



# Detección de secuencias tipo (ST) por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) en *Enterococcus faecalis* aislados de pacientes hospitalizados en Argentina

C. Schell<sup>1</sup>, J. Mauro<sup>1</sup>, AS. Tedim Pedrosa<sup>2</sup>, MM. De Luca<sup>1</sup>, M. Sparo<sup>1,3</sup>, S. Lissarrague<sup>3</sup>, JA. Basualdo<sup>1</sup>, T. Coque González<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Centro Universitario de Estudios Microbiológicos y Parasitológicos (CUDEMyP)-UNLP-CIC. <sup>2</sup>Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRyCIS). Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid, España. <sup>3</sup>Hospital Ramón Santamarina. Tandil, Buenos Aires. E-mail: [schellcelia@med.unlp.edu.ar](mailto:schellcelia@med.unlp.edu.ar)

**INTRODUCCIÓN:** *Enterococcus* spp. es reconocido en la actualidad como un patógeno hospitalario cuya frecuencia de aislamiento es cada vez mayor a nivel mundial. Este género se caracteriza por poseer multirresistencia (MR) antimicrobiana que puede ser intrínseca ó adquirida por mecanismos de transferencia horizontal de genes. *E. faecalis* es la especie mas frecuentemente recuperada de infecciones asociadas al cuidado de la salud (IACS) y extrahospitalarias. Las infecciones que produce pueden ser de origen endógeno o exógeno, siendo esta última de importancia en el origen y agravamiento de las IACS, debido a la diseminación de clones intrahospitalarios evolucionados de *E. faecalis* con MR y con capacidad de invasión. *Multilocus Sequence Typing* (MLST) es un método molecular basado en la identificación de alelos de secuencias de genes del metabolismo bacteriano (genes *housekeeping*). Permite identificar clones y/o líneas clonales, permitiendo investigar los linajes genéticos fundamentalmente en poblaciones bacterianas. Es una herramienta de gran utilidad para determinar la epidemiología bacteriana local y global en un nicho ecológico determinado, la estructura poblacional de cepas circulantes intrahospitalarias, para caracterizar brotes y, entre otras cosas, para conocer líneas clonales hipervirulentas.

**MATERIALES Y MÉTODOS:** Se identificaron por pruebas bioquímicas convencionales y espectroscopía de masa (MALDI-TOF MS, Bruker, Daltonics, Germany) N=49 cepas de *E. faecalis* productoras de IIH, aisladas en el Hospital Ramón Santamarina de Tandil (2010-2014). Posteriormente, se seleccionaron n=10 cepas según resultados obtenidos por electroforesis de campo pulsado (PFGE) utilizando el equipo CHEF-DR III (Bio-Rad) y se analizaron por MLST. El estudio de MLST fue realizado en etapas: 1-extracción del ADN cromosómico; 2-amplificación específica por PCR de fragmentos internos seleccionados, de 7 genes metabólicos específicos y descriptos para *E. faecalis* (*gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt* y *yiqL*); 3-purificación de los amplicones obtenidos; 4- secuenciación de los productos obtenidos y purificados (*Macrogen*); 5-análisis de los resultados y comparación de los perfiles alélicos con los descriptos en la base de datos PubMLST.org (<http://pubmlst.org/efaecalis/>).

**OBJETIVO:** Detectar los tipos de secuencias (ST) en cepas seleccionadas de *E. faecalis* aisladas de infecciones invasivas humanas (IIH) de pacientes internados utilizando *Multilocus Sequence Typing* (MLST).

**RESULTADOS:** Se detectaron 7 ST diferentes en las n=10 cepas investigadas, una de las cuales fue un nuevo tipo descripto a nivel mundial (ST720). Las STs encontradas con mayor frecuencia fueron ST179, ST236 y ST720 (todos correspondieron a 2 aislamientos cada uno), seguidas de ST9, ST281, ST388 y ST604 presente cada uno en un sólo aislamiento. En la Tabla I y II se detallan los resultados obtenidos.

Tabla I: Números de alelos y ST detectados por amplificación (PCR) y secuenciación de genes *housekeeping* (<http://pubmlst.org/efaecalis/>) en n=10 cepas de *E. faecalis*.

Muestra Clínica	ST	<i>gdh</i>	<i>gyd</i>	<i>pstS</i>	Nº de alelos			
					<i>gki</i>	<i>aroE</i>	<i>xpt</i>	<i>yiqL</i>
Hemocultivo/Liq. peritoneal	ST179	5	1	1	3	7	1	6
Hemocultivo/Liq. articular	ST236	11	6	50	33	1	38	10
Liq. abdominal/Absceso	ST720	35	7	3	2	56	1	5
Hemocultivo	ST388	35	7	40	32	32	26	31
Liq. articular	ST281	15	7	3	2	56	1	5
Liq. articular	ST604	2	7	11	1	23	16	2
Hemocultivo	ST9	4	6	16	4	1	1	4

Tabla II: Número de identificación de ST, país, categoría de la fuente y sitio de aislamiento a nivel mundial (PubMLST.org, 2016).

MLST	Aislamientos (año)	País (nº aislamientos)	Fuente y Sitio de aislamiento
ST 9	1 (1989)	Argentina	H*/Sangre
ST 9	24	España <sup>†</sup> (11), EE.UU. <sup>‡</sup> (1), Polonia <sup>λ</sup> (6), Noruega <sup>ξ</sup> (1), Francia <sup>ψ</sup> (1), Brasil <sup>ς</sup> (4)	†: H* (sangre [3], hisopados rectales [4], no especificado (NE) [3] y alimento vegetal [1]); ‡: NE; λ: orina [5] y sangre [1]; ξ: orina de perro; ψ: alimento de origen animal; ς: orina [2], herida quirúrgica [2]
ST 179	5	España (2), Sur Corea <sup>χ</sup> (2), Países Bajos <sup>φ</sup> (1)	†: H* (líquido peritoneal y descarga nasal); χ: H* sangre [2]; φ: H* sangre [1]
ST 236	1	Noruega	H*, absceso periodontal
ST 281	1	Francia	H*, sangre
ST 388	1	Francia	H*, NE
ST 604	1	Suecia	A**, heces
ST 720	2 (2010/2013)	Argentina	H*, fluído abdominal y absceso de tejido subcelular

H\*: paciente hospitalizado; A\*\*: paciente ambulatorio.

21 años ST9 a ST720 (Argentina)

**CONCLUSIONES:** 1. Se detectaron 7 ST en cepas seleccionadas de *E. faecalis* aisladas de IIH en pacientes internados en el Hospital R. Santamarina utilizando *Multilocus Sequence Typing*. 2. Se aportan los primeros datos sobre la estructura poblacional de *E. faecalis* circulantes en dicho hospital y su relación con la epidemiología a nivel mundial según los ST encontrados en este trabajo. 3. Se detectó un nuevo ST a nivel mundial asignado ST720. 4. Debido a los datos encontrados en este estudio, se recomienda extender los mismos hacia bacterias del mismo género o de otros, para monitorear la evolución de clones circulantes, para detectar nuevos clones emergentes con MR antimicrobiana y, para identificar la presencia de líneas clonales hipervirulentas, prediciendo con cierta antelación la llegada de brotes.