: *Lactobacillales*<sup>13</sup>

Familia: *Enterococcaceae*<sup>13</sup>

Género: *Enterococcus*<sup>13</sup>

*Enterococcus* es una bacteria Grampositiva, anaerobia facultativa, cuenta con 37.5% de GC y son organismos ubicuos capaces de resistir un amplio rango de temperaturas (10°C – 50°C) y pH (4.5 – 9.9); así como, condiciones hipo e hipertónicas. Aunque algunas especies liberan una pseudocatalasa que produce una reacción débil, en general el género *Enterococcus* se considera catalasa negativo. *Enterococcus* puede crecer en medio con 6.5% de NaCl y tiene la capacidad de hidrolizar la esculina en presencia de un 40% de sales biliares. La pigmentación de las colonias es variable y algunas especies cuentan con la habilidad de producir hemólisis. Algunas especies, se han utilizado para la producción de quesos y como probióticos en humanos. Como parte de la microbiota intestinal, se sabe que constituye aproximadamente el 1% de la población total en un adulto sano, colonizando principalmente en el colon<sup>11,12</sup>. En el 2002, se habían identificado 23 especies distintas de *Enterococcus*, y recientemente, de acuerdo con la base de datos de LPSN (Lista de nombres de procariontas<sup>14</sup>) ya existen 62 especies de *Enterococcus* y dos subespecies. Las subespecies del género *Enterococcus* se han catalogado en seis grupos diferentes de acuerdo con



sus características fenotípicas. Varias especies del género *Enterococcus* se han descrito como patógenas, tales como: *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis* y *E. faecium*, sin embargo, la única especie de *Enterococcus* considerada un patógeno de importancia a nivel mundial es Efm que pertenece al grupo II del género *Enterococcus*. Las especies pertenecientes a este grupo del género *Enterococcus*, tienen la capacidad de formar ácido en presencia de manitol y de hidrolizar arginina; aunque, no pueden formar ácido en presencia de sorbosa.<sup>12</sup> Otros estudios han descrito, que cepas de Efm son capaces de utilizar y crecer en medios ricos en rafinosa, debido a la adquisición de genes que codifican galactosidasas contenidos en megaplásmidos<sup>12,15</sup>.

Efm ha mostrado una gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes, es considerado un organismo ubicuo, y se puede encontrar en diferentes especies animales, ejemplo, reptiles e insectos. En los humanos es considerado un patógeno oportunista que afecta principalmente a pacientes inmunosuprimidos<sup>12,16</sup>.

### *E. faecium* como comensal

En 1899 Thiercelin, describió por primera vez un coco saprofítico capaz de causar infecciones intestinal en humanos con el término “Entérocoque” en francés<sup>12,17</sup>. Años más tarde, la bacteria fue reclasificada con el género *Enterococcus* y clasificarse en el phylum: *Fimicutes*, clase: *Bacilli*, orden: *Lactobacillales* y familia: *Enterococcaceae*. En el género *Enterococcus*, *E. faecalis* (Efs) y *Efm*, comprenden aproximadamente el 1% de la microbiota intestinal en adultos, siendo la región de colon y seguido del íleon como los sitios de mayor colonización. Efs y Efm son especies que se

pueden encontrar como parte de la microbiota intestinal, sin embargo, se ha identificado que Efm tiene una mayor capacidad de colonización en comparación con Efs, debido a que tiene un perfil de resistencia más amplio, además de tener la fácil adquisición de genes que codifican para factores de virulencia, atributos que le confieren a la bacteria la habilidad para diseminarse y persistir en diferentes nichos<sup>12</sup>.

### Factores de virulencia de *E. faecium*

Efm es capaz de adaptarse y persistir a diferentes ambientes a través de la expresión de diferentes factores de virulencia. Los factores de virulencia de Efm, se han dividido en dos grupos, las proteínas que son secretados y las proteínas localizadas en la superficie celular bacteriana.<sup>18</sup> A continuación se describen los principales factores de virulencia en cepas de origen hospitalario:

- Proteína de adherencia (Acm): ésta proteína se localiza en la superficie celular y su función es la de adherirse al colágeno de los tejidos del huésped.<sup>12,18</sup> La proteína Acm, es un integrante de la subfamilia de las adhesinas de superficie conocida como Componentes de la superficie microbiana; las cuales reconocen moléculas de la matriz de adhesión (MSCRAMM - Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) y ha sido considerado el análogo de la proteína Ace, adhesina presente en cepas de Efs.<sup>12,18-21</sup> Varios estudios han descrito, una mayor proporción de muestras clínicas en comparación con muestras de origen fecal o incluso de origen animal, es decir, estas proteínas se han relacionado con la colonización y persistencia de Efm en ambiente hospitalario y su relación con el desarrollo de endocarditis<sup>12,18-20</sup>.

- Pili: La adhesina fimbrial MSCRAMM, es estructura compuesta por subunidades multiméricas de pilina que se ensamblan en la superficie celular como filamentos.<sup>18</sup> La proteína de adherencia Acm, es un factor de virulencia localizada en la superficie celular.<sup>18</sup> La secuenciación del genoma de cepas de Efm, ha permitido identificar genes agrupados (Pili gene clusters – PGC's)<sup>18,22</sup>, ejemplo, clusters *ebpABC<sub>fm</sub>*; los cuales codifican para proteínas involucradas en el ensamble de los pilli.<sup>23,24</sup> Algunos estudios, han mostrado la producción de cuatro distintos tipos de pilli.<sup>18,24,25</sup> En una sola cepa de Efm; se ha identificado la expresión de dos distintos tipos de pilli al mismo tiempo.<sup>26</sup> También ha sido descrito que los pilli de Efm, tiene una función de adherencia a fibras de colágeno, fibrinógeno y plaquetas, así como, en la formación de biopelículas. La colonización de Efm, es un evento inicial para el desarrollo de diferentes infecciones, como la endocarditis y las infecciones ascendentes de vías urinarias.<sup>12,22,24–27</sup>
- Proteína de superficie enterocócica (*esp*): Efs y Efm expresan la proteína de superficie enterocócica, ensamblada en la superficie celular microbiana.<sup>18</sup> La proteína de superficie enterocócica, es un factor de virulencia que le permite a la bacteria adherirse a diferentes superficies y/o tejidos, participa en el desarrollo de las biopelículas, ayuda a la bacteria evadir la respuesta inmune del huésped y a persistir en diferentes nichos.<sup>12,18,28</sup> La proteína de superficie enterocócica, es un marcador molecular en cepas clínicas. La expresión de *esp* ha sido asociado con procesos de endocarditis, peritonitis, infecciones urinarias y colonización intestinal.<sup>12,18</sup> También se ha reportado que la presencia de *esp* está relacionada con cambios en la pared celular bacteriana con un impacto en la

susceptibilidad a algunos antimicrobianos, ejemplo, Beta lactámicos.<sup>18,28,29</sup> Además, se ha relacionado la presencia de *esp* en aislamientos clínicos causantes de IACS y su alta patogenicidad.<sup>12,28,30,31</sup>

- Hyl: Otro factor de virulencia de Efm, relacionado con su alta patogenicidad es la presencia de la glucosil hidrolasa (Hyl); la cual, presenta una acción similar a una  $\beta$  - N - acetylglucosaminidasa.<sup>25,32</sup> Hyl es secretado por las cepas de Efm.<sup>18,25</sup> Anteriormente, se había llamado erróneamente “hialuronidasa” debido a su homología con otras hialuronidasas aunque no presentaba la actividad de hialuronidasa; actualmente se sabe que su presencia facilita la colonización intestinal.<sup>32</sup> Un estudio identificó la presencia del gen *hyl* en un plásmido que está relacionado con un complejo clonal reportado como el principal causante de IACS a nivel mundial, en dicho plásmido, también se identificó la presencia de genes que codifican para resistencia antimicrobiana.<sup>25,32,33</sup> Aunque Hyl se propuso en un inicio como un importante factor de virulencia, actualmente se considera más como un marcador de las cepas virulentas de Efm. Se tienen pocos datos de la expresión de *hyl* y su papel en el desarrollo de IACS, actualmente se asocia más a la facilidad de colonización ya que un gran número de aislamientos clínicos cuentan con la presencia de *hyl*.<sup>32,34,35</sup>

Se sabe que los factores de virulencia que más se han estudiado, se han reportado en Efs, sin embargo, los que se mencionaron previamente en este trabajo, también se encuentran presentes en Efm, y se les ha dado importancia por la capacidad de colonización, así como evasión del

sistema inmune del huésped y la formación de biopelículas. Ésta última, limita la penetración de antibióticos, lo que permite la persistencia de Efm. Efm no es reconocido como un organismo altamente virulento, ya que presenta pocos factores de virulencia comparado con otros microorganismos, sin embargo, se cree que, aunque presente pocos factores de virulencia, el desarrollo de la resistencia a múltiples antimicrobianos, le ha otorgado un lugar importante como patógeno oportunista a nivel mundial.<sup>12,18,22,25</sup>

### Resistencia antimicrobiana de Efm

Efm expresa diferentes factores de virulencia que le permiten colonizar y adaptarse a diferentes nichos y causar IACS, sin embargo, no es lo único que interviene en la capacidad de Efm para persistir en diferentes nichos, ya que una de los rasgos más relevantes de Efm para lograr persistir, es la múltiple resistencia antimicrobiana que ha logrado adquirir hasta nuestros días.<sup>12,18,36</sup> La lista de resistencia antimicrobiana de Efm comenzó con la resistencia a ampicilina de Efm en la década de los ochenta; lo cual se propone que fue la pauta para la aparición de cepas de Efm resistentes a la vancomicina (EfmVR) en la década de los noventa.<sup>37</sup> El género *Enterococcus* cuenta de forma intrínseca con resistencia a diferentes antimicrobianos, entre los que podemos mencionar los siguientes: altos niveles de resistencia a las cefalosporinas y penicilinas semi-sintéticas, clindamicina, aminoglucósidos y trimetoprim/sulfametoxazol.<sup>12,22,36</sup>

La resistencia antimicrobiana está mediada por diferentes mecanismos que en el caso de Efm, ha logrado adquirir y/o desarrollar en las últimas décadas. A continuación, mencionaremos algunos de los mecanismos de resistencia antimicrobiana que se han descrito en Efm.

**Betalactámicos:** La resistencia a éste grupo de antimicrobianos se lleva a cabo por las D,D - transpeptidasas o también conocidas como proteínas fijadoras de penicilina (penicilin binding proteins - PBP). Se sabe que el género *Enterococcus* presenta resistencia a las penicilinas, leve resistencia a los carbapenémicos y mucho menor resistencia a las cefalosporinas.<sup>12</sup> En *Enterococcus* se han identificado la presencia de más de seis PBP's, las cuáles presentan una afinidad variable y en el caso de las cefalosporinas, al menos una o dos tienen baja afinidad.<sup>12,38</sup>

La resistencia a los betalactámicos en Efm, es intrínseca y se lleva a cabo principalmente por la producción de la PBP5 clase B, un ortólogo de baja afinidad de la PBP2 que se ha reportado en *S. aureus*.<sup>12</sup> Sin embargo, este mecanismo de resistencia no es el único reportado para los betalactámicos. Se sabe que en el caso de la resistencia intrínseca a las cefalosporinas además de la presencia de la PBP5, es necesario la presencia de otros genes. Diversos estudios han reportado que la PBP5 funciona en conjunto con otras PBP de clase A. Otro mecanismo de resistencia a los betalactámicos es el reportado por un sistema regulador de dos componentes (two-component regulatory systems - TCS). Los TCS son sistemas de transducción de señales presentes en diferentes bacterias, en el caso del género *Enterococcus* se ha reportado la participación del sistema CroRS (compuesto por un sensor CroS y un regulador CroR), otro sistema relacionado con la resistencia a las cefalosporinas es el conformado por IreK e IreP. Diversos estudios han reportado que la delección de dichos genes disminuye la resistencia a las cefalosporinas.<sup>12,38</sup>

En el caso de la resistencia a la penicilina se ha reportado variación en la secuencia de la PBP5, dichas variaciones se reportan como consecuencia de mutaciones, sin embargo, aún no se ha

logrado correlacionar la variación de la secuencia con la resistencia y/o sensibilidad a la ampicilina.<sup>12,38</sup> Otro mecanismo descrito en el género *Enterococcus* que está relacionado con la resistencia a la ampicilina, es la presencia de una  $\beta$  - lactamasa, la cual está codificada por un operón que contiene los genes *blaZ*, *blaI* y *blaR* que codifican para betalactamasas y que se producen ante la presencia de betalactámicos.<sup>18,38</sup> Además del mecanismo de resistencia antimicrobiana previamente descrito, se reporta un mecanismo de resistencia a la ampicilina, el cual consiste en la L,D - transpeptidación y en el que hay un cambio de una D,D – transpeptidasa a una L,D – transpeptidasa, lo que evita el funcionamiento de los betalactámicos y mantiene intacta la formación de la pared celular.<sup>12,38</sup>

**Aminoglucósidos:** La resistencia moderada de *Enterococcus* a los aminoglucósidos, es considerada intrínseca.<sup>12</sup> Uno de los mecanismos, es por la metilación de la subunidad 30S del 16rRNA, ya que se han encontrado especies de Efm que codifican para una rRNA metiltransferasa que metila la subunidad 30S. Al metilar la subunidad 30S, altera el sitio de unión con el aminoglucósido otorgándole resistencia a kanamicina y tobramicina. Otro mecanismo reportado es la producción de 6'-N- aminoglucósido acetyltransferasa (*aac(6')*-II), que modifica al aminoglucósido cuando ingresa a la célula añadiendo un grupo acetilo, lo que afecta el funcionamiento de la tobramicina, sisomicina, kanamicina y netilmicina. Otro mecanismo es el que lleva a cabo la enzima APH (3')-IIIa, que tiene habilidad de fosfotransferasa y de igual forma altera la estructura de la kanamicina y amikacina.<sup>12,38</sup>

Los altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos es una forma de hacer referencia a la resistencia de la sinergia de aminoglucósidos, como la gentamicina y estreptomicina, con  $\beta$ -lactámicos.<sup>38</sup> Se ha reportado que los niveles altos de resistencia a los aminoglucósidos se deben a la adquisición de elementos genéticos móviles (EGM) que contienen enzimas que modifican a los aminoglucósidos, como las fosfotransferasas, acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas.<sup>12,38</sup> Se reportan con mayor frecuencia miembros de la familia de las fosfotransferasas como APH (2'')-I o enzimas con doble función como las de la familia acetiltransferasas – fosfotransferasas como AAC (6') – Ie – APH (2'') – Ia, la cual se ha reportado en diferentes transposones y plásmidos y que otorga resistencia a todos los aminoglucósidos excepto a la estreptomicina.<sup>12,38,39</sup>

**Daptomicina:** La daptomicina es un antibiótico lipopéptido que se terminó de desarrollar y fue aprobado para su uso a inicios del siglo XXI.<sup>40,41</sup> Su mecanismo de acción consiste en formar canales iónicos en la membrana celular alterando el potencial de membrana lo que impide que se sigan llevando a cabo ciertos procesos celulares lo que induce a lisis celular.<sup>40</sup> Se han reportado tres genes que intervienen en la resistencia a la daptomicina en *Enterococcus*, los cuales son miembros de un sistema regulador de tres componentes que controla la homeostasis de la envoltura celular y se conoce como sistema LiaFSR.<sup>38,41</sup> En el caso específico de Efm se ha propuesto dos mecanismos de resistencia a la daptomicina, el primero llevado a cabo por el sistema LiaFSR y el sistema YycFGHIJ, que parece tener un mecanismo de repulsión del antibiótico, parecido a *S. aureus* y el segundo mecanismo es llevado a cabo por enzimas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos que se encargan de la modificación de la membrana.<sup>38,41–43</sup> En el caso de las enzimas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos se



encuentran *cls* y *cfa*, que se proponen como .<sup>38</sup> Los estudios publicados al respecto, reportan que dichos genes presentan mutaciones.<sup>12,38,41,42</sup> Actualmente se sigue estudiando los mecanismo de resistencia desarrollados por Efm a la daptomicina.<sup>41,42</sup>

**Rifampicina:** La rifampicina es un antimicrobiano que se usa comúnmente en pacientes infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo, aunque no se usa con regularidad en infecciones causadas por el género *Enterococcus*, frecuentemente se encuentran cepas con resistencia a la rifampicina.<sup>12</sup> Tomando en cuenta que la rifampicina actúa uniéndose a la RNA polimerasa para inhibir su función, se ha identificado que el mecanismo de resistencia a la rifampicina consiste en la sustitución de bases en el gen de la RNA polimerasa (*rpoB*) evitando así la unión de la rifampicina con la RNA polimerasa.<sup>12,38</sup> Se ha reportado que la mutación específica en *rpoB* (H486Y), también confiere resistencia a las cefalosporinas sin alterar el funcionamiento de otros antibióticos similares como la ampicilina o la vancomicina.<sup>12,38</sup>

**Quinolonas:** El mecanismo de acción de las quinolonas se da por la inhibición de dos enzimas importantes para la replicación bacteriana: la ADN girasa y la topoisomerasa IV.<sup>12,18,38</sup> Actualmente, se sabe en el caso del género *Enterococcus*, se presentan mutaciones en ambas enzimas, lo cual dificulta que se lleve a cabo la acción de las quinolonas. Las mutaciones se presentan principalmente en los genes *gyrA* y *parC*.<sup>12,18,38</sup> Otro mecanismo de resistencia a las quinolonas que se ha descrito en *Enterococcus* son las bombas de eflujo *EmeA*, el cual es un homólogo de la bomba de eflujo en *S. aureus*.<sup>12,18</sup>

**Macrólidos, estreptograminas y lincosamidas:** Existen antimicrobianos que comparten el mismo mecanismo de acción, como las estreptograminas, las lincosamidas y los macrólidos, que se unen a la subunidad 50S del ribosoma para inhibir la síntesis de proteínas.<sup>12</sup> En la práctica clínica, normalmente no se usan lincosamidas ni macrólidos para las infecciones causadas por el género *Enterococcus*, sin embargo, la resistencia a éstos se ha diseminado.<sup>12,36,42</sup> Diversos estudios han reportado que el uso indiscriminado de macrólidos y lincosamidas en el ámbito veterinario pudo haber causado la selección de cepas de *Enterococcus* resistentes y su diseminación de cepas de animales a humanos.<sup>44,45</sup> El mecanismo de resistencia a los macrólidos que más se ha reportado es la producción de una metilasa que afecta a la subunidad 50S y reduce la capacidad de unión con los macrólidos, el gen responsable de la producción de dicha enzima y que se ha identificado en cepas de Efm es *ermB*.<sup>12,38,44</sup> En cuanto a la resistencia a las lincosamidas, se ha reportado que el mismo mecanismo de resistencia afecta la unión de las lincosamidas a la subunidad 50S.<sup>12,44</sup> En el caso de las estreptograminas, son una combinación de una estreptogramina A (dalfopristina) y una estreptogramina B (quinupristina), dicha combinación ha demostrado ser eficaz para tratar las infecciones causadas por Efm.<sup>38</sup> El mecanismo de resistencia que ha adquirido Efm ante el uso de las estreptograminas es por medio de una familia de acetiltransferasas que se encarga de acetilar a la dalfopristina y que es codificada por el gen *vatD*, aunque también se ha encontrado la presencia del gen *vatE*, el cual presenta la misma acción.<sup>12,38,44,45</sup> Mientras que la resistencia a la quinupristina se lleva a cabo mediante una hidrolasa que inactiva al antibiótico, dicha hidrolasa es codificada por el gen *vgbA*.<sup>38,44</sup>

**Linezolid:** Dentro de la familia de las oxazolidinonas se encuentra el linezolid, un antibiótico desarrollado para combatir las infecciones causadas por bacterias Grampositivas multidrogo resistentes.<sup>12,18</sup> El mecanismo de acción del linezolid se lleva cabo por medio de la unión de 23s rRNA, lo que detiene la síntesis de proteínas<sup>12,38</sup>, sin embargo, *Enterococcus* ha adquirido un mecanismo de resistencia al linezolid. El mecanismo de resistencia que se ha descrito principalmente en Efm, es la mutación de genes que codifican 23S rRNA.<sup>12,18,22,38</sup> Se ha identificado que en el caso de Efm, el mecanismo de resistencia anteriormente mencionado está relacionado con la adquisición por medio de EGM's de los genes *cfrB* y *cfrD*, los cuales codifican para una metilasa que actúa en el 23S rRNA, lo cual disminuye la afinidad de unión con el linezolid.<sup>18,22,38</sup> Diversos estudios refieren que entre más mutaciones se presenten en los genes que codifican para 23S rRNA, mayor es el grado de resistencia al linezolid.<sup>12,18,38</sup>

**Trimetoprim/Sulfametoxazol:** La combinación del trimetoprim con sulfonamidas se utiliza como sinergia para diferentes tipos de infecciones, principalmente para microorganismos Gramnegativos, sin embargo, también se ha llegado a utilizar en Grampositivos.<sup>46</sup> El trimetoprim/sulfametoxazol inhibe la formación de dihidrofolato, el cual es un componente que se utiliza en diferentes funciones celular y principalmente para la formación de ADN.<sup>38,46</sup> Se han reportado diferentes mecanismos de resistencia a este antibiótico, sin embargo, parece que en el caso de *Enterococcus*, más que adquirir uno de estos mecanismos de resistencia, *Enterococcus* es capaz de adquirir dihidrofolato por vías alternas, lo que ocasiona que siga llevando su crecimiento normal a pesar de utilizar el antibiótico. Lo anterior se concluye debido a que en diversos estudios se ha encontrado que, manteniendo un ambiente controlado *in vitro*,

*Enterococcus* es susceptible al trimetoprim/sufametoxazol, sin embargo, al realizar diferentes pruebas *in vivo*, no se cumple esa regla.<sup>38,47,48</sup> En un estudio no notaron diferencia en la tasa de crecimiento de *Enterococcus* con el uso de trimetoprim/sulfametoxazol y sin antibiótico.<sup>47</sup>

**Tigeciclina y tetraciclinas:** Otro grupo de antimicrobianos que se han utilizado en las infecciones causadas por *Enterococcus*, son las tetraciclinas. Las tetraciclinas tienen como mecanismo de acción, la unión con el aminoacyl – tRNA de la subunidad 30 S, lo que inhibe la síntesis de proteínas.<sup>38,49</sup> Los mecanismos de resistencia que se han reportado en Efm son una bomba de eflujo, codificada por los genes *tet (K)* y *tet (L)*; y la protección ribosomal codificada por los genes *tet (M)*, *tet (O)* y *tet (S)*.<sup>18,22,38,50,51</sup> En el caso de la bomba de eflujo, se sabe que es una bomba transmembranal que hace un intercambio de la tetraciclina en contra del gradiente de concentración y que mantiene los niveles intracelulares de tetraciclinas que no interfiere con la síntesis de proteínas.<sup>51-54</sup> El segundo mecanismo de resistencia que presenta Efm, tiene que ver con la protección ribosomal, dicho mecanismo se lleva a cabo por medio de una proteína GTPasa similar a factores de elongación G y Tu (EF – Tu y EF – G), la proteína se une al ribosoma bacteriano y promueve una alteración en la conformación del mismo, evitando su unión con la tetraciclina. Se sabe que los dos mecanismos de resistencia previamente mencionados se han diseminado a Efm debido a los EGM's como plásmidos y transposones (Tn).<sup>38,51,53,54</sup> Otra opción terapéutica utilizada en IACS causadas por Efm es la tigeciclina, la cual pertenece al grupo de gliciclinas, que son derivados sintéticos de la minociclina con acción de amplio espectro en contra de Gramnegativos y Grampositivos. La tigeciclina tiene el mismo mecanismo de acción que las tetraciclinas, sin embargo, se sabe que no es susceptible al mecanismo de resistencia a las

tetraciclinas que incluyen las proteínas Tet(M) y Tet(L). En los últimos años se han reportado cepas de Efm que han presentado resistencia a la tigeciclina.<sup>12,22</sup>

**Glucopéptidos:** Una de las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por microorganismos grampositivos, son los glucopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina. Las infecciones causadas por microorganismos gramnegativos no son contempladas para ser tratadas con glucopéptidos, debido a que el mecanismo de acción se lleva a cabo en la pared bacteriana y en el caso de los gramnegativos, presentan una membrana externa que protege la pared bacteriana. El mecanismo de acción de los glucopéptidos radica en inhibir la formación de la pared bacteriana formando complejos con los extremos precursores del peptidoglicano D – Ala – D – Ala. El mecanismo de resistencia a los glucopéptidos que se lleva a cabo en estos microorganismos se da por medio de la modificación del blanco, es decir, de los precursores del peptidoglicano, los precursores de la pared bacteriana se modifican de D – Ala – D – Ala a D – Ala – D -Lac o por D – Ala – D – Ser, lo que reduce la afinidad del antimicrobiano y así la bacteria es capaz de formar su pared bacteriana.<sup>12,18,22,55</sup>

El mecanismo de resistencia a los glucopéptidos ha sido muy bien estudiado, sin embargo, para que se lleve a cabo es necesario un grupo de genes (operón) codificados por elementos genéticos móviles (EGM). Por si fuera poco, existen diferentes tipos de operones que confieren resistencia a los glucopéptidos. Estos operones difieren entre ellos por la ubicación dentro del genoma bacteriano, por la resistencia que confieren a los diferentes glucopéptidos (vancomicina y

teicoplanina), el nivel de resistencia (constitutiva o inducible) y el tipo de precursor que producen.<sup>12</sup> Las diferentes funciones que presentan los genes de estos operones van desde<sup>12,18,22</sup>:

1. La función de detectar a la presencia de glucopeptidos
2. Producir los sustitutos D – Lac o D – Ser
3. Producir las enzimas que modifican los extremos de los precursores de la pared
4. Producir las ligasas que incorporan los extremos modificados a los precursores
5. La producción de las carboxipeptidasas que eliminan todos los extremos no modificados del peptidoglicano

Debido a que hay varios operones que codifican para la resistencia a la vancomicina y que difieren en la expresión de la resistencia, se ha catalogado cada operón como genotipo de resistencia a la vancomicina, y el nombre asignado depende de la ligasa que cada operón contiene; de esta forma se han identificado los genotipos de resistencia a la vancomicina VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM y VanN. Los genotipos de resistencia más frecuentemente encontrados en los aislamientos clínicos son VanA y VanB.<sup>12,18,22</sup> Los operones que sustituyen D – Ala por D – Lac son VanA, VanB, VanD y VanM, mientras que los operones que sustituyen D – Ala por D – Ser son VanC, VanE, VanG, VanL y VanN. Se sabe que los genotipos de resistencia que codifican para terminaciones D- Ser, confieren resistencia a la vancomicina en niveles bajos, pero son susceptibles a la teicoplanina.<sup>18,22,25</sup> Mientras que el genotipo de resistencia VanA confiere una alta resistencia a la vancomicina y teicoplanina. En el caso del genotipo de resistencia VanB, no es inducible con la presencia a la teicoplanina, por lo que presenta alta resistencia a la vancomicina y permanece susceptible a la teicoplanina.<sup>18,22</sup>

Además del uso de antimicrobianos, conviene resaltar que, como parte del control de la diseminación de microorganismos como Efm dentro del ámbito hospitalario, se recomienda el uso de biocidas para limpieza de superficies. Sin embargo, estudios recientes revelaron el incremento a la tolerancia de Efm a antisépticos y desinfectantes comúnmente utilizados en hospitales como la clorhexidina e isopropanolol.<sup>18,25,37,56</sup> Tanto en Efs como en Efm se ha encontrado una asociación a mecanismos protectores de estrés cuando hay presencia de concentraciones subletales de éstos componentes, incluyendo una errónea aplicación o presencia de residuos biocidas en el ambiente.<sup>18</sup> La respuesta al estrés por exposición tanto a los antimicrobianos como a los biocidas esta mediada por pequeños RNAs (Small RNA's - sRNAs) que se producen en condiciones específicas como la exposición a biocidas y que regula la expresión de genes específicos que inducen la tolerancia a biocidas.<sup>18,57</sup>

### IACS causadas por Efm

Como ya se mencionó anteriormente, las IACS son un problema de salud a nivel mundial. Se sabe que Efm puede causar diferentes tipos de infecciones en pacientes inmunosuprimidos, debido a que es capaz de colonizar diferentes regiones del cuerpo humano.<sup>12,36,58</sup> Para el 2017, se reportó en un estudio realizado en EUA, que las infecciones por *Enterococcus* ocupaban el 2do lugar en infecciones nosocomiales, después de *Staphylococcus*.<sup>36</sup> Efm se ha relacionado con infecciones intraabdominales, pélvicas y de tejidos blandos; provocando en algunos casos, abscesos, úlceras y peritonitis.<sup>12,36</sup> Otro tipo de infecciones que Efm puede provocar, son las infecciones del tracto urinario<sup>35</sup>; desde las infecciones de vías urinarias bajas hasta cistitis, prostatitis y

epididimitis.<sup>12,36,59</sup> Las infecciones poco comunes que se han reportado a causa de Efm son meningitis, neumonía, artritis séptica y osteomielitis hematógena.<sup>12,36</sup> Una de las IACS más frecuentemente reportadas son las bacteriemias<sup>12,16,36,58</sup>, la cual en muchos de los casos, es el resultado de la translocación del intestino al torrente sanguíneo.<sup>58</sup> La bacteriemia puede tener como origen las infecciones de tracto urinario, intraabdominal, de tejidos blandos o por contaminación de un catéter central. Otra infección muy común causada por Efm es la endocarditis, siendo una de las IACS más importantes además de la bacteriemia.<sup>12,58,60,61</sup> En la última década se estudió el genoma de 51 aislamientos de Efm provenientes de diversos nichos, de cinco continentes, obtenidos desde 1951 al 2010 y con diferentes ST. Se obtuvo un árbol filogenético basado en los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y se logró diferenciar dos clados o linajes; el clado A representado en su mayoría por aislamientos clínicos humanos y el clado B que contenía aislamientos asociados a la comunidad. Adicionalmente se identificaron los subclados A1 que contenía en su mayoría cepas epidémicas hospitalarias y que incluía al CC17 que se ha identificado como el principal causante de la mayoría de las IACS a nivel mundial; y el clado A2 que contenía cepas no epidémicas junto con aislamientos de animales.<sup>62,63</sup>

### Tratamiento para infecciones causadas por Efm

El manejo de las infecciones causadas por Efm dependerá del tipo de infección que tenga el paciente y el uso previo de algún otro antimicrobiano. Se recomienda de primera instancia utilizar betalactámicos combinados con aminoglucósidos en cepas susceptibles; otra opción que genera menor nefro u ototoxicidad es la combinación de dos tipos de betalactámicos. En caso de presentar resistencia a la ampicilina u otros betalactámicos, se sugiere el uso de linezolid o



vancomicina. En caso de resistencia a la vancomicina, se recomienda el uso de linezolid o daptomicina, aunque en realidad, el único agente antimicrobiano aprobado por la FDA para cepas de *Enterococcus* vancomicina resistentes, es el linezolid.<sup>36</sup>

Además de los antimicrobianos mencionados, se están desarrollando otros antimicrobianos para el tratamiento de infecciones causadas por Efm. Los fármacos que se están desarrollando para el tratamiento contra Efm son: tedizolid, cadazolid, televancina, dalbavancina, oritavancina y la teixobactina. En el caso del tedizolid y cadazolid, pertenecen a las oxazolidinonas como el linezolid, por lo que comparten el mismo mecanismo de acción pero con la ventaja de que las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) son más bajas y tienen una vida media más larga, lo que facilita su administración en una sola dosis. La televancina, dalbavancina y oritavancina son lipoglicopéptidos semisintéticos que comparten el mismo mecanismo de acción que otros fármacos de su grupo, sin embargo, tienen la ventaja de que las MIC que se utilizan también son más bajas que la vancomicina y que su vida media es mayor, por lo que también permite su administración en monodosis. La teixobactina es un péptido natural que se une al lípido II del ácido teicoico de la pared celular, por lo que evita la formación de la misma causando la lisis celular. A pesar de ser antimicrobianos prometedores para el tratamiento de infecciones causadas por Efm, todavía se encuentran en estudio.<sup>42</sup>

Si bien el uso de antimicrobianos es una de las primeras opciones de tratamiento para las infecciones causadas por Efm, irónicamente también ha sido en gran parte uno de los factores que ha inducido el desarrollo de la resistencia a la terapia antimicrobiana. Por lo mencionado

anteriormente, en los últimos años se ha desarrollado la terapia con bacteriófagos para las bacterias que presentan multidrogorresistencia como Efm.<sup>64</sup> La terapia con bacteriófagos tiene la ventaja de desarrollar diferentes blancos de diferentes tipos de bacterias y en diferentes tipos de infecciones. Otra de las ventajas que se tiene con el uso de terapia con bacteriófagos es que se puede combinar con antimicrobianos, lo que facilita la eliminación de las bacterias patógenas.<sup>64</sup>

## ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

Efm es un microorganismo ubicuo que se ha convertido en un patógeno oportunista y en la actualidad sigue presentándose como un problema de salud a nivel global. En México las IACS causadas por Efm fueron incrementando en los últimos años. Una de las herramientas para la identificación de clonas de Efm causantes de IACS, es la tipificación molecular como MLST, la cual ha ayudado a identificar al CC17 como el principal causante de IACS. En México hay pocos referentes en la literatura sobre la genotipificación con MLST de brotes de IACS causadas por Efm. En nuestro grupo de investigación obtuvimos una colección de aislamientos provenientes de IACS causado por Efm del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), los cuales se tipificaron por MLST para identificar al CC al que pertenecía y así, comparar los aislamientos clínicos con aislamientos comensales de individuos sanos y de nichos ambientales.

## **HIPÓTESIS**

Los aislamientos clínicos de nuestra colección están cercanamente relacionados con el CC17, que se ha identificado como el principal causante de IN a nivel mundial, por lo tanto, los aislamientos clínicos deben presentar características específicas que los diferencien de los aislamientos comensales y ambientales

## **OBJETIVOS**

### **4.1 General**

Determinar las características de resistencia antimicrobiana y clonalidad de los aislamientos de Efm clínicos, ambientales y comensales.

### **4.2 Específicos**

- Identificar los aislamientos de la colección por métodos fenotípicos y genotípicos.
- Determinar el perfil de resistencia a los antimicrobianos de la colección de Efm.
- Determinar la relación genética de los aislamientos hospitalarios por PFGE.
- Investigar la presencia de genes que codifican para factores de virulencia en la colección de Efm.
- Indagar sobre la diferencia en el metabolismo de las cepas de la colección de Efm con los datos obtenidos de la identificación fenotípica.

- Asignar los ST y el CC al que pertenecen los aislamientos de la colección de Efm por medio de MLST
- Obtener la filogenia de los aislamientos de la colección de Efm.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Estrategia experimental**

El presente trabajo se realizó con un total de 60 cepas que se fueron recolectando a lo largo del proyecto. Las cepas son aislamientos clínicos, comensales y ambientales. Se utilizó la cepa ATCC *Enterococcus faecalis* 29212 como control negativo y como control positivo se utilizó la cepa Efm E155. Los aislamientos clínicos de muestras de pacientes de con bacteriemia de tres hospitales: del Instituto Nacional de Cancerología (N: 40, del 2009 al 2013), Hospital Infantil de México (N:1, 1999) y el Instituto de Enfermedades Respiratorias (N:1, 1999). Los aislamientos obtenidos del Instituto Nacional de Cancerología fueron de pequeños brotes intrahospitalarios. Los aislamientos ambientales se obtuvieron de muestras de plantas de tratamiento y canales de Xochimilco (N: 11, 2000 – 2001). Los aislamientos comensales, se obtuvieron de muestras de heces de individuos sanos (N:6, 2015). La descripción detallada de la colección de aislamientos utilizados en este proyecto se encuentra en el ANEXO A. En la figura 1 se muestra las características generales de la colección de cepas de Efm. En la Figura 2 se muestra la estrategia experimental del presente trabajo.

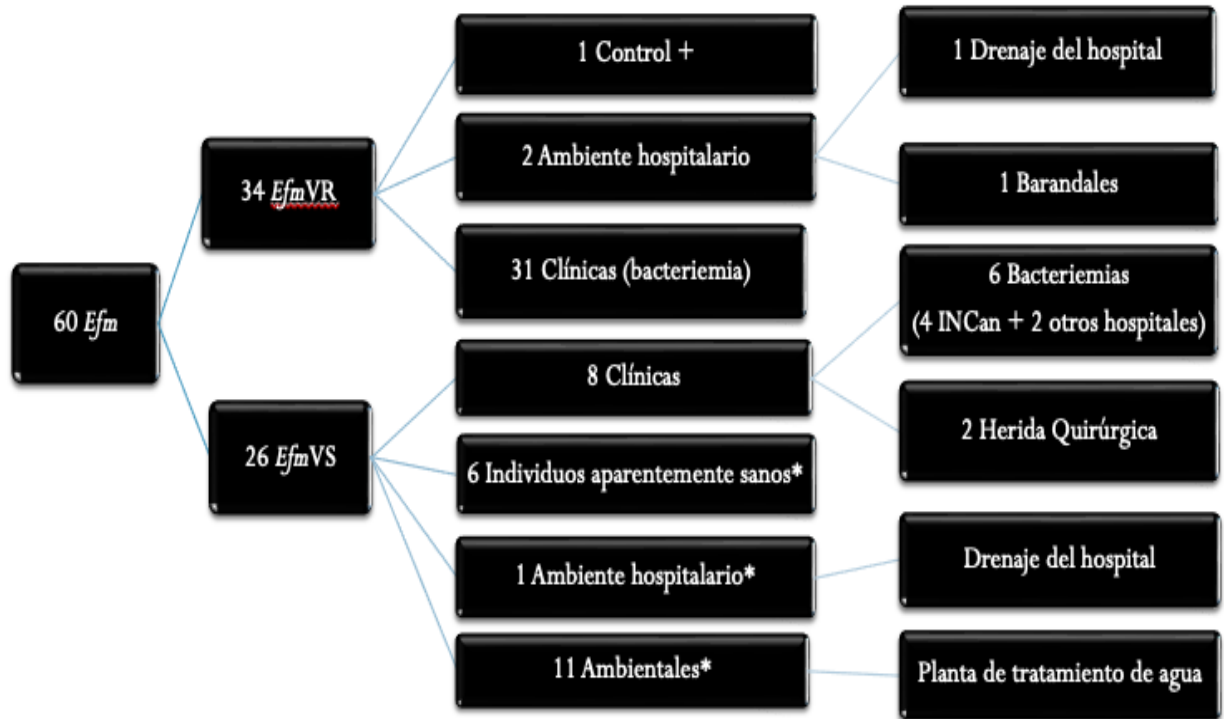


Figura 1. Características de la colección de Efm. \* Negativo para genotipo Van A

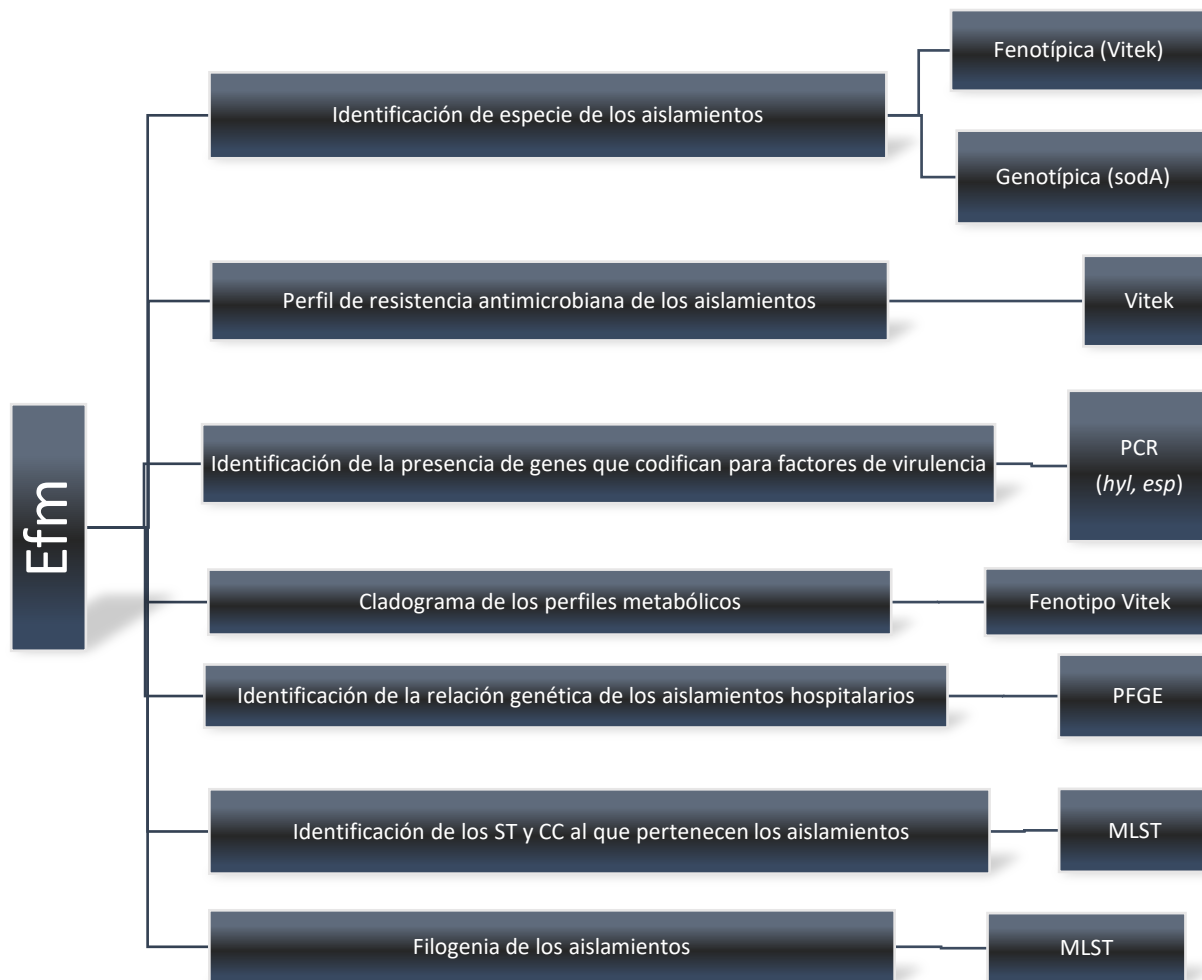


Figura 2. Estrategia experimental

### Almacenamiento de los aislamientos

Cada una de las cepas utilizadas en el presente trabajo fue purificada, es decir, cada cepa se sembró y se seleccionó sólo una colonia de la cual se obtuvo una cosecha en 5 mL de medio líquido Soya-Trypticaseína con glicerol 15% y se guardaron 250 µL en tubos eppendorf de 0.5 mL a -70 °C para utilizar cada tubo sólo una vez por cada técnica realizada.

## Identificación de especie de los aislamientos

La identificación de especie de los aislamientos se realizó por dos metodologías: una fenotípica y una genotípica. A continuación, se describen brevemente cada una de las metodologías.

### *Identificación fenotípica*

Cada cepa fue identificada fenotípicamente por el equipo automatizado Vitek 2 de acuerdo con las instrucciones del proveedor. A partir de un cultivo puro de 24 hrs en agar, se tomó suficiente muestra y se inoculó en 3 mL de solución salina al 0.45 %, se ajustó la turbidez a 0.5 de Mc Farland. Se colocó el tubo de transferencia de la tarjeta de identificación de especie a la suspensión, y se colocaron en el cassette del equipo. Se utilizaron las tarjetas para identificación de especie para grampositivos GP con el N° de referencia 21342. Los aislamientos que no pudieron identificarse claramente con Vitek 2, fueron procesadas por un equipo de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS).

### *Identificación genotípica*

Para confirmar la identificación fenotípica de especie, se realizó la identificación genotípica basado en la presencia del gen *sodA* para Efm. Para lo cual realizamos la extracción de ADN para grampositivos con el kit QIAmp DNA Mini de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Posteriormente se realizó el protocolo de PCR para identificación de especie del género *Enterococcus* con las condiciones establecidas en el laboratorio.<sup>65,66</sup> Para cada cepa se utilizó un

oligo del gen *sodA* para Efm (214 pb) y otro del gen *sodA* para Efs (360 pb). Posteriormente se realizó una electroforesis convencional para visualizar la presencia del producto de la amplificación para cada cepa. La descripción de las condiciones de las PCR, se encuentran en el ANEXO D – Metodología.

### Perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos

Para obtener el perfil de resistencia antimicrobiana, se utilizó el equipo automatizado Vitek 2 de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se utilizaron las tarjetas de AST-P577 con el N° de referencia 22218, las cuáles evalúan la susceptibilidad a los antimicrobianos comúnmente utilizados para las infecciones causadas por microorganismos Grampositivos.

Para complementar la información del perfil de resistencia y tener más datos sobre la resistencia a la vancomicina, buscamos la presencia de genes que codificaran el genotipo de resistencia a vancomicina. Debido a que los genotipos más frecuentes a nivel mundial son el genotipo A y el B, utilizamos un oligo para amplificar el gen *vanA* (732 pb) y otro para el gen *vanB* (635 pb), posteriormente realizamos una electroforesis convencional para visualizar los productos obtenidos. La amplificación de los genes mencionados se realizó con las condiciones previamente reportadas.<sup>67</sup>



### Identificación de genes de factores de virulencia

Para la identificación de los genes que codifican factores de virulencia en los aislamientos, se realizó PCR con los primers que codifican para el gen de hialuronidasa (*hyl*) de 661 pb y el gen de la proteína de superficie (*esp*) de 945 pb, ambos previamente reportados.<sup>34,35,68</sup> Posteriormente realizamos una electroforesis convencional para confirmar o descartar la presencia de dichos genes en cada uno de los aislamientos.

### Cladograma de los perfiles metabólicos

Para obtener los perfiles metabólicos, utilizamos la información obtenida de la identificación de especie con el equipo Vitek 2. Recopilamos los datos de los sustratos que utilizó cada cepa y posteriormente utilizamos el algoritmo Pars del programa PHYLIP ver. 3.695 para agrupar las cepas que tenían perfiles idénticos o similares.

### Identificación de la relación genética de los aislamientos hospitalarios

Para comenzar a establecer las relaciones genéticas de los aislamientos hospitalarios utilizamos la técnica de PFGE. El protocolo utilizado fue el establecido en el laboratorio.<sup>65</sup> De un cultivo puro en BHI de aprox 12 hrs se tomó 1 mL y se obtuvo una pastilla, se resuspendió cada muestra en 200  $\mu$ L de TE, se incubaron las muestras a 50 °C por 10 min, se agregó 10  $\mu$ L de lisozima (20 mg/mL) y 800  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión, se homogeneizó y se distribuyó aproximadamente 100  $\mu$ L por cada celda para formar bloques, los bloques de agarosa fueron

tratados con lisozima, proteinasa y lauril sarcosinato de Na para terminar la lisis, posteriormente se dejaron en restricción con la enzima SmaI, se realizaron lavados con TE y se colocaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión para realizar una electroforesis en campos pulsados por 24 h. Por último se tiñó el gel con BrEt y se visualizó en un fotodocumentador para obtener la imagen de cada gel. Por medio de software Gel Compare II vers. 6.6.11 se analizó cada imagen para obtener un perfil electroforético por cepa, la similitud de cada perfil se calculó con el coeficiente de Jaccard y se construyó un dendrograma mediante UPGMA.

#### Identificación de los ST y CC de cada cepa

Para la asignación de los ST y CC, se realizó la obtención de ADN de todas las cepas. Se seleccionaron los primers en el esquema de MLST para *Enterococcus faecium* de la página de PubMLST. Se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos internos de los genes seleccionados (*atpA*, *adk*, *pstS*, *gyd*, *gdh*, *purK*, *ddl*) de acuerdo con las condiciones reportadas por Homan *et al.* Verificamos la amplificación de los fragmentos por medio de una electroforesis convencional. Posteriormente purificamos los productos de PCR con el kit High Pure PCR Product Purification de Roche, al final se concentraron las muestras y se secuenciaron por el método Sanger en MacroGen Inc. Se realizó el análisis y ensamble de las secuencias con el software CLC Genomics Workbench 10<sup>a</sup> ed. Se compararon las secuencias obtenidas con la base de datos de PubMLST para asignar los ST. Para confirmar los alelos potencialmente nuevos, se clonaron los productos de PCR con el Clone JET PCR Cloning kit de Thermo Fisher y se secuenciaron en el Instituto de Biología y el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los alelos nuevos fueron reportados a la base de datos de PubMLST.

## Filogenia de los aislamientos

Para realizar la filogenia utilizamos los perfiles alélicos que se habían reportado hasta el 24 de septiembre del 2017. Excluimos los alelos y ST que tenían secuencias de inserción: 113 *pstS* y 72, 67 y 82 *ddl*; así como los ST: 1177, 998, 1180 y 1042. Concatenamos las secuencias y las alineamos con AliView. Analizamos las secuencias con SplitsTree 4 ver 4.14.5 para estimar la diversidad de los nucleótidos basada en los alelos y para detectar señales de recombinación por medio del estadístico de Phi. Excluimos los genes que tenían señales de recombinación y sólo trabajamos con las secuencias de los genes: *adk* *atpA*, *gyd* y *purK*. Utilizamos el software jModelTest ver 2.1.10 para obtener el modelo de sustitución de nucleótidos más apropiado y por último utilizamos el software PhyML ver. 3.1 para construir la filogenia de nuestra colección. Adicionalmente, utilizamos el software RaxML ver 8.2 para construir otra filogenia con las secuencias concatenadas de la base de datos de PubMLST que se encontraba hasta el 24 de septiembre del 2017. Los árboles se visualizaron con Fig Tree ver 1.4.3.

## RESULTADOS

### Identificación de especies

De los 60 aislamientos, 53 fueron identificados fenotípicamente de forma automatizada con Vitek 2.0. como Efm con un porcentaje de confiabilidad > 90%. Las siete cepas restantes (5 clínicas, 1 ambiental, 1 comensal) tuvieron una baja discriminación para la identificación y/o se identificaron como *Enterococcus faecalis*, por lo que utilizamos el sistema MALDI – TOF MS para terminar de realizar la identificación fenotípica y el número de cepas de la colección. Además de la

identificación fenotípica, también se llevó a cabo la identificación genotípica por medio de la búsqueda de la presencia del gen *sodA* para Efm y agregamos una cepa ATCC *Enterococcus faecalis* como control negativo. Como resultado final de la identificación genotípica, se logró identificar la presencia del gen *sodA* para Efm en las 60 cepas previamente seleccionadas con la identificación fenotípica.

### Perfil de resistencia antimicrobiana

Referente al perfil de resistencia antimicrobiana, como se menciona anteriormente, se llevó a cabo de forma automatizada por medio del sistema Vitek 2.0. Los gráficos de los resultados de acuerdo con grupo de estudio: aislamientos de origen hospitalario, ambientales o comensales se encuentran en el Anexo C. La tabla con los perfiles de resistencia de toda la colección de Efm se encuentra en el Anexo A (Tabla 5). A continuación, se describen brevemente los resultados en porcentajes de aislamientos resistentes o susceptibles:

- Toda la colección presentó resistencia fenotípica a la clindamicina y al trimetoprim/sulfametoxazol.
- El 65% (N:39) de la colección de Efm presentó resistencia a la ampicilina, todos los aislamientos resistentes fueron de origen hospitalario.
- El 61.6% (N:37) de los aislamientos presentaron resistencia a la sinergia con gentamicina y el 68.3% (N:41) resistencia a la sinergia con estreptomina.
- El 68.3% (N: 41) presentó resistencia a las quinolonas como la ciprofloxacina y moxifloxacina, mientras que el 65% (N:39) presentó resistencia a la levofloxacina.

- El 90% (N:54) presentó resistencia a la eritromicina.
- Se reportó resistencia a las estreptograminas en 15% (N:9) de los aislamientos de la colección, los cuales fueron de origen clínico.
- Sólo el 1.6% (N: 1) de la colección demostró resistencia intermedia a linezolid y fue un aislamiento de origen clínico.
- Referente a la resistencia a las tetraciclinas, el 35% (N:21) de los aislamientos presentaron resistencia tanto a la tetraciclina como a la minociclina.
- El 55% (N:33) de los aislamientos presentaron resistencia a la nitrofurantoína, de los cuáles, seis fueron de una alta resistencia, mientras que 23 presentaron resistencia intermedia.
- La resistencia a la teicoplanina, se reportó en el 55% (N:33) de los aislamientos, entre ellos, un aislamiento de ambiente hospitalario y 32 aislamientos clínicos.
- El 60% (N:36%) de los aislamientos presentaron resistencia a la vancomicina y todos eran de origen hospitalario.
- Los 36 aislamientos resistentes a vancomicina presentaron un genotipo de resistencia a vancomicina VanA, sin embargo tres aislamientos presentaron un fenotipo VanB.
- Referente al genotipo de resistencia a vancomicina, se demostró que 42 aislamientos presentaban el genotipo de resistencia a vancomicina VanA, de los cuales 40 eran aislamientos clínicos y dos de ambiente hospitalario. Además, identificamos que seis aislamientos que tenían un genotipo de resistencia a la vancomicina VanA, eran fenotípicamente susceptibles a vancomicina.

Referente a los aislamientos ambientales y comensales los resultados más relevantes fueron los siguientes:

- El 100% de los aislamientos presentaron susceptibilidad a la ampicilina, a la sinergia con gentamicina, a las estreptograminas, linezolid y a los glucopéptidos.
- Además de la resistencia antimicrobiana que presentaron los aislamientos ambientales y comensales a la clindamicina y al trimetoprim/sulfametoxazol, también presentaron a la eritromicina (8 ambientales, 6 comensales), seguida de las quinolonas como la levofloxacina y moxifloxacina (1 ambiental, 3 comensales).
- Los antimicrobianos a los que las cepas ambientales y comensales presentaron resistencia en menor proporción fueron nitrofurantoína, tetraciclina, minociclina, ciprofloxacina y la sinergia con estreptomina.

Encontramos una diferencia evidente entre el perfil de resistencia de los aislamientos de origen hospitalario y los aislamientos ambientales y comensales. Los primeros, presentaron un perfil de resistencia extendido, mientras que los segundos, su perfil de resistencia era muy bajo. Se hizo la prueba de  $X^2$  para probar la independencia entre el origen de los aislamientos y el perfil de resistencia antimicrobiana, la cual arrojó un valor de p de 0.0004. Para confirmar lo obtenido por  $X^2$ , se realizó el coeficiente de contingencia en el que obtuvimos un valor de 0.56. Lo anterior confirma la relación que existe entre el perfil de resistencia antimicrobiana que presentan los aislamientos y su origen.

## Presencia de factores de virulencia

La presencia de los genes que codifican para los factores de virulencia *hyl* y *esp*, quedaron de la siguiente forma: 52 aislamientos presentaron el gen *esp*, de los cuáles 38/39 aislamientos clínicos, 3/3 del ambiente hospitalario, 6/11 aislamientos ambientales y 5/6 aislamientos comensales. Mientras que la presencia del gen *hyl* se encontró en 42 aislamientos: 34/39 aislamientos clínicos, 2/3 ambiente hospitalario, 3 aislamientos ambientales y 3 aislamientos comensales. Al realizar la prueba de  $X^2$  obtuvimos un valor de p de 0.84 y en el coeficiente de contingencia un valor de 0.09, por lo que podemos concluir que no existe una asociación significativa entre a la presencia de genes que codifican para factores de virulencia y el origen de los aislamientos.

## Perfil metabólico

El perfil metabólico lo obtuvimos de forma automatizada por el sistema Vitek 2.0, el cual otorga un número al final del análisis de cada aislamiento. El número obtenido fue llamado “perfil metabólico”, y con base a eso observamos que en la colección había 47 diferentes perfiles metabólicos. Con los perfiles obtenidos, obtuvimos un cladograma utilizando un criterio de parsimonia basado en la habilidad para utilizar los diferentes sustratos incluidos en las tarjetas para Grampositivos del sistema Vitek 2.0. El cladograma obtenido con los criterios mencionados (Figura 3), muestra dos cladogramas principales, el clado “A” que contiene aislamientos clínicos y un aislamiento del ambiente hospitalario y el clado B, que a su vez se divide en dos cladogramas principales y que para fines didácticos se nombraron “B1” y “B2”. El clado B1 es exclusivo de aislamientos clínicos, mientras que el clado B2 contiene todos los aislamientos ambientales y comensales, además de algunos aislamientos de origen hospitalario. Una de las principales diferencias entre

los clados B1 y B2 es que ninguno de los aislamientos del clado B2 fue capaz de utilizar el ácido glucorónico como fuente de carbono.

### Relación genética de los aislamientos por PFGE

Pudimos determinar la relación genética de treinta y tres aislamientos de Efm de origen hospitalario. Obtuvimos un perfil electroforético diferente por cada aislamiento, por lo que en total fueron treinta y tres perfiles electroforéticos. Obtuvimos un dendrograma por UPGMA, el cual fue analizado con los criterios de Tenover para identificar la probabilidad de relación genética entre los aislamientos, tomando en cuenta que 100%: clonal, 99% -75%: estrechamente relacionados, 74% - 51%: probablemente relacionados, = o < 50%: no relacionados.<sup>69</sup> Con el dendrograma logramos identificar ocho aislamientos hospitalarios probablemente relacionados, el resto de los aislamientos no tenían relación de acuerdo a los criterios de Tenover *et al*, lo que confirma que el brote hospitalario del cual provenían las cepas analizadas por PFGE, era un brote policlonal. El porcentaje de similitud que se presentó fue de 55.6% entre los aislamientos Efm3 y Efm33, 57.1% entre los aislamientos 30 y 31, 63.6% entre los aislamientos Efm 38 y Efm39 y de 66.7% entre los aislamientos Efm 25 y 28. También es importante resaltar que todos los aislamientos que tenían una probable relación provenían de bacteriemias, además de que sólo un aislamiento era susceptible a la vancomicina (Efm 3), los otros siete aislamientos presentaron resistencia a la vancomicina. Sólo dos cepas tuvieron dos años de diferencia de su aislamiento y son las que presentaron menor porcentaje de similitud (55.6%), los otros 3 pares de cepas se aislaron en el mismo año con diferencia de días y algunas con diferencia de meses.



## Tipificación por secuencia Multilocus

Hicimos la genotipificación de la colección de Efm por medio de MLST con base al esquema publicado por Homan *et al.*<sup>70</sup> Adicionalmente, comparamos nuestros resultados con la base de datos publicada en la base de datos de PubMLST. Con base a los datos obtenidos, encontramos que nuestra colección es altamente diversa ya que pudimos genotipificar 34 diferentes tipos de secuencia (Sequence typing – ST). De los 34 ST, reportamos 20 ST nuevos (1303 – 1320, 1332, 1337) y 14 ST ya se habían descrito con anterioridad. De las 60 cepas de nuestra colección, 28 fueron asignadas a los 20 ST nuevos (ST 1313 – 1320, 1337) y dentro de éstos, nueve fueron reportados con un alelo nuevo (ST 1313 – 1320, 1337), mientras que el resto sólo presentó una combinación diferente de alelos previamente reportados. De los 40 aislamientos clínicos de la colección, sólo un 42.5% (N:18) fueron asignados al complejo clonal 17 (CC17). En la Tabla 1 se describen los ST's identificados en nuestra colección de acuerdo con el tipo de aislamiento. También encontramos que en la colección predominaron algunos ST's: 412 (N:6), 757 (N:8), 770 (N:6) y 1304 (N:8). Adicionalmente, encontramos que dos de los tres aislamientos del ambiente hospitalario, estaban relacionados con el CC17, sin embargo, el otro aislamiento del ambiente hospitalario y 11 aislamientos clínicos no estaban relacionados con el CC17. Es importante resaltar que ninguno de los aislamientos ambientales y comensales se relacionó con el CC17 y ocho de los aislamientos ambientales fueron reportados como nuevos ST's (1307 – 1310, 1316 – 1319). Referente a los aislamientos comensales, cuatro de ellos se reportaron como nuevos ST's (1311, 1312, 1320, 1332) y los dos restantes se asignaron a ST's previamente descritos. Tomando en cuenta que el número de aislamientos fue pequeño, podemos considerar que hubo una gran

variedad de ST's en la colección, lo cual corrobora los hallazgos reportados previamente en el trabajo realizado por Alatorre *et al.*<sup>71</sup>

Tabla 1. ST's reportados en la colección de Efm. \*ST que pertenecen al CC17

Aislamientos hospitalarios	Aislamientos Ambientales	Aislamientos comensales
18*	94	29
64*	218	854
92	971	1311
205*	1307	1312
412*	1308	1320
757	1309	1332
770*	1310	
775	1316	
893	1317	
1303	1318	
1304	1319	
1305		
1306		
1313*		
1314*		
1315		
1337		

### Análisis filogenético

Para evaluar la relación genética existente entre las cepas de la colección, se construyeron dos árboles filogenéticos con las secuencias de los genes utilizados en MLST que no presentaron señales de recombinación, los cuáles fueron: *adk*, *atpA*, *gyd* y *purK*. Uno de los árboles se construyó con todas las secuencias de los genes reportados en la base de datos de PubMLST y el

segundo árbol se construyó usando las secuencias de nuestra colección. El análisis del 1er árbol mostró que los aislamientos de nuestra colección se distribuyen en todo el árbol filogenético (Figura 4). Podemos resaltar que los ST's que reportamos como nuevos no se agruparon. Sin embargo, la mayoría de los aislamientos comensales y ambientales se agruparon en un extremo del árbol, mientras que la mayoría de los aislamientos de origen hospitalarios se localizaron en el otro extremo del árbol. De igual forma, tampoco se agruparon los ST's pertenecientes al CC17 que encontramos en nuestra colección.

El segundo árbol demostró que los aislamientos de nuestra colección se distribuyeron en dos clados principales, el clado A que incluía 4 aislamientos clínicos en tres ST's, mientras que el clado B contenía el resto de aislamientos clínicos, los aislamientos ambientales y comensales. El clado B se subdividía a su vez en dos, el clado B1 tenía la mayoría de los aislamientos comensales y ambientales, mientras que el clado B2 contenía la mayoría de los aislamientos clínicos. Sin embargo, algo que vale la pena resaltar es que los aislamientos clínicos que estaban asignados al ST 412 y que forman parte del CC17, se encontraban en el clado B1 con junto con un aislamiento de ambiente hospitalario que fue asignado al ST 92 (Figura 5).

En el clado B2 se encontraron el resto de los aislamientos de origen hospitalario junto con un aislamiento comensal asignado al ST 1332, el cual parece estar cercanamente relacionado con los aislamientos clínicos que correspondían al ST 1314 y 1315.

En resumen, nuestro análisis filogenético demostró que los aislamientos de México son diversos independientemente del origen clínico, ambiental o comensal.

## DISCUSIÓN

Efm es un microorganismo de importancia clínica relacionado con infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos, sin embargo, ha llegado a ser un importante patógeno oportunista nosocomial que ha obtenido resistencia a la vancomicina. Además, Efm posee algunas características que le han permitido sobrevivir y prosperar en el ambiente hospitalario como la habilidad de permanecer por periodos prolongados de tiempo en objetos inanimados y la habilidad de adquirir determinantes de resistencia antimicrobiana, colonizar piel y tracto intestinal.<sup>12,22,36</sup>

En el cladograma que construimos (Figura 3) con el perfil metabólico de los aislamientos de la colección, encontramos que los aislamientos comensales y ambientales está localizados en un clado diferente a la mayoría de los aislamientos clínicos. Como se mencionó previamente, la diferencia crítica entre sendos clados es que todas los aislamientos comensales y ambientales fueron incapaces de utilizar el ácido glucorónico como fuente de carbono a diferencia de varios de los aislamientos clínicos. Esta observación, sugiere que la detección cromogénica de la beta – glucoronidasa podría ser un criterio relevante para distinguir la mayoría de los aislamientos clínicos de los ambientales. Ésta prueba ha sido de utilidad para la caracterización de algunos

microorganismos como *Escherichia coli*, especies de *Salmonella* y algunas cepas de *Clostridium* y *Staphylococcus*.<sup>72-75</sup> Es importante resaltar que la capacidad de utilizar diferentes fuentes de carbono otorga a las bacterias ventajas que incrementan la supervivencia de las mismas.<sup>76,77</sup> La  $\beta$ -glucuronidasa se ha asociado con la disociación de la sustancia intercelular del tejido conectivo del huésped.<sup>72,73</sup> Es importante mencionar que, aunque la presencia de la  $\beta$ -glucuronidasa no es considerado un factor de virulencia, algunos estudios han sido capaces de diferenciar las cepas patógenas con la positividad de la prueba.<sup>74,75</sup> Otro dato importante sobre la glucuronidasa es que éstas enzimas al remover el ácido glucorónico, liberan a la luz intestinal las moléculas originales, lo que incrementa la actividad y toxicidad de varios medicamentos y xenobióticos (como fármacos quimioterapéuticos), promoviendo el daño de la mucosa intestinal.<sup>76,77</sup>

La resistencia antimicrobiana es otro aspecto fundamental en Efm; en este estudio, observamos una clara diferencia entre los perfiles de resistencia de los aislamientos hospitalarios comparados con los aislamientos comensales y ambientales (Tabla 5). En general, los aislamientos hospitalarios fueron resistentes a un amplio rango de antimicrobianos, a diferencia del resto de los aislamientos. Todos los aislamientos de la colección fueron resistentes a la clindamicina y trimetoprima/sulfametoxazol. Esta observación es consistente con otros reportes que indican que Efm presenta resistencia intrínseca a estos dos antibióticos, independientemente del origen de aislamiento.<sup>12,17</sup>

El análisis de los brotes hospitalarios causados por Efm, frecuentemente muestra que son brotes policlonales, por lo que es difícil identificar el origen del brote nosocomial.<sup>32,71,78-82</sup> Nosotros

estudiamos los aislamientos de un mismo brote nosocomial, los aislamientos los obtuvimos de pacientes con neoplasias hematológicas y tratados con quimioterapia altamente mielosupresora. Algunos de estos aislamientos (N:33) fueron genotipificados con PFGE y demostramos que el brote nosocomial era policlonal.<sup>71</sup> Para elucidar el posible origen de los aislamientos, genotipificamos a la colección de Efm con el esquema de MLST aumentando la colección a 43 aislamientos de origen hospitalario y agregando aislamientos de origen ambiental y comensal. Con este análisis, pudimos notar la diversidad de nuestra colección. De los 60 aislamientos analizados en este trabajo, identificamos 34 ST's diferentes, incluyendo 20 nuevos ST's. Cabe mencionar que la mayoría de los nuevos ST's fueron asignados a aislamientos comensales y ambientales. De los aislamientos hospitalarios, sólo 17 se asociaron con el CC17. Dentro de los resultados obtenidos, logramos identificar 2 ST's predominantes en nuestra colección y probablemente endémico de México, ya que de acuerdo con la base de datos de PubMLST, sólo se han reportado en aislamientos procedentes de pacientes mexicanos y éste es el 2do trabajo que reporta la asignación de los 757 y 770 ST's.<sup>35,83</sup>

El análisis filogenético del árbol filogenético reveló dos pequeños clados que unen los aislamientos comensales y/o ambientales con los aislamientos nosocomiales. El primer clado incluye seis aislamientos clínicos que corresponden al ST 412 y que pertenece al CC17, dos aislamientos ambientales (ST 1308, 1309), uno del ambiente hospitalario (agua de desecho - ST 92) y uno comensal (ST 1320). Todos los aislamientos nosocomiales de este clado presentaron resistencia a la vancomicina. El segundo clado se conformó por dos aislamientos clínicos resistentes a la vancomicina (ST 1314, 1315) y un aislamiento comensal (ST 1332). Al comparar

los dos árboles filogenéticos, encontramos ciertas similitudes como la que mencionamos previamente, tomando en cuenta que hay un punto de los árboles donde se encuentran aislamientos clínicos con comensales y ambientales, concluimos que los aislamientos nosocomiales de nuestra colección tuvieron dos probables orígenes: A) el microbioma de los pacientes hemato – oncológicos antes de la admisión hospitalaria era variable que incluía cepas pertenecientes al CC17.<sup>71</sup> B) La terapia antimicrobiana que recibieron éstos pacientes (incluyendo vancomicina), seleccionó clonas que presentaron un amplio perfil de resistencia antimicrobiana.<sup>84</sup> Los pacientes hemato – oncológicos fueron tratados con regímenes altamente mielosupresoras que producen neutropenia profunda y daño a la mucosa intestinal, permitiendo a las cepas de Efm translocarse e invadir el torrente sanguíneo produciendo así bacteriemias.<sup>71,85</sup> No podemos excluir otro posible origen como el que algunos pacientes hayan adquirido las cepas de Efm causante de sus infecciones en el hospital (cepas adaptadas al ambiente hospitalario)<sup>86</sup>; sin embargo, es difícil trazar una ruta de adquisición de cepas ambientales al tracto intestinal de los pacientes. Pensamos que el brote de Efm causante de bacteriemias en estos pacientes hematooncológicos está más relacionado a que los pacientes estaban confinados en una sola área donde tuvieron procedimientos terapéuticos en común como los regímenes de quimioterapia altamente mielosupresores y un amplio uso de antimicrobianos que seleccionó cepas de Efm del microbioma de los pacientes. Esta hipótesis podría explicar la diversidad de clonas involucradas en el brote nosocomial en pacientes mielosuprimidos.

Además de la naturaleza policlonal del brote, no encontramos un perfil de resistencia antimicrobiana específico de las cepas que relacionaron con el CC17, aunque es evidente que los

aislamientos de origen hospitalario presentaron un perfil de resistencia antimicrobiano mucho más extenso que las cepas de origen comensal y ambiental y pudimos demostrar que hay una dependencia entre el origen y el perfil de resistencia antimicrobiana de las cepas. Vale la pena mencionar que algunos aislamientos que se relacionaron con el CC17 presentaron el mismo perfil de resistencia que otros aislamientos clínicos que no fueron asignados a dicho CC, lo que sugiere que los genes de resistencia antimicrobiana están ligados a EGM's.<sup>12,17</sup>

## CONCLUSIONES

En este estudio pudimos demostrar que los aislamientos que circulan en un solo hospital son altamente diversos, es decir, son policlonales, lo que podría indicar que el origen de los aislamientos clínicos es diferente. Aunado a lo anterior, sabemos que la mayoría de los aislamientos clínicos fueron obtenidos de pacientes que recibieron quimioterapia altamente mielosupresora, lo cual sugiere que la terapia generó un daño en la mucosa intestinal y que la selección de clonas de Efm se presentó por la presión selectiva ejercida por la terapia antimicrobiana administrada, lo que pudo desencadenar los brotes de bacteriemias en estos pacientes. En cuanto a los aislamientos comensales y ambientales notamos que hay mayor diversidad que los aislamientos clínicos.



## PERSPECTIVAS

Efm tiene una gran plasticidad genómica, lo que le ha permitido subsistir y mantenerse como uno de los microorganismos de mayor importancia a nivel mundial. La multidrogo resistencia de Efm se ha dado por diferentes razones a nivel mundial, sin embargo, en México, es importante resaltar que una de las principales causas de la aparición de microorganismos multidrogo resistentes como Efm, se debe al uso indiscriminado de los antimicrobianos, lo que genera la presión selectiva de estos microorganismos. Es importante realizar más estudios en microorganismos como Efm para entender mejor su comportamiento y encontrar herramientas para controlar la multidrogo resistencia que llegan a desarrollar para así poder tratar a los pacientes que desarrollan infecciones causadas por Efm multidrogo resistente.

## REFERENCIAS

1. Imbert J. Historia De La Infección Y Del Contagio. *Elementos*. 1994;20(No. 3):37-44. <http://www.elementos.buap.mx/num20/pdf/37.pdf>
2. Acuña L G. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Revista chilena de Infectología*. 2003;20(Supl 1):7-10. doi:10.4067/S0716-10182003020100001
3. Blot S, Ruppé E, Harbarth S, et al. Healthcare-associated infections in adult intensive care unit patients: Changes in epidemiology, diagnosis, prevention and contributions of new technologies. *Intensive Crit Care Nurs*. 2022;70(January). doi:10.1016/j.iccn.2022.103227
4. Haque M, Sartelli M, Mckimm J, Abu Bakar M. Infection and Drug Resistance Dovepress Health care-associated infections-an overview. *Infection and Drug Resistance* . 2018;11:2321-2333. doi:10.2147/IDR.S177247
5. OMS. La OMS publica el primer informe mundial sobre prevención y control de infecciones (PCI). Organización Mundial De La Salud (OMS). Published 2022. <https://www.who.int/es/news/item/06-05-2022-who-launches-first-ever-global-report-on-infection-prevention-and-control>
6. Rodríguez Salgado M. Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México. *Boletín CONAMED*. 2018;3(17):16-20. [http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia\\_infecciones.pdf](http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia_infecciones.pdf)
7. Dirección General de Epidemiología. Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) 2022. 2022;(August):1-21.
8. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1079-1081. doi:10.1086/533452
9. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48(1):1-12. doi:10.1086/595011
10. Organización Panamericana de la Salud. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. 4 Marzo. Published 2021. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
11. García-Solache M, Rice LB. The enterococcus: A model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):1-28. doi:10.1128/CMR.00058-18
12. Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.*; 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649510>
13. Liu D, ed. *Handbook of Foodborne Diseases*. 1st ed. CRC Press; 2018. doi:10.1201/b22030
14. LPSN-DSMZ. Genus: Enterococcus. Published online 2021. <https://www.bacterio.net/genus/enterococcus%0Ahttps://lpsn.dsmz.de/genus/enterococcus>

15. Zhang X, Vrijenhoek JEP, Bonten MJM, Willems RJL, Van Schaik W. A genetic element present on megaplasmids allows *Enterococcus faecium* to use raffinose as carbon source. *Environ Microbiol.* 2011;13(2):518-528. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02355.x
16. Raven KE, Gouliouris T, Parkhill J, Peacock SJ. Genome-based analysis of *Enterococcus faecium* bacteremia associated with recurrent and mixed-strain infection. *J Clin Microbiol.* 2018;56(3):1-9. doi:10.1128/JCM.01520-17
17. Lee T, Pang S, Abraham S, Coombs GW. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;16:36-47. doi:10.1016/j.jgar.2018.08.016
18. Geraldes C, Tavares L, Gil S, Oliveira M. *Enterococcus* Virulence and Resistant Traits Associated with Its Permanence in the Hospital Environment. *Antibiotics.* 2022;11(7):1-23. doi:10.3390/antibiotics11070857
19. Sillanpää J, Nallapareddy SR, Weinstock GM, et al. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):896-901. doi:10.1128/JCM.02283-08
20. Nallapareddy SR, Singh K V., Okhuysen PC, Murray BE. A functional collagen adhesin gene, acm, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infect Immun.* 2008;76(9):4110-4119. doi:10.1128/IAI.00375-08
21. Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol.* 2003;47(6):1733-1747. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03417.x
22. García-Solache M, Rice LB. The enterococcus: A model of adaptability to its environment. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(2):1-28. doi:10.1128/CMR.00058-18
23. Sillanpää J, Prakash VP, Nallapareddy SR, Murray BE. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2009;47(4):896-901. doi:10.1128/JCM.02283-08
24. Sillanpää J, Nallapareddy SR, Prakash VP, et al. Identification and phenotypic characterization of a second collagen adhesin, Scm, and genome-based identification and analysis of 13 other predicted MSCRAMMs, including four distinct pilus loci, in *Enterococcus faecium*. *Microbiology (N Y).* 2008;154(10):3199-3211. doi:10.1099/mic.0.2008/017319-0
25. Gao W, Howden BP, Stinear TP. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Curr Opin Microbiol.* 2018;41:76-82. doi:10.1016/j.mib.2017.11.030
26. Hendrickx APA, Bonten MJM, van Luit-Asbroek M, Schapendonk CME, Kragten AHM, Willems RJL. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology (N Y).* 2008;154(10):3212-3223. doi:10.1099/mic.0.2008/020891-0
27. Enayati M, Sadeghi J, Nahaei MR, Aghazadeh M, Pourshafie MR, Talebi M. Virulence and antimicrobial resistance of *Enterococcus faecium* isolated from water samples. *Lett Appl Microbiol.* 2015;61(4):339-345. doi:10.1111/lam.12474

28. Weng PL, Ramli R, Hamat RA. Antibiotic susceptibility patterns, biofilm formation and esp gene among clinical enterococci: Is there any association? *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(18):1-10. doi:10.3390/ijerph16183439
29. Meredith K, Bolhuis A, O'Neill MAA. Enterococcal surface protein Esp affects antibiotic sensitivity in *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34:392-393. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.06.012
30. Van Wamel WJB, Hendrickx APA, Bonten MJM, Top J, Posthuma G, Willems RJL. Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect Immun*. 2007;75(2):924-931. doi:10.1128/IAI.00941-06
31. Leavis H, Top J, Shankar N, et al. A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the esp Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Associated with Epidemicity A Novel Putative Enterococcal Pathogenicity Island Linked to the esp Virulence Gene of *Enterococcus faecium* and Ass. 2004;186(3):672-682. doi:10.1128/JB.186.3.672
32. Freitas AR, Tedim AP, Novais C, et al. Global spread of the hyl(Efm) colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2660-2665. doi:10.1128/AAC.00134-10
33. Arias CA, Panesso D, Singh K V., Rice LB, Murray BE. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm -containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(10):4240-4246. doi:10.1128/AAC.00242-09
34. Rice LB, Carias L, Rudin S, et al. BRIEF REPORT A Potential Virulence Gene , hyl Efm , Predominates in *Enterococcus faecium* of Clinical Origin. *Internal Medicine*. 2003;0016(3):12552437. doi:10.1086/367711
35. Ochoa S a, Escalona G, Cruz-Córdova A, et al. Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC Microbiol*. 2013;13:291. doi:10.1186/1471-2180-13-291
36. Said MS, Tirthani E LE. *Enterococcus Infections* - StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567759/>
37. Freitas AR, Pereira AP, Novais C, Peixe L. Multidrug-resistant high-risk *Enterococcus faecium* clones: can we really define them? *Int J Antimicrob Agents*. 2021;57(1):106227. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106227
38. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(10):1221-1236. doi:10.1586/14787210.2014.956092
39. Kak V, Donabedian SM, Zervos MJ, Kariyama R, Kumon H, Chow JW. Efficacy of ampicillin plus arbekacin in experimental rabbit endocarditis caused by an *Enterococcus faecalis* strain with high-level gentamicin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(9):2545-2546. doi:10.1128/AAC.44.9.2545-2546.2000
40. Araos R, García P, Chanqueo L, Labarca J. Daptomicina: Características farmacológicas y aporte en el tratamiento de infecciones por cóceas gram positivas. *Revista Chilena de Infectología*. 2012;29(2):127-131. doi:10.4067/S0716-10182012000200001
41. Munita JM, Murray BE, Arias and CA. Daptomycin for the treatment of bacteraemia due to vancomycin-resistant enterococci. *Int J Antimicrob Agents*. Published online 2015:387-395. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.08.002.Daptomycin

42. van Harten RM, Willems RJL, Martin NI, Hendrickx APA. Multidrug-Resistant Enterococcal Infections: New Compounds, Novel Antimicrobial Therapies? *Trends Microbiol.* 2017;25(6):467-479. doi:10.1016/j.tim.2017.01.004
43. Rincón S, Panesso D, Díaz L, et al. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina [Resistance to “last resort” antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era] HHS Public Access. *Biomedica.* 2014;34(1):191-208. doi:10.1590/S0120-41572014000500022
44. De Graef EM, Decostere A, De Leener E, Goossens H, Baele M, Haesebrouck F. Prevalence and mechanism of resistance against macrolides, lincosamides, and streptogramins among *Enterococcus faecium* isolates from food-producing animals and hospital patients in Belgium. *Microbial Drug Resistance.* 2007;13(2):135-141. doi:10.1089/mdr.2007.718
45. Hammerum AM, Flannagan SE, Clewell DB, Jensen LB. Indication of transposition of a mobile DNA element containing the vat(D) and erm(B) genes in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(11):3223-3225. doi:10.1128/AAC.45.11.3223-3225.2001
46. Eliopoulos GM, Huovinen P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases.* 2001;32(11):1608-1614. doi:10.1086/320532
47. Chenoweth CE, Robinson KA, Schaberg DR. Efficacy of ampicillin versus trimethoprim-sulfamethoxazole in a mouse model of lethal enterococcal peritonitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(9):1800-1802. doi:10.1128/AAC.34.9.1800
48. Grayson ML, Thauvin-Eliopoulos C, Eliopoulos GM, et al. Failure of trimethoprim-sulfamethoxazole therapy in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(9):1792-1794. doi:10.1128/AAC.34.9.1792
49. Shutter, Mollie C. ; Akhondi H. Tetracycline - StatPearls - NCBI Bookshelf. In: *StatPearls - NCBI Bookshelf.* StatPearls Publishing; 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549905/>
50. Bentorcha F, De Cespedes G, Horaud T. Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(5):808-812. doi:10.1128/AAC.35.5.808
51. Kak V, Chow JW. *Acquired Antibiotic Resistances in Enterococci.*; 2014. doi:10.1128/9781555817923.ch9
52. Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev.* 1992;5(4):387-399. doi:10.1128/CMR.5.4.387
53. Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;19(1):1-24. doi:10.1016/0168-6445(96)00021-6
54. Grossman TH. Tetracycline antibiotics and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(4):1-24. doi:10.1101/cshperspect.a025387
55. Sadowy E. Mobile genetic elements beyond the VanB-resistance dissemination among hospital-associated enterococci and other Gram-positive bacteria. *Plasmid.* 2021;114(October 2020):102558. doi:10.1016/j.plasmid.2021.102558

56. Pidot SJ, Gao W, Buultjens AH, et al. Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Sci Transl Med*. 2018;10(452). doi:10.1126/scitranslmed.aar6115
57. Sinel C, Augagneur Y, Sassi M, et al. Small RNAs in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* involved in daptomycin response and resistance. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/s41598-017-11265-2
58. Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4). doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0053-2018
59. Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MRC, et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the clones? *Front Microbiol*. 2016;7(MAY):1-15. doi:10.3389/fmicb.2016.00788
60. Munita JM, Arias CA, Murray BE. Enterococcal endocarditis: Can we win the war? *Curr Infect Dis Rep*. 2012;14(4):339-349. doi:10.1007/s11908-012-0270-8
61. Cecchi E, Chirillo F, Castiglione A, et al. Clinical epidemiology in Italian Registry of Infective Endocarditis (RIEI): Focus on age, intravascular devices and enterococci. *Int J Cardiol*. 2015;190(1):151-156. doi:10.1016/j.ijcard.2015.04.123
62. Lebreton F, van Schaik W, McGuire AM, et al. Emergence of epidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium* from animal and commensal strains. *mBio*. 2013;4(4). doi:10.1128/mBio.00534-13
63. van Hal SJ, Willems RJL, Gouliouris T, et al. The global dissemination of hospital clones of *Enterococcus faecium*. *Genome Med*. 2021;13(1). doi:10.1186/s13073-021-00868-0
64. Chang RYK, Nang SC, Chan HK, Li J. Novel antimicrobial agents for combating antibiotic-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev*. 2022;187:114378. doi:10.1016/j.addr.2022.114378
65. Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, Ponce de León S, et al. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Water and Clinical Samples: Antimicrobial Susceptibility and Genetic Relationships. *PLoS One*. 2013;8(4):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0059491
66. Layton BA, Walters SP, Lam LH, Boehm AB. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J Appl Microbiol*. 2010;109(2):539-547. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x
67. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33(1):24-27. doi:10.1128/jcm.33.1.24-27.1995
68. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *espA*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect Immun*. 1999;67(1):193-200. <http://iai.asm.org/content/67/1/193.abstract> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96296/pdf/ii000193.pdf>
69. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, et al. *GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing*. Vol 33.; 1995. <https://journals.asm.org/journal/jcm>
70. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium* Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):1963-1971. doi:10.1128/JCM.40.6.1963

71. Alatorre-Fernández P, Mayoral-Terán C, Velázquez-Acosta C, et al. A polyclonal outbreak of bloodstream infections by *Enterococcus faecium* in patients with hematologic malignancies. *Am J Infect Control*. 2017;45(3):260-266. doi:10.1016/j.ajic.2016.10.002
72. Manafi M, Kneifel W, Bascomb S. Fluorogenic and Chromogenic Substrates used in Bacterial Diagnostics. 1991;55(16):335-348.
73. Dahlen G, Linde A. Screening plate method for detection of bacterial beta-glucuronidase. *Appl Microbiol*. 1973;26(6):863-866.  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4767294](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4767294)
74. Cimolai N, Mah D. group C and G streptococci. Published online 1991:824-825.
75. Hansen W, Yourassowsky E. Detection of ??-glucuronidase in lactose-fermenting members of the family Enterobacteriaceae and its presence in bacterial urine cultures. *J Clin Microbiol*. 1984;20(6):1177-1179.
76. Dashnyam P, Mudududdla R, Hsieh TJ, et al.  $\beta$ -Glucuronidases of opportunistic bacteria are the major contributors to xenobiotic-induced toxicity in the gut. *Sci Rep*. 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-34678-z
77. Pellock SJ, Redinbo MR. Glucuronides in the gut: Sugar-driven symbioses between microbe and host. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(21):8569-8576. doi:10.1074/jbc.R116.767434
78. Landerslev KG, Jakobsen L, Olsen SS, et al. Polyclonal spread of vanA *Enterococcus faecium* in Central Denmark Region, 2009–2013, investigated using PFGE, MLST and WGS. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):767-768. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.09.001
79. Kawalec M, Gniadkowski M, Hryniewicz W. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdansk, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like transposon variants and clonal spread of several strains. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3317-3322. Accessed May 3, 2018.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970377>
80. Iosifidis E, Karakoula K, Protonotariou E, et al. Polyclonal outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a pediatric oncology department. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012;34(7):511-516. doi:10.1097/MPH.0b013e318257a5d3
81. Liu Y, Cao B, Gu L, Wang H. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci in a Chinese Hospital Between 2003 and 2009. *Microbial Drug Resistance*. 2011;17(3):449-455. doi:10.1089/mdr.2011.0025
82. Kawalec M, Kędzierska J, Gajda A, et al. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2007;13(9):893-901. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01774.x
83. *Enterococcus faecium* | PubMLST. Published 2023.  
<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium>
84. Gouliouris T, Warne B, Cartwright EJP, et al. Duration of exposure to multiple antibiotics is associated with increased risk of VRE bacteraemia: A nested case-control study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(6):1692-1699. doi:10.1093/jac/dky075

85. Santos BA, Oliveira JS, Cardoso NT, et al. Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resistant enterococci associated with infections in cancer patients in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017;55:56-62. doi:10.1016/j.meegid.2017.08.027
86. Arshadi M, Shokoohizadeh L, Douraghi M, et al. Epidemiological linkage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from different sources in Ahwaz, Iran. *FEMS Microbiol Lett*. 2019;366(6). doi:10.1093/femsle/fnz062



## **ANEXOS**

ANEXO A - TABLAS

Tabla 2. Información general de la colección de Efm. VR: Vancomicina resistente, VS: Vancomicina susceptible

Alias	Fecha de aislamiento	Tipo de aislamiento	Resistencia a vancomicina	Origen
<b>ATCC*</b>		Control negativo		
<b>Efm1</b>	1995	Control positivo	VR	Bacteriemia
<b>Efm2</b>	10/04/13	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm3</b>	29/07/09	Clínico	VS	Bacteriemia
<b>Efm4</b>	08/06/10	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm5</b>	05/08/09	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm6</b>	29/09/11	Ambiente hospitalario	VS	Salida del agua del hospital
<b>Efm7</b>	31/07/10	Clínico	VR	Herida quirúrgica
<b>Efm8</b>	16/04/13	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm9</b>	15/05/13	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm10</b>	11/05/12	Ambiente hospitalario	VR	Barandales de cama
<b>Efm11</b>	11/01/13	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm12</b>	30/06/10	Clínico	VS	Herida quirúrgica
<b>Efm13</b>	21/04/13	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm14</b>	30/03/99	Clínico	VS	Bacteriemia
<b>Efm15</b>	28/01/99	Clínico	VS	Bacteriemia
<b>Efm16</b>	09/05/08	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm17</b>	07/04/09	Clínico	VS	Bacteriemia
<b>Efm18</b>	01/04/09	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm19</b>	07/02/10	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm20</b>	21/04/10	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm21</b>	27/05/10	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm22</b>	21/06/10	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm23</b>	21/07/10	Clínico	VS	Bacteriemia
<b>Efm24</b>	06/09/10	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm25</b>	26/01/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm26</b>	19/02/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm27</b>	18/04/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm28</b>	05/06/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm29</b>	11/06/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm30</b>	19/06/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm31</b>	28/07/11	Clínico	VR	Bacteriemia

<b>Efm32</b>	04/08/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm33</b>	19/09/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm34</b>	29/11/11	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm35</b>	04/04/12	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm36</b>	30/04/12	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm37</b>	27/05/12	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm38</b>	01/08/12	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm39</b>	17/08/12	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm40</b>	20/09/12	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm41</b>	03/11	Ambiente hospitalario	VR	Salida del agua del hospital
<b>Efm42</b>	05/06/13	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm43</b>	05/09/13	Clínico	VR	Bacteriemia
<b>Efm46</b>	28/02/01	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm47</b>	08/02/01	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm49</b>	14/03/01	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm51</b>	08/02/01	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm55</b>	28/02/01	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm56</b>	28/02/01	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm62</b>	25/10/00	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm65</b>	07/00	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm68</b>	07/00	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm69</b>	28/02/01	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm72</b>	28/02/01	Ambiental	VS	Agua de canal
<b>Efm73</b>	14/04/15	Voluntarios sanos	VS	Heces
<b>Efm74</b>	14/04/15	Voluntarios sanos	VS	Heces
<b>Efm75</b>	14/04/15	Voluntarios sanos	VS	Heces
<b>Efm76</b>	14/04/15	Voluntarios sanos	VS	Heces
<b>Efm77</b>	14/04/15	Voluntarios sanos	VS	Heces

Tabla 3. Características fenotípicas de la colección de Efm.

Alias	Año	VR-Vitek	Especie	Origen	Identificación Vitek (%)	Biotipo
<b>ATCC</b>			<i>E. faecalis</i>			
1	1995	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 99%	34003265771671
2	10/04/13	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	30002665771671
3	29/07/09	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	34047265771671
4	08/06/10	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	36003265771661
5	05/08/09	EfmVI	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	36003265771661
6	29/09/11	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Salida de agua del hospital	<i>E. faecium</i>	32003265771641
7	31/07/10	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Herida quirúrgica	<i>E. faecium</i>	36047265771671
8	16/04/13	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	36003265771671
9	15/05/13	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	16002265771671
10	11/05/12	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Barandales de una cama	<i>E. faecium</i> 97%	30043265771671
11	11/01/13	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	414002265771671
12	30/06/10	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Herida quirúrgica	<i>E. faecium</i>	34043265771671
13	21/04/13	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	16003265771671
14	30/03/99	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecalis</i> 99%	114002765773671
15	28/01/99	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 96%	36003665773771
16	09/05/08	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 98%	10002065771671
17	07/04/09	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042265771671
18	01/04/09	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	36047265771671
19	07/02/10	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecalis</i> 94%	114002765773671
20	21/04/10	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	Baja discriminación	10003265731671
21	27/05/10	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042065771671
22	21/06/10	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042265771671
23	21/07/10	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	430003265761671
24	06/09/10	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	12002665771671
25	26/01/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042065771671
26	19/02/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042265751671
27	18/04/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 93%	12046265771671
28	05/06/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10002665771671
29	11/06/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 93%	34047265771671
30	19/06/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 91%	34047265771771
31	28/07/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 93%	34047265771671
32	04/08/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	32003065771771
33	19/09/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042065771671
34	29/11/11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	Baja discriminación	136003665773771
35	04/04/12	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 96%	34043265771771
36	30/04/12	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 93%	10046265751671
37	27/05/12	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042265771671
38	01/08/12	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 98%	12042265771671
39	17/08/12	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042265771671
40	20/09/12	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i> 97%	10042061751671
41	mar-11	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Salida de agua del hospital	<i>E. faecium</i> 99%	34003265773671

42	05/06/13	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	36043261771671
43	05/09/13	EfmVR	<i>E. faecium</i>	Bacteriemia	<i>E. faecium</i>	34002265771671
46	28/02/01	EfmVS	<i>E. faecium</i>	P. tratamiento	<i>E. faecium</i>	32002065733671
47	08/02/01	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Canal	<i>E. faecium</i>	116002065773671
49	14/03/01	EfmVS	<i>E. faecium</i>	P. tratamiento	<i>E. faecalis</i>	116002361773671
51	08/02/01	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Canal	<i>E. faecium</i>	32002065771671
55	28/02/01	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Canal	<i>E. faecium</i>	32002065771671
56	28/02/01	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Canal	<i>E. faecium</i>	132003065773671
62	25/10/00	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Pozo	<i>E. faecium</i>	132002265773671
65	jul-00	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Canal	<i>E. faecium</i>	36003065771631
68	jul-00	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Canal	<i>E. faecium</i>	36003065771671
69	28/02/01	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Canal	<i>E. faecium</i>	30003065731671
72	28/02/01	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Canal	<i>E. faecium</i>	12003365773771
73	14/04/15	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Heces	Baja discr ( <i>E. durans, E. faecium</i> )	34002265731671
74	14/04/15	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Heces	<i>E. faecium</i>	30002065711371
75	14/04/15	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Heces	<i>E. faecium</i>	132003065773771
76	14/04/15	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Heces	<i>E. faecium</i>	34002265771671
77	14/04/15	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Heces	<i>E. faecium</i>	36002265771671
78	14/04/15	EfmVS	<i>E. faecium</i>	Heces	Baja discriminación <i>E. durans, E. faecium, Lactococcus garvieae</i>	132002365773661

Tabla 4. Características genotípicas de la colección de *Efm*. \* Fenotipo Van B

Alias	I. molecular ( <i>sodA</i> )	Genotipo Van A	Gen <i>esp</i>	Gen <i>hyl</i>	ST
1	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	64
2	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	412
3	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1303
4	<i>E. faecium</i>	Positivo*	Positivo	Positivo	1337
5	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1306
6	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	92
7	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1304
8	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Negativo	1305
9	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	412
10	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	757
11	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	18
12	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	757
13	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	770
14	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	205
15	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Negativo	893
16	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	412
17	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	757
18	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1304
19	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Negativo	1306
20	<i>E. faecium</i>	Positivo	Negativo	Positivo	1313
21	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	757
22	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	757
23	<i>E. faecium</i>	Positivo	Negativo	Positivo	775
24	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	412
25	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Negativo	757
26	<i>E. faecium</i>	Positivo*	Positivo	Positivo	757
27	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	770
28	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	412
29	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Negativo	1304
30	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1304
31	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1304
32	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1314
33	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1304
34	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1315
35	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1304
36	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	757
37	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	770
38	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	770
39	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Negativo	770
40	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	770
41	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	18
42	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	1304
43	<i>E. faecium</i>	Positivo	Positivo	Positivo	412

46	<i>E. faecium</i>	Negativo	Negativo	Negativo	1316
47	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	1317
49	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Positivo	1307
51	<i>E. faecium</i>	Negativo	Negativo	Negativo	1318
55	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	1308
56	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	94
62	<i>E. faecium</i>	Negativo	Negativo	Negativo	218
65	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	1319
68	<i>E. faecium</i>	Negativo	Negativo	Positivo	971
69	<i>E. faecium</i>	Negativo	Negativo	Positivo	1309
72	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	1310
73	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	1311
74	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Positivo	1332
75	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Positivo	854
76	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	29
77	<i>E. faecium</i>	Negativo	Positivo	Negativo	1320
78	<i>E. faecium</i>	Negativo	Negativo	Positivo	1312

Tabla 5. Perfil de resistencia antimicrobiana de la colección de Efm. Amp: ampicilina, Gent alt: sinergia con gentamicina, Estrepto alt: sinergia con estreptomycinina, Ciprof: ciprofloxacina, Levof: levofloxacina, Moxif: moxifloxacina, Eritro: eritromicina, Clind: clindamicina, Q/D: estreptograminas (quinupristina/dalfopristina), Teicop: teicoplanina, Vanco: vancomicina, Minocicl: minociclina, Tetracicl: tetraciclina, Nitrofur: nitrofurantoína, T/S: trimetoprim/sulfametoxazol

Alias	Amp	Gent alt	Estrepto alt	Ciprof	Levof	Moxif	Eritro	Clind	Q/D	Linezolid	Teicop	Vanco	Minocicl	Tetracicl	Nitrofur	T/S
1	R >32	Syn-S	Syn-R	I 2	S 2	I 2	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R <10
2	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	R 4	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	S 32	R >320
3	S <=2	Syn-R	Syn-R	S <0.5	S 1	S <=0.25	R >8	R >8	R 4	S 2	S <0.5	S 2	R >16	R >16	S <16	R <10
4	S 8	Syn-R	Syn-R	S <0.5	S 1	S <=0.25	R >8	R >8	R 8	S 2	S <0.5	R >32	R >16	R >16	S <16	R <10
5	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	I 2	S 2	S <0.5	I 8	R >16	R >16	I 64	R 160
6	S <=2	Syn-R	Syn-R	I 2	S 2	I 2	I 2	R >8	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	R >16	R >16	I 64	R <10
7	R >32	Syn-S	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R <10
8	R >32	Syn-R	Syn-R	I 2	S 2	S 1	R >8	R >8	S 1	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
9	R >32	Syn-R	Syn-S	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	S <16	R >320
10	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
11	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 1	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	I 64	R 160
12	S <=2	Syn-S	Syn-R	S <0.5	S 1	S <=0.25	R >8	R >8	R 4	S 2	S <0.5	S 2	R >16	R >16	S <16	R <10
13	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R 80
14	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	I 2	S 2	S <0.5	S 1	R >16	R >16	S 32	R >320
15	R >32	Syn-R	Syn-R	S <0.5	S 2	S 0.5	R >8	R >8	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	I 8	I 8	I 64	R <10
16	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	S <0.25	R <0.25	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	R 256	R 160
17	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R >320
18	R >32	Syn-S	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R <10
19	R >32	Syn-R	Syn-R	R 4	I 4	R >8	R >8	R >8	R 4	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	S 32	R <10
20	R >32	Syn-S	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	I 2	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	I 64	R <10
21	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
22	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	I 4	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R <10



23	R >8	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	I 2	S 2	S <0.5	S 1	R >16	R >16	S 32	R >320
24	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	R 128	R >320
25	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
26	R >32	Syn-S	Syn-S	R >8	R >8	R >8	I 1	R <0.25	S 0.5	S 2	S 1	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
27	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R 40
28	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	I 64	R >320
29	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
30	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
31	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
32	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	R 128	R 80
33	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R >320
34	R >32	Syn-S	Syn-S	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	R 128	R >320
35	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	S <16	R >320
36	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	S 32	R 160
37	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 1	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	R 128	R 80
38	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R 40
39	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 1	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	R 128	R 40
40	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 1	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	S 32	R 20
41	R >32	Syn-R	Syn-S	S 1	S 2	S 1	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	S <0.5	S <1	I 64	R <10
42	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	S 32	R >320
43	R >32	Syn-R	Syn-R	R >8	R >8	R >8	R >8	R >8	S 0.5	S 2	R >32	R >32	R >16	R >16	S 32	R >320
46	S <=2	Syn-S	Syn-S	S 1	S 2	S 0.5	S 0.5	R >8	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	I 64	R <10
47	S <=2	Syn-S	Syn-S	S <0.5	S 2	S 0.5	R >8	R 4	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10
49	S <=2	Syn-S	Syn-S	S <0.5	S 1	S 0.5	R >8	R >8	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10
51	S <=2	Syn-S	Syn-S	S <0.5	S 2	S 0.5	S <0.25	R 4	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	I 64	R <10
55	S <=2	Syn-S	Syn-S	S 1	S 2	S 1	I 2	R <0.25	S 0.5	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10
56	S <=2	Syn-S	Syn-S	S <0.5	S 1	S <=0.25	R >8	R 4	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10
62	S <=2	Syn-S	Syn-S	S <0.5	S 1	S <=0.25	R >8	R >8	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10
65	S <=2	Syn-S	Syn-S	S <0.5	S 2	S <=0.25	R >8	R 4	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10
68	S <=2	Syn-S	Syn-R	R 4	I 4	R 4	I 4	R >8	S 1	S 2	S <0.5	S 1	R >16	R >16	S 32	R <10
69	S <=2	Syn-S	Syn-S	S <0.5	S 2	S 0.5	I 2	R <0.25	S 0.5	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10

72	S<=2	Syn-S	Syn-S	S<0.5	S 2	S 0.5	S <0.25	R >8	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	I 64	R <10
73	S<=2	Syn-S	Syn-S	I 2	I 4	I 2	I 2	R 2	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	I 64	R <10
74	S<=2	Syn-S	Syn-S	S 1	S 2	S 1	I 1	R >8	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S <16	R <10
75	S<=2	Syn-S	Syn-S	S<0.5	S 0.5	S<=0.25	R >8	R 4	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10
76	S<=2	Syn-S	Syn-S	R 4	I 4	R 4	I 4	R >8	S 0.5	S 2	S <0.5	S 1	R >16	R >16	S 32	R <10
77	S<=2	Syn-S	Syn-S	S 1	I 4	I 2	S <0.25	R <0.25	S 0.5	S 1	S <0.5	S 1	S <0.5	S <1	S 32	R <10
78	S<=2	Syn-S	Syn-S	S 1	S 2	S 0.5	S <0.25	R <0.25	S 1	S 2	S <0.5	S <0.5	S <0.5	S <1	S 32	R <10

ANEXO B – FIGURAS

Figura 3. Cladograma colección Efm. VR: vancomicina resistente.

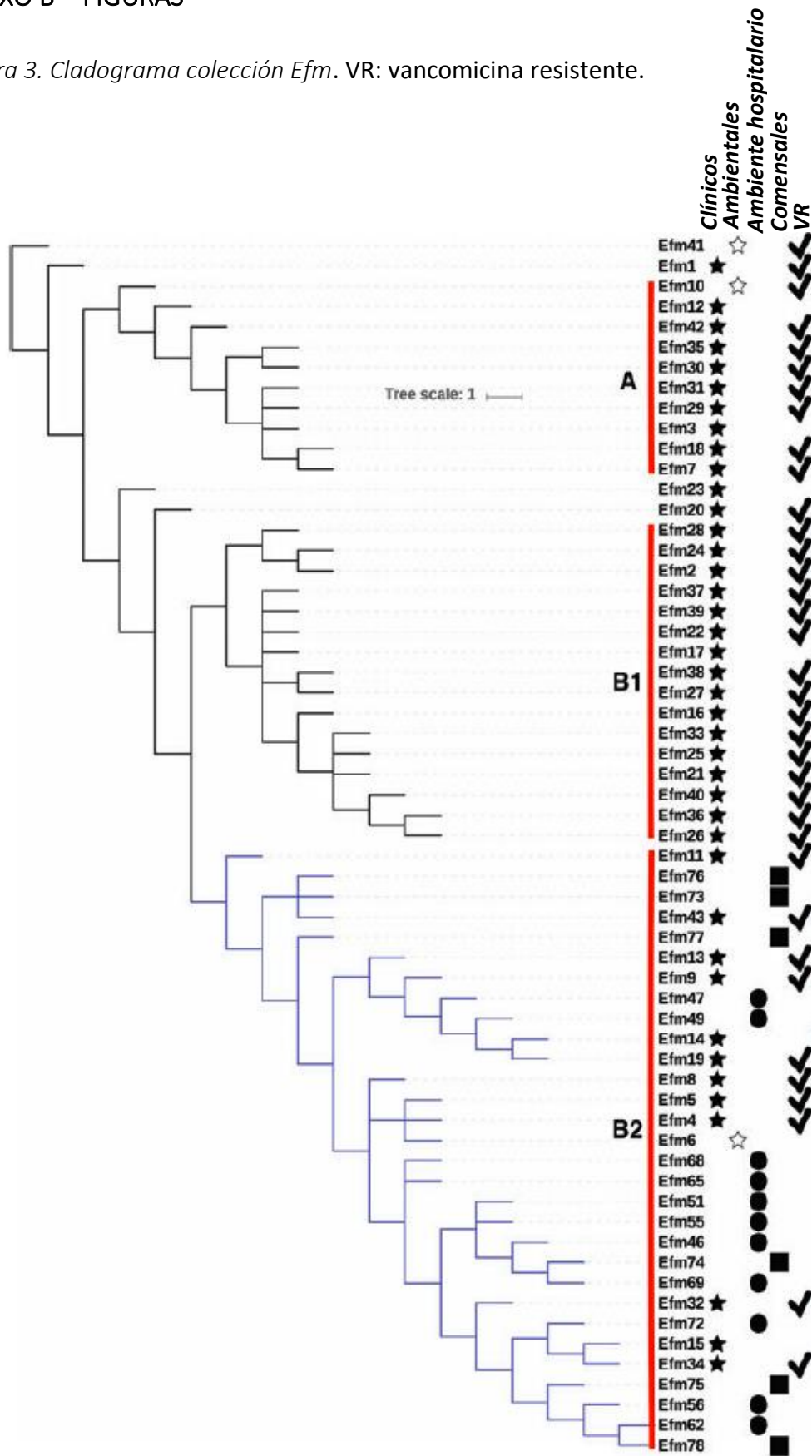


Figura 4. Filogenia de 1348 secuencias concatenadas de Efm de la base de datos de PubMLST. Las líneas de colores señalan la posición de los ST's de las cepas de nuestra colección.

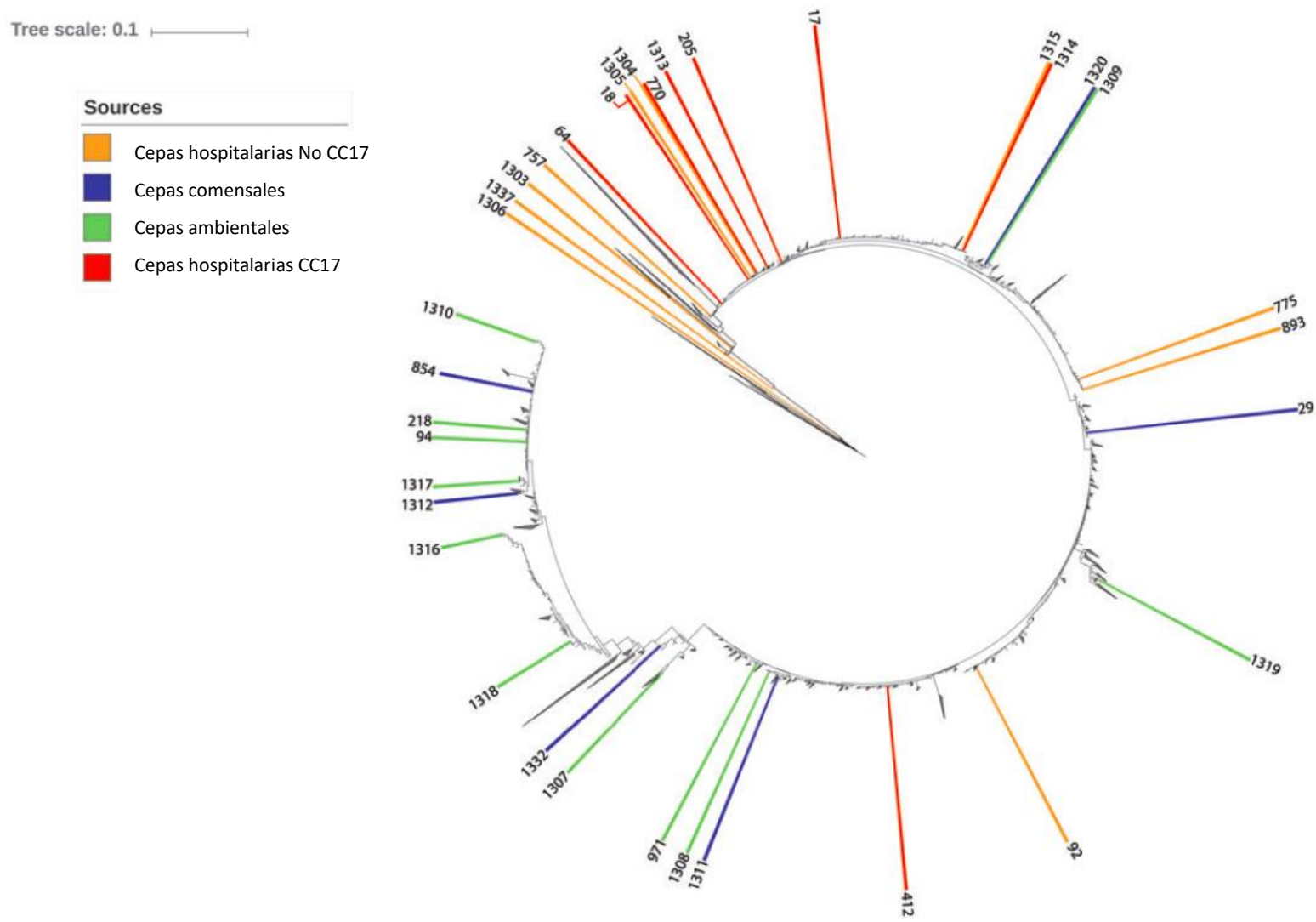


Figura 5. Filogenia de 34 secuencias concatenadas de nuestra colección de aislamientos de *Efm*. Nivel de confianza de los nodos: 100, \*\*: 70 – 99, \*: <70.

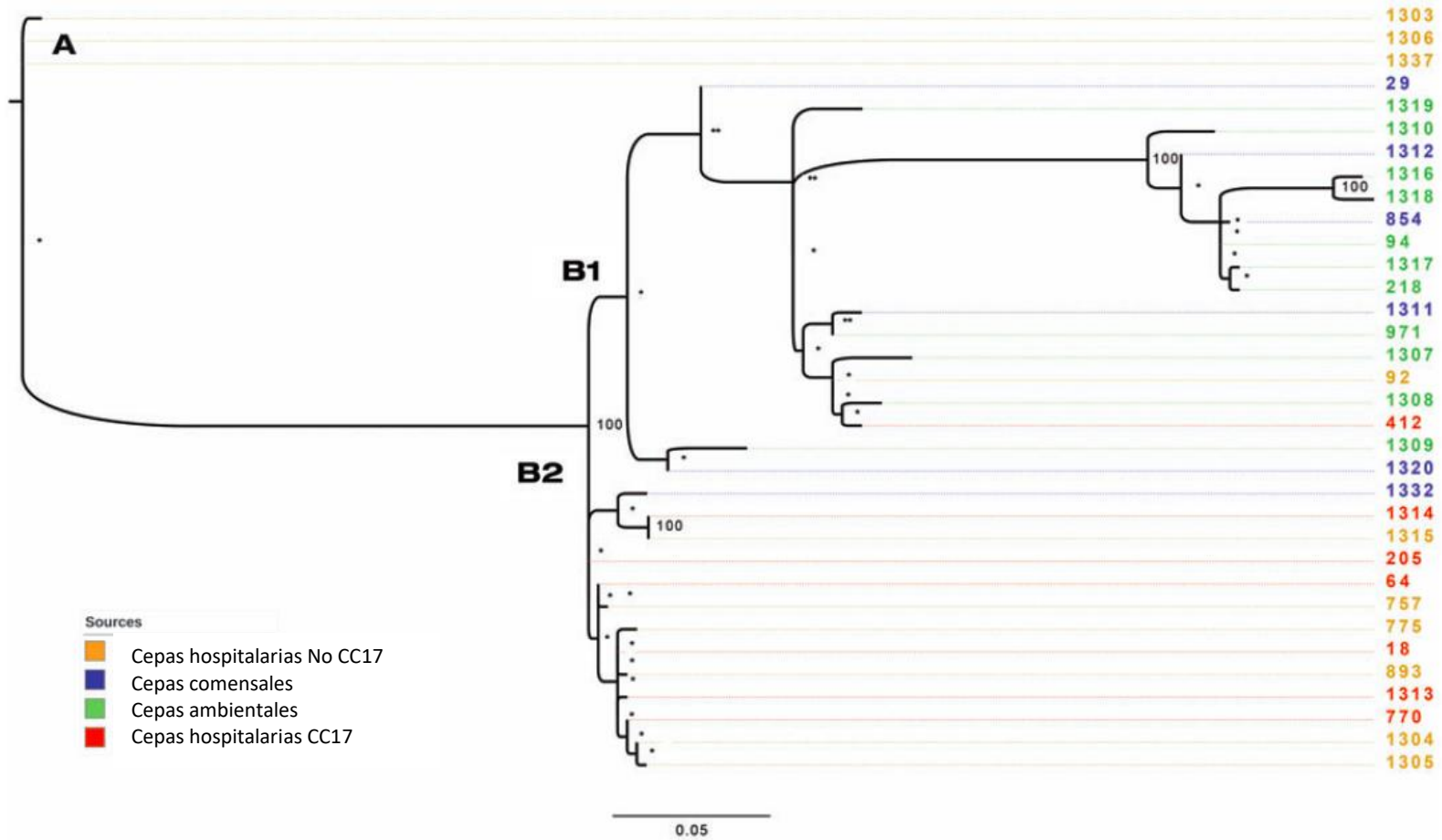
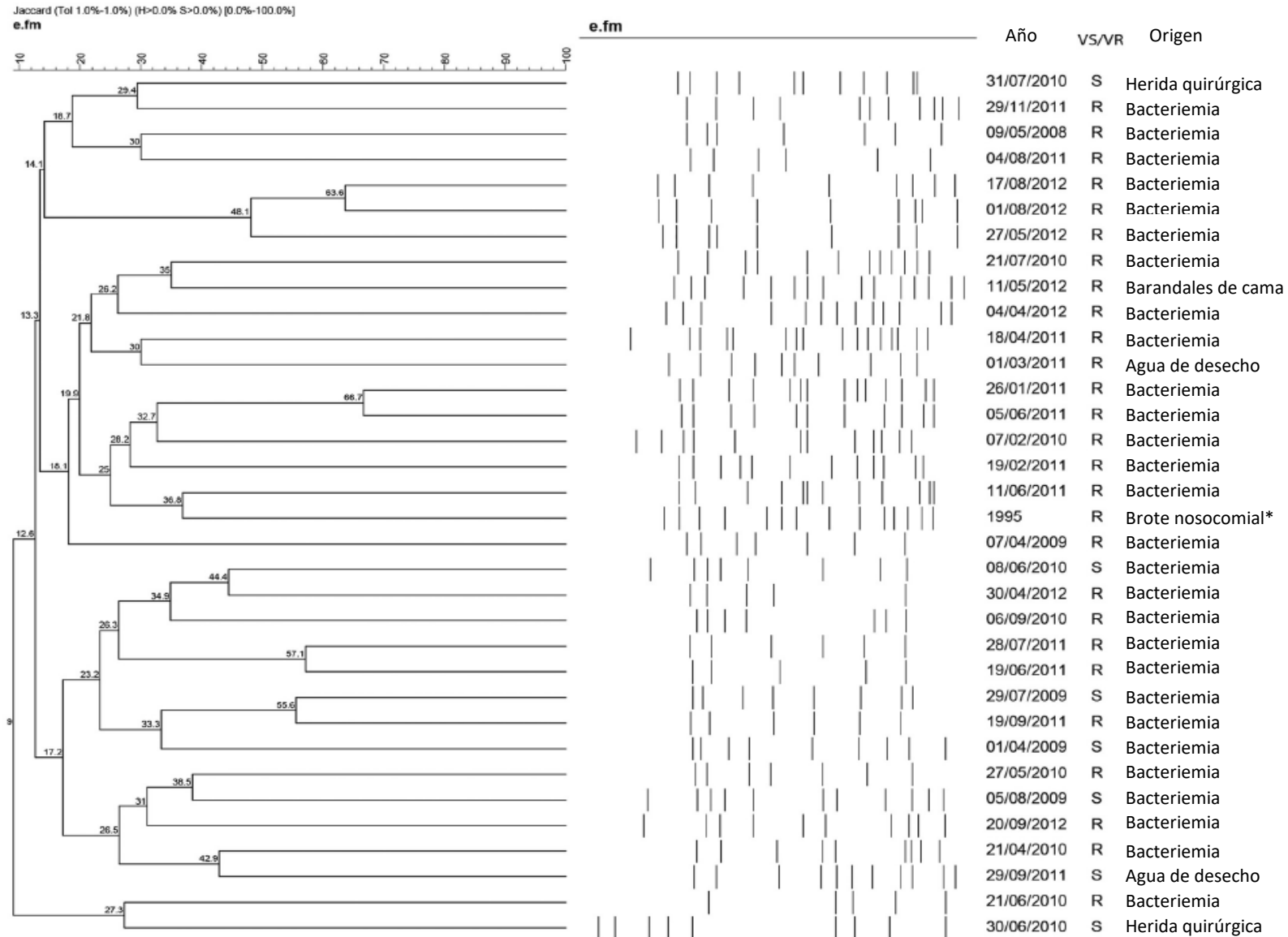


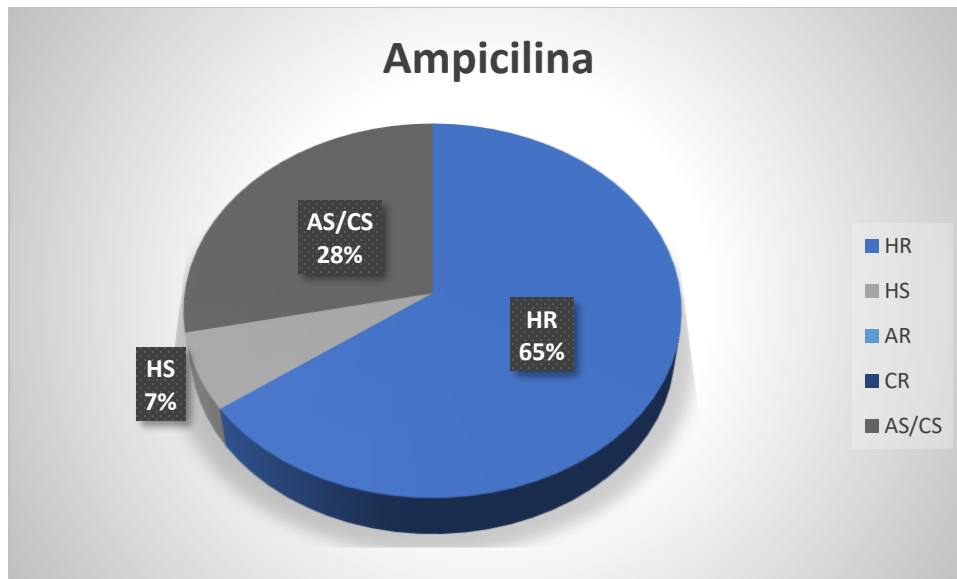
Figura 6. Dendrograma de la relación genética de 33 aislamientos hospitalarios de *Efm* (clínicos, de la salida del agua del hospital y del ambiente hospitalario). Los números de las ramas representan el porcentaje de similitud. VR: vancomicina resistente, VS: vancomicina sensible. \*Cepa de referencia E155.



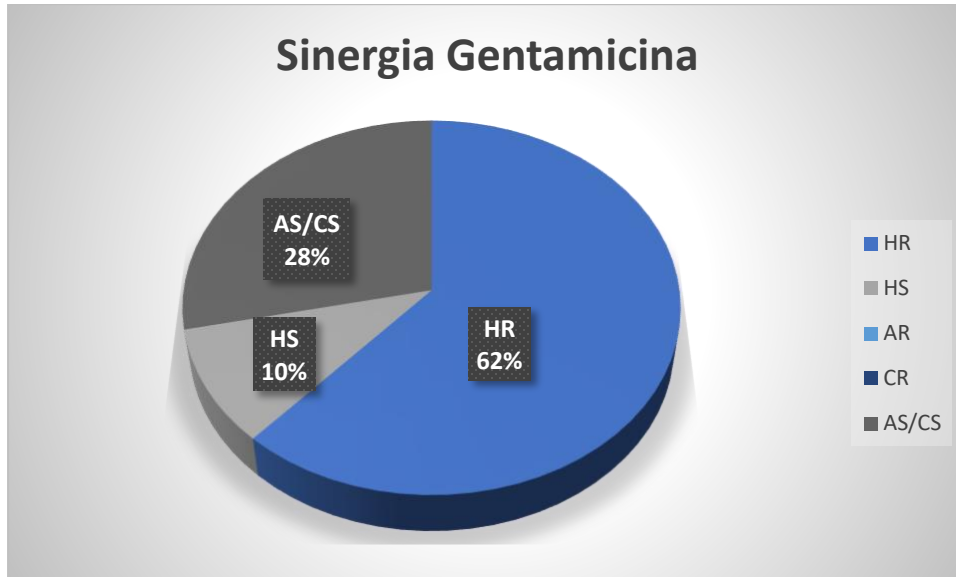
## ANEXO C – GRÁFICAS

Las siguientes gráficas representan en porcentajes la resistencia o susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos de cada grupo de la colección: HR (hospitalarias resistentes), HS (hospitalarias susceptibles), AR (ambientales resistentes), CR (comensales resistentes), AS/CS (ambientales susceptibles/comensales susceptibles).

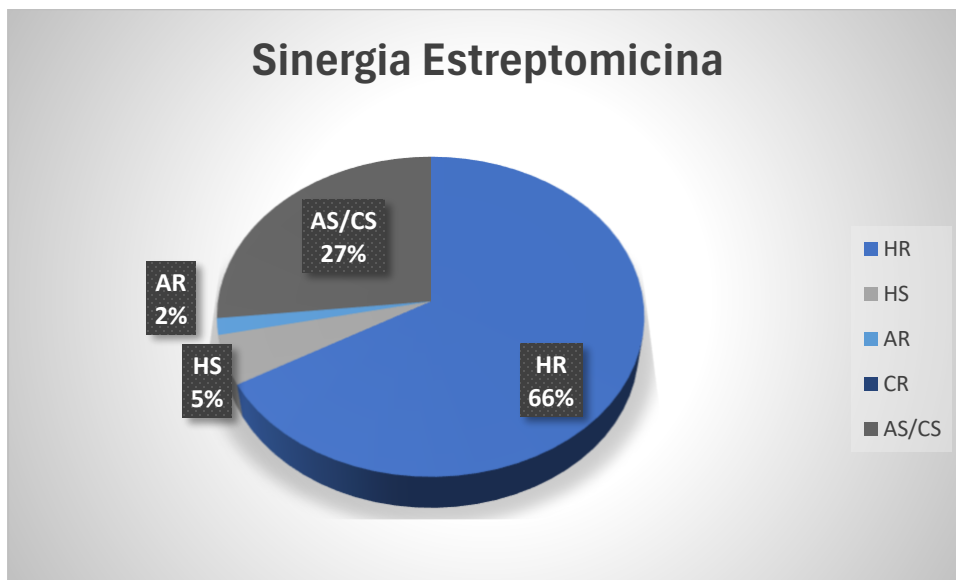
Gráfica 1.



Gráfica 2.

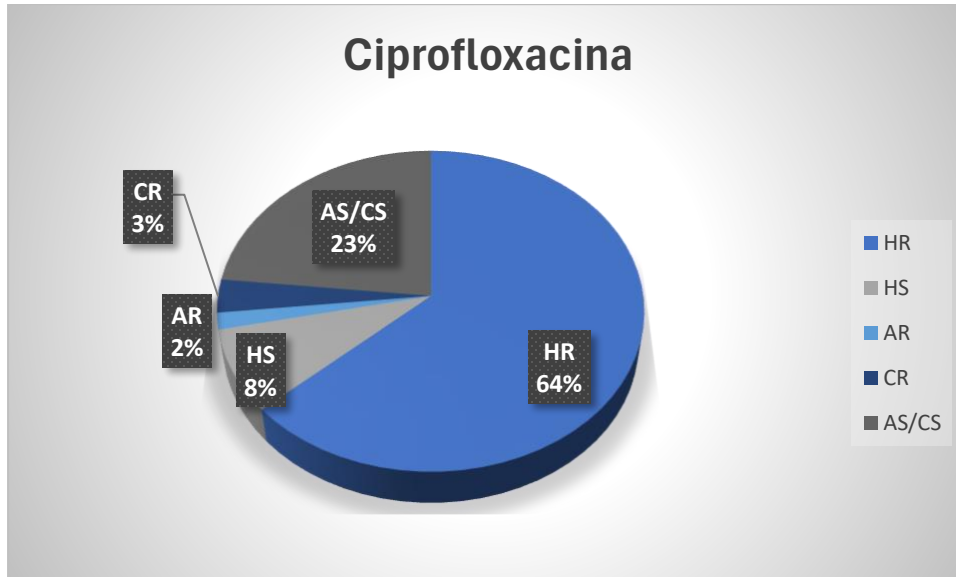


Gráfica 3.

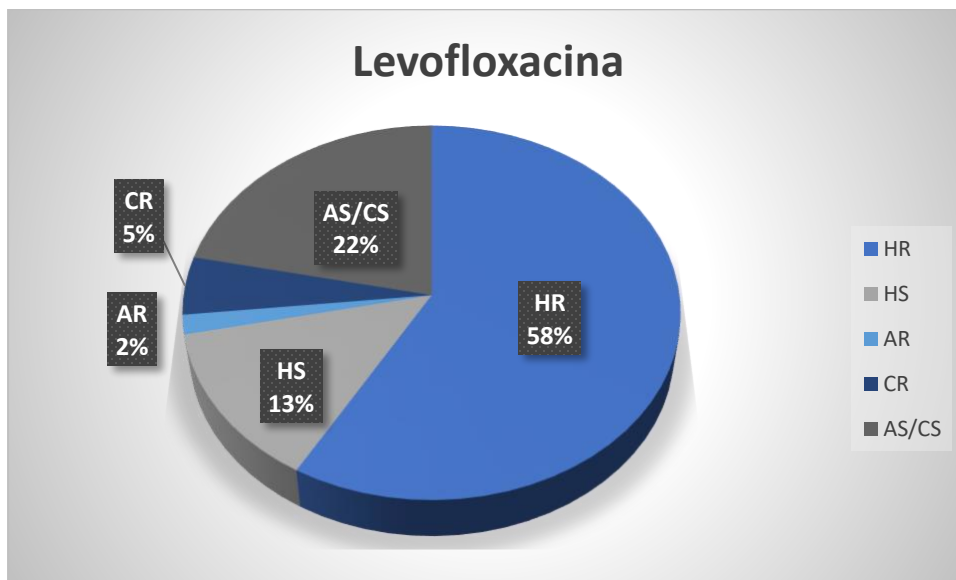




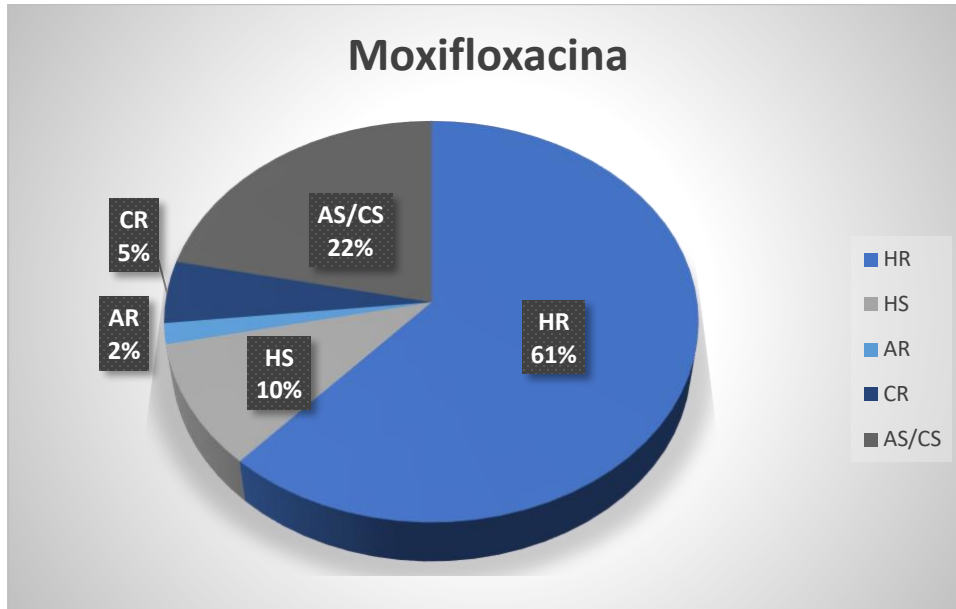
Gráfica 4.



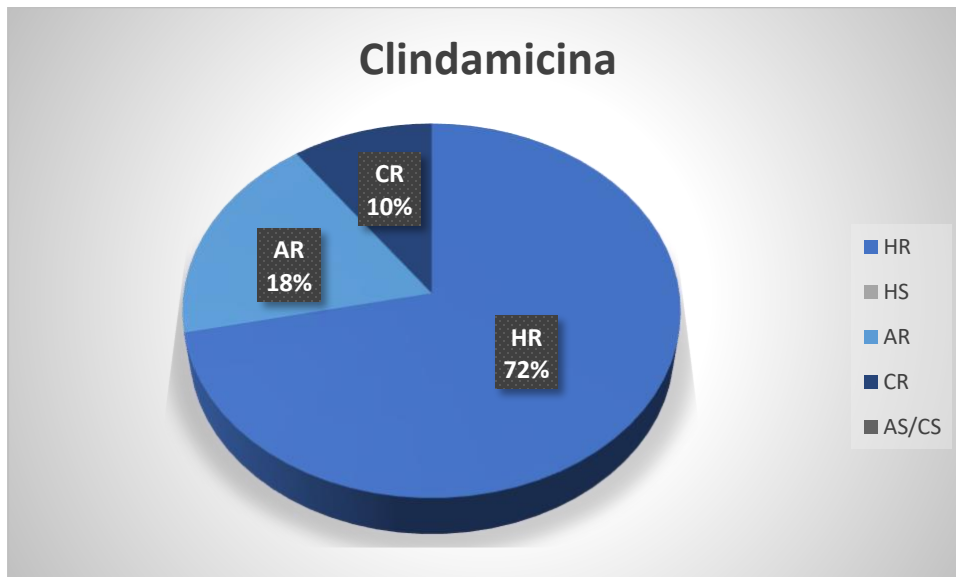
Gráfica 5.



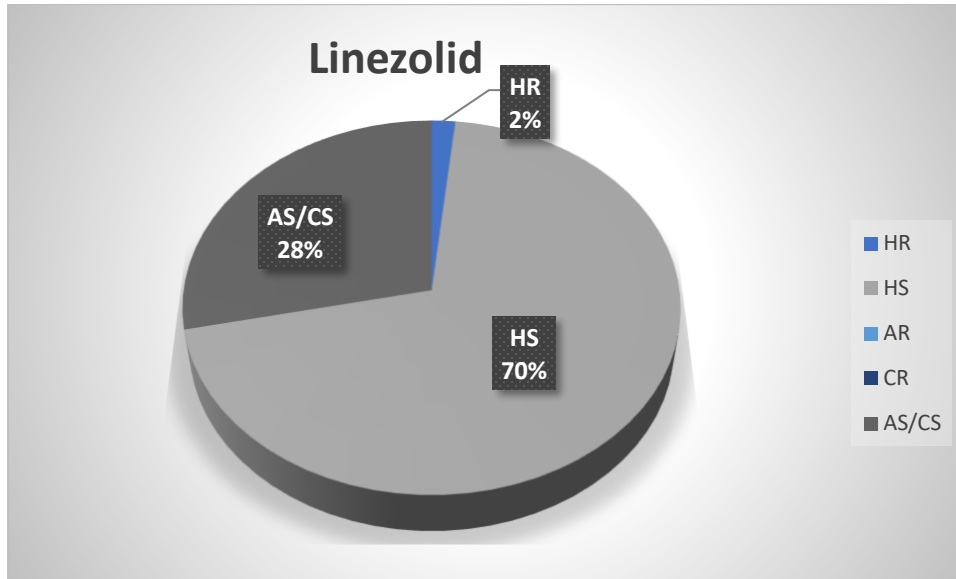
Gráfica 6.



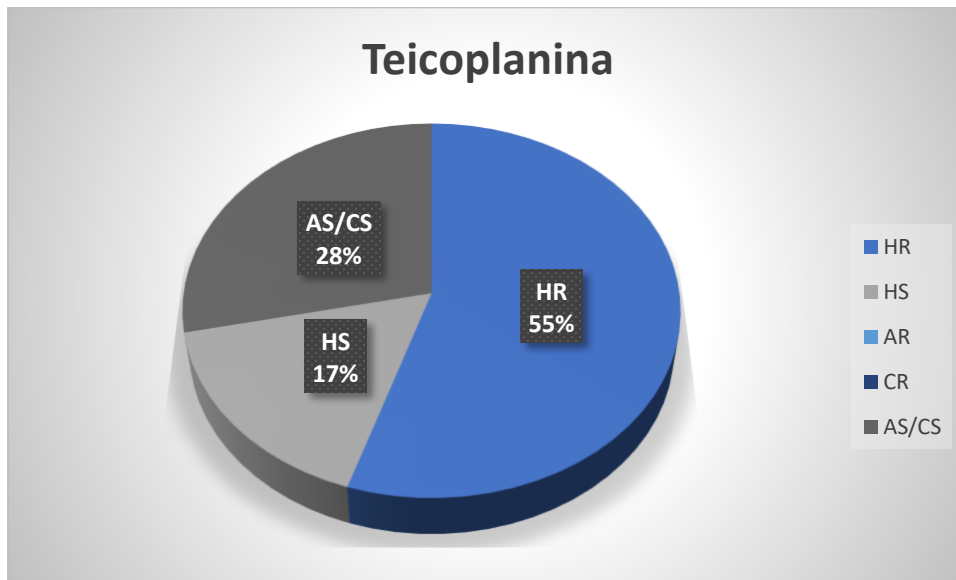
Gráfica 7.



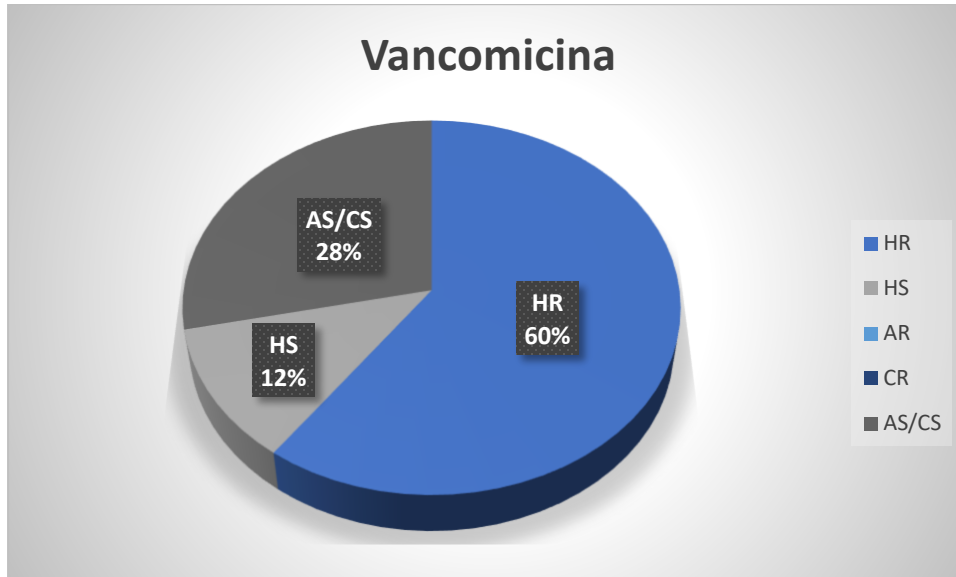
Gráfica 8.



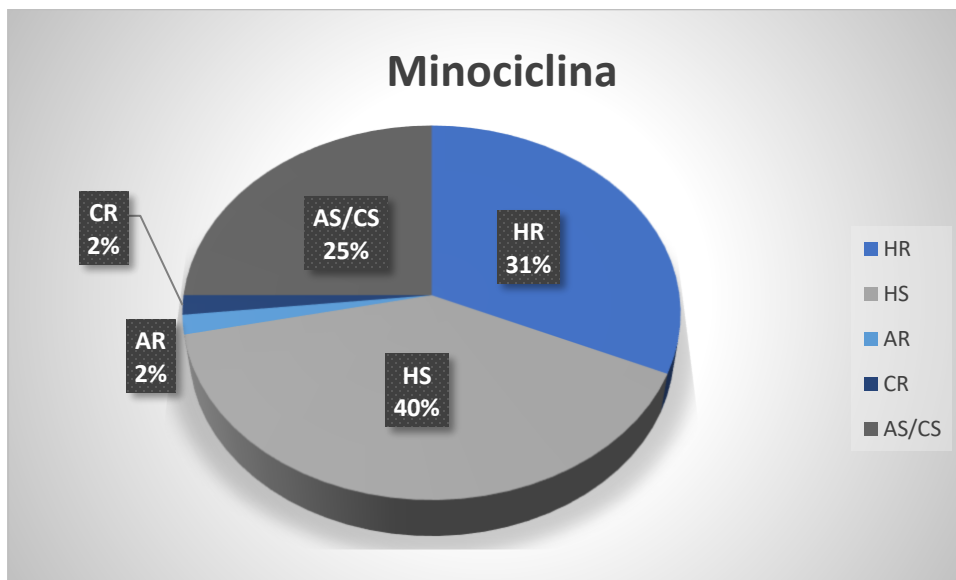
Gráfica 9.



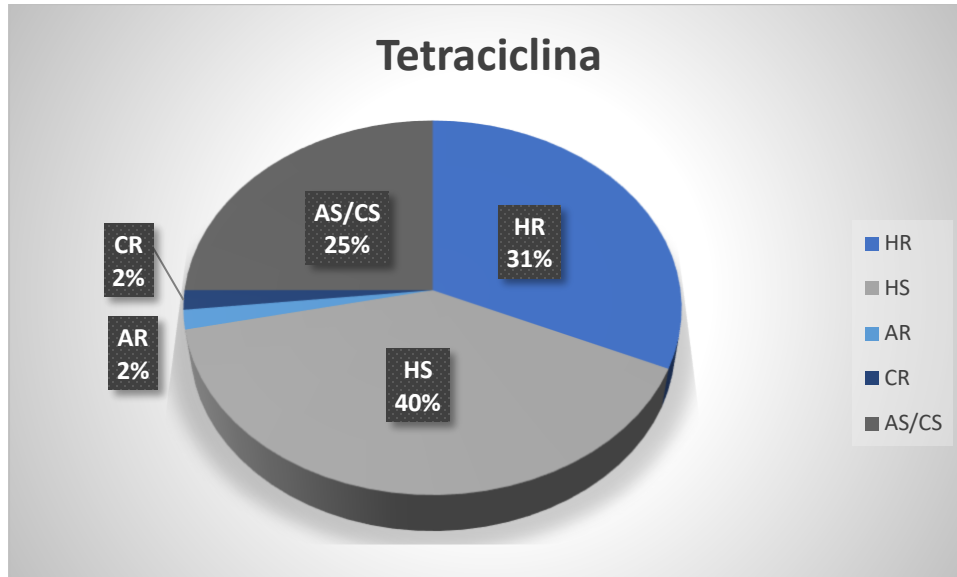
Gráfica 10.



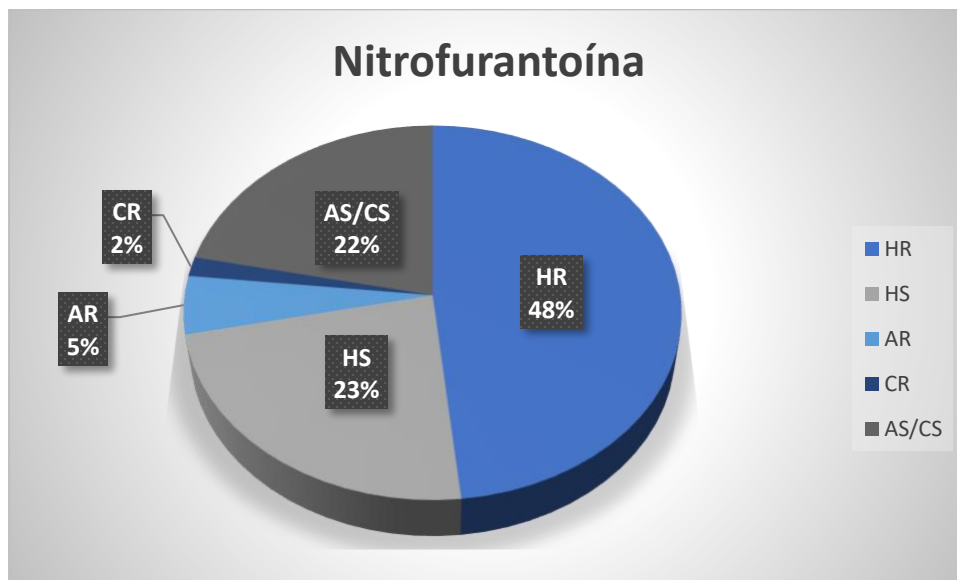
Gráfica 11.



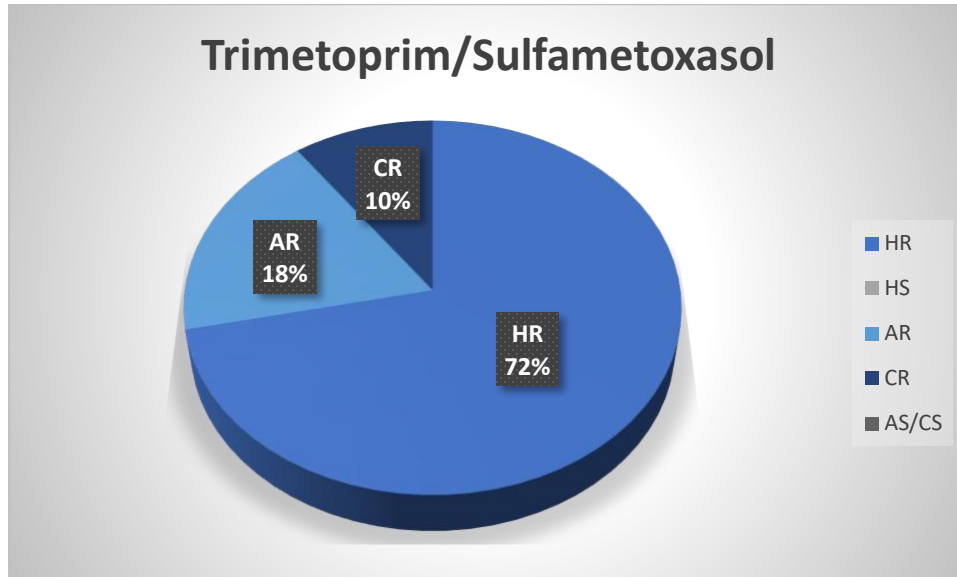
Gráfica 12.



Gráfica 13.



Gráfica 14.



## ANEXO D – METODOLOGÍA

## Condiciones de PCR

Se reportan las condiciones utilizadas para la amplificación de los diferentes genes seleccionados para cada objetivo. A continuación, se muestra la lista de los oligos utilizados en este trabajo.

<i>Gen</i>	<i>Oligo</i>	<i>Secuencia (5' - 3')</i>	<i>Tamaño (pb)</i>
<b>sodA Efm</b>	FM1B	ACA ATA GAA GAA TTA TTA TCT G	214
	FM2B	CGG CTG CTT TTT TGA ATT CTT CT	
<b>sodA Efs</b>	FL1	ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC	360
	FL2	TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG	
<b>vanA</b>	vanA1	GGGAAAACGACAATTGC	732
	vanA2	GTACAATGCGGCCGTTA	
<b>vanB</b>	vanB1	ATGGGAAGCCGATAGTC	635
	vanB2	GATTCGTTCTCACC	
<b>esp</b>	esp-F	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	945
	esp-R	GCGTCAACACTTGCATTGCCGA	
<b>hyl</b>	hyl-F	GAGTAGAGGAATATCTTAGC	661
	hyl-R	AGGCTCCAATTCTGT	
<b>adk</b>	adk1	TATGAACCTCATTTTAATGGG	437
	adk2	GTTGACTGCCAAACGATTTT	
<b>atpA</b>	atpA1	CGG TTC ATA CGG AAT GGC ACA	556
	atpA2	AAG TTC ACG ATA AGC CAC GG	
<b>ddl</b>	ddl1	GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G	465
	ddl2	AAA AAG AAA TCG CAC CG	
<b>gdh</b>	gdh1	GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT	530
	gdh2	CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA	
<b>gyd</b>	gyd1	CAA ACT GCT TAG CTC CAA GG C	395
	gyd2	CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC	
<b>pstS</b>	pstS1	TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G	583
	pstS2	CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC	
<b>purK</b>	purK1	GCA GAT TGG CAC ATT GAA AGT	492
	purK2	TAC ATA AAT CCC CCT GTT TY	

*Identificación de especie*

Se utilizaron oligos para la amplificación del gen *sodA* de Efm y Efs en reacciones de 25  $\mu$ L

95°	x	4m	}	X	30 ciclos
95°	x	30s			
55°	x	1m			
72°	x	1m			
72°	x	7m			

*Genotipo Van*

Se utilizaron oligos para la amplificación de los genes *vanA* y *VanB* de Efm en reacciones de 25

$\mu$ L.

94°	x	5m	}	X	30 ciclos
94°	x	1m			
54°	x	1m			
72°	x	1m			
72°	x	10m			

*Factores de virulencia*

Se utilizaron oligos para la amplificación de los genes *hyl* de Efm en reacciones de 30  $\mu$ L.



94°	x	5m	}	X	30 ciclos
94°	x	45s			
60°	x	45s			
72°	x	2m			
72°	x	5m			

Se utilizaron oligos para la amplificación de los genes *esp* de Efm en reacciones de 30 µL.

94°	x	5m	}	X	30 ciclos
94°	x	45s			
64°	x	45s			
72°	x	2m			
72°	x	5m			

#### MLST

Se utilizaron oligos para la amplificación de los genes *adk*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *pstS* y *purK* de Efm en reacciones de 50 µL. En éste caso se utilizó como polimerasa Taq Gold (AmpliTaq Gold DNA Polymerase – Thermo Fisher Scientific)

94°	x	5m	}	X	35 ciclos
94°	x	30s			
50°	x	30s			
72°	x	30s			
72°	x	5m			

## Medios y soluciones

Todos los medios y soluciones fueron preparados y esterilizados para evitar contaminación de las muestras y cultivos.

### *Medios*

- Agar Soya – Trypticaseína

40 g

- Caldo Soya – Trypticaseína BD

30 g

### *Soluciones*

- TBE 10X

Trizma base                    108 g

Ácido bórico                    55 g

EDTA 0.5 M pH 8            40mL

Aforar a 1000 mL con H<sub>2</sub>O desionizada

Esterilizar

- TE

Tris 1M, pH 7.5                10 mL

EDTA 0.5 M, pH 8            2 mL

Aforar a 1000 mL con H<sub>2</sub>O desionizada

Esterilizar

- EDTA 0.5 M, pH8

EDTA                      186.1 g

H<sub>2</sub>O                        800 mL

Ajustar pH con NaOH

Aforar a 1000 mL con H<sub>2</sub>O desionizada

Esterilizar

- Tris 1M, pH 7.5

Trizma base              121.1 g

H<sub>2</sub>O                        800 mL

Ajustar pH con HCl

Aforar a 1000 mL con H<sub>2</sub>O desionizada

Esterilizar

ANEXO E (Artículo publicado)

# High Phenotypic and Genotypic Diversity of *Enterococcus faecium* from Clinical and Commensal Isolates in Third Level Hospital

Claudia Mayoral-Terán,<sup>1</sup> Karen Flores-Moreno,<sup>1</sup> Miguel A. Cevallos,<sup>2</sup> Patricia Volkow-Fernández,<sup>3</sup> Santiago Castillo-Ramírez,<sup>2</sup> Lucia Graña-Miraglia,<sup>2</sup> and Yolanda López-Vidal<sup>1</sup>

**Background:** The use of antimicrobials and myeloablative chemotherapy regimens has promoted multiresistant microorganisms to emerge as nosocomial pathogens, such as vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm). We described a polyclonal outbreak of bloodstream infection caused by Efm in a hemato-oncological ward in Mexico. Our aim was to describe the clonal complex (CC) of the Efm strains isolated in the outbreak in comparison with commensal and environmental isolates.

**Methodology:** Sixty Efm clinical, environmental, and commensal strains were included. We constructed a cladogram and a phylogenetic tree using Vitek and Multilocus sequence typing data, respectively.

**Results:** We reported 20 new sequence types (ST), among which 17/43 clinical isolates belonged to CC17. The predominant ST in the clinical strains were ST757, ST1304, ST412, and ST770. Neither environmental nor commensal isolates belonged to CC17. The phylogeny of our collection shows that the majority of the clinical isolates were different from the environmental and commensal isolates, and only a small group of clinical isolates was closely related with environmental and commensal isolates. The cladogram revealed a similar segregation to that of the phylogeny.

**Conclusions:** We found a high diversity among clinical, environmental, and commensal strains in a group of samples in a single hospital. Highest diversity was found between commensal and environmental isolates.

**Keywords:** polyclonal outbreak, bacteremia, vancomycin resistance, MLST, high diversity, *Enterococcus faecium*, biotypes, clinical isolates, commensal isolates, environmental strains

## Introduction

*ENTEROCOCCUS FAECIUM* (Efm) has emerged as a nosocomial pathogen in the past three decades.<sup>1</sup> It has been recognized as one of the microorganisms frequently isolated in patients with mucosal barrier injury laboratory-confirmed bloodstream infections (BSIs), due to bacterial translocation in patients with profound neutropenia after myeloablative chemotherapy or graft versus host disease. Some studies have shown that outbreaks caused by Efm can be polyclonal, stressing the importance of antimicrobial pressure and myelosuppressive therapeutic regimes over solely nosocomial transmission.<sup>2–8</sup>

Efm has developed resistance to different antimicrobials, including the following: penicillin/ampicillin, aminoglycoside, and glycopeptides such as vancomycin.<sup>9</sup> Nine genotypes

encoding for resistance to vancomycin have been described (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, and *vanN*).<sup>10</sup> The *vanA* and *vanB* genotypes are the most frequent worldwide: in America and Europe.<sup>10,11</sup> In addition to multidrug resistance, Efm has virulence factors that facilitate host invasion. There are two potential virulence factors, namely hyaluronidase (*hyl*) and enterococcal surface protein (*esp*), which have been associated with outbreaks. These virulence factors can facilitate Efm in causing invasive infections<sup>5,12–14</sup>; in addition, the expression of the *esp* gene in Efm strains is associated with biofilm formation, and it was reported that *esp*-positive strains can produce thicker biofilms.<sup>14</sup> This is important in the clinical setting, mainly because biofilm formation provides Efm protection against the host immune system and antimicrobials. The *hyl* gene encodes a hyaluronidase, a virulence factor described in

<sup>1</sup>Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México-Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico.

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Genómicas, Programa de Genómica Evolutiva, UNAM, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Cancerología, Mexico City, Mexico.

other human pathogens such as *Streptococcus pyogenes* or *Clostridium perfringens*, and has been associated with intestinal colonization in many other bacteria.<sup>5,13</sup>

Few studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) have been conducted in Mexico.<sup>2,15–22</sup> The first two strains of VREfm were isolated in 1999, and the second isolation was reported in 2005.<sup>15,16</sup> A few years later, Ochoa *et al.* showed that 9 of the 12 clinical isolates of VREfm obtained from a Mexican pediatric hospital outbreak belonged to clonal complex (CC) 17, which has been linked to Efm strains giving rise to nosocomial infections around the world.<sup>19</sup>

We reported an outbreak of BSI caused by VREfm and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*, along with the circumstances associated with this upsurge of bacteremia by Efm.<sup>2</sup> Using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), we determined that the outbreak was polyclonal and associated with the use of highly myelosuppressive chemotherapy regimens in patients with hematologic malignancies and antibiotic pressure, particularly vancomycin, due to an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in this group of patients.

As the outbreak was polyclonal,<sup>2</sup> we wanted to determine the possible origin of the outbreak, obtaining information to contrast with the following possible hypothesis: the Efm isolates were closely related to CCs usually involved in nosocomial infections and they were acquired from the hospital environment. To evaluate this hypothesis, we added to the initial outbreak collection, commensal, environmental, and more clinical isolates to determine their genetic relationships through a phylogenetic analysis of the multilocus sequence typing (MLST) genes.

## Materials and Methods

The VREfm isolates utilized in this work were the following: 33/60 belong to the polyclonal outbreak that occurred between 2010 and 2012 (included three strains of the hospital environment: two isolated from sewage, and one isolated from bed railings) at the Instituto Nacional de Cancerología,<sup>2</sup> and seven Efm clinical strains were isolated in 2013 from blood in the same group of patients in this hospital, one from Hospital Infantil de México and one from Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, the latter two isolated in 1999. We also included 11 environmental isolates (8 from Xochimilco channels, 2 from a water treatment plant, and another collected from a water well), 6 commensal isolates obtained from healthy volunteers, and 2 reference strains: *Enterococcus faecalis* 29212<sup>23</sup> and an *Enterococcus faecium* isolate belonging to CC17 (donated by J. Huebner, MD, of the Ludwig Maximilian University of Munich) (see Table 1 for a description of the collection).

To obtain commensal strains, we collected stool samples from 15 healthy volunteers who had not received any antimicrobial within the previous 60 days; age and gender were recorded. One sample was collected per volunteer, and we took the stool sample and resuspended it in 0.9% saline solution (100  $\mu$ L). Chromo agar plates were inoculated with cell suspensions previously made for the first selection and incubated at 37°C. Six colonies per sample were selected, and isolates were identified by PCR amplification of the *sodA* gene, utilizing their isolated genomic DNA as tem-

plate. We only recovered six Efm isolates from healthy volunteers' group. Mean age of the first group was 25 years (range, 22–28 years) (two males and four females).

### Bacterial species identification and antimicrobial resistance profile

In the majority of the clinical strains derived from a previously described outbreak,<sup>2</sup> we wanted to know whether there was a difference in the antimicrobial resistance profile among clinical, environmental, and commensal isolates. Antimicrobial resistance profiles and taxonomic assignation of our isolates at the species level were determined by the VITEK 2 system according to the manufacturer's instructions (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). We used the GP (N° Ref 21342) and AST—P577 (N° Ref 22218) cards, respectively. The isolates that were not clearly identified with the VITEK 2 system were processed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). To confirm the classification of our isolates, we used PCR to amplify the specific regions of the *sodA* gene for *E. faecium* (215 bp) and *E. faecalis* (360 bp),<sup>24</sup> and we selected only *vanA* (732 bp) and *vanB* (635 bp) genes to confirm the vancomycin resistance genotype because these are the most frequent worldwide.<sup>25</sup>

### VITEK 2 analysis

We utilized information of the VITEK 2 system on the use of substrates and constructed a cladogram to visualize how the strains were grouped if they exhibited similar use of substrates; this was performed using the parsimony program Pars within PHYLIP ver. 3.695.<sup>26</sup>

### DNA purification and PCRs

Genomic DNA was purified with a QIAmp DNA Mini Kit, according to the manufacturer's instructions (QIAGEN), while plasmid DNA was purified with the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). PCRs were performed with Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich). The presence of *sodA*, *vanA*, and *vanB* genes was determined by PCR using the primers and conditions previously described.<sup>24</sup> We determined whether there was a difference in the presence of the *esp* and *hyl* genes among the hospital, environmental, and commensal isolates. To amplify the enterococcal surface protein gene (*esp*) and the hyaluronidase gene (*hyl*), we utilized the previously described primers, but under different conditions. For the *esp* gene, conditions were denaturing at 94°C for 45 sec, annealing at 64°C for 45 sec, and extension at 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 5 min, while for the *hyl* gene, denaturing at 94°C for 45 sec, annealing at 60°C for 45 sec, and extension at 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 5 min.<sup>13,19</sup>

### Multilocus sequence typing

The conditions and primers used to amplify the internal fragments of the genes reported by the MLST scheme of Efm were those described in PubMLST.<sup>27</sup> PCR products were purified with a High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) and MacroGen-performed Sanger sequencing. Sequence assemblies were conducted with CLC Genomics Workbench 10th edition. To confirm the sequence of

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ISOLATE COLLECTION

<i>Alias</i>	<i>Date of isolation</i>	<i>Category</i>	<i>VS/VR</i>	<i>Source</i>
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	Negative control	VS	
Efm1	1995	Positive control	VS	Bacteremia
Efm2	04/10/13	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm3	07/29/09	Clinical isolation	VI	Bacteremia
Efm4	06/08/10	Clinical isolation	VS	Bacteremia
Efm5	08/05/09	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm7	07/31/10	Clinical isolation	VR	Surgical wound
Efm8	04/16/13	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm9	05/15/13	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm11	01/11/13	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm12	06/30/10	Clinical isolation	VS	Surgical wound
Efm13	04/21/13	Clinical isolation	VS	Bacteremia
Efm14	03/30/99	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm15	01/28/99	Clinical isolation	VS	Bacteremia
Efm16	05/09/08	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm17	04/07/09	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm18	04/01/09	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm19	02/07/10	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm20	04/21/10	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm21	05/27/10	Clinical isolation	VS	Bacteremia
Efm22	06/21/10	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm23	07/21/10	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm24	09/06/10	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm25	01/26/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm26	02/19/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm27	04/18/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm28	06/05/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm29	06/11/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm30	06/19/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm31	07/28/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm32	08/04/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm33	09/19/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm34	11/29/11	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm35	04/04/12	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm36	04/30/12	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm37	05/27/12	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm38	08/01/12	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm39	08/17/12	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm40	09/20/12	Clinical isolation	VR	Bacteremia
Efm42	06/05/13	Clinical isolation	VS	Bacteremia
Efm43	09/05/13	Clinical isolation	VS	Bacteremia
Efm6	09/09/11	Hospital environment	VR	Sewage
Efm10	05/11/12	Hospital environment	VS	Bed railings
Efm41	03/11	Hospital environment	VR	Sewage
Efm46	02/28/01	Environmental isolation	VS	Water
Efm47	02/08/01	Environmental isolation	VS	Water
Efm49	03/14/01	Environmental isolation	VS	Water
Efm51	02/08/01	Environmental isolation	VS	Water
Efm55	02/28/01	Environmental isolation	VS	Water
Efm56	02/28/01	Environmental isolation	VS	Water
Efm62	10/25/00	Environmental isolation	VS	Water
Efm65	07/00	Environmental isolation	VS	Water
Efm68	07/00	Environmental isolation	VS	Water
Efm69	02/28/01	Environmental isolation	VS	Water
Efm72	02/28/01	Environmental isolation	VS	Water
Efm73	04/14/15	Healthy volunteers	VS	Stool
Efm74	04/14/15	Healthy volunteers	VS	Stool
Efm75	04/14/15	Healthy volunteers	VS	Stool
Efm76	04/14/15	Healthy volunteers	VS	Stool
Efm77	04/14/15	Healthy volunteers	VS	Stool
Efm78	04/14/15	Healthy volunteers	VS	Stool

VR, vancomycin resistant; VS, vancomycin sensitive; VI, vancomycin intermediate resistant; Efm, *Enterococcus faecium*.

TABLE 2. ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILES

Alias	ST	Amp	H-L Gent	H-L Strepto	Ciprof	Levof	Moxif	Erythro	Clind	Q/D	Linezld	Teicop	Vanco	Minocycl	Tetracycl	Nitrof	T/S
Efm1	64	R>32	Syn-S	Syn-R	I 2	R>8	I 2	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R<10
Efm2	412	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	R 4	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	S 32	R>320
Efm3	1303	S≤2	Syn-R	Syn-R	S<0.5	S 1	S≤0.25	R>8	R>8	R 4	S 2	S<0.5	S 2	R>16	R>16	S<16	R<10
Efm4	1337	S 8	Syn-R	Syn-R	S<0.5	S 1	S≤0.25	R>8	R>8	R 8	S 2	S<0.5	R 8	R>16	R>16	S<16	R<10
Efm5	1306	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	I 2	S 2	S<0.5	I 8	R>16	R>16	I 64	R 160
Efm6	92	S≤2	Syn-R	Syn-R	I 2	S 2	I 2	I 2	R>8	S 1	S 2	S<0.5	S<0.5	R>16	R>16	I 64	R<10
Efm7	1304	R>32	Syn-S	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<0.5	S<1	I 64	R<10
Efm8	1305	R>32	Syn-R	Syn-R	I 2	S 2	S 1	R>8	R>8	S 1	S 2	R>32	R>32	S<0.5	S<1	I 64	R>320
Efm9	412	R>32	Syn-R	Syn-S	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	S<16	R>320
Efm10	757	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<0.5	S<1	I 64	R>320
Efm11	18	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 1	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	I 64	R 160
Efm12	757	S≤2	Syn-S	Syn-R	S<0.5	S 1	S≤0.25	R>8	R>8	R 4	S 2	S<0.5	S 2	R>16	R>16	S<16	R<10
Efm13	770	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<0.5	S<1	I 64	R 80
Efm14	205	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	I 2	S 2	S<0.5	S 1	R>16	R>16	S 32	R>320
Efm15	893	R>32	Syn-R	Syn-R	S<0.5	S 2	S 0.5	R>8	R>8	S 1	S 2	S<0.5	S 1	I 8	I 8	I 64	R<10
Efm16	412	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	S<0.25	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	R 256	R 160
Efm17	757	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	S<0.5	S<0.5	S<1	S<1	S 32	R>320
Efm18	1304	R>32	Syn-S	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R<10
Efm19	1306	R>32	Syn-R	Syn-R	I 4	R>8	R>8	R>8	R>8	R 4	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	S 32	R<10
Efm20	1313	R>32	Syn-S	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	I 2	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	I 64	R<10
Efm21	757	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R>320
Efm22	757	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	I 4	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R<10
Efm23	775	R 16	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	I 2	S 2	S<0.5	S 1	R>16	R>16	S 32	R>320
Efm24	412	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	R 128	R>320
Efm25	757	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R>320
Efm26	757	R>32	Syn-S	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	S 1	R>32	S<1	S<1	I 64	R>320
Efm27	770	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R 40
Efm28	412	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	I 64	R>320
Efm29	1304	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R>320
Efm30	1304	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R>320
Efm31	1304	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R>320
Efm32	1314	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	R 128	R 80
Efm33	1304	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R>320
Efm34	1315	R>32	Syn-S	Syn-S	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	R 128	R>320
Efm35	1304	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	S<16	R>320
Efm36	757	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	S 32	R 160
Efm37	770	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 1	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	R 128	R 80
Efm38	770	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R 40
Efm39	770	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 1	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	R 128	R 40
Efm40	770	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 1	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	S 32	R 20
Efm41	18	R>32	Syn-R	Syn-S	S 1	S 2	S 1	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	S<1	S<1	I 64	R<10
Efm42	1304	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	S 32	R>320
Efm43	412	R>32	Syn-R	Syn-R	R>8	R>8	R>8	R>8	R>8	S 0.5	S 2	R>32	R>32	R>16	R>16	S 32	R>320
Efm46	1316	S≤2	Syn-S	Syn-S	S 1	S 2	S 0.5	S 0.5	R>8	S 1	S 2	S<0.5	S<0.5	S<1	S<1	I 64	R<10

(continued)



TABLE 2. (CONTINUED)

Alias	ST	Amp	H-L Gent	H-L Strepto	Ciprof	Levof	Moxif	Erythro	Clind	Q/D	Linezld	Teicop	Vanco	Minocycl	Tetracycl	Nitrof	T/S
Efm47	1317	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 2	S 0.5	R > 8	R 4	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm49	1307	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 1	S 0.5	R > 8	R > 8	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm51	1318	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 2	S < 0.25	S < 0.25	R 4	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	I 64	R < 10
Efm55	1308	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S 1	S 2	S 1	I 2	R < 0.25	S 0.5	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm56	94	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 1	S ≤ 0.25	R > 8	R 4	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm62	218	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 1	S ≤ 0.25	R > 8	R > 8	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm65	1319	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 2	S ≤ 0.25	R > 8	R 4	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm68	971	S ≤ 2	Syn-S	Syn-R	R 4	I 4	R 4	I 4	R > 8	S 1	S 2	S < 0.5	S 1	R > 16	R > 16	S 32	R < 10
Efm69	1309	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 2	S 0.5	I 2	R < 0.25	S 0.5	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm72	1310	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 2	S 0.5	S < 0.25	R > 8	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	I 64	R < 10
Efm73	1311	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	I 2	I 4	I 2	I 2	R 2	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	I 64	R < 10
Efm74	1332	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S 1	S 2	S 1	I 1	R > 8	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S < 16	R < 10
Efm75	854	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S < 0.5	S 0.5	S ≤ 0.25	R > 8	R 4	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm76	29	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	R 4	I 4	R 4	I 4	R > 8	S 0.5	S 2	S < 0.5	S 1	R > 16	R > 16	S 32	R < 10
Efm77	1320	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S 1	I 4	I 2	S < 0.25	R < 0.25	S 0.5	S 1	S < 0.5	S 1	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10
Efm78	1312	S ≤ 2	Syn-S	Syn-S	S 1	S 2	S 0.5	S < 0.25	R < 0.25	S 1	S 2	S < 0.5	S < 0.5	S < 0.5	S < 1	S 32	R < 10

All results are according to minimal inhibitory concentration. Bold represents high resistance, italics represent intermediate resistance, and roman represents antimicrobial sensitive. ST, sequence types; Amp, ampicillin; H-L Gent, high level gentamicin; H-L Strept, high level streptomycin; Ciprof, ciprofloxacin; Levof, levofloxacin; Moxif, moxifloxacin; Erythro, erythromycin; Clind, clindamycin; Q/D, quinupristin-dalfopristin; Linezld, linezolid; Teicop, teicoplanin; Vanco, vancomycin; Minocycl, minocycline; Tetracycl, tetracycline; Nitrof, nitrofurantoin; T/S, trimethoprim/sulfamethoxazole; R, resistant; S, sensitive; I, intermediate; Syn-S, sensitive to synergy; Syn-R, resistant to synergy.

potential new alleles, the PCR products were cloned with a Clone JET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher), while the sequence of the plasmid inserts was obtained at the Instituto de Biotecnología and Instituto de Biología, UNAM. The new alleles and allelic profiles obtained were reported to the PubMLST database.

MLST analysis

All of the allelic sequences and allelic profiles reported to date in the PubMLST database as of September 24, 2017, were downloaded. The following alleles were removed due to the presence of insertion sequences: 113 *pstS* and 72, 67, and 82 *ddl*, as well as 1177, 998, 1180, and 1042 sequence types (ST). Phylogenetic trees were constructed using the concatenated alignments of the MLST *Efm* genes. The concatenated and the individual allele sequences were aligned in frame using AliView. We utilized SplitsTree 4 ver. 4.14.5<sup>28</sup> to detect recombination signals by means of the Phi statistic.<sup>29</sup> We estimated nucleotide diversity based on alleles with SplitsTree 4 ver. 4.14.5. Then, we used jModelTest ver. 2.1.10<sup>30,31</sup> to obtain the most appropriate model of nucleotide substitution and, subsequently, built the phylogenetic trees of each gene of the MLST *Efm* scheme with PhyML ver. 3.1.<sup>31,32</sup> In addition, another phylogenetic tree was constructed on the concatenated sequences of these genes with RaxML ver. 8.2.<sup>33</sup> All of the phylogenetic trees were visualized with FigTree ver. 1.4.3.

Results

Bacterial species identification and the antimicrobial resistance profile

Our collection comprised isolates from different sources, only 53 isolates were correctly identified as Efm with the VITEK ver. 2.0 system. The remaining seven were further analyzed using MALDI-TOF MS to corroborate their phenotypical identity as Efm. To further confirm the identity of the species, we used a PCR probe for *sodA*, and the 60 strains were positive for *sodA* probe of Efm.

All of the isolates of our collection were clindamycin and trimethoprim/sulfamethoxazole resistant (Table 2), the environmental and commensal isolates were all ampicillin susceptible, and 37 clinical isolates and 2 hospital environmental isolates were ampicillin resistant. Thirty-six hospital isolates exhibited resistance to vancomycin; 33 clinical isolates and 2 from the hospital environment exhibited high resistance to vancomycin, while only 1 of the clinical isolates possessed an intermediate vancomycin-resistance phenotype. Thirty-three of these 36 VREfm strains possessed the *vanA* resistance phenotype and 3 the *vanB* resistance phenotype. Interestingly, one ampicillin-susceptible strain revealed vancomycin resistance with a *vanB* resistance phenotype. However, we found only six vancomycin-susceptible isolates among those obtained from the hospital. In contrast, all of the environmental isolates (11) and the commensal isolates (6) were susceptible to vancomycin.

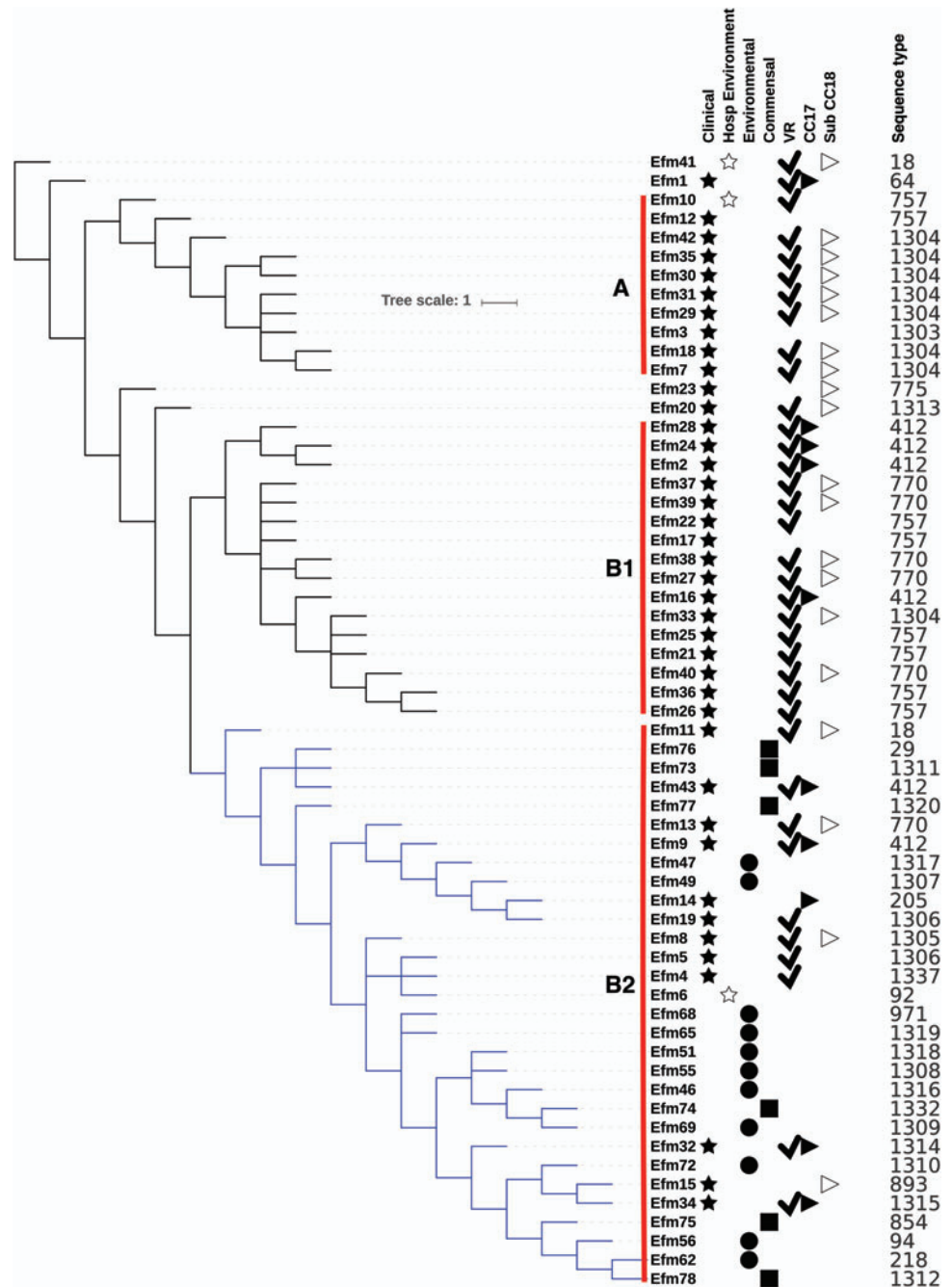
We also found that 5/43 of the clinical strains were not sensitive to quinupristin-dalfopristin, and 4/43 showed intermediate resistance. Only one clinical strain demonstrated

intermediate resistance to linezolid (Table 2). Resistance to teicoplanin and synergy with gentamicin were only present in hospital isolates.

In addition to the vancomycin-resistance phenotype, we found 42/60 isolates with the *vanA* gene (40 clinical isolates and 2 hospital-environment isolates). We found six clinical strains with the *vanA* genotype but with the vancomycin sensitive phenotype. Taken together, these results show that hospital isolates presented considerably more extended resistance profiles than environmental and commensal isolates (Table 2). Nonetheless, both environmental and commensal isolates exhibited resistance to some antimicrobials.

#### Metabolism profile cladogram

The VITEK 2 system results indicate that the collection of 60 isolates possesses 47 different metabolic profiles (biotypes). We constructed a cladogram, using the parsimony criterion, based on the ability or inability to utilize the different substrates included in the VITEK 2 system to evaluate whether the clinical isolates have a different metabolic profile from the commensal and environmental isolates. The cladogram (Fig. 1) depicts that there appears to be two clades containing clinical isolates: clade B1 has only clinical isolates, whereas clade A has a group of clinical isolates plus one isolated from the hospital environment.



**FIG. 1.** Cladogram of all biotypes with the characteristics of our collection. Color images are available online.

Clade B2 contains all of the commensal and environmental isolates: 12 clinical isolates and 1 hospital-environment isolate. The most outstanding difference between B1 and B2 is that the isolates from Clade B2 are unable to use glucuronic acid as carbon source.

#### Virulence factors

We determined whether there was a difference in the presence of the *esp* and *hyl* genes among the hospital, environmental, and commensal isolates. The *esp* gene was present in nearly all of the isolates (52/60) as follows: 38 clinical isolates; 3 hospital environmental isolates; 6 environmental isolates; and 5 commensal isolates. In contrast, the following 42/60 isolates exhibited the presence of the *hyl* gene: 34 clinical isolates; 2 hospital environmental isolates; 3 environmental isolates; and 3 commensal isolates. We did not find any relationship between the presence of *esp* or *hyl* genes and the source of the isolates. These results show that these genes are not exclusively present in the clinical isolates.

#### Multilocus sequence typing

To evaluate the genetic diversity of our isolates and compare them with others obtained from different parts of the world, we genotyped our collection with the MLST scheme used for *E. faecium*<sup>27</sup> and contrasted the results with those deposited in the PubMLST database. These analyses indicated that our collection is highly diverse, considering that it comprises 34 different ST as follows: 20 new and 14 previously described ST. Twenty-eight isolates were assigned to these 20 new ST because 9 of them have novel alleles, while the remainder is the result of new combinations of alleles already described. Interestingly, of the 40 clinical isolates studied here, only 17 (42.5%) belong to the widespread CC17, including single-, double-, or triple-locus variants of ST17. In addition to the latter, we found that the predominant ST in clinical isolates were 412, 757, 770, and 1304. We also found that, of three hospital-environment isolates, two of these were also part of CC17. However, we identified 11 clinical isolates and 1 hospital-environment isolate that are not related to CC17 (Table 3). We point out that to highlight that none of our environmental isolates is related to CC17 and that eight of them have new ST. Regarding the commensal isolates, four of these belong to new ST, two belong to already described ST, and none is part of CC17 (Table 3); despite the small size of our collection, we found a wide variety of ST. The latter corroborates the polyclonality of the strains involved in the 2011–2012 outbreak.<sup>2</sup>

#### Phylogenetic analysis

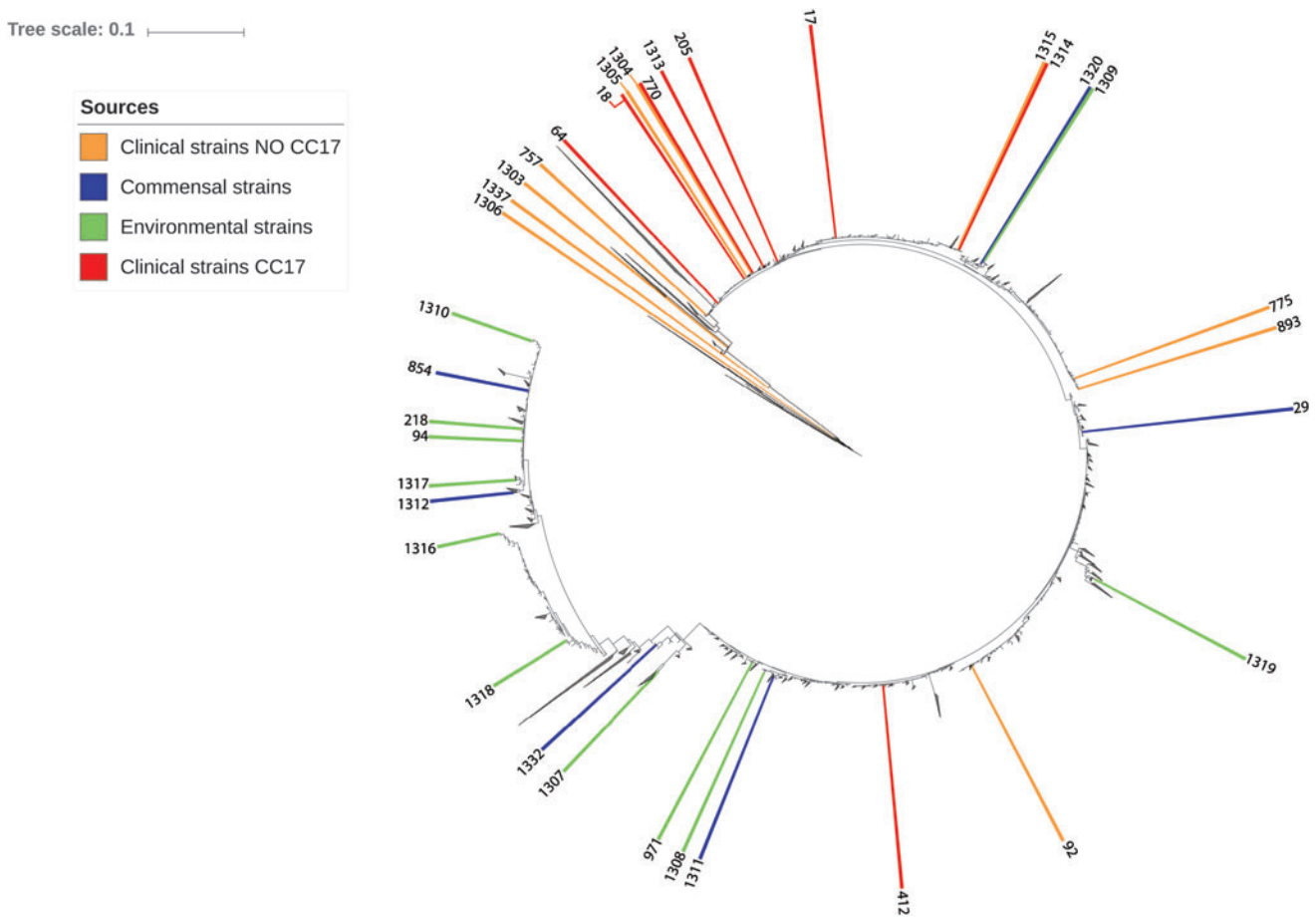
To evaluate the genetic relatedness of our isolates, we constructed two phylogenetic trees with the sequence of the MLST genes that did not have recombination signals, and these were the following: *adk*, *atpA*, *gyd*, and *purK*. One of these trees was constructed with all of the sequences of these genes present in the *Enterococcus* PubMLST database, and the second tree was constructed using only the sequenced data of our collection. Analysis of the first tree indicated that our isolates were distributed throughout the phylogenetic tree (Fig. 2). For instance, the new ST that we reported were

TABLE 3. SEQUENCE TYPES AND ID PUBMLST

Alias	Sequence types	Clonal complex (CC)/subclonal complex (subCC)	ID PubMLST	References
Efm3	1303 <sup>a</sup>		3118	2
Efm7	1304 <sup>a</sup>	subCC18	3120	2
Efm18	1304 <sup>a</sup>	subCC18	3122	2
Efm29	1304 <sup>a</sup>	subCC18	3124	2
Efm30	1304 <sup>a</sup>	subCC18	3125	2
Efm31	1304 <sup>a</sup>	subCC18	3126	2
Efm33	1304 <sup>a</sup>	subCC18	3104	2
Efm35	1304 <sup>a</sup>	subCC18	3127	2
Efm42	1304 <sup>a</sup>	subCC18	3128	This study
Efm8	1305 <sup>a</sup>	subCC18	3121	This study
Efm5	1306 <sup>a</sup>		3151	2
Efm19	1306 <sup>a</sup>		3123	2
Efm20	1313 <sup>a</sup>	CC17	3136	2
Efm32	1314 <sup>a</sup>	CC17	3137	2
Efm34	1315 <sup>a</sup>	subCC280	3138	2
Efm4	1337 <sup>a</sup>		3156	2
Efm49	1307 <sup>a</sup>	Singleton	3129	43
Efm55	1308 <sup>a</sup>	subCC518	3130	43
Efm69	1309 <sup>a</sup>	subCC156	3131	43
Efm72	1310 <sup>a</sup>		3132	43
Efm46	1316 <sup>a</sup>	subCC328	3139	43
Efm47	1317 <sup>a</sup>	Singleton	3140	43
Efm51	1318 <sup>a</sup>	Singleton	3141	43
Efm65	1319 <sup>a</sup>	Singleton	3142	43
Efm73	1311 <sup>a</sup>	subCC156	3133	3
Efm78	1312 <sup>a</sup>	Singleton	3134	3
Efm77	1320 <sup>a</sup>	Singleton	3143	3
Efm74	1332 <sup>a</sup>	subCC518	3152	3
Efm11	18	17	3090	3
Efm41	18	17	3110	2
Efm1	64	17	NA	NA
Efm6	92	subCC32	3087	2
Efm14	205	17	3147	43
Efm2	412	17	3086	3
Efm9	412	17	3088	3
Efm16	412	17	3094	2
Efm24	412	17	3099	2
Efm28	412	17	3103	2
Efm43	412	17	3111	3
Efm10	757		3089	2
Efm12	757		3091	2
Efm17	757		3095	2
Efm21	757		3096	2
Efm22	757		3097	2
Efm36	757		3105	2
Efm25	757		3100	2
Efm26	757		3101	2
Efm13	770	17	3092	This study
Efm27	770	17	3102	2
Efm37	770	17	3106	2
Efm38	770	17	3107	2
Efm39	770	17	3108	2
Efm40	770	17	3109	2
Efm23	775	subCC18	3098	2
Efm15	893	subCC18	3093	43
Efm56	94	subCC178	3112	43
Efm62	218	CC76	3113	43
Efm68	971	subCC134	3114	43
Efm75	854	subCC178	3116	This study
Efm76	29	subCC117	3117	This study

<sup>a</sup>New sequence types.

MLST, multilocus sequence typing; NA, not available.



**FIG. 2.** Phylogeny of 1,348 concatenate sequences of *Enterococcus faecium* database from PubMLST. The lines indicate location of the sequence types of our collection. Color images are available online.

not grouped together, nor were the clinical, environmental, or commensal isolates.

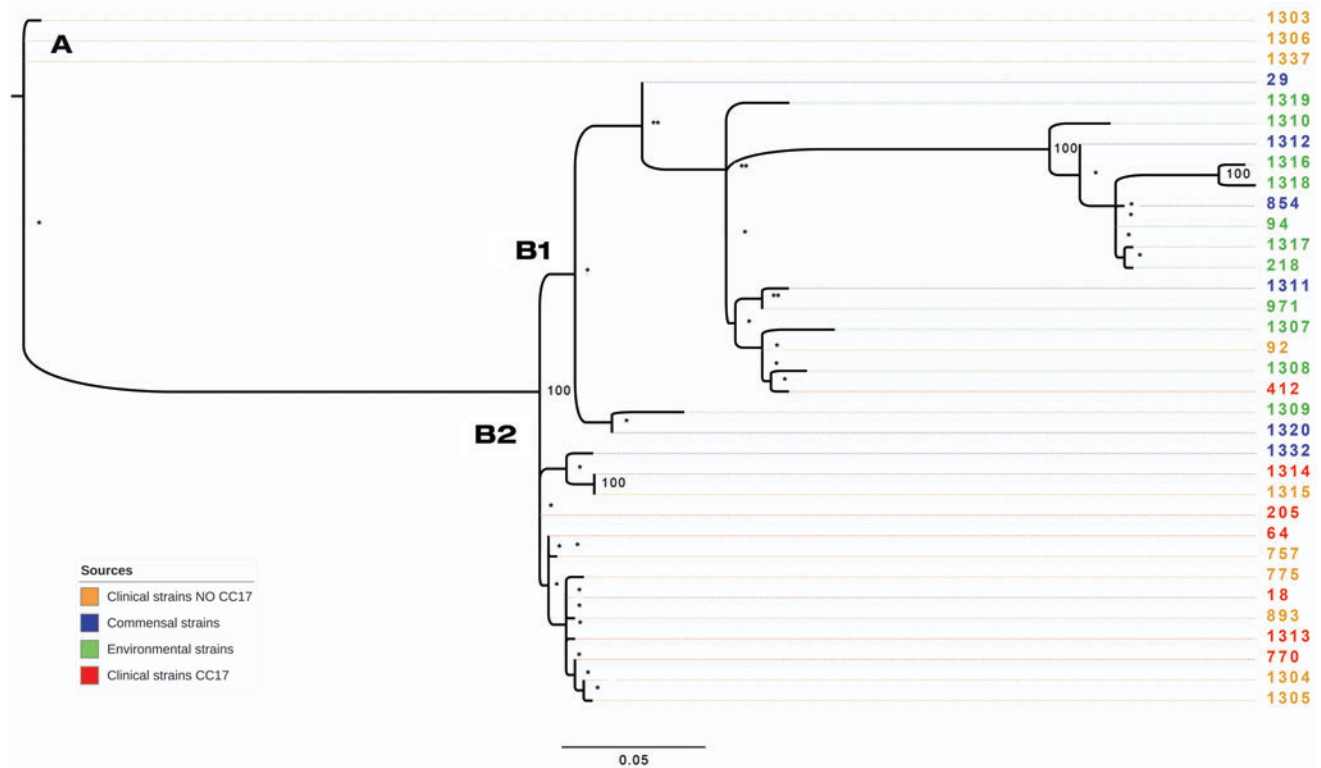
The second tree demonstrated that our isolates were distributed in two clades as follows: Clade A included four distant clinical isolates, while clade B contained the remaining clinical, environmental, and commensal isolates. Clade B can be further subdivided into two subclades as follows: B1 contains the majority of the commensal and environmental isolates, and B2 the majority of the clinical isolates. However, we would like to highlight that the clinical isolates belonging to ST412 are part of CC17, in that they are tightly grouped with some commensal and environmental isolates. Clinical isolates belonging to ST1314 and ST1315 are closely associated with a commensal isolate (ST1332) (Fig. 3). In summary, our phylogenetic analyses indicate that these Mexican isolates are quite diverse and that clinical and nonclinical (environmental and commensal) isolates are not differentiated from one another in terms of their position on the tree.

## Discussion

Efm, once considered a commensal of the gut that only caused occasional opportunistic infections in severely ill and immunocompromised patients, has become an important nosocomial opportunistic pathogen and has gained resis-

tance to vancomycin. Moreover, this microorganism possesses some characteristics that allow it to survive and prosper in the hospital environment: the ability to survive for prolonged periods in inanimate environments, and also the ability to acquire antibiotic-resistance determinants and skills to colonize the skin and the intestinal tract, a “triple threat,” as some authors described.<sup>34</sup>

In the cladogram that we constructed (Fig. 1) with the metabolism profile of Efm, we found that environmental and commensal isolates are located in a clade different from that of the majority of the clinical isolates. It appears that the critical difference between these two clades is that all of the commensal and environmental isolates were incapable of using glucuronic acid as carbon source, unlike clinical isolates. This observation suggests that the chromogenic detection of Beta-glucuronidase could be a relevant criterion to distinguish the majority of clinical isolates from those isolated from the environment. This test has been useful for the characterization of some microorganisms, such as *Escherichia coli*, *Salmonella* species, and some strains of *Clostridium* and *Staphylococcus*.<sup>35–38</sup> Beta-glucuronidase has been associated with the breakdown of the intercellular substance of the host’s connective tissue.<sup>35,36</sup> It is important to mention that although the presence of Beta-glucuronidase is not considered a virulence factor, some studies have been able to differentiate pathogenic strains with the positivity of the test.<sup>37,38</sup>



**FIG. 3.** Phylogeny of 34 concatenate sequences of our collection. Node Trust Level: 100, \*\*: 70–99, \*: <70. Color images are available online.

In this study, we observed a clear difference between the antibiotic-resistance profiles of hospital isolates compared to those of environmental and commensal isolates (Table 2). In general, hospital isolates were nonsusceptible to a broader range of antibiotics, unlike the remainder of the isolates. All isolates of the collection were resistant to clindamycin and trimethoprim-sulfamethoxazole. This observation is consistent with other reports that indicate that Efm, independent of the isolation source, possesses intrinsic resistance to both antibiotics.<sup>9,39</sup>

Analysis of Efm outbreaks in hospitals frequently showed that they are polyclonal, rendering it difficult to explain the outbreak from a common source of infections.<sup>2–8</sup> We studied isolates from the same nosocomial outbreak, obtained from patients with hematologic malignancies and treated with highly myelosuppressive chemotherapy. These isolates were characterized through PFGE and showed that this outbreak was polyclonal. To elucidate the possible origin of the isolates, we conducted genotyping with an MLST scheme, considering not only the 43 clinical isolates of the outbreak but also commensal and environmental Efm isolates. Through this analysis, we found a high level of diversity within our collection. Of the 60 isolates analyzed in this work, we found 34 different ST, including 20 new ST. Notably, the majority of the new ST were obtained from commensal and environmental isolates. Only 17 isolates were associated with the widespread CC17, but 12 were not closely related with this CC, and another 11 isolates did not have any relation with this CC. With this analysis, we found two ST (ST757 and ST770) that are probably endemic in Mexico, as this is the second report of clinical isolates from Mexican patients belonging to ST 757 and 770.<sup>19</sup>

The phylogenetic analysis provided us with new clues: The phylogenetic tree revealed two small clades that link

environmental or commensal isolates with nosocomial isolates. The first clade includes six clinical isolates belonging to ST412 and to CC17, two environmental isolates, and one from the nosocomial environment (sewage). Interestingly, all nosocomial isolates were resistant to vancomycin. The second clade was constituted of two clinical vancomycin-resistant isolates and one commensal isolate. Our interpretation of these observations is that our nosocomial isolates have two possible origins: (i) the hemato-oncologic patient's microbiome before hospital admission with a wide variety of strains, including some of CC17.<sup>2</sup> (ii) The antibiotic therapy (including vancomycin) that these patients received selected clones that were resistant to the antibiotics.<sup>40</sup> Hemato-oncological patients are treated with highly myelosuppressive regimens that produce profound neutropenia and injury to the mucosa, allowing Efm strains to translocate and invade the bloodstream.<sup>2,41</sup> We cannot exclude the fact that another possible origin was that some patients could have acquired Efm in the hospital (nosocomial-adapted strains)<sup>42</sup>; however, it is difficult to trace the route of acquisition from environmental strains to the patient's intestinal tract. We think that the outbreak of Efm BSI in these hemato-oncologic patients is rather related to the grouping of patients in a hospital ward with common therapeutic procedures (highly myelosuppressive-chemotherapy regimens) and the extensive use of antibiotics, including vancomycin, which selects the patient's microbiome. This hypothesis explains the diversity of clones involved in the outbreak and the common type of highly myelosuppressed patients.

Consistent with the polyclonal nature of the outbreak analyzed here, we did not find a specific antimicrobial-resistance profile in Efm strains belonging to CC17. It is noteworthy that some

isolates belonging to CC17 have the same antimicrobial-resistance profile as other clinical isolates that do not belong to this CC, suggesting that antibiotic-resistance genes are linked to mobile elements such as plasmids or transposons.<sup>9,39</sup>

The isolates linked with BSI probably formed part of the patients' microbiome. The antibiotic pressure selected the clones in each patient, and the disruption of the mucosal integrity (induced by the myelosuppressive chemotherapy) allowed to translocate from the patient's gut microbiota and finally cause BSI.

## Conclusion

This study has two main contributions: first, it showed that the Efm circulating in a single hospital is highly diverse and that highest diversity was found in the commensal and environmental isolates, and second, the nosocomial isolates obtained from patients of the outbreak probably have different origins. It is very likely that some of the strains of the BSI could have originated from selected clones of the patient's own microbiome.

## Acknowledgments

The authors thank Lilia Ruiz-Velázquez for helping with final figures and Patricia Orduña, PhD, for supervising the methodologies used in the present study.

## Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## Funding Information

This work was partially supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IV200315, Universidad Nacional Autónoma de México, and Fundación Gonzalo Río Arronte, proyecto S.590. Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU) (513047).

## References

- Lebreton, F., R.J.L. Willems, and M.S. Gilmore. 2014. *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization. In M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar (eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, pp. 5–63.
- Alatorre-Fernandez, P., C. Mayoral-Teran, C. Velazquez-Acosta, C. Frnaco-Rodríguez, K. Flores-Moreno, M.A. Cevallos, Y. López-Vidal, and P. Volkow-Fernández. 2017. A polyclonal outbreak of bloodstream infections by *Enterococcus faecium* in patients with hematologic malignancies. *Am. J. Infect. Control* 45:260–266.
- Landerslev, K.G., L. Jakobsen, S.S. Olsen, M.B. Pedersen, B. Kristensen, L.E. Lemming, M. Wang, M. Kjærsgaard, M. Stegger, H. Hasman, and A.M. Hammerum. 2016. Polyclonal spread of vanA *Enterococcus faecium* in Central Denmark region, 2009–2013, investigated using PFGE, MLST and WGS. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48:767–768.
- Kawalec, M., M. Gniadkowski, and W. Hryniewicz. 2000. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a hospital in Gdask, Poland, due to horizontal transfer of different Tn1546-like transposon variants and clonal spread of several strains. *J. Clin. Microbiol.* 38:3317–3322.
- Freitas, A.R., A.P. Tedim, C. Novais, P. Ruiz-Garbajosa, G. Werner, J.A. Laverde-Gomez, R. Cantón, L. Peixe, F. Baquero, and T.M. Coque. 2010. Global spread of the hyl(Efm) colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2660–2665.
- Iosifidis, E., K. Karakoula, E. Protonotariou, M. Kaperoni, E. Matapa, S. Pournaras, D. Kolioukas, D. Sofianou, and E. Roilides. 2012. Polyclonal outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a pediatric oncology department. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 34:511–516.
- Liu, Y., B. Cao, L. Gu, and H. Wang. 2011. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci in a Chinese hospital between 2003 and 2009. *Microb. Drug Resist.* 17:449–455.
- Kawalec, M., J. Kedzierska, A. Gajda, E. Sadowy, J. Wegrzyn, S. Naser, A.B. Skotnicki, M. Gniadkowski, and W. Hryniewicz. 2007. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13:893–901.
- Kristich, C.J., L.B. Rice, and C.A. Arias. 2014. Enterococcal infection-treatment and antibiotic resistance. In M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar (eds.), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, pp. 123–184.
- Guzman Prieto, A.M., W. van Schaik, M.R. Rogers, T.M. Coque, F. Baquero, J. Corander, and R.J. Willems. 2016. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front. Microbiol.* 7:788.
- Werner, G., T.M. Coque, A.M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K.G. Kristinsson, R. Leclercq, C.H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L.V. Peixe, E. Sadowy, G.S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R.J. Willems, W. Witte, and N. Woodford. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro. Surveill.* 13:pii: 19046.
- Leavis, H., J. Top, N. Shankar, K. Borgen, M. Bonten, J. van Embden, and R.J. Willems. 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.* 186:672–682.
- Rice, L.B., L. Carias, S. Rudin, C. Vael, H. Goossens, C. Konstabel, I. Klare, S.R. Nallapareddy, W. Huang, and B.E. Murray. 2003. A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J. Infect. Dis.* 187:508–512.
- Van Wamel, W.J., A.P. Hendrickx, M.J. Bonten, J. Top, G. Posthuma, and R.J. Willems. 2007. Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect. Immun.* 75:924–931.
- Morfin-Otero, R.E.-A.S., G. Atilano-Duran, D. Pinto-Trindade, J. Heredia-Cervantes, J.J. Rodriguez-Chagollan, and E. Rodriguez Noriega. 1999. Trends of antibiotic resistance: *Enterococcus* 1991–1999. *Enf. Infect. Microbiol.* 19:222–226.
- Cuellar-Rodríguez, J., A. Galindo-Fraga, V. Guevara, C. Pérez-Jiménez, L. Espinosa-Aguilar, A.L. Rolón, A. Hernández-Cruz, E. López-Jácome, M. Bobadilla-del-Valle, A. Martínez-Gamboa, A. Ponce-de-León, and J.

- Sifuentes-Osornio. 2007. Vancomycin-resistant enterococci, Mexico city. *Emerg. Infect. Dis.* 13:798–799.
17. Leo-Amador, G.E., A. Borbolla-Ramos, J.A. Morales-Lara, H.A. Pérez-González, H.L. Hernandez-Montiel, and J.C. Solis-S. 2011. Infection or colonization and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. at a regional hospital in Queretaro, Mexico. *Am. J. Infect. Control* 39:615–616.
  18. García, G.M., G.E. Leo-Amador, J. Avila-Morales, G. Zaldívar-Lelo de Larrea, and J. Sanchez-Corona. 2014. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolated from community acquired infections and colonizations in Queretaro City, Mexico. *Am. J. Infect. Control* 42:578–580.
  19. Ochoa, S.A., G. Escalona, A. Cruz-Cordova, L.B. Dávila, Z. Saldaña, V. Cázares-Domínguez, C.A. Eslava, B. López-Martínez, R. Hernández-Castro, G. Aquino-Jarquín, and J. Xicohtencatl-Cortés. 2013. Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC Microbiol.* 13:291.
  20. Llaca-Díaz, J.M., S. Mendoza-Olazarán, A. Camacho-Ortiz, S. Flores, and E. Garza-González. 2012. One-year surveillance of *ESKAPE* pathogens in an intensive care unit of Monterrey, Mexico. *Chemotherapy* 58:475–481.
  21. Bocanegra-Ibarias, P., S. Flores-Trevino, A. Camacho-Ortiz, R. Morfin-Otero, L. Villarreal-Treviño, J. Llaca-Díaz, E.A. Martínez-Landeros, E. Rodríguez-Noriega, A. Calzada-Güereca, H.J. Maldonado-Garza, and E. Garza-González. 2016. Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from two hospitals in Mexico: first detection of VanB phenotype-vanA genotype. *Enf. Infect. Microbiol. Clin.* 34:415–421.
  22. Calderon-Jaimes, E., J.L. Arredondo-García, F. Aguilar-Ituarte, and P. García-Roca. 2003. In vitro antimicrobial susceptibility in clinical isolates of *Enterococcus* species. *Salud Publ. Mexico* 45:96–101.
  23. Tenover, F.C., J.M. Swenson, C.M. O'Hara, and S.A. Stocker. 1995. Ability of commercial and reference antimicrobial susceptibility testing methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 33:1524–1527.
  24. Jackson, C.R., P.J. Fedorka-Cray, and J.B. Barrett. 2004. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 42:3558–3565.
  25. Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:24–27.
  26. Felsenstein, J. 2009. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.695. Distributed by the author Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA.
  27. Homan, W.L., D. Tribe, Poznanski, M. Li, G. Hogg, E. Spalburg, J.D. Van Embden, and R.J. Willems. 2002. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 40:1963–1971.
  28. Huson, D.H., and D. Bryant. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23:254–267.
  29. Bruen, T.C., H. Philippe, and D. Bryant. 2006. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. *Genetics* 172:2665–2681.
  30. Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9:772.
  31. Guindon, S., and O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696–704.
  32. Guindon, S. 2010. Bayesian estimation of divergence times from large sequence alignments. *Mol. Biol. Evol.* 27:1768–1781.
  33. Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313.
  34. Bonten, M.J., M.K. Hayden, C. Nathan, J. van Voorhis, M. Matushek, S. Slaughter, T. Rice, and R.A. Weinstein. 1996. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 348:1615–1619.
  35. Manafi, M., W. Kneifel, and S. Bascomb. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Rev.* 55:335–348.
  36. Dahlen, G., and A. Linde. 1973. Screening plate method for detection of bacterial beta-glucuronidase. *Appl. Microbiol.* 26:863–866.
  37. Cimolai, N., and D. Mah. 1991. Beta-D-glucuronidase activity assay for rapid differentiation of species within beta-haemolytic group C and G streptococci. *J. Clin. Pathol.* 44:824–825.
  38. Hansen, W., and E. Yourassowsky. 1984. Detection of beta-glucuronidase in lactose-fermenting members of the family Enterobacteriaceae and its presence in bacterial urine cultures. *J. Clin. Microbiol.* 20:1177–1179.
  39. Lee, T., S. Pang, S. Abraham, and G.W. Coombs. 2019. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: the past, the present and the future. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 16:36–47.
  40. Gouliouris, T., B. Warne, E.J.P. Cartwright, L. Bedford, C.K. Weerasuriya, K.E. Raven, N.M. Brown, M.E. Török, D. Limmathurotsakul, and S.J. Peacock. 2018. Duration of exposure to multiple antibiotics is associated with increased risk of *VRE* bacteraemia: a nested case-control study. *J. Antimicrob. Chemother.* 73:1692–1699.
  41. Santos, B.A., J.S. Oliveira, N.T. Cardoso, A.V. Barbosa, S.V. Superti, L.M. Teixeira, and F.P.G. Neves. 2017. Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resistant enterococci associated with infections in cancer patients in Brazil. *Infect. Genet. Evol.* 55:56–62.
  42. Arshadi, M., L. Shokoohzadeh, M. Douraghi, P. Owlia, R. Mashhadi, S. Soltani, and M.R. Pourmand. 2019. Epidemiological linkage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from different sources in Ahwaz, Iran. *FEMS Microbiol. Lett.* 366:fnz062.
  43. Castillo-Rojas, G., M. Mazari-Hiriart, S. Ponce de León, R.I. Amieva-Fernández, R.A. Agis-Juárez, J. Huebner, and Y. López-Vidal. 2013. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PLoS One* 8: e59491.

Address correspondence to:

Yolanda López-Vidal, PhD  
 Programa de Inmunología Molecular Microbiana  
 Departamento de Microbiología y Parasitología  
 Facultad de Medicina  
 Universidad Nacional Autónoma de  
 México-Ciudad Universitaria  
 Del. Coyoacán, Ciudad de México (CDMX)  
 Mexico City, CP 04510  
 Mexico

E-mail: lvidal@unam.mx