



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**INFORME DE SERVICIO SOCIAL
(POR TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)**

PROYECTO DE TESIS:

**Diversidad genética de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas en el
Hospital Infantil de México Federico Gómez en un periodo de 10 años**

PRESENTA LA ALUMNA

Aranza Montserrat Martínez González

(Matrícula 2173062981)

ASESORES

INTERNA

Dra. María Elisa Drago Serrano
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

EXTERNO

Dr. Juan Xicohtencatl Cortes
Hospital Infantil de México Federico Gómez



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD





SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez, bajo la dirección del Dr. Juan Xicohtencatl Cortes, además de la asesoría de la Dra. María Elisa Drago Serrano del Laboratorio de Homeostasis Intestinal, Departamento de Sistemas Biológicos, Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana.

El desarrollo metodológico de este trabajo forma parte del proyecto de Fondos Federales, sometido a evaluación en el HIMFG y aprobado por los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad con el siguiente número de registro:

- **HIM/2017/006 SSA 1302**

“Epidemiología molecular de los determinantes de resistencia, virulencia y diversidad clonal de aislados clínicos de *Enterococcus faecium* en los últimos años en el Hospital Infantil de México Federico Gómez”

Contenido

I.	RESUMEN.....	5
II.	ABSTRACT	6
III.	INTRODUCCIÓN	7
IV.	ANTECEDENTES	10
2.1	Generalidades.....	10
2.2	Resistencia antimicrobiana.....	12
2.2.1	Resistencia a β -lactámicos.....	13
	2.2.2 Resistencia a Glucopéptidos	14
2.2.3	Resistencia a Tetraciclinas	15
2.2.4	Resistencia a Aminoglucósidos.....	16
2.3	Factores de Virulencia en <i>Enterococcus</i> spp.....	16
2.3.1	Proteína de superficie (Esp).....	17
2.3.2	Proteína de unión a colágeno (Acm).....	17
2.3.3	Hialuronidasa (hylEfm)	17
2.3.4	Pili (pila/fms).....	18
V.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	21
VI.	OBJETIVO GENERAL.....	21
VII.	HIPÓTESIS	21
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1	Criterios de Selección	22
	Día 1. Crecimiento Bacteriano:.....	25
	Día 3. Desproteínización:	25
	Día 4. Lavado de bloques:.....	25
	Día 5. Gel de integridad de DNA:.....	25
	Día 7. Corrimiento de electroforesis:	26
	Día 8. Revelado del gel de agarosa.	26
IX.	RESULTADOS.....	28
X.	DISCUSIÓN	35

XII. CONCLUSIONES.....	37
XII. PERSPECTIVAS.....	37
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
XII. ANEXOS	42

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Enterococcus faecium* es una bacteria oportunista que soporta numerosas tensiones, resiste el tratamiento con antibióticos y persiste en entornos clínicos y causa Infecciones Asociadas en Salud (IAAS). El uso excesivo de antibióticos para atender las IAAS ha generado con el tiempo un aumento en la resistencia a los antibióticos en las bacterias. *E. faecium* ha desarrollado un aumento significativo en la resistencia a la vancomicina. El uso de herramientas moleculares para su tipificación bacteriana ha permitido observar la relación genética de los aislamientos para determinar la evidencia de brotes de aislamientos relacionados genéticamente o epidemiológicamente, su vigilancia y seguimiento mediante el uso de la técnica de Electroforesis en Gel por Campo Pulsado (PFGE). **JUSTIFICACIÓN:** En el Hospital Infantil de México Federico Gómez, se han detectado numerosos casos de colonización e infección por *E. faecium* resistente a vancomicina (EFRV), por lo tanto, es importante obtener su diversidad genética que elucide su comportamiento en el ambiente hospitalario. **OBJETIVO:** Analizar la diversidad genética de *E. faecium* aisladas en los últimos 10 años en el Hospital Infantil de México. **METODOLOGÍA:** Se estudiaron 188 cepas de EFRV con base en el protocolo de PFGE. Dicho protocolo consistió en: i) la extracción de DNA total, ii) digestión con la enzima SmaI, iii) la separación de los fragmentos de restricción sobre gel de agarosa en el equipo de PFGE (CHEF MAPPER, Biorad) iv) revelado con Gel Red. Las imágenes observadas se adquirieron en un fotodocumetador. **RESULTADOS:** De las 188 cepas de EFRV más de la mitad de las cepas fueron aisladas de pacientes femeninas, la mayoría de las muestras fueron de pacientes entre 1 a 5 años y el origen de las muestras fueron principalmente de orina y en su mayoría provinieron de la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica, y en su mayoría fueron cepas en el año 2012. Los resultados de PFGE se identificaron 5 pulsotipos de donde 6 cepas presentaron el mismo perfil de macrorrestricción. **CONCLUSIÓN:** se puede constatar que en los últimos años se ha dado un aumento significativo en la incidencia de las IAAS por bacterias como EFRV y en algunos periodos se observaron cepas relacionadas genéticamente, con base en su perfil de PFGE.

Palabras clave: *Enterococcus faecium*, vancomicina, PFGE, IAAS, multirresistencia

II. ABSTRACT

INTRODUCTION: *Enterococcus faecium* is an opportunistic bacterium that supports numerous stresses, causing Healthcare Associated Infections (HCAIs) resists antibiotic treatment and persists in clinical environment. The excessive use of antibiotics to treat HCAIs has generated an increase in antibiotic resistance in bacteria over time. *E. faecium* has developed a significant increase in resistance to vancomycin. The use of molecular tools for its bacterial typing has allowed observe the genetic relationship of the isolates to determine the evidence of outbreaks of genetically or epidemiologically related isolates, their vigilance and follow-up through the use of the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique. **JUSTIFICATION:** At the Hospital Infantil de México Federico Gómez, numerous cases of colonization and infection by vancomycin-resistant *E. faecium* (VRE) have been detected, it is important to obtain genetic diversity to elucidate its behavior in the hospital environment. **OBJETIVE:** To analyze the genetic diversity of *E. faecium* isolated in the last 10 years at the Hospital Infantil de México. **METHODOLOGY:** 188 strains of EFRV were studied based on the inclusion various criteria. The PFGE protocol was realized for each of them, which consists of: the extraction of total DNA, digestion with the enzyme SmaI and the separation of restriction fragments on agarose gel in the PFGE equipment (CHEF MAPPER, Biorad) and leave to run for 24 hours. It was revealed with Red Gel, the images were observed and acquired in a photodocumentation. **RESULT:** Of the 188 EFVR strains, more than half of the strains were female, most samples were from patients between 1 and 5 years of age, and the origin of the samples was mainly urine. Most samples came from the Pediatric Intensive Care Unit, with a higher number of strains observed in 2012. Of these, 5 pulsotypes were identified, of which 6 strains presented the same macrorestriction profile. **CONCLUSION:** It can be seen that in recent years there has been a significant increase in the incidence of HCAIs caused by bacteria such as vancomycin-resistant *E. faecium* (VRE), and in some periods genetically related strains were observed, based on their PFGE profile.

Key words: *Enterococcus faecium*, vancomycin, PFGE, HCAIs, multiresistance

III. INTRODUCCIÓN

Las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) antes conocidas como infecciones nosocomiales, son definidas como infecciones localizadas que se desencadenan a partir de una reacción adversa a la atención de la salud de las personas por la presencia de uno o varios agentes infecciosos, durante su estancia en hospitales, instalaciones comunitarias/ambulatorias o instalaciones de cuidados o centros comunitarios. Usualmente, se considera que una infección corresponde a una IAAS si se manifiesta al menos 48 horas después de la admisión o posterior a su alta (Unahalekhaka, 2011).

Las IAAS se encuentran entre las principales complicaciones de terapia médica debido principalmente al aumento de la utilización de dispositivos invasivos, así como, el uso inadecuado de terapia antimicrobiana, por lo que, están relacionadas con procedimientos como infecciones asociadas a catéteres, heridas quirúrgicas, ventilación mecánica y quemaduras, (Unahalekhaka, 2011).

Asimismo, existen factores relacionados con la atención médica que ponen en riesgo a la persona expuesta al agente infeccioso como el uso de instrumentos o equipos médicos, así como superficies ambientales o la humedad del lugar. (Trejo, 2019, Al- & Tambyah, 2014 &Unahalekhaka, 2011).

No obstante, representan un problema frecuente de hospitalización y una preocupación constante para el personal de salud, pues se reporta frecuencias del 24% hospitalizaciones pediátricas y en México se calcula que, de cada 100 mil habitantes, 32 muertes son causadas por IAAS, teniendo un promedio de 450 mil casos, con una prevalencia que alcanza el 21% de casos (Flores *et al.*, 2014; Franco, 2019).

En los últimos años se han reportado un gran número de agentes causantes de infecciones hospitalarias, entre los que destacan bacterias resistentes, nombrando a estos patógenos ESKAPE, el cual es un acrónimo formado por la primera letra que corresponde al género y especie de seis bacterias con características de resistencia múltiple a los antibióticos y patogenicidad específica (*Enterococcus faecium* (*E.faecium*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y especies del género *Enterobacter*) (ver Tabla 1) (Ahuatzin *et al.*, 2023).

Los patógenos ESKAPE muestran principalmente fenotipos de multidrogo resistentes (MDR) son microorganismos resistentes a dos o más grupos de antibióticos y los extremadamente drogo resistentes (XDR) que son especies de bacterias clínicamente relevantes con ausencia de sensibilidad en al menos un antibiótico de todas las familias. No obstante, existe otro grupo de cepas llamado pandrogo resistentes (PDR) y son microorganismos resistentes a todos los antibióticos probados (actualmente no hay reportes de patógenos PDR) (Trejo, 2019; Camacho, 2021). En México, este grupo de microorganismos destacan por ser de los

principales agentes etiológicos de infecciones asociadas a la atención en salud (Guevara *et al.* 2021).

Tabla 1. Descripción de los patógenos ESKAPE

	Especies	Gram	Siglas	Resistencia	CC/ST	Manifestaciones clínicas
E	<i>Enterococcus faecium</i>	Positivo	VREF (<i>E. faecium</i> resistente a vancomicina)	vancomicina	ST17 (CC17), ST203 (CC17), ST796, ST1421 y (CC17).	Bacteremia asociada a catéter vascular, ITU ¹ , infección intraabdominal y pélvica, endocarditis.
S	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positivo	MRSA (<i>S. aureus</i> resistente a meticilina)	Meticilina vancomicina	ST5, ST8, ST22, ST30, ST59, ST72 (CC8), ST80, ST398.	Infección bacteriana aguda de la piel, bacteremia, neumonía, endocarditis.
K	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo	BLEE (Beta-lactamasas de espectro extendido)	Carbapenémicos Cefalosporinas	ST11, ST15, ST17, ST37, ST101, ST147, ST258, ST307, ST405, ST512.	Neumonía, abscesos hepáticos, infección del torrente sanguíneo, ITU, meningitis.
A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Negativo	-	Carbapenémicos, Polimixinas	ST195 (CC92), ST457 (CC92).	Neumonía asociada a ventilador, infecciones del torrente sanguíneo, meningitis nosocomial, infección de piel y tejidos blandos.
P	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Negativo	-	Cefalosporinas, Carbapenémicos, Quinolonas	ST111, ST175, ST233, ST235, ST253, ST292, ST1725.	ITU, infecciones del torrente sanguíneo, neumonía, infección respiratoria crónica, endocarditis.
E	<i>Enterobacter spp</i>	Negativo	-	Carbapenémicos, Cefalosporinas, Flouroquinolonas.	ST4 y ST93.	ITU, neumonía neonatal, infección intraabdominal, artritis séptica.

¹ITU (Infecciones del Tracto Urinario), CC (Complejo Clonal), ST (Secuencia Tipo). Tomado de: De Oliveira, D., Forde, B., Kidd, T., Harris, P., Schembri, M., Beatson, S., Paterson, D. & Walker, M. 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 33(3). DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00181-19>

En los últimos años se ha evidenciado un aumento significativo en la incidencia de las infecciones asociadas con las IAAS por bacterias del género *Enterococcus spp.*, ya que estos microorganismos tienen la capacidad de contar con mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos. Son bacterias gram positivas con metabolismo de tipo anaerobio facultativo, catalasa negativa y tienen la capacidad de unirse en cadenas cortas (Murray, 1998; Schell, 2024).

Diversos autores reportaron entre el año 2015 a 2017 a este patógeno oportunista como la segunda causa de infecciones asociadas, principalmente en unidades de oncología, ya que, ya que los mayores afectados son poblaciones de pacientes inmunocomprometidos (Miller *et al.*, 2020 & Weiner-Lastinger *et al.*, 2019). *Enterococcus* puede causar endocarditis, bacteriemia, infecciones del tracto urinario, infecciones del sistema nervioso central, intraabdominal y pélvica (Guevara *et al.* 2021).

Enterococcus faecium (*E. faecium*) es una de las especies más relevantes clínicamente, pues ha adquirido resistencia a la mayoría de los antibióticos (β -lactámicos, lincosamidas, glucopéptidos y aminoglucósidos) por ejemplo, la vancomicina (ERV) (Schell, 2024). En 1988 se reportó el primer aislamiento de EVR en Inglaterra y Francia, sin embargo, cobró mayor relevancia pues rápidamente se ha propagado en el ambiente hospitalario y ha crecido su resistencia a antibióticos (López *et al.*, 2019 & Trejo, 2019). *E. faecium* se convierte en resistente a la vancomicina al adquirir genes (*vanA*, *vanB*) a través de plásmidos y otros elementos genéticos móviles, que permiten a las bacterias modificar su pared celular, así como cambiar los sitios blanco del antibiótico en su pared celular, de esta manera logran la inmunidad y hacen más difícil su tratamiento (Guevara *et al.* 2021).

La relación de un microorganismo con su hospedero y el medio ambiente es el objeto de estudio de la epidemiología y con ayuda de la filogenia aplicada a las enfermedades infecciosas se pueden describir las características de un patógeno en una población a través del tiempo. Una aplicación de las técnicas de biología molecular es tipificar a un organismo, la cual ha tenido un gran significado en la microbiología clínica. El método de tipificación de aislamientos proporciona la caracterización de diferentes subgrupos dentro de una especie, a través de técnicas moleculares que establecen una relación epidemiológica de las cepas; entre las pruebas que se realizan, se incluye Electroforesis en Gel por Campo Pulsado (PFGE) (Cardozo, 2013; Freitas, 2010).

La técnica de Electroforesis en Gel por Campo Pulsado (PFGE) consiste en un campo eléctrico que es generado por varios electrodos organizados en contorno hexagonal, el campo es pulsado alternamente por lapsos de tiempo definidos, generando así un ángulo de reorientación del ADN de 120°, esto permite alterar la dirección de las moléculas de DNA, orientándolas en diferentes posiciones dependiendo su tamaño y de esta manera, se obtienen pistas de migración de las moléculas de DNA en los carriles del gel de agarosa (Montalvo & Lugo, 2016) La separación del DNA da como resultado un perfil de macrorrestricción por muestra que permite diferenciar en estas condiciones la relación genética del perfil obtenido entre sí.

El método PFGE ha demostrado ser una técnica altamente discriminatoria, por lo que, se ha empleado para reconocer brotes de infección, detectar transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, identificar la fuente de infección y reconocer cepas particularmente virulentas (Cardozo *et al.*, 2013).

En el presente estudio, se trabajaron con 188 cepas, realizando 10 geles de agarosa bajo la técnica de PFGE y de esta manera se logró identificar patrones de macrorrestricción y así poder inferir la asociación entre las cepas en el Hospital Infantil de México, Federico Gómez (HIMFG).

IV. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

Los Enterococos se identificaron por primera vez en 1899, gracias al primer caso correspondiente a un cuadro de endocarditis infecciosa, confirmándose que el microorganismo era el responsable mediante la producción del cuadro clínico al inocular el mismo en modelos animales. Se consideraron Estreptococos durante mucho tiempo, hasta 1986 cuando se aceptó la inclusión de los Enterococos en el género *Enterococcus*, separado del género *Streptococcus* (Calderón *et al.*, 2022).

Los Enterococos son bacterias Gram-positivas, se desarrollan en presencia de 40% de bilis e hidrolizan la esculina; por lo general son gamma-hemolíticos (Figura 1A) en medios específicos como agar sangre de carnero al 5%, su morfología es esférica u ovoide de 0.6 a 2.0 x 0.6 a 2.5 μm (Figura 1B); anaerobios facultativos, no tiene motilidad. Tienen la capacidad de adaptabilidad a condiciones extremas, como NaCl 6.5%, pH 9.6, son catalasa

negativa, prueba de PYR positiva (L-pirrolidonil- β -naftilamida) detecta la enzima PYRasa que identifica a los Enterococos (Figura 2), Rosas, 2014).

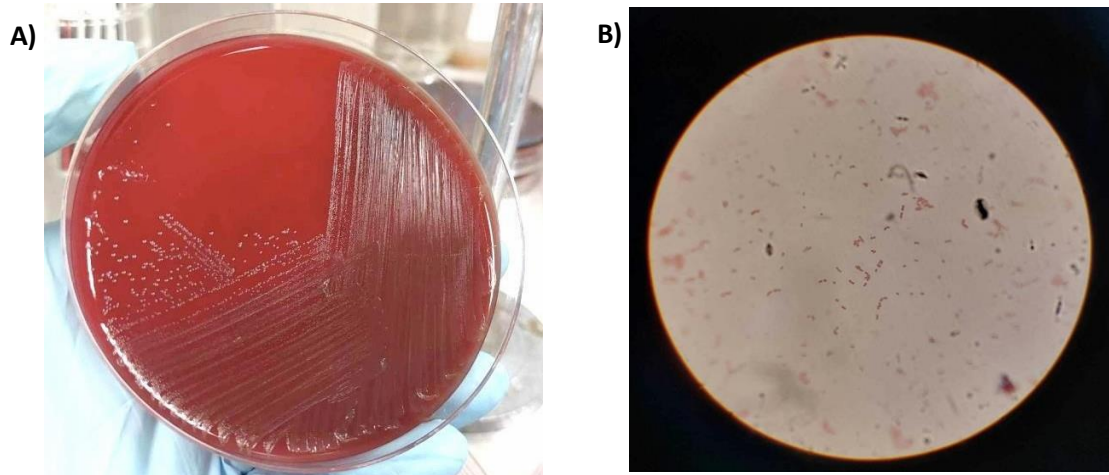


Figura 1. A) Morfología colonial de *E. faecium* en agar sangre al 5%. B) Morfología microscópica en luz visible de *Enterococcus faecium*, aumento a 100X.

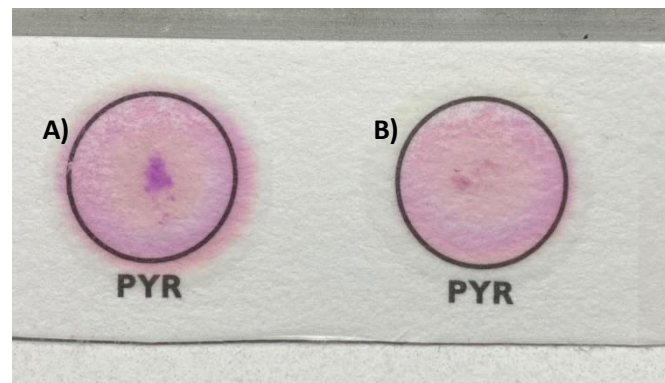


Figura 2. Prueba bioquímica de PYR, A) prueba positiva en *E. faecium*. En B) se muestra una prueba negativa en *Streptococcus pneumoniae*.

Se han aislado 18 especies de Enterococos capaces de causar infecciones en seres humanos, de las cuales solo 2 especies son significativas, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*, estos han adquirido mecanismos de supervivencia que hacen posible que permanezcan durante semanas o meses en distintas superficies. No obstante han desarrollado mecanismos de virulencia y resistencia que los convierte en patógenos importantes causantes de IAAS principalmente en personas con predisposiciones especiales (pacientes vulnerables de oncología, hematología o unidades de trasplante) (Freitas, 010; Calderón *et al.*, 2022).

La importancia clínica de los Enterococos proviene de su multirresistencia a los antibióticos, pues ha aumentado en los últimos años, observando un aumento de resistencia a vancomicina, ampicilina, gentamicina y estreptomina, debido a la gran exposición de antibióticos durante el transcurso de terapias médicas, que marcan un antes y un después en su dinámica biológica, adquiriendo así, además, de su resistencia intrínseca a algunos antibióticos como los aminoglucósidos y la habilidad para adquirir y diseminar determinantes de resistencia como a la vancomicina (Arredondo *et al.*, 2018 & Coba, 2017).

Es así como las infecciones por enterococos tienen su primer origen en la colonización del tubo digestivo de los pacientes, tanto por cepas hospitalarias como comunitarias, las cuales persisten en superficies inanimadas; en el caso de hospitales, se encuentran en termómetros, sistemas de administración intravenosa, estetoscopios, camas, etc., y debido a sus características propias, tiene la capacidad de transmitirse a través del personal y el equipo médico contaminado, sumado a su resistencia intrínseca, los frecuentes procedimientos invasivos y la creciente utilización de antibióticos, han contribuido a que los enterococos se establezcan como biota colonizante, lo cual conlleva posibles brotes epidemiológicos y una elevada letalidad (30 al 40%) asociada a enterococos resistente a vancomicina (EVR) (Rosas, 2014).

Por lo que, los enterococos son uno de los principales responsables de infecciones nosocomiales. Así mismo, en varios estudios en Estados Unidos, se han identificado como el segundo microorganismo más frecuente en infecciones hospitalarias, siendo *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (EFVR) el más frecuente correspondiente al 30% de las infecciones enterocócicas (Rosas, 2014 & Calderón *et al.*, 2022).

2.2 Resistencia antimicrobiana

La resistencia bacteriana a los antibióticos ha sido una realidad reconocida en los últimos veinte años, pues se ha producido la aparición de cepas peligrosas y resistentes de forma acelerada, por lo que, es un problema de salud mundial que se encuentra en constante evolución (Fair & Tor, 2014). La presencia de resistencia en una bacteria causante de infección disminuye las posibilidades de obtener la curación clínica y la erradicación bacteriológica e incrementa los costos de tratamiento, la morbilidad y la mortalidad (Rodríguez *et al.*, 2014).

La resistencia bacteriana es utilizada por algunos microorganismos como mecanismo de defensa pues permiten la transferencia horizontal de los genes (mecanismo para generar la plasticidad genética suficiente para adaptarse a las diferentes condiciones del medio ambiente) de resistencia a través de elementos genéticos móviles, como bacteriófagos, plásmidos o transposones, que son los factores clave en la diseminación de las resistencias de una bacteria a otra. Los genes de resistencia suelen estar dirigidos contra un antibiótico o una misma familia de antibióticos, pero una misma bacteria puede ir acumulando diferentes genes de resistencia hasta hacerse multiresistente (Figura 3) (Ruiz & Ballesteros, 2018). La multiresistencia (Multiple Drug Resistance, MDR) se define como la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un fármaco en tres o más de las categorías de antibióticos; la resistencia extrema (Extensively Drug-Resistant, XDR) se refiere a la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto en dos de ellas o menos, y la resistencia a todos los antimicrobianos se define como Pandrogo-resistencia (Pan Drug-Resistant, PDR) (Rodríguez *et al.*, 2014).

En el caso de *Enterococcus faecium* es preocupante el elevado porcentaje de resistencia, ya que, es una bacteria naturalmente multiresistente, que puede conducir en algún caso a una ausencia total de antibióticos eficaces (Alós, 2015), ya que, tiene la capacidad de adquirir rápidamente determinantes de virulencia y resistencia a los antimicrobianos, entre ellas la resistencia a vancomicina, pues posee genes específicos (principalmente *VanA* y *VanB*) que le confieren esta resistencia específica (Condor *et al.*, 2021). Sin embargo, también presenta resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos, incluyendo β -lactámicos, Clindamicina o bajas concentraciones de aminoglucósidos (Trejo, 2019).

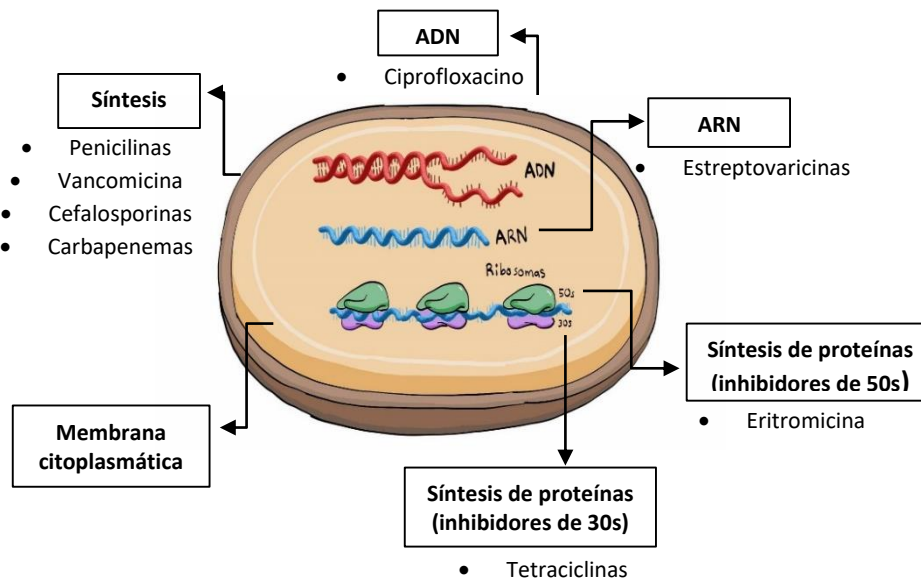


Figura 3. Mecanismos de resistencia bacteriana, esquema modificado de Madigan *et al.*, 2015.

2.2.1 Resistencia a β -lactámicos

Los antibióticos betalactámicos son un componente importante del arsenal antimicrobiano de las enfermedades, utilizado en el tratamiento de una variedad de infecciones Gramnegativas y Grampositivas, los medicamentos de esta clase que incluyen penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos (Poole, 2004). Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de peptidoglicano (componente de la pared celular bacteriana que le proporciona estabilidad a la bacteria, la cual, está unida a tallos de péptido (l-alanina-d-isoglutamina-l-lisina-d-alanina) al agregar un grupo acilo a la transpeptidasa involucrada en el entrecruzamiento de péptidos para formar peptidoglicano; al unirse, interrumpe el proceso de transpeptidación terminal e induce pérdida de viabilidad y lisis a través de procesos autolíticos dentro de la célula bacteriana (Pandey , 2023).

Sin embargo, el uso extensivo de β -lactámicos ha provocado la aparición y diseminación de resistencia y puede ocurrir por múltiples mecanismos, como la modificación del objetivo (mutación o expresión de PBP alternativas. Específicamente, la resistencia a la ampicilina en *Enterococcus faecium* se debe a la expresión e hiperproducción de la proteína 5 de unión a penicilina de clase B de baja afinidad (PBP 5) (Tooke *et al.*, 2019; Rice *et al.*, 2004).

2.2.2 Resistencia a Glucopéptidos

Los enterococos resistentes a los glucopéptidos han surgido como importantes patógenos nosocomiales desde finales de la década de 1980. Su manera de actuar se basa fundamentalmente en la unión al dipéptido terminal D-alanina-D-alanina inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana (Trejo, 2019) (Figura 4). La resistencia a los antibióticos glucopéptidos en los enterococos resulta de la síntesis de precursores de peptidoglicanos con baja afinidad por estos antibióticos, mediada por diferentes grupos de genes *van*, se han descrito siete tipos de grupos de genes que confieren resistencia a los glucopéptidos en enterococos según la secuencia y organización del ADN. Se designan según el nombre del gen de la ligasa genes (*VanA*, *VanR*, *VanS*, *VanH*, *VanX*, *VanY* y *VanZ*), estos se localizan en el transposón Tn1546 en el plásmido. El gen principal es *VanA* que codifica para una proteína que actúa como D-alanina-D-lactato ligasa, el cual sustituye al D-alanina-D-alanina en el peptidoglucano (Trejo, 2019; Faron *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2010).

El fenotipo *VanA* codifica resistencia inducible de alto nivel a vancomicina, este operón contiene 7 genes: 3 (*VanH*, *VanA*, *VanX*) los cuales son responsables directamente de la resistencia a los glucopéptidos, 2 (*VanR* y *VanS*) que son los responsables de la regulación de la resistencia y 1 (*VanY*) es el responsable de eliminar los precursores normales de la pared celular (Cercenado, 2011).

Por su parte, el fenotipo *VanB* tiene una resistencia moderada a la vancomicina, donde sus elementos genéticos responsables se sitúan en el transposón Tn1546 y su localización es más frecuente de manera cromosómica que plasmática (Trejo, 2019).

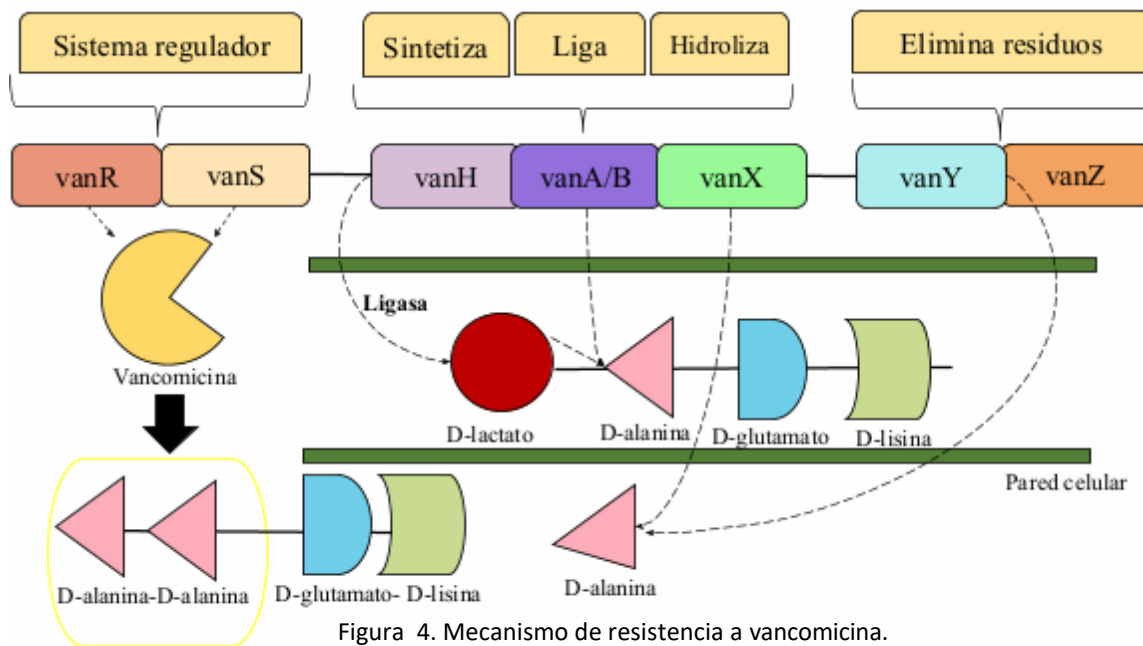


Figura 4. Mecanismo de resistencia a vancomicina.

2.2.3 Resistencia a Tetraciclinas

Son antibióticos de amplio espectro que inhiben a la mayoría de las bacterias Gram-positivas, la resistencia a la tetraciclina en cepas de enterococos es bastante frecuente y su mecanismo de acción más prevalente es el eflujo, con 28 clases distintas de bombas identificadas hasta el momento; le siguen de cerca las llamadas proteínas protectoras del ribosoma, que se unen al ribosoma y eliminan el fármaco de su sitio de unión (Trejo, 2019; Nguyen *et al.*, 2014), al inhibir la síntesis que interfiere con la función de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, bloqueando el acceso del aminoacil tRNA al sitio receptor (A) en el complejo mRNA-ribosoma. (Madigan *et al.*, 2015; Schell, 2024). Los mecanismos de resistencia menos prevalentes están mediados por múltiples genes (los más habituales son *tet(L)* y *tet(M)*), que codifican monooxigenasas, modifican las tetraciclinas y como consecuencia, promueven su degradación y mutaciones reduciendo la afinidad de unión del fármaco por el ribosoma (Nguyen *et al.*, 2014; Lozano y Torres, 2017).

2.2.4 Resistencia a Aminoglucósidos

Recientes estudios han demostrado una resistencia creciente de los enterococos a agentes antimicrobianos como los aminoglucósidos, siendo antibióticos que contienen aminoazúcares unidos por enlaces glicosídicos de gran utilidad clínica. Se han identificado dos mecanismos de resistencia especialmente en *E. faecium* (Trejo, 2019; Emaneini *et al.*, 2008); el primero comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, posteriormente a la membrana interna y, finalmente, la unión a la subunidad 30S de los ribosomas, aquí produce una lectura errónea de mRNA, lo que conlleva a una terminación prematura de la traducción y de esta manera se producen aminoácidos anormales o no funcionales, conduciendo a la muerte del microorganismo (Madigan *et al.*, 2015; Pualomino y Pachón, 2003), en el segundo mecanismo de resistencia produce enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) codificadas dentro de elementos genéticos móviles, uno de los genes ME más prevalentes es el *aac* (6')-*le aph* (2'') que codifica una enzima bifuncional, *aac* (6)-*aph* (2'') que confiere resistencia a un amplio espectro de aminoglucósidos (Pualomino y Pachón, 2003; Emaneini *et al.*, 2008).

2.3 Factores de Virulencia en *Enterococcus spp.*

El aumento de los *Enterococcus spp.*, como patógenos nosocomiales se propuso como resultado de la ventaja selectiva proporcionada por su resistencia a antibióticos, sin embargo, existen otros determinantes de virulencia que, en conjunto, expresan la capacidad patogénica de la bacteria demostrando el éxito de estos microorganismos en el ambiente hospitalario (Trejo, 2019; Padilla *et al.*, 2012). Los factores de virulencia bacterianos se pueden dividir en varios grupos según el mecanismo de virulencia y función, como las proteínas de membrana, que desempeñan funciones en la adhesión, colonización e invasión, promueven la adherencia a las superficies de la célula huésped, son responsables de la resistencia a los antibióticos y promueven la comunicación intercelular, también hay cápsulas de polisacáridos, las cuales, rodean la célula bacteriana y tienen propiedades antifagocíticas; así como las proteínas secretoras (como las toxinas) que pueden modificar el entorno de la célula huésped y son responsables de algunas interacciones entre la célula huésped y las bacterias (Wu, *et al.*, 2008). Existen otros factores de virulencia, como proteínas formadoras de biopelículas y adherencia, que mejoran la capacidad de un patógeno para resistir el flujo de fluido del huésped, unirse a células diana específicas y potencialmente invadir esas células diana, por lo que, las bacterias formadoras de biopelículas tienen una ventaja selectiva para la persistencia en condiciones ambientales, para la resistencia a los agentes antimicrobianos y también facilita la

colonización en el huésped por parte de las bacterias (Wu, *et al.*, 2008; Johnson, 2018).

2.3.1 Proteína de superficie (Esp)

La proteína de superficie en enterococos (codificada por la presencia del gen *esp*), es una proteína de alto peso molecular de función desconocida cuya frecuencia aumenta significativamente entre los aislados de *E. faecium* derivados de infecciones (Toledo *et al.*, 2001). Participa en la generación de biopelícula y cumple un rol en la resistencia antimicrobiana (Padilla *et al.*, 2012), pues el gen *esp* exhibe características de receptores de proteínas de superficie designando componentes microbianos que reconocen moléculas de matriz adhesivas, además de promover la colonización y evasión del sistema inmune al desarrollar proteínas (Pedraza, 2020; Trejo, 2019; Toledo *et al.*, 2001).

2.3.2 Proteína de unión a colágeno (Acm)

Estudios realizados en aislados clínicos de *E. faecium* relacionados con la adherencia al colágeno han demostrado una alta asociación de este gen con la virulencia, sugiriendo que la adherencia a colágeno puede estar relacionada con la capacidad de estos microorganismos para colonizar, persistir y causar infecciones en ambientes hospitalarios (Coba, 2017). El gen involucrado es denominado *acm* (adhesina de colágeno), es una adhesina primaria que tiene un péptido señal N-terminal, seguido de un dominio A de unión a colágeno, un número variable de repeticiones B y una región C-terminal (Nallapareddy, 2008); tiene la capacidad de unirse a la proteína de superficie celular, unión que produce enzimas que modifican los aminoglucósidos, los cuales mantienen un rol fundamental en la pared celular bacteriana que junto con los ácidos lipoteicos, actúan como reguladores de la actividad autolítica de las enzimas (Molina *et al.*, 2022).

2.3.3 Hialuronidasa (hylEfm)

El gen *hylEfm* se describió inicialmente como una hialuronidasa, pero recientemente se ha considerado como un supuesto glucósido-hidrolasa después de un análisis comparativo; las glucosilhidrolasas facilitan la colonización intestinal en muchos organismos bacterianos (Freitas *et al.*, 2010), por lo que, presenta una prevalencia relativamente alta en aislados clínicos de *E. faecium* cuando se compara con aislamientos de *E. faecium* comunitarios y está codificado por mega-plásmidos que también pueden albergar determinantes de resistencia a los antibióticos y algunos genes que codifican pilus de *E. faecium* (Coba,

2017). Su mecanismo es despolimerizar a la molécula de mucopolisacárido del tejido conectivo que permite a la bacteria diseminarse; dicho gen ha sido postulado como un potencial factor de virulencia en patógenos Gram positivos (Trejo, 2019; Pedraza, 2020).

2.3.4 Pili (pila/fms)

Son estructuras denominadas “pili” (también conocidas como fimbrias), que son usualmente codificadas por dos o tres genes contenidos en un operón, y están estrechamente relacionadas tanto con la adhesión de las bacterias a la matriz extra-celular como con la formación de biopelículas en superficies abióticas, produciendo infecciones del tracto urinario y endocarditis. *Ebpfm* es un operón que incluye tres genes codificantes de pili, que inicialmente fueron llamados *ebpAfm*, *ebpBfm* y *ebpCfm*. Los pili codificados por *Ebpfm* podrían cumplir un papel similar en *E. faecium* y en *E. faecalis*, como la adhesión al colágeno, fibrinógeno y plaquetas del huésped en casos de endocarditis (Coba, 2017; Sillanpää *et al.*, 2010).

3. Tipificación bacteriana

3.1 Generalidades

La vigilancia de las enfermedades bacterianas ha evolucionado y ha tenido aplicaciones importantes en otros programas de seguimiento y control de enfermedades como las infecciones hospitalarias, invasivas y respiratorias (Besser, 2015). En áreas hospitalarias se deben utilizar métodos de tipificación molecular para la genotipificación con alta capacidad discriminadora para confirmar o rechazar casos con vínculos epidemiológicos (Lytsy *et al.*, 2017). Resulta una herramienta importante para la investigación, vigilancia y estudios filogenéticos de brotes; los primeros experimentos de tipificación se llevaron a cabo mediante experimentos bioquímicos donde los resultados se basaron en el genotipo de la bacteria analizada como la resistencia a los antibióticos, la susceptibilidad a los fagos y el transporte de antígenos de superficie (serotipificación) (Neoh *et al.*, 2019).

Se han desarrollado varios esquemas de tipificación molecular para estudiar la epidemiología molecular de las bacterias mediante diferentes métodos, incluida la secuenciación del genoma completo (WGS), la tipificación de secuencias multilocus (MLST) y la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) (Scheier *et al.*, 2023; Erdem *et al.*, 2020).

3.1 Electroforesis en Gel por Campo Pulsado (PFGE)

De acuerdo con Neoh *et al.*, 2019 un buen método de tipificación debe cumplir con cinco características principales: tipificación, reproducibilidad, poder discriminatorio y facilidad de realización e interpretación. La metodología de PFGE cumple con los requisitos en un solo experimento, ya que es capaz de resolver en patrones de bandas los fragmentos de ADN de macrorrestricción de más del 90% del genoma bacteriano, revelando la huella genética de cada muestra analizada (López *et al.*, 2019).

Por lo que, la electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE) es un método estable y reproducible y se considera el “estándar de oro” para genotipificar ERV en brotes nosocomiales debido a su alto grado de diferenciación de cepas ya que este método se basa en la restricción de todo el genoma bacteriano y la separación de sus fragmentos de ADN mediante un campo eléctrico administrado por pulsaciones alternadas en un equipo de electroforesis (Lytsy *et al.*, 2017).

PFGE implica la liberación de ADN genómico intacto mediante lisis in situ dentro de un tapón de agarosa, digestión con enzimas de restricción y separación de fragmentos mediante electroforesis en gel de campo pulsado (Figura 5). Se hacen comparaciones por pares entre los patrones de bandas de las cepas, que se interpretan de acuerdo con el número de fragmentos de restricción diferentes que se observan: "indistinguibles" (sin diferencia), "estrechamente relacionados", "posiblemente relacionados" y "diferentes" (que indican la mayor cantidad de divergencia de tensión) (Salipante *et al.*, 2015). Mediante el análisis de los patrones de PFGE, ya sea de manera visual (Tenover *et al.* 1995) o utilizando un software, se han podido determinar las similitudes genéticas entre los aislamientos, lo que permite inferir si dos aislamientos aparentemente no relacionados tienen la misma procedencia evolutiva (Cardozo *et al.*, 2013).

El éxito del PFGE puede atribuirse a su versatilidad, reproducibilidad, costo relativamente bajo, poder discriminatorio, fácil estandarizado, es reproducible, sólido y en general, demuestra alta concordancia epidemiológica para muchos patógenos de importancia para la salud pública; además si se siguen estrictamente las instrucciones del protocolo, el patrón de bandas de ADN PFGE de un aislado siempre será estable y reproducible, no obstante, el método de preparación del ADN inmovilizado, casi sin modificaciones, es aplicable a cualquier especie bacterianos, por lo tanto, los protocolos son sencillos y facilitan el procesamiento simultáneo de muchas muestras, además de respetar los principios de no enzimático. Demostrando así, que el PFGE proporciona los mejores resultados para diferenciar aislados, principalmente de *S. aureus*, enterococos resistentes a vancomicina (López *et al.*, 2019).

Incluso cuando la comunidad de salud pública avanza hacia la secuenciación del genoma

completo (WGS) para funciones rutinarias de seguimiento; a pesar de sus limitaciones, se puede decir que la PFGE ha sido la herramienta de epidemiología molecular más exitosa hasta la fecha, según lo medido por hallazgos prácticos de salud pública (Besser, 2015).

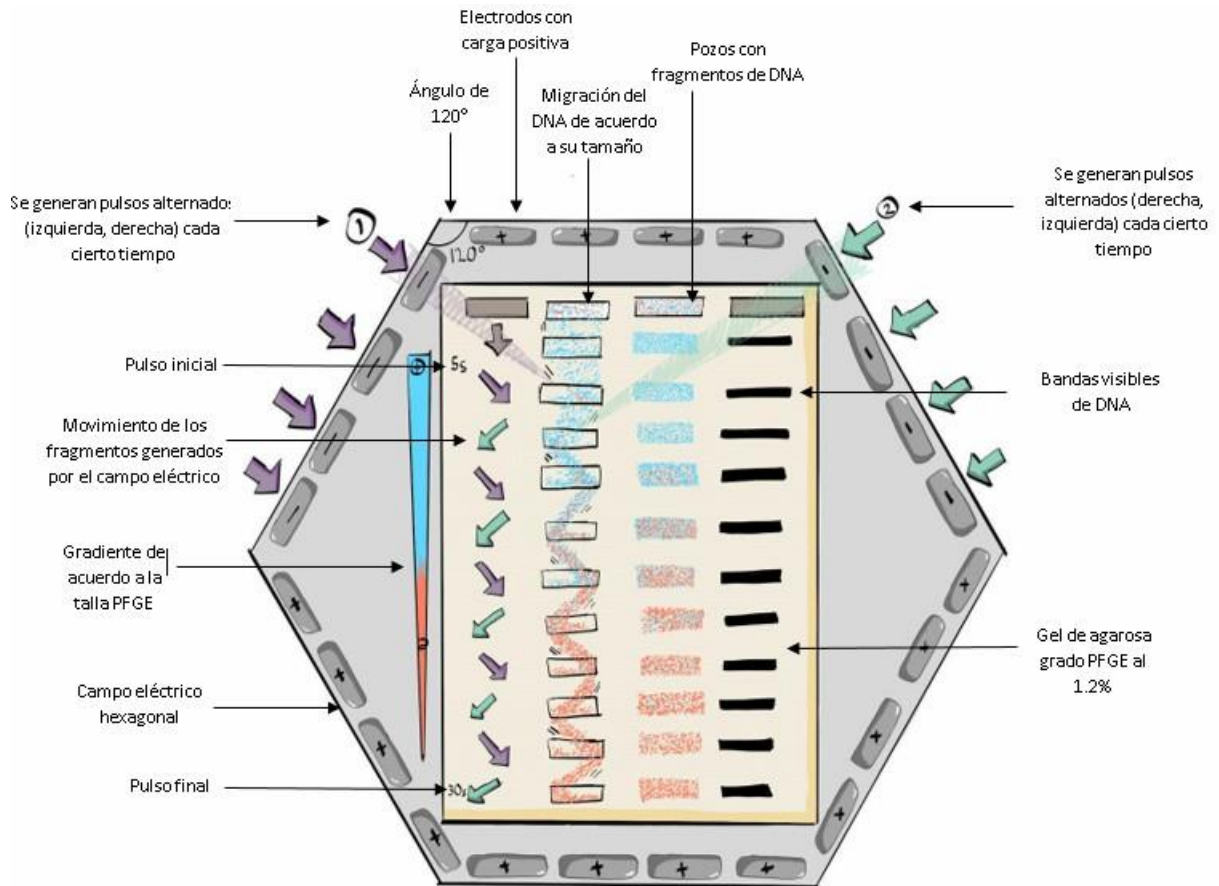


Figura 5. Desarrollo del proceso de separación de moléculas de DNA por PFGE.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En México, existe poca información disponible sobre la prevalencia de aislamientos de Enterococos resistente a vancomicina por sus siglas ERV, se han realizado pocos estudio relacionado con su complejo clonal en pacientes pediátricos (Ochoa *et al.*, 2013) además del creciente problema de multirresistencia de *E. faecium* a los antibióticos que impacta sobre todo a la población pediátrica oncológica e inmunocomprometida, ya que puede limitar las opciones terapéuticas, empeorando el pronóstico del paciente y producir un significativo aumento en el costo de los tratamientos; siendo la mayoría de los pacientes colonizados asintomáticos con riesgo de infectarse en el período intrahospitalario, por lo que, surge la gran necesidad de proporcionar información actual acerca de la epidemiología de este agente causante de IAAS, así como, su comportamiento a lo largo del tiempo en el Hospital Infantil de México.

VI. OBJETIVO GENERAL

Analizar la diversidad genética de *E. faecium* aisladas en los últimos 10 años en el Hospital Infantil de México.

VII. HIPÓTESIS

Si encontramos la diversidad genética de las cepas *E. faecium* vancomicina resistentes aisladas en los últimos 10 años en el HIMFG, entonces podremos determinar la presencia de estas cepas relacionadas genéticamente en el periodo de tiempo de estudio.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas incluidas en este estudio se seleccionaron del trabajo previo titulado: Análisis Retrospectivo de los Determinantes de Resistencia y Virulencia de Cepas Clínicas de *Enterococcus faecium* aisladas de pacientes pediátricos (Trejo, 2019) y que forman parte de la colección del cepario del Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal, conservadas en ultracongelación a -80°C en leche descremada, de acuerdo a los criterios de selección se obtuvieron 188 cepas para su tipificación molecular por PFGE.

7.1 Criterios de Selección

- Cepas a partir de aislados clínicos identificados como *E. faecium* provenientes de pacientes pediátricos hospitalizados en el HIMFG (Tabla 3).
- Con base en los resultados del trabajo previo, se seleccionaron todas las cepas con base en su perfil de resistencia a vancomicina.

7.2 Confirmación de las cepas de *E. faecium*

Las cepas de *E. faecium* recibidas en el Laboratorio de Bacteriología Intestinal, se encuentran conservadas en criotubos con leche descremada al 10 % (Skim-milk) y almacenadas a -80° C. Estas se cultivaron en base de agar suplementada con 5 % de sangre de carnero desfibrinada y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Para este estudio se validaron las cepas de acuerdo a su morfología colonial y microscópica, no producción de catalasa, crecimiento en gelosa bilis esculina, tolerancia al cloruro de sodio y prueba de pirrolidonil - β -naftilamida (PYR) positiva.

7.3 Electroforesis en gel por campo pulsado

Los perfiles de macrorrestricción fueron generados siguiendo las condiciones para *E. faecium* estandarizadas en el laboratorio e interpretadas de acuerdo a los criterios de Tenover *et al.*, 1995 (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios de interpretación de patrones PFGE tomado de Tenover *et al.*, 1995.

Categoría	N° de diferencias genéticas comparadas con la cepa del brote	N° de diferencias de fragmentos en comparación con el patrón de brote	Interpretación epidemiológica
Indistinguible	0	0	Se consideran genéticamente indistinguibles si sus patrones de restricción tienen el mismo número de bandas y las bandas correspondientes tienen el mismo tamaño aparente. Se considera que todos los aislamientos representan la misma cepa; es decir, los aislamientos que demuestran el patrón de brote común representan la cepa del brote.
Estrechamente relacionado	1	2-3	Se considera que un aislado está estrechamente relacionado con la cepa del brote si su patrón de PFGE difiere del patrón del brote por cambios consistentes con un único evento genético, es decir, una mutación puntual o una inserción o eliminación de ADN. Dichos cambios suelen dar lugar a diferencias de dos a tres bandas. Se han observado variaciones de dos a tres bandas en cepas de algunas especies cuando se cultivan repetidamente a lo largo del tiempo o se aíslan varias veces del mismo paciente.
			Se considera que un aislado está posiblemente relacionado con la cepa del brote si su patrón de PFGE difiere del patrón del brote por cambios consistentes con dos eventos genéticos independientes (es decir, diferencias de cuatro a
Posiblemente relacionado	2	4-6	Seis bandas que pueden explicarse por simples inserciones o deleciones de ADN o la ganancia o pérdida de sitios de restricción). Si bien estos aislados pueden tener el mismo linaje genético que el de la cepa del brote, no están tan estrechamente relacionados genéticamente y, en consecuencia, es menos probable que estén relacionados epidemiológicamente. Dicha variación se ha observado entre los aislados recolectados durante períodos más largos (6 meses) o tomados de un gran número de pacientes involucrados en brotes extendidos.
Diferente	>3	>7	Se considera que no está relacionado con la cepa del brote si su patrón PFGE difiere del patrón del brote por cambios consistentes con tres o más eventos genéticos independientes (generalmente siete o más diferencias de bandas). Normalmente, esto implica que más del 50 % de los fragmentos bien resueltos presentes en el patrón de dicho aislado estarán presentes en el patrón del brote.

El protocolo se describe a continuación en la Figura 6.

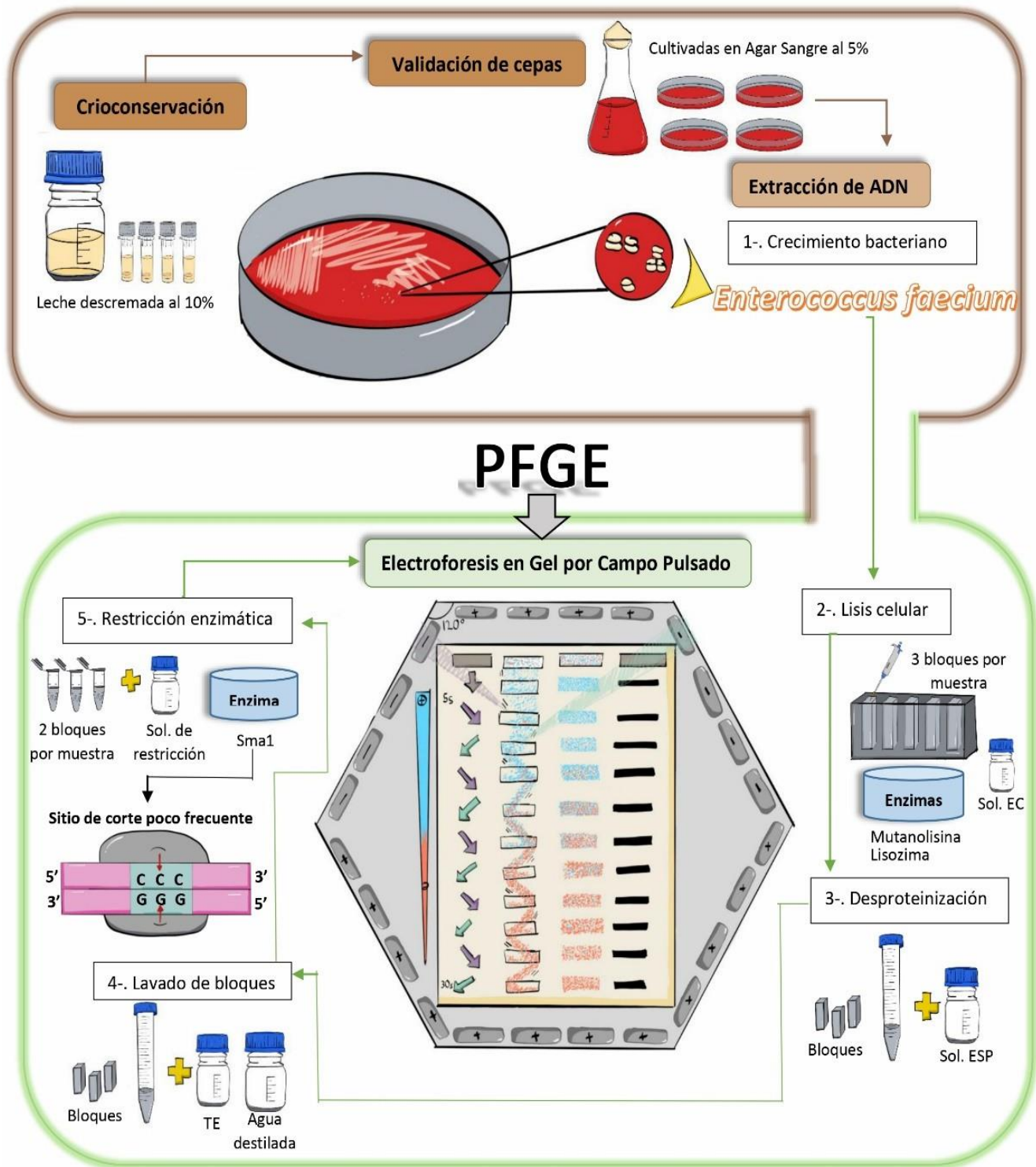


Figura 6. Esquema general del desarrollo metodológico para la técnica de PFGE.

Día 1. Crecimiento Bacteriano:

Se descongelaron las cepas requeridas y se inocularon en un medio nutritivo (Gelosa sangre) a 37° C/24h.

Día 2. Lisis Celular:

En tubos eppendorf de 1.5ml (uno por cepa) se agregaron 200µL de Solución PIV (Anexo 1), se transfirió una pequeña asada del cultivo bacteriano al tubo y se homogenizó. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, dejando un pellet. Se agregaron 5µL de Mutanolisina, 15µL de Lisozima y se completó con 180 µL de regulador PIV (Anexo 1) para incubar a 37° C por aproximadamente 2 horas. Durante esas 2 horas se prepararon 20ml de agarosa LMP (Promega) al 1% y se mantuvo a 45° C en baño maría. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 200µL de agarosa LMP al tubo y se mezcló con ayuda de la micropipeta, se sellaron con cinta los moldes en la parte de abajo y se transfirieron 100µL de la mezcla y así formar los bloques (3 bloques por muestra). Para solidificar los bloques, se refrigeran a 4° C por 15 minutos. Por último, se removieron los bloques, colocándolos en tubos falcón de 12ml y se transfirieron 2ml de solución de lisis EC (Anexo 2) para incubar toda la noche a 37° C en agitación ligera.

Día 3. Desproteínización:

Se removió el sobrenadante de la solución EC dejando sólo los bloques y se agregaron 2ml de solución de desproteínización (ESP) (Anexo 3), dejando incubar a 50° C toda la noche en agitación suave.

Día 4. Lavado de bloques:

Se desechó la solución ESP y se realizaron 2 lavados de bloques con 10ml de agua estéril y se dejó incubar a 50° C para cada uno. Seguidamente se llevaron a cabo 2 lavados más, agregando 10ml de solución TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM) y se dejaron en agitación por 25° C.

Día 5. Gel de integridad de DNA:

Se realiza un gel de agarosa al 1% con el objetivo de conocer en qué estado se encuentra el DNA de las muestras después de la serie de pasos antes descritos, si se encuentra íntegro, se prosigue con la restricción enzimática de las cepas; sin embargo, si el DNA se encuentra dañado o contaminado (resultado de algún error realizado en los pasos descritos), se tiene que repetir el proceso aislando de nuevo las cepas.

Se pesaron 0.3g de Agarosa agregando 30 ml de buffer de carga (TBE 0.5x), se tomó 1/4 de bloque de 8 muestras al azar y se colocaron en el molde donde después se vertió la agarosa, se separó en una cámara de electroforesis, configurando la fuente de poder a 90V por 25 minutos. Transcurrido el tiempo de corrimiento, el gel se depositó en un recipiente con solución de Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) por 20 minutos en agitación ligera.

Por último, el gel se visualizó en un fotodocumentador con ayuda del programa Gel-Pro Analyzer con un tiempo de exposición de aproximadamente de 0.8s

Día 6. Restricción enzimática:

Ya que se determinó que el DNA se encuentra íntegro, se procedió a agregar 100µL por muestra de solución de Restricción (Sma 1 con 20 U) (Anexo 4) en 20 tubos eppendorf de 1.5ml, se colocó 2/3 de bloque por muestra en los tubos con la solución y se dejaron incubar a 30° C toda la noche.

Día 7. Corrimiento de electroforesis:

1. Se retiró la solución de restricción con ayuda de una micropipeta y se agregaron 500µL de solución TE y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente.
2. Durante esa hora se lavó la cámara de PFGE con agua desionizada estéril, dejando circular el agua durante 30 minutos aproximadamente.
3. Se preparó un gel de agarosa grado PFGE al 1.2% con solución TBE 0.5X, pesando 1.2g de agarosa LMP en 100 ml de TBE 0.5X.
4. En una probeta con capacidad de 2000ml se agregaron 100ml de TBE 10X y 1900ml de agua estéril y una concentración de 50 µM de thiourea, se tomaron 100ml para el gel de agarosa y lo restante se depositó en la cámara de PFGE (previamente se drenó el agua desionizada) y se prendió el módulo de enfriamiento con recirculación.
5. Se colocó 1/3 de bloque por muestra en un molde donde se vertió el gel posteriormente y en las orillas se colocó 1 bloque del marcador de peso molecular Lambda Ladder, se selló el área del gel con agarosa LMP y se vertió el resto.
6. Ya que solidificó el gel, se posicionó dentro de la cámara para iniciar el corrimiento.

Se configuró la fuente de poder con las siguientes condiciones de corrimiento:

200V (6V/cm), Ángulo: 120°, Temperatura: 14° C, Pulso inicial: 5s, Pulso final: 35s, Tiempo de corrimiento: 24 horas en CHEF-MAPPER.

Día 8. Revelado del gel de agarosa.

Cumplidas las 24 horas de corrimiento, se procedió a revelar el gel, depositándolo en una solución de Gel Red por 30 minutos en agitación ligera (en ocasiones el gel se dejó en la solución durante 24 horas para mayor impregnación). Para observar el gel, fue necesario

visualizarlo en el fotodocumentador modelo Fusion Fx (VILBER).

Ya generados los patrones de macrorrestricción, se procedió a identificar la diversidad genética de los patrones de PFGE utilizando los criterios de interpretación sugeridos por Tenover y colaboradores.

IX. RESULTADOS

La información extraída de la base de datos que corresponde a la selección de cepas provenientes de pacientes en el periodo de estudio, nos permitió observar que, de acuerdo a la Figura 7A el 54% de los pacientes pediátricos fue del sexo femenino y mientras que el 46% correspondió a pacientes masculinos, por lo que el sexo femenino se encontró en mayor proporción. En el mismo orden de ideas, se obtuvieron los datos que corresponden a la edad de los pacientes, en la Figura 7B podemos observar que la mayor población en la edad fue de 1 a 5 años, por el contrario, sólo 16 pacientes se encontraban edades mayores a los 15 años; los menores de 6 a 14 años se encontraron de manera semejante.

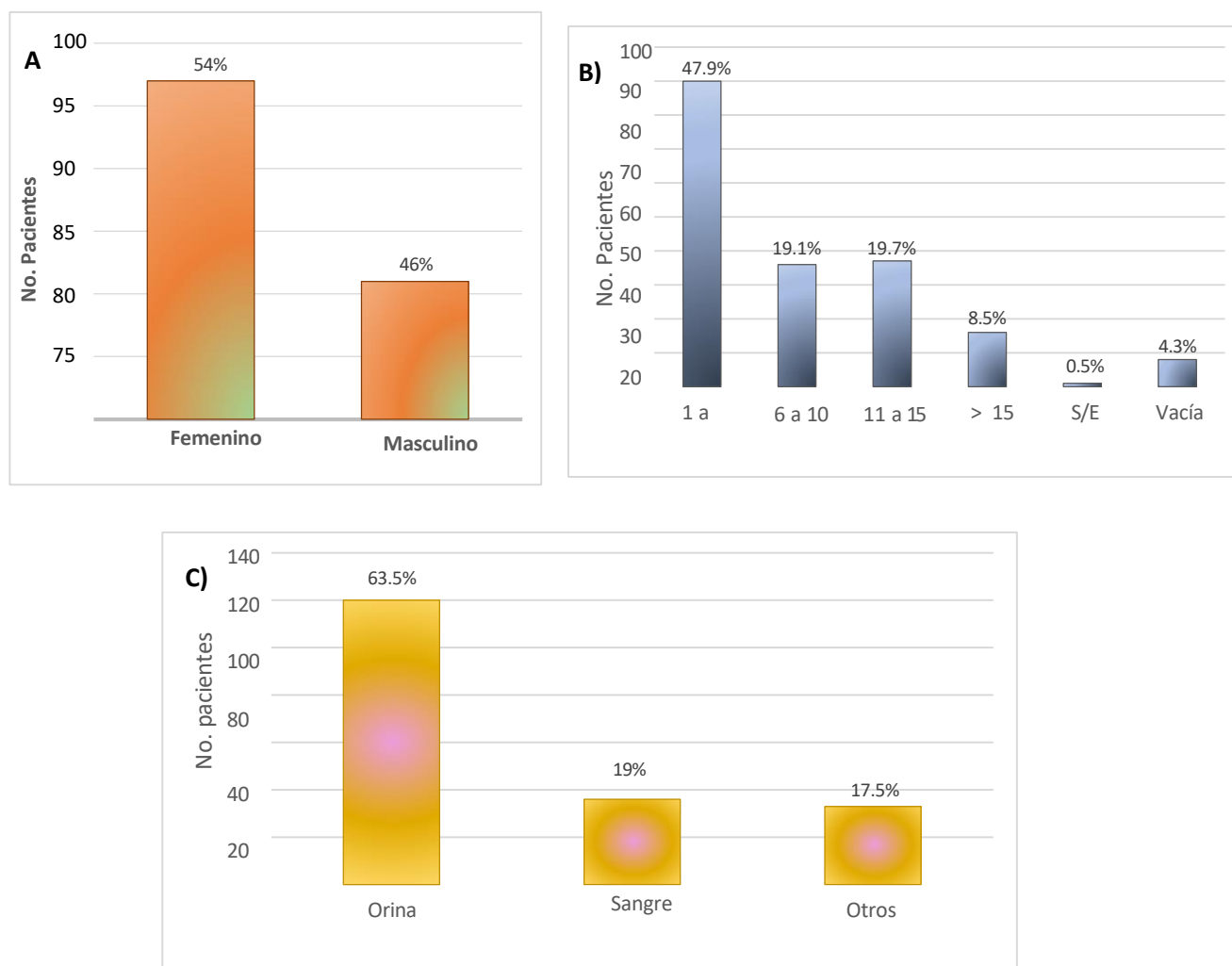


Figura 7. A) Género de pacientes, B) Edad de pacientes, C) Origen de las muestras en pacientes.

En cuanto al origen de las muestras, la de orina fue la más común con un 63.5% de acuerdo

con la misma base de datos de pacientes, seguido por las muestras de sangre (19%) (Figura 7C).

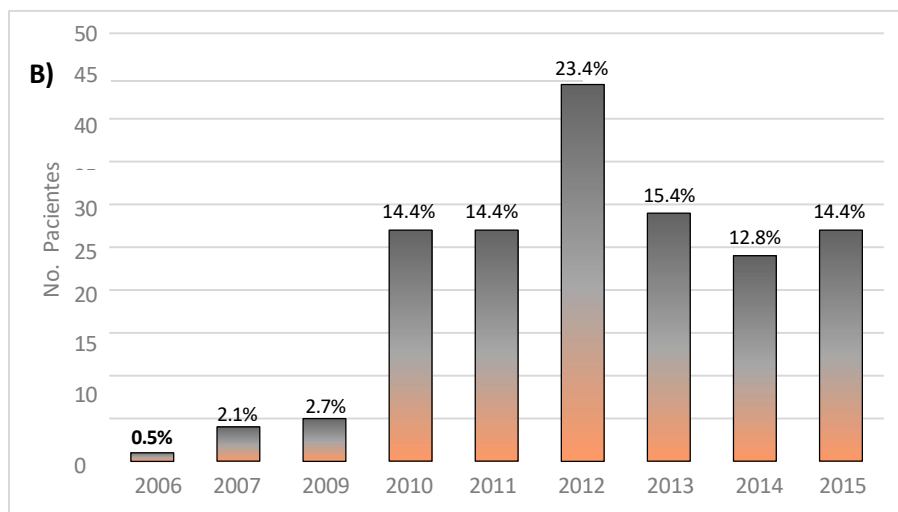
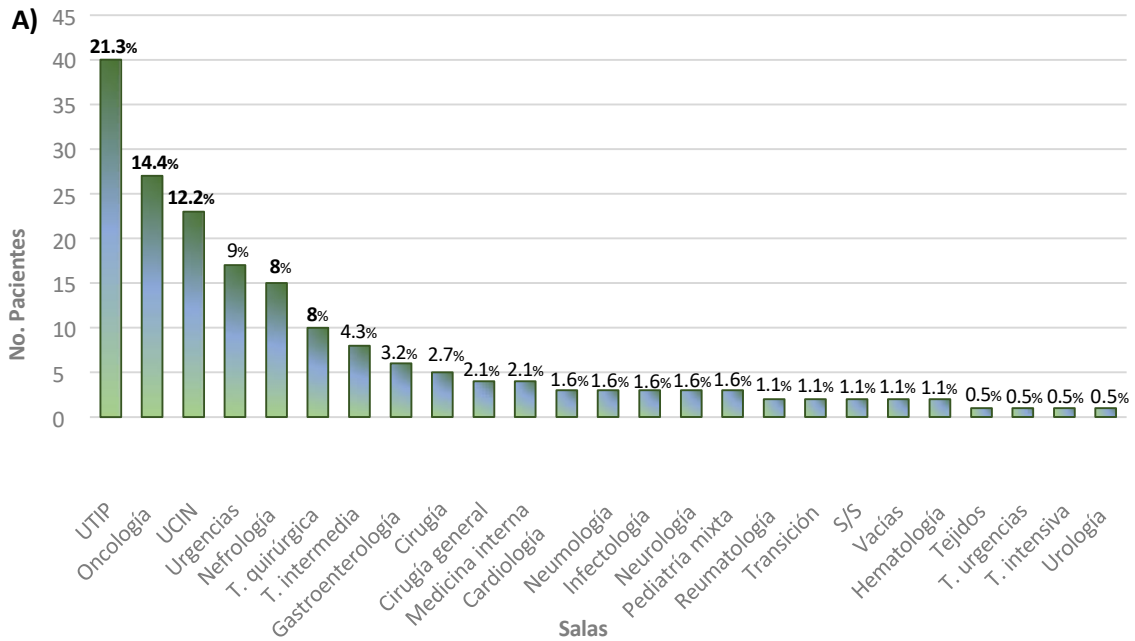


Figura 8. A) Salas de origen, B) Año de la toma de muestra.

Como se puede observar en la Figura 8A, los pacientes procedentes de la Unidad de Terapia

Intensiva Pediátrica (UTIP) fueron los que predominaron en este estudio, seguido de pacientes de Oncología y de la sala de Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN). Por otro lado, en las salas de Urología, Terapia Intensiva y de Urgencias, así como de Tejidos sólo se registró 1 paciente. Mientras que en la Figura 8B, se muestra que en el año donde se obtuvieron más muestras fue en 2012, seguido del año 2013, por el contrario, en el año 2008 no hubo registros de cepas incluidas en los criterios de selección de pacientes pediátricos con infección por EVR, así como, en 2006 se encontraron en menor proporción.

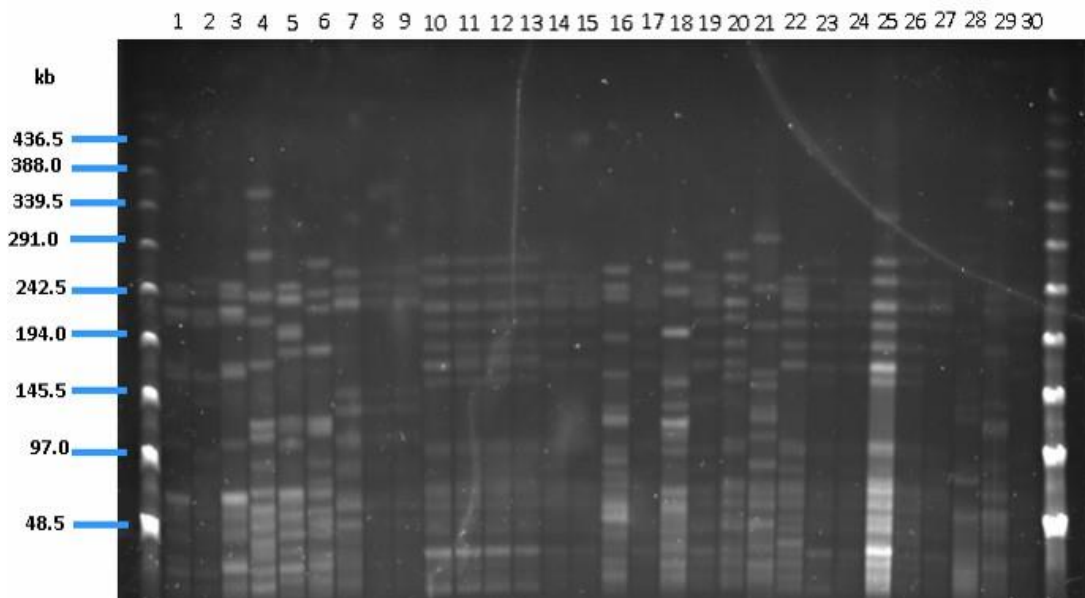


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1, marcador de talla PFGE Lambda Ladder, carril 2-29 cepas de *Enterococcus faecium* (1-30), carril 30, m a rcador Lambda Ladder.

En la Figura 9 podemos observar la imagen de uno de los geles obtenidos y digitalizados en un fotodocumentador modelo Fusion Fx (VILBER) que es un sistema de imágenes con autoexposición y procesamiento de adquisición rápido e instintivo.

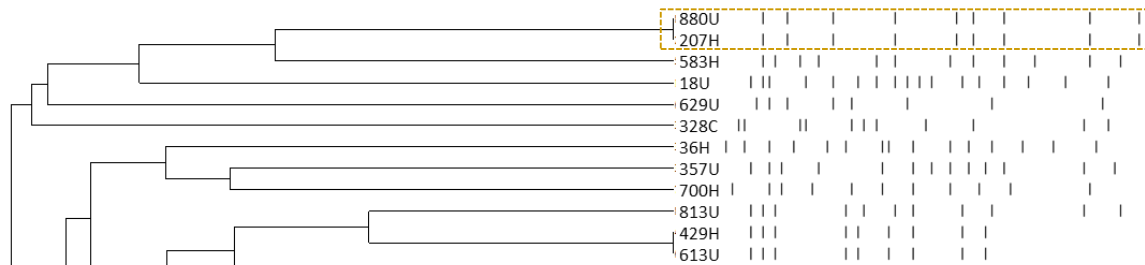
Con base a los criterios de Tenover *et al.*, 1995 ya mencionados, se identificaron 5 pulsotipos predominantes en el gel, donde 6 cepas (10, 11, 12, 13, 23 y 26) presentaron el mismo perfil de macrorrestricción siendo el pulsotipo predominante, esto se puede apreciar mejor en la Figura 10 y 11 en donde se encuentran agrupadas en el mismo clado y con base en los criterios referidos son consideradas como indistinguibles y por la temporalidad de aislamientos adicional a su relación genética idéntica podrían ser epidemiológicamente relacionadas. Las cepas 14, 15, 17 y 19 se valoraron como estrechamente relacionadas. De este modo, 3 pulsotipos independientes a las anteriores agruparon a las cepas 1 y 3, 8 y 9 y 20, 25 respectivamente relacionadas entre pares, pero con menor similitud entre los pulsotipos predominantes. Por lo tanto, las cepas restantes se consideraron diferentes. Es

importante recalcar que la inspección visual para estos análisis, se realiza con base en el conocimiento empírico de la técnica por el equipo de trabajo, sin embargo, para confirmar estas similitudes o diferencias entre sí con los patrones de macrorrestricción, también conocido como pulsotipos se utiliza un software que nos permite la adquisición digital de imágenes con autoexposición y procesamiento de rápido e intuitivo en el análisis de los fragmentos obtenidos. Será necesario realizar el análisis de todos los perfiles obtenidos utilizando un software para el procesamiento y normalización de todos los geles denominado: Bionumerics, Biomérieux.

Con base en el marcador de talla, los fragmentos que se separaron con la enzima de restricción sugerida por el protocolo, estuvieron en un rango de análisis de aproximadamente 25 kilobases hasta 388 kilobases. Las condiciones del corrimiento en general permitieron separar con mayor definición los fragmentos de los perfiles de restricción de cada cepa.

Las 188 cepas fueron procesadas de la misma forma para el desarrollo de la técnica de PFGE estandarizada en el laboratorio, se trabajaron en lotes de entre 20 y 30 cepas por cada corrimiento electroforético por PFGE, colocadas junto con un marcador de talla denominado PFG Lambda Ladder PFG de la marca Biolabs, el cual, fue colocado en ambos lados del gel, flanqueando a las cepas probadas en cada ensayo.

Se obtuvieron 10 geles para el procesamiento de todas las cepas, incluso aquellas que consideramos necesario repetir el experimento para mejorar el patrón de macrorrestricción y obtener la mejor calidad en la imagen para su análisis.



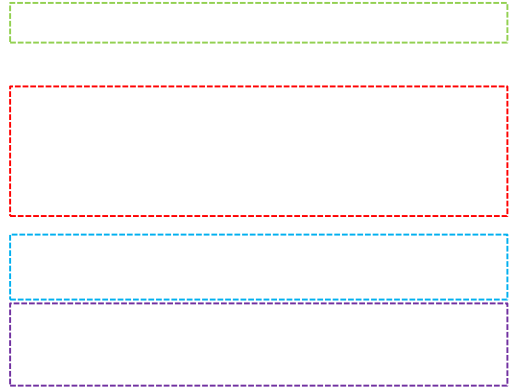


Figura 10. Dendrograma y esquema de los pulsotipos obtenidos.

En el mismo software se realizó el análisis del perfil de bandas obtenido por la macrorrestricción y separación de los fragmentos de cada cepa. Con base en este perfil de bandas se realizó una matriz binomial de datos (0, 1) para la obtención de una matriz de distancias basada en el índice de similitud de DICE utilizando el método de agrupamiento UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) para la construcción del dendrograma mediante el uso de programa NTSYS 2.0.

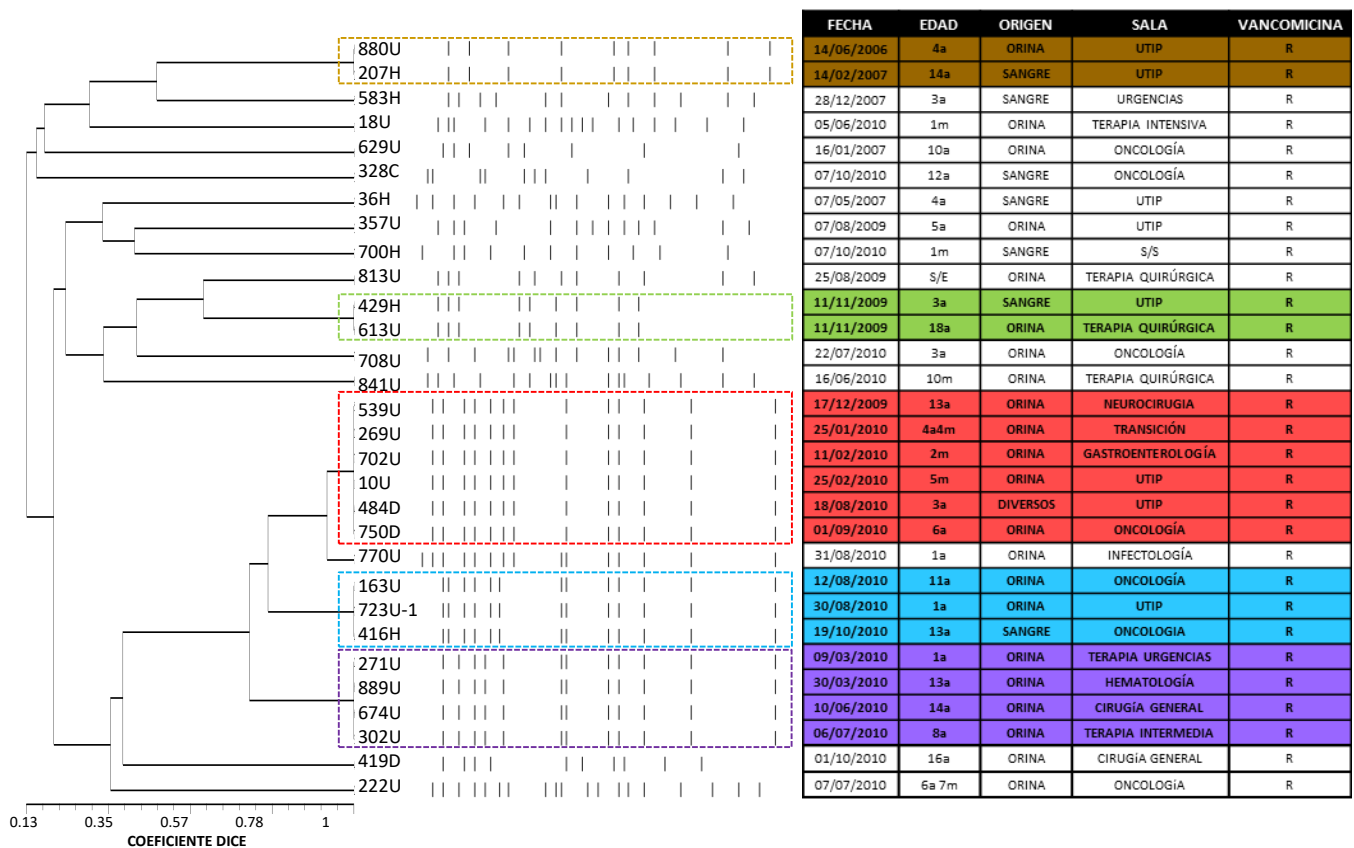


Figura 11. Dendrograma y su asociación con los datos clínicos de la cepas de *E. faecium*

En la figura 11 podemos observar los 5 pulsotipos que agruparon entre 2 a 6 cepas, los cuales aparecen en recuadros de colores con líneas discontinuas para su mejor apreciación. Del lado derecho se encuentran colocados los datos clínicos disponibles hasta el momento en donde se puede observar la fecha de aislamiento, la edad de paciente, la sala de origen de internamiento del paciente, además del perfil de resistencia a vancomicina.

Interesantemente en el pulsotipo resaltado en color rojo el cual agrupo a 6 cepas podemos apreciar que la temporalidad de aislamiento se dio de forma continua entre los meses de diciembre 2009 a febrero de 2010 para 4 cepas y las dos restantes se aislaron en los meses de agosto y septiembre del mismo año, Sin embargo, cada uno de los aislados fueron obtenidos en diferentes salas y la mayor parte de ellos fueron obtenidos de muestras de orina.

En el segundo pulsotipo predominante esta resaltado en color morado, el cual agrupo a 4 cepas, 2 aislados en los meses de marzo, junio y agosto del 2010, de muestras de orina y de diferentes áreas clínicas.

En los demás pulsotipos resaltan semejantes asociaciones únicamente que se agruparon 3 cepas y en los otros 2 pulsotipos agruparon a 2 cepas cada uno.

X. DISCUSIÓN

Enterococcus faecium a menudo está asociado a brotes en hospitales en todo el mundo, aumentando su multirresistencia a fármacos (especialmente vancomicina) ya que actualmente es el antibiótico más empleado para tratar infecciones hospitalarias (Raza *et al.*, 2018). Debido a lo anterior, se han implementado diversos métodos de biología molecular para conocer nuevos datos sobre la epidemiología de las infecciones hospitalarias como PFGE.

Por lo que, en el presente estudio realizado en el laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez, se planteó por un periodo de 10 años, se obtuvo una colección de cepas las cuales fueron almacenadas en el laboratorio. Estas cepas fueron adquiridas de muestras de sangre, orina, entre otros provenientes de pacientes pediátricos hospitalizados de diversas áreas clínicas. Posteriormente se realizó una selección de acuerdo a su perfil de resistencia y así desarrollar los perfiles de macrorrestricción por Electroforesis en Gel por Campo Pulsado, obteniendo resultados significativos que fueron interpretados de acuerdo a los criterios de Tenover *et al.*, 1995. Drews y colaboradores realizaron un estudio similar donde recolectaron cepas EVR de pacientes pediátricos en el periodo de febrero a mayo del 2005 en un Hospital de Toronto y el hallazgo fue encontrar similitud en una sola cepa del brote (Drews *et al.*, 2008).

En lo que respecta la Figura 7A, se puede observar que las muestras recolectadas de los pacientes pediátricos del género femenino fueron mayores con el 56%. Sin embargo, nuestros resultados discrepan con los obtenidos por Dí Pentina *et al.*, 2014 y Pinholt *et al.*, 2015 donde reportan mayor cantidad de muestras tomadas en pacientes pediátricos del género masculino recolectadas en muestras de sangre y muestras fecales respectivamente para desarrollar PFGE en EVR. Es importante mencionar que en la literatura no se encuentra reportado si existe alguna asociación entre el género del paciente y el contraer infecciones provocadas por EVR.

Por otro lado, a lo que se muestra en la Figura 7B, fueron los infantes de menor edad de los que se obtuvieron más muestras con un rango de 1 mes a 5 años siendo 90 pacientes en total, semejante al trabajo realizado por López *et al.*, 2018, donde reportó en su estudio a pacientes menores de un año principalmente e identificó un brote en el Hospital Universitario Río Hortega, siendo 10 neonatos los afectados, asimismo identificó el CC17. De acuerdo con Larrosa, 2016 la razón por la que los pacientes más pequeños son más vulnerables se debe a que la mayoría de las infecciones en niños ingresados son oportunistas facilitadas generalmente por el paciente, como la fragilidad cutánea que favorece erosiones y la entrada de microorganismos a través de la piel, así como diversos instrumentos utilizados para su tratamiento que producen la penetración de

microorganismos. Asociado a esto, otros factores pueden ser la inmadurez del sistema inmunológico o la administración de inmunosupresores.

En cuanto a la Figura 7C, el origen de las muestras de nuestro estudio fue de orina con el 63.5%, que coincide con el estudio realizado por Bocanegra y colaboradores en el 2016, donde estudiaron ERV en 2 Hospitales en México entre 2011 y 2012, la mayoría de sus aislados se recuperaron de la orina (33.9%) y reportaron la presencia del genotipo *vanA* y el gen *espfm*, así como la identificación de cepas por medio de PFGE. De acuerdo con Labra, 2012, la presencia de *E. faecium* en la orina se debe a que son muy comunes en infecciones de las vías urinarias, estas patologías son muy frecuentes entre los pacientes que se encuentran en las áreas de cuidados intensivos, sobretodo se asocian a la contaminación cruzada por la presencia de catéteres urinarios, instrumentación y anomalías del tracto genito-uterino.

De acuerdo a la Figura 8A, la mayoría de las muestras de pacientes fueron recolectadas de las salas de Unidad de Terapia Intensiva y de Oncología, similar al estudio realizado por Avilés, 2010 donde reportó principalmente pacientes pediátricos inmunocomprometidos, se infiere que esto se debe a que los pacientes gravemente enfermos son más susceptibles a contraer infecciones por bacterias multirresistentes generadas por un brote así como aquellos que han recibido múltiples y prolongados esquemas de antibióticos y los pacientes con patologías hemato-oncológicas (Labra, 2012).

Siguiendo la misma relación, en la Figura 8B, en el presente estudio la incidencia de muestras fue mayor en el año 2012, lo que coincide con el trabajo realizado en Colombia por Maldonado *et al.*, 2014, desarrolló un análisis donde se registraron más casos de pacientes infectados por *E. faecium*, incrementando su resistencia un 16.3%, mostrando altas variaciones. De acuerdo con Medell *et al.*, 2014, el incremento de resistencia a glucopéptidos en los últimos años se debe a que el principal factor de riesgo es el uso de antimicrobianos como la vancomicina, cefalosporinas de segunda o tercera generación, metronidazol y clindamicina, siendo el uso de la vancomicina el más frecuente en los países desarrollados, por lo que en estos se presenta mayor prevalencia de cepas resistentes.

XII. CONCLUSIONES

El objetivo se cumplió, ya que de forma preliminar en el análisis de las cepas estudiadas en el primer gel obtenido, se observa que se obtuvieron 5 pulsotipos, de los cuales 2 pulsotipos agruparon a 10 cepas con características genéticamente relacionadas, por lo que se puede deducir la diversidad genética de *E. faecium* en los años de estudio; eventualmente con un análisis con mayor profundidad, podría evidenciar la existencia de brotes intrahospitalarios relacionados con factores inherentes a la atención hospitalaria.

Interesantemente podemos constatar que en los últimos años se ha dado un aumento significativo en la incidencia de las IAAS por bacterias como *E. faecium* resistente a vancomicina, ya que estos microorganismos tienen la capacidad de contar además de los mecanismos de resistencia adquirida, con mecanismos de resistencia intrínseca a los antibióticos, lo que resulta, en una dificultad en su erradicación de los entornos hospitalarios.

XII. PERSPECTIVAS

Sera necesario realizar el análisis de todos los perfiles obtenidos utilizando un software para el procesamiento y normalización de todos los geles denominado: Bionumerics, Biomérieux y obtener un análisis más completo de la diversidad genética de las cepas, así como, la epidemiología molecular y distribución clonal en un estudio a mayor profundidad, así como la asociación o relación clonal entre las cepas en el periodo de estudio.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahuatzin, O., Morales, J., & Chávez, E. (2023). Superbacterias: Sin escape hacia el futuro. RD-ICUAP, 9(25), 104-117. <https://doi.org/10.32399/icuap.rdic.2448-5829.2023.25.1050>
2. Alós, J. 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*. 33(10). 692-699. doi: 10.1016/j.eimc.2014.10.004
3. Al-Tawfiq, J., & Tambyah, P. (2014). Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *Journal of infection and public health*, 7(4), 339-344. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2014.04.003>
4. Arredondo, G., Echeguren F., Arzate B. (2018). Susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* y *faecium* en un Hospital de tercer nivel. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*. 31(2). 56-61.
5. Avilés, M. 2010. Caracterización de dos brotes de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina en un hospital pediátrico de tercer nivel. Tesis de Posgrado UNAM. 55p.
6. Besser, J. 2015. Pulsed-field gel electrophoresis for disease monitoring and control. *Methods Mol Biol*. doi: 10.1007/978-1-4939-2599-5_1
7. Bocanegra, P., Flores, S., Camacho, A., Morfin, R., Villareal, L., Llaca, J., Martínez, E., Rodríguez, E., Calzada, A., Maldonado, H. & Garza, E. 2016. Phenotypic and genotypic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates from two hospitals in Mexico: First detection of VanB phenotype-vanA genotype. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 34(7). 415-421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.09.011>
8. Calderón, J., Díaz, A. y Callejas, A. 2022. Infecciones por Enterococos, *Medicine*. 13(50): 2909-18.
9. Camacho, L. 2021. Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México, *Cir. cir.* .89. pp.426-434. <https://doi.org/10.24875/ciru.20000304>
10. Cardozo, A., Ramón, L., Poutou, R., Carrascal, A. Y Zambrano, D. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. *Journal of the Faculty of Sciences*. 18(2). 203-222.
11. Cercenado, E. 2011. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*. 29(5). 59-65.
12. Coba, J. 2017. Caracterización Molecular de *Enterococcus faecium* multirresistentes causantes de infecciones en sangre en un Hospital Universitario del norte de España. Universidad de Cantabria. Máster Oficial Interuniversitario en Biología Molecular y Biomedicina.
13. Condor, K., Zavaleta, M., Sevilla, C., Piscocoya, S., Vicente, W., & Gonzales, E. 2021. Vancomycin-resistant in clinical isolates of *Enterococcus*. *Revista Medica Herediana*. 32(4). 270-271. <https://dx.doi.org/10.20453/rmh.v32i4.4129>
14. Dí Pentina, M., Chan, S., Briody, C., Power, M. & Hossain, J. 2014. Driving forces of vancomycin-resistant *E. faecium* and *E. faecalis* blood-stream infections in children. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 3(29).
15. Drews, S., Richardson, S., Wray, R., Freeman, R., Goldman, C., Streitenberger, L., Stevens, D., Goia, C., Kovach, D., Brophy, J. & Matlow, A. 2008. An outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an acute care pediatric hospital: Lessons from environmental screening and a case-control study. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 19, 727062, 4 p. <https://doi.org/10.1155/2008/727062>
16. Emaneini, M., Aligholi, M. & Aminshahi, M. 2008. Characterization of Glycopeptides, Amonoglycosides and Macrolide Resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates from Hospitals in Tehran. *Polish Journal of Microbiology*. 57(2). 173-178.
17. Erdem, F., Kayacan, C., Oncul, O., Karagoz, A. & Aktas, Z. 2020. Clonal distribution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Turkey and the new singleton ST733. *J Clin Lab Anal*. 2020 Dec;34(12):e23541. doi: 10.1002/jcla.23541. *J Clin Lab Anal*,34(12). doi: 10.1002/jcla.23541

18. Fair, R. & Tor, Y. 2014. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. 6(1). 25–64. doi: 10.4137/PMC.S14459
19. Faron, M., Ledebøer, A., Buchan, B. (2016). Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting. *Journal of Clinical Microbiology*. 54:(10). <https://doi.org/10.1128/jcm.00211-16>
20. Flores, J., Riquelme, P., Cerda, J., Carrillo, D., Soledad, M., Araya, G. & Viviani, T. 2014. Mayor riesgo de infecciones asociadas a atención en salud en niños con necesidades especiales hospitalizados. *Revista chilena de infectología*. 31(3). <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000300006>
21. Franco, V. 2019. Flora bacteriana en hospitales del Instituto Salvadoreño del Seguro social, 2010-2017. *Revista Científica del Instituto Nacional de Salud*. 2(2). DOI: 10.5377/alerta.v2i2.7941
22. Freitas, A., Tedim, A., Novais, C., Ruiz, P., Werner, G., Laverde, J., Cantón, R., Peixe, L., Baquero, F. & Coque, T. 2010. Global spread of the hlyEfm colonization-virulence gene in megaplasmids of the *Enterococcus faecium* CC17 polyclonal subcluster. *American Society Microbiology Journal*. 54(6). DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00134-10>
23. Guevara, J, Maldonado, M., Valadez, D., Muro, R., Palomares, M., & Rikimatsu, I. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Mesa Directiva 2021-2022*, 41(3), 111.
24. Johnson, D. 2018. Bacterial Virulence Factors. In: Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors. *Springer, Cham*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7_1
25. Labra, M. 2012. Factores de riesgo para adquirir infección por *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina en pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tesis Posgrado UNAM. 58p.
26. Larrosa, M. 2016. Monitorización continua de la colonización por bacterias multirresistentes en una unidad neonatal de cuidados intensivos. Tesis Doctoral. UAB. 204 p.
27. López, L., Frutos, M., Oteo, J. y Eiros, J. 2018. Brote por *Enterococcus faecium* ST17 resistente a glucopéptidos en una Unidad de Neonatología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 36 (3). 198-200p DOI: 10.1016/j.eimc.2017.07.002
28. López, L., Martínez, M., Herrera, J. & Flores, E. (2019). Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, Present and Future. *Analytical Biochemistry*. 573(1). 17-29. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.020>
29. Lozano, C. y Torres, C. 2017. Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*. 35(1). 2-8. doi:10.1016/s0213-005x(17)30028-9
30. Lytsy, B., Engstrand, L., Gustafsson, A. & Kaden, R. 2017. Time to review the gold standard for genotyping vancomycin-resistant enterococci in epidemiology: Comparing whole-genome sequencing with PFGE and MLST in three suspected outbreaks in Sweden during 2013-2015. *Infect Genet Evol*. 54(1). 74-80. doi: 10.1016/j.meegid.2017.06.010
31. Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. 2015. Brock, Biología de los microorganismos. 14a ed. Editorial Pearson educación S.A. Cap. 27, Microbiología diagnóstica. pp. 1131.
32. Maldonado, N., Múnera, M., López, J., Sierr, P., Robledo, C. y Grupo GERMEN. 2014. Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: resultados de seis años de vigilancia. *Biomédica*. 34(3). <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i3.1658>
33. Medell, M., Hart, M. y Batista, M. 2014. Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* obtenidos de pacientes hospitalizados. *Biomédica*. 34. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2122>
34. Miller, W., Murray, B. & Rice, L. (2020). Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infectious Disease Clinics*. 34(4). 751-771.
35. Molina, N., Dávila, M., Sáenz, J. & Venegas, D. 2022. Factores de resistencia microbiana de

- Enterococcus faecalis* asociado a los fracasos endodónticos. Revista Científica Especialidades Odontológicas UG, 5(2).
36. Montalvo, C. y Lugo, M. (2016). Electroforésis: fundamentos, Sistema Operativo, Avances y Aplicaciones. *Epistemos*. 13. 48-54.
 37. Murray, B. 1998. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. *Emerg Infect Dis*. 4(1). 37-47. <https://doi.org/10.3201/eid0401.980106>
 38. Nallapareddy, S., Singh, K., Okhuysen, P. & Murray, B. 2008. A functional collagen adhesin Gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. *Infection and Immunity*. 76(9). DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00375-08>
 39. Neoh, H., Tan, X.-E., Sapri, H. F., & Tan, T. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution*, doi:10.1016/j.meegid.2019.10393
 40. Nguyen, F., Starosta, A., Arenz, S., Sohmen, D., Donhofer, A. & Wilson, D. 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*. 395(5). 559-575. doi:10.1515/hsz-2013-0292
 41. Ochoa, S. Escalona, G., Cruz, A., Dávila, L. Saldaña, Z., Cázares, V., Eslava, C., López, B., Hernández, R., Aquino, G. & Xicohtencatl, J. (2013). Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC Microbiology*. 13, 291. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-291>
 42. Padilla, E., Núñez, A., Padilla, G., y Lobos, G. 2012. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 29(1). 55-61. doi: 10.4067/s0716-10182012000100010
 43. Pandey, A. (2023). Development of LC-MS/MS based multiclass methods for quantification of antibiotic residues in milk. Thesis Master of technology in dairy chemistry.
 44. Pedraza, K. 2020. Medicación intraconducto frente al *Enterococcus faecalis*. *Revista odontológica basadrina*, 3(2). <https://doi.org/10.33326/26644649.2019.3.2.893>
 45. Pinholt, M., Larnar, H., Littauer, P., Moser, C., Pedersen, M., Lemming, L., Ejlersen, T., Sondergaard, T., Holzknecht, B., Justesen, U., Dzajic, E., Olsen, S., Nielsen, J., Wearing, P., Hammerum, A., Westh, H. & Jakobsen, L. 2015. Multiple hospital outbreaks of *vanA* *Enterococcus faecium* in Denmark, 2012-13, investigated by WGS, MLST and PFGE. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 70(9). 2474-2482. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv142>
 46. Poole, K. Resistencia a los antibióticos β -lactámicos. (2004). *Cellular and Molecular Life Sciences*. 61. 2200-2233. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9>
 47. Pualomino, J. & Pachón, J. 2003. Aminoglucósidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 21(2). 105–115. doi:10.1016/s0213-005x(03)72893-6
 48. Raza, T., Rahmat, S., Andleeb, S. & Mehmood, K. 2018. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. *J Pak Med Assoc*, 68(5), 768-772.
 49. Rice, L., Bellais, S., Carias, L., Hutton-Thomas, R., Bonomo, R., Caspers, P., Page, M. & Gutmann, L. 2004. Impact of Specific *pbp5* Mutations on Expression of β -Lactam Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(8). 3028-3032. <https://doi.org/10.1128/aac.48.8.3028-3032.2004>
 50. Rodríguez, E., León, G., Shen, S., Pérez, H., González, E. y Morfín, R. 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*. 34(1). 181-90. doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2142>
 51. Rosas, K. 2014. Estudio genético molecular de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* Resistencia a vancomicina aisladas en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen Red Essaulud-Lima, Perú. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional de San Marcos.
 52. Ruiz, J. y Ballesteros, M. 2018. Consumo de antibióticos y prevención de las resistencias bacterianas. *Revista Pediatría Atención Primaria Suplementos*. 27.13-21.

53. Salipante, S., Sengupta, D., Cummings, L., Land, T., Hoogestraat, D. & Cookson, B. (2015). Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 53(4). 1072-1079. DOI: 10.1128/JCM.03385-14
54. Scheier, T., Franz, J., Boumasmoud, M., Andreoni, F., Chakrakodi, B., Duvnjak, B., Egli, A., Zingg, W., Ramette, A., Wolfensberger, A., Kouyos, R., Brugger, S. 2023. Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: performance analysis and outbreak investigation. *American Society for Microbiology Journals*. 11(5). DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00984-23>
55. Schell, C., Blancato, V., Carbone, R., Mauro, M., Torres, V. & Magni, C. (2024). Epidemiological and Molecular Investigation of Multidrug-Resistant *Enterococcus* spp. Strain Isolated from Hospitalized Patients Using a One-Health Approach. *Asian Journal of Research in Infectious Diseases*. 15(2), 37-52.
56. Sillanpää, J., Nallapareddy, S., Singh, K., Prakash, V., Fothergill, T., Ton-That, H. & Murray, B. 2010. Characterization of the *ebp_{fm}* pilus-encoding operon of *Enterococcus faecium* and its role in biofilm formation and virulence in a murine model of urinary tract infection. *Virulence*. 1(4). 236-246. DOI: [10.4161/viru.1.4.11966](https://doi.org/10.4161/viru.1.4.11966)
57. Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D. & Swaminathan, B. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(9). 2233-2239.
58. Toledo, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J. & Lasa, I. 2001. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10). DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4538-4545.2001>
59. Tooke, C., Hinchliffe, P., Bragginton, E., Colenso, C., Hirvonen, V., Takebayashi, Y. & Spencer J. 2019. β -Lactamases Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*. 431(18). 3472-3500. doi: [10.1016/j.jmb.2019.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002)
60. Trejo, S. 2019. Análisis retrospectivo de los determinantes de resistencia y virulencia de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de pacientes pediátricos. Tesis Licenciatura. 71.
61. Unahalekhaka, A. (2011). Epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud. *Conceptos básicos de control de infecciones de IFIC*, 29.
62. Weiner, L., Abner, S., Edwards, J., Kallen, A., Karlsson, M., Pollock, D., See, I., Soe, M., Walters, M. & Dudeck, M. (2019). Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 41(1). 1-18. doi:10.1017/ice.2019.296
63. Wu, J., Wang, A. & Jennings, M. 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(1). 93-101. doi: 10.1016/j.cbpa.2008.01.023
64. Xu, X., Lin, D., Yan, G., Ye, X., Wu, S., Guo, Y., Zhu, D., Hu, F., Zhang, Y., Wang, F., Jacoby, G. & Wang, M. 2010. vanM, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. *American Society of Microbiology*. 54(11). DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01710-09>

XII. ANEXOS

Preparación de soluciones para el desarrollo del protocolo de PFGE para *E. faecium*.

1. Solución de re-suspensión del pellet (PIV):

Reactivo	Para 100ml de solución
Tris-HCl 2M(pH 7.6)	0.5 ml
NaCl 5M	20 ml
H ₂ O	79.5 ml

2. Solución de Lisis (EC):

Reactivo	Para 20 muestras
Tris-HCl 2M (pH 7.6)	0.13 ml
NaCl 5M	8.8 ml
EDTA 0.5M (pH 8)	8.8 ml
Brij58 10%	2.2 ml
Desoxicolato 10%	0.88 ml
Sarcosil 10%	1.1 ml
Lisozima (10mg/mL)	0.44 ml
RNAasa (4mg/mL)	0.088 ml
H ₂ O	21.5 ml

3. Solución de Desproteínización (ESP):

Reactivo	Para 20 muestras
EDTA 0.5M (pH 9.5)	39.6 ml
Sarcosil 10%	4.4 ml
Proteinasa K (10mg/mL)	0.22 ml

4. Solución para Restricción enzimática

Reactivo	Para 20 muestras
Buffer	220 μ L
Enzima Sma 1	44 μ L
BSA	22 μ L
H2O	1980 μ L

Tabla 3.Base de datos de los pacientes mostrados.

PFGE	CEPA	FECHA	NOMBRE	REGISTRO	EDAD	ORIGEN	SALA	VA	acm	esp	hyl	pilA
1	880U	14/06/2006		778020	4a	ORINA	UTIP	R	+		+	+
2	629U	16/01/2007		778834	10a	ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+		+
3	207H	14/02/2007		705443	14a	SANGRE	UTIP	R	+			+
4	36H	07/05/2007		778370	4a	SANGRE	UTIP	R	+	+		+
5	583H	28/12/2007		790393	3a	SANGRE	URGENCIAS	R	+		+	+
6	357U	07/08/2009		792775	5a	ORINA	UTIP	R	+	+		+
7	813 U	25/08/2009		791998	S/E	ORINA	Tx.Qx	R	+	+		+
8	429H	11/11/2009		801778	3a	SANGRE	UTIP	R	+	+		+
9	613U	11/11/2009		21125	18a	ORINA	TX.QX.	R	+	+		+
10	539U	17/12/2009		793142	13a	ORINA	NEUROCIRUGIA	R	+			+
11	269U	25/01/2010		793102	4a4m	ORINA	TRANSICION	R	+	+		+
12	702U	11/02/2010		793363	2m	ORINA	GASTRO	R	+	+		+
13	10U	25/02/2010		793579	5m	ORINA	UTIP	R	+	+		+
14	271U	09/03/2010		809696	1a	ORINA	TERAPIA DE URGENCIAS	R	+	+	+	+
15	889U	30/03/2010		S/R	13a	ORINA	HEMATOLOGIA	R	+	+		+
16	18U	05/06/2010		792479	1m	ORINA	TERAPIA INTENSIVA	R	+	+		+
17	674U	10/06/2010		793958	14a	ORINA	CIRUJIA GENERAL	R	+	+		+
18	841U	16/06/2010		793974	10m	ORINA	TERAPIA QUIRURJICA	R	+			+
19	302U	06/07/2010		793709	8a	ORINA	TERAPIA INTERMEDIA	R	+	+		+
20	222U	07/07/2010		792944	6a 7m	ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+		+
21	708U	22/07/2010		794008	3a	ORINA	ONCOLOGIA	R	+			+
22	163U	12/08/2010		793978	11a	ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+		+
23	484D	18/08/2010		S/R	3a	DIVERSOS	UTIP	R	+	+		+
24	723U-1	30/08/2010		794267	1a	ORINA	UTIP	R	+	+		+
25	770U	31/08/2010		794352	1a	ORINA	INFECTOLOGIA	R	+	+		+
26	750D	01/09/2010		742944	6a	ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+		+
27	419D	01/10/2010		794127	16a	ORINA	CIRUJIA GENERAL	R	+	+		+
28	328C	07/10/2010		790975	12a	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+			+
29	700H	07/10/2010		222640	1m	SANGRE	S/S	R	+	+	+	+
30	416H	19/10/2010		792982	13a	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+	+		+
31	459U	18/11/2010		7743645	17a	ORINA	UTIP	R	+	+		+
32	772U	06/12/2010		793270	13a	ORINA	URGENCIAS	R	+	+	+	+
33	770U	08/12/2010		774365	16a	ORINA	URGENCIAS	R	+	+		+
34	922D	22/12/2010		944685	8a	DIVERSOS	UTIP	R	+	+	+	+
35	219U	29/12/2010		794779*	9a	ORINA	UTIP	R	+	+		+
36	209U	30/12/2010		29840	2M	ORINA	URGENCIAS	R	+	+		+
37	228U	30/12/2010		786075	5A 3M	ORINA	NEUMOLOGIA	R	+	+		+
38	495U	12/01/2011		794849	7M	ORINA	NEUMOLOGIA	R	+	+		+

39	500U	12/01/2011		794802*	7A	ORINA	CARDIOLOGIA	R	+	+		+
40	508U	14/01/2011		794524*	9A 11M	ORINA	URGENCIAS	R	+	+		+
41	634U	19/01/2011		794490	10A	ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+		+
42	614U	20/01/2011		794532*	1A	ORINA	GASTROENTERO LOGIA	R	+	+		+
43	475H	01/02/2011		793195	3A	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+			+
44	450D	10/02/2011		799832	15A	HERIDA	S/S	R	+		+	+
45	378U	25/02/2011		792470	17a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+		+
46	183H	28/02/2011		794859	2a	SANGRE	CIRUGIA GENERAL	R	+	+	+	+
47	664U	09/03/2011		S/R	10a	ORINA	ONCOLOGIA	R	+			+
48	677U	10/03/2011		774365	16a	ORINA	REUMATOLOGIA	R	+	+	+	+
49	698U	14/03/2011		789758	12a	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
50	851D	15/03/2011		778577	18a 3m	LIQUIDOS	ONCOLOGIA	R	+	+	+	+
51	6U	25/03/2011		795077	7m	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
52	851H	25/03/2011		794981	13a	SANGRE	UTIP	R	+	+	+	+
53	50U	30/03/2011		812209	15a	ORINA	ONCOLOGIA	R		+	+	+
54	133H	06/04/2011		793782	1a 3m	SANGRE	URGENCIAS	R	+	+	+	+
55	685U	27/04/2011		794862	2m	ORINA	UCIN	R	+	+	+	+
56	768U	27/04/2011		795169	9m	ORINA	TERAPIA QUIRURGICA	R	+	+	+	+
57	228U	19/05/2011		794803	11a 2m	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+	+	+
58	207H	29/11/2011		795905	2a 10m	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+	+	+	+
59	814U	01/12/2011		806616-11	16a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+	+	+
60	854U	07/12/2011		818279	16a	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
61	144U	16/12/2011		806646	16a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+	+	+
62	151U	20/12/2011		795280	9m	ORINA	GASTROENTERO LOGIA	R	+	+	+	+
63	200U	20/12/2011		795982	1m	ORINA	UCIN	R	+	+	+	+
64	356U	29/12/2011		795672	15a	ORINA	TERAPIA INTERMEDIA	R	+	+	+	+
65	394U	30/12/2011		815926	9a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+	+	+
66	994H	06/01/2012		795102	5a	SANGRE	TERAPIA INTERMEDIA	R	+	+	+	+
67	581D	01/02/2012		786124		DIVERSO S	UROLOGIA	R	+	+		+
68	174U	08/02/2012		796056	10d	ORINA	UCIN	R		+	+	+
69	778H	09/02/2012		796246	12a	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
70	800C	09/02/2012		819176	2a	ORINA	URGENCIAS	R	+	+	+	+
71	228U	10/02/2012		821351	7a	ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+	+	+
72	161U	15/02/2012		796270	6a	ORINA		R	+			+
73	955C	24/02/2012		796326		ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+		+
74	607U	27/02/2012		790556	2m	ORINA	UCIN	R	+			+
75	724U	06/03/2012		739285	3a	ORINA	TEJIDOS	R	+		+	+
76	847U	08/03/2012		795969	16d	ORINA	UCIN	R	+		+	+
77	979U	13/03/2012		796273	41d	ORINA	UCIN	R	+	+	+	+
78	66U	20/03/2012		821346	14a	ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+	+	+

79	305D	28/03/2012		796426		HERIDA	TERAPIA QUIRURGICA	R	+	+	+	+
80	45H	03/04/2012		821613	14a	SANGRE	UTIP	R	+	+	+	+
81	185H	11/04/2012			16a	SANGRE	TERAPIA QUIRURGICA	R	+	+	+	+
82	215H	11/04/2012		795104	8m	SANGRE	UTIP	R	+	+	+	+
83	419H	20/04/2012		796452	1a11m	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+	+	+	+
84	572D	25/04/2012		822118	6m	DIVERSOS	TERAPIA QUIRURGICA	R	+	+	+	+
85	174U	16/05/2012		795237	3a	ORINA	TRANSICION	R	+	+	+	+
86	261U	19/05/2012		778809	5a	ORINA	NEUMOLOGIA	R	+	+	+	+
87	11U	15/06/2012		796605	12a	ORINA	CARDIOLOGIA	R	+	+	+	+
88	91H	25/06/2012		796032	8a	SANGRE	UTIP	R	+		+	+
89	241U	26/06/2012		820547	7a	ORINA	NEFROLOGÍA	R	+		+	+
90	282U	29/06/2012		788926	15a	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
91	330U	29/06/2012		790019	15a	ORINA	UTIP	R	+	+		+
92	463H	12/07/2012		796442	9a	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+	+	+	+
93	876U	27/07/2012		767351	10a	ORINA	URGENCIAS	R	+	+		+
94	7H	01/08/2012		798368	13a3m	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+	+	+	+
95	931D	16/08/2012		796821	14a	DIVERSOS	CIRUGIA	R	+	+	+	+
96	479D	24/08/2012		796424	9m	LIQUIDOS	UTIP	R	+		+	+
97	208D	13/09/2012		793634	5a7m	DIVERSOS	UTIP	R	+	+		+
98	5U	17/09/2012		775352	14a	ORINA	NEUROCIRUGIA	R	+	+	+	+
99	250U	27/09/2012		797077	3a	ORINA	INFECTOLOGIA	R	+	+	+	+
100	279U	28/09/2012		796926	4m	ORINA	GASTROENTEROLOGIA	R	+	+		+
101	426D	04/10/2012		796503		DIVERSOS	TERAPIA INTERMEDIA	R	+			+
102	450U	04/10/2012		822465	7a	ORINA	NEUROCIRUGIA	R	+		+	+
103	520U	09/10/2012		708089	29d	ORINA	UCIN	R	+		+	+
104	6U	30/10/2012		818097	6a	ORINA	URGENCIAS	R	+	+		+
105	762D	05/11/2012		797054	11a	DIVERSOS	UTIP	R	+	+		+
106	840D	12/11/2012		796396	15a	LIQUIDOS	HEMATOLOGIA	R	+	+		+
107	849D	12/11/2012		806925	8a	DIVERSOS	CIRUGIA	R	+	+		+
108	115U	22/11/2012		796608	2a	ORINA	CIRUGIA	R	+	+	+	+
109	439U	23/11/2012		797290	10m	ORINA	CIRUGIA	R	+	+	+	+
110	766U	06/12/2012		769103	15a	ORINA	ONCOLOGIA	R	+	+		+
111	428D	15/01/2013		797549	18d	LIQUIDOS	UCIN	R	+	+		+
112	130H	22/01/2013		81442	1m	SANGRE	UTIP	R	+	+		+
113	638U	25/01/2013		820838	3a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+		+
114	456H	28/01/2013		817449	5a	SANGRE	CIRUGIA	R	+	+	+	+
115	257H	29/01/2013		824278	9a	SANGRE	TERAPIA INTERMEDIA	R	+	+	+	+
116	461H	05/02/2013		797593	2a	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+	+	+	+
117	485H	07/02/2013		797636	7d	SANGRE	UCIN	R	+	+		+
118	627D	08/02/2013		797099	8a	LIQUIDOS	TERAPIA	R	+	+	+	+

							QUIRURGICA					
119	657D	08/02/2013		797537	1m	HERIDA	UCIN	R	+	+		+
120	168U	19/02/2013		796135	12a	ORINA	REUMATOLOGIA	R	+	+	+	+
121	431H	14/03/2013		824738	11m	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
122	76D	14/03/2013		797224	7m	LIQUIDOS	TERAPIA QUIRURGICA	R	+	+	+	+
123	183D	14/03/2013		788683	9a	HERIDA	UTIP	R	+	+	+	+
124	29C	15/03/2013		797307	2a	ORINA	MEDICINA INTERNA	R	+	+	+	+
125	797U	15/03/2013		804925	8a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+	+	+
126	109U	01/04/2013		825531	1a	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
127	378U	15/04/2013		797813	2a3d	ORINA	UCIN	R	+	+	+	+
128	300H	16/04/2013		814061	9a	SANGRE	UTIP	R		+	+	+
129	495U	18/04/2013		797568	9m	ORINA	CARDIOLOGIA	R	+	+	+	+
130	784U	03/05/2013		797906	10a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+		+
131	497H	02/07/2013		797984	9m	SANGRE	UTIP	R	+	+	+	+
132	330D	05/07/2013		821497	2a	HERIDA	URGENCIAS	R	+	+	+	+
133	274U	09/07/2013		797271	3a	ORINA	URGENCIAS	R	+	+	+	+
134	743U	23/09/2013		797825	6a	ORINA	ONCOLOGÍA	R	+	+	+	+
135	221H	11/10/2013		797696	8 meses	SANGRE	Tx Ox	R	+	+	+	+
136	299U	11/10/2013		798531	3 años	ORINA	Tx int	R	+	+	+	+
137	330H	16/10/2013		798570	6 meses	SANGRE	Gastro	R		+	+	+
138	119-LCR	29/10/2013		798002	9 años	LCR	Ürgencias	R	+	+	+	+
139	333U	28/11/2013		804925	9a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+	+	+
140	526U	11/12/2013		829548	14a	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
141	903U	02/01/2014		798572	15 años	ORINA	Onco	R	+	+	+	+
142	14U	15/01/2014		766718	11 años	ORINA	Nefro	R	+	+	+	+
143	779U	22/01/2014		798497	6a	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
144	516H	29/01/2014		769928	17 años	SANGRE	UTIP	R	+	+	+	+
145	302U	30/01/2014		798859	5 años	ORINA	Nefro	R	+	+	+	+
146	306U	30/01/2014		798714	5 años	ORINA	Med. Interna	R	+	+	+	+
147	816U	10/02/2014		827270	17 años	ORINA	Onco	R	+	+	+	+
148	973U	10/02/2014		798881	8 años	ORINA	Med. Interna	R	+	+	+	+
149	73U	27/02/2014		798132	8 meses	ORINA	Gastro	R	+		+	+
150	110U	27/02/2014		798927	9 años	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
151	192U	06/03/2014		799093	16 días	ORINA	UCIN	R	+	+	+	+
152	706U	25/03/2014		796835	16 años	ORINA	Urgencias	R	+	+		+
153	152U	03/04/2014		798927	9a	ORINA	UCIN	R	+	+	+	+
154	29U	08/04/2014		798967	2 meses	ORINA	UCIN	R	+	+	+	+
155	242U	23/04/2014		795902	2 años	ORINA	Ped. Mixta	R	+	+	+	+
156	366U	25/04/2014		798108	2 años	ORINA	Ped. Mixta	R	+	+	+	+
157	320C	29/04/2014		827120	12 años	DIVERSOS	Nefro	R	+	+	+	+

158	904U	19/05/2014		799346	1 mes	ORINA	UCIN	R	+	+	+	+
159	962U	06/08/2014		795455	16a	ORINA	NEFROLOGIA	R	+	+		+
160	872U	18/09/2014		794176	8m	ORINA	MEDICINA INTERNA	R	+	+		+
161	357U	09/10/2014		796106	15a	ORINA	UTIP	R	+	+		+
162	829U	28/10/2014		776382	9a	ORINA	URGENCIAS	R	+	+	+	+
163	487H	18/12/2014		840005	2m	SANGRE	UCIN	R	+	+	+	+
164	75H	30/12/2014		840059	15a	SANGRE	ONCOLOGIA	R	+		+	+
165	207D	15/01/2015		840313	1a.	LIQUIDOS	UTIP	R	+	+	+	+
166	612U	19/01/2015		830695	10a.	ORINA	INFECTOLOGÍA	R	+	+		+
167	318D	26/01/2015		840166	1m.	HERIDA	UCIN	R	+	+		+
168	713H	26/01/2015		840273	24d.	SANGRE	UCIN	R	+			+
169	349D	28/01/2015		840116	2m.	DIVERSOS	UCIN	R	+	+		+
170	588D	18/02/2015		840401	17a.	LIQUIDOS	NEFROLOGÍA	R	+	+	+	+
171	400U	19/02/2015		744814	17a.	ORINA	NEFROLOGÍA	R	+	+	+	+
172	604U	26/02/2015		840400	1m.	ORINA	UCIN	R	+	+		+
173	850D	13/03/2015		840121	8a.	LIQUIDOS	UTIP	R	+	+		+
174	644H	27/03/2015		21136-15	6m.	SANGRE	URGENCIAS	R	+	+	+	+
175	345U	17/04/2015		840059	16a.	ORINA	UTIP	R	+	+	+	+
176	351H	17/04/2015		797748	11a.	SANGRE	ONCOLOGÍA	R	+	+	+	+
177	283D	23/04/2015		799837	10m.	DIVERSOS	TERAPIA INTERMEDIA	R	+	+	+	+
178	446 U	15/05/2015		840431	4m.	ORINA	ONCOLOGÍA	R	+	+		+
179	646 D	29/05/2015		799717	10m.	DIVERSOS		R	+	+		+
180	674 D 1,2	29/05/2015		836734	14a.	LIQUIDOS	CIRUGIA GENERAL	R	+	+	+	+
181	249 H	02/06/2015		840010	9m.	SANGRE	TERAPIA INTERMEDIA	R	+	+	+	+
182	845 U	02/06/2015		840618	13a.	ORINA	URGENCIAS	R	+	+	+	+
183	91 U	11/06/2015		850491	2 m.	ORINA	UTIP	R	+			+
184	997 U	11/06/2015		835120	15 a	ORINA	NEFROLOGÍA	R	+	+	+	+
185	205 U	16/06/2015		840792	1a.	ORINA	UTIP	R	+			+
186	483 U	29/06/2015		840801	9a.	ORINA	URGENCIAS	R	+	+		+
187	696 U	08/07/2015		834483	1a.	ORINA	PEDIATRIA MIXTA	R	+	+		+
188	185 D	10/07/2015		799746	4a.4m.	DIVERSOS	ONCOLOGÍA	R	+	+	+	+
189	929 U	16/07/2015		792750	15a.	ORINA	NEFROLOGÍA	R	+	+	+	+
190	674 U no D	20/08/2015		840919	2 m.	ORINA	UCIN	R	+	+		+
191	516 U	24/09/2015		841110	1 m.	ORINA	UCIN	R	+	+		+
192	888 D	25/09/2015		841274	10d.	LIQUIDOS	UCIN	R	+	+		+
193	12 D	05/10/2015		772870	18a.	LIQUIDOS	CIRUGIA GENERAL	R	+	+	+	+
194	124 H	18/10/2015		840786	5m.	SANGRE	NEFROLOGÍA	R	+	+		+
195	708 U	13/11/2015		841487	2a.	ORINA	TERAPIA QUIRÚRGICA	R	+	+		+

196	669 D	02/12/2015		841055	4m.	HERIDA	CIRUGIA GENERAL	R	+	+		+
197	209 U	08/12/2015		841387	7a.	ORINA	NEUROCIRUGÍA	R	+	+		+
198	742 D	09/12/2015		829657	14a.	HERIDA	TERAPIA QUIRÚRGICA	R	+	+		+