

63



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“LA IMPORTANCIA CLÍNICA DE *Enterococcus faecalis* Y SUS PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA”

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE.
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A
KAREN HERNÁNDEZ ACOSTA

299055



MÉXICO, D.F.



2001

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Profr. RAÚL GARZA VELASCO
Vocal: Profa. ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ
Secretario: Profa. NORMA TREJO MEDINA
1er. Suplente: Profa. ESTRELLA MIRELLA CERVANTES GARCÍA
2º. Suplente: Profa. MARÍA DEL ROCÍO LÓPEZ ÁLVAREZ

El tema se desarrolló en las Bibliotecas de las Facultades de Química y Medicina de la UNAM, así como en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y diversas bibliotecas del Sector Salud.

Asesor del tema



Q.F.B. Raúl Garza Velasco

Sustentante:



Karen Hernández Acosta

DEDICATORIAS

A mis queridos padres por su amor, esfuerzo, apoyo y la dedicación que siempre me han brindado. Los quiero mucho.

A mi hermana Evelyn por su cariño y su compañía a lo largo de mi vida.

A Mario por el amor, cariño, comprensión y apoyo que me ha brindado.

A Fusae por brindarme su amistad durante todos estos años.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Química.

Al maestro Raúl Garza porque gracias a su dedicación y enseñanza es posible la realización de este trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS	
1 1. Taxonomía	5
1.2. Características microscópicas.....	7
1.3. Medios de cultivo.....	8
1.4. Identificación bioquímica.....	10
1 5. Tipificación	27
1.6. Detección de resistencia a antibióticos.....	28
II. IMPORTANCIA CLÍNICA	
2.1. Resistencia a antibióticos.....	35
2.2. Patogenia.....	43
2.2.1. Colonización y translocación	43
2.2.2. Respuesta inmune.....	47
2.2.3. Patología del daño tisular	48
2.3. Patología.....	51
2.3.1. Bacteremia.....	51
2.3.2. Endoftalmitis	52
2.3.3. Endocarditis.....	53
2.3.4. Infección de heridas postquirúrgicas	54
2.3.5. Infección urinaria.....	55
2.4. Epidemiología.....	56
III. FACTORES DE VIRULENCIA	
3.1. La sustancia de agregación (AS).....	62
3.1.1. Participación en conjugación de plásmidos	63
3.1.2. Adherencia a tejidos del hospedero.....	69
3.1.3. Promoción de la fagocitosis.....	76
3.1.4. Estimulación de supervivencia intracelular del microorganismo	81
3.2. Hemolisina.....	84
3.3. Gelatinasa.....	88
3.4. Bacteriocinas (enterocinas).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
VRE	Vancomycin-resistant enterococci (enterococos vancomicina resistentes)
PBP	Protein binding penicillin (Proteína de unión a la penicilina)
EBS	<i>Enterococcus</i> binding substance (Sustancia de unión enterococal)
AS	Aggregation substance (sustancia de agregación)
UTI	Urinary tract infection (Infección del tracto urinario)
CDC	Center for Disease Control (Centro de control de infecciones)
SEM	Scanning electron microscopy (Microscopía electrónica)
IAP	Integrin-associated protein (Proteína asociada a integrina)
MPO	Mieloperoxidasa
MIC	Minimum inhibitory concentration (concentración mínima inhibitoria)
DL ₅₀	Dosis letal al 50%
PMN	Polimorfonucleares

INTRODUCCIÓN

Los primeros reportes referentes a la patogenicidad de los enterococos se remontan a finales del siglo XIX, cuando McCallum y Hastings lograron aislar al microorganismo a partir de un caso de endocarditis y le asignaron la denominación de *Micrococcus zimogenes*, tomando como base su morfología microscópica y sus amplias propiedades fermentativas. Desde aquel entonces, se pudo comprobar la persistente resistencia de los enterococos a la desecación, a las temperaturas de hasta 60°C y a diversos agentes antisépticos, factores que, un siglo después, contribuyeron a su elevada incidencia dentro del ambiente nosocomial, lo que gradualmente los ha venido situando entre los cuatro principales agentes causales de enfermedades intrahospitalarias (31,40).

Durante casi un siglo, los enterococos fueron considerados simples miembros de la flora habitual del intestino y sólo ocasionalmente se les reportó como probables responsables de los cuadros patológicos que afectaban a la población; sin embargo, en la época actual se les toma en cuenta entre los patógenos más destacados dentro de las instituciones nosocomiales: en E.U.A., se calcula que estos microorganismos provocan más de 800,000 casos anuales de enfermedades diversas, con costos mayores a los 500 millones de USD, alcanzando uno de los primeros tres sitios, dependiendo de la región anatómica implicada y de la ubicación geográfica analizada (28).

Sí bien entre los padecimientos debidos al género *Enterococcus* figuran las infecciones del tracto urinario, las bacteremias, las afecciones intraabdominales y la endocarditis -todos los cuales requieren de los mayores cuidados-, quizá el problema más importante resida en su actual multirresistencia a los antibióticos (28,50).

Las septicemias debidas a enterococos resistentes a vancomicina (VRE) registran una doble tasa de mortalidad (37 %), respecto a la implicada (16 %) en los casos asociados a cepas susceptibles al mencionado glucopéptido. En este sentido, es importante subrayar que la vancomicina había venido representando una eficaz alternativa para llevar a cabo el tratamiento de infecciones sistémicas enterocócicas provocadas por cepas resistentes a muchos otros antibióticos y que, por lo tanto, la abrupta aparición de numerosas clonas de VRE (prácticamente la mitad del total de los aislamientos clínicos) plantea un complicado desafío terapéutico para los equipos de salud (28,31,40,80).

Por otra parte, es preciso aclarar que la adquisición de multirresistencia a los antimicrobianos no explica del todo el acelerado incremento en la frecuencia de las enfermedades intrahospitalarias debidas a *E. faecalis* y *E. faecium*, ya que otros factores que también influyen de manera determinante en la problemática, son: el aumento de la propagación de los enterococos a partir

del intestino y su adquisición de mayor virulencia, a través de diversos elementos génicos móviles; a este último respecto, resulta hasta cierto punto incomprensible que el marcado incremento observado en los pacientes hospitalizados, no se haya acompañado por un aumento significativo en la incidencia observada entre los miembros de la comunidad extranosocomial (31,40,80).

OBJETIVOS

- Señalar los fundamentos de las pruebas bioquímicas y moleculares más utilizadas en el diagnóstico de laboratorio de las enterococcias
- Describir los principales factores de virulencia involucrados en la patogenicidad de *Enterococcus faecalis*
- Destacar los principales factores que influyen en la incidencia de *Enterococcus faecalis* dentro del ambiente intrahospitalario
- Describir las principales enfermedades ocasionadas por *Enterococcus faecalis*.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

1.1. Taxonomía

En 1930, Rebecca Lancefield ubicó a los enterococos como *Streptococcus* del grupo D. La clasificación anterior la estableció aislando cepas de estreptococos a partir de exudados faríngeos provenientes de personas afectadas por padecimientos respiratorios. Con los exudados preparó cultivos líquidos y extrajo sus respectivos carbohidratos "C", sometiénolos a la acción del HCl 0.2 N en caliente. Una vez extraído el carbohidrato "C", lo inoculaba en conejos y, previa sangría del animal inoculado, obtenía (por centrifugación) el suero que contenía anticuerpos anti- carbohidrato "C". Finalmente las cepas que reaccionaron con el suero anti-D se les clasificó como estreptococos del grupo D (22, 34).

No fue sino hasta el año de 1984, cuando Schleifer y Kilpper-Bälz demostraron mediante estudios de hibridación DNA-DNA, DNA-rRNA y secuenciación de 16S rRNA que *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus faecium* manifestaban características diferentes a otros miembros del género *Streptococcus* y que, por lo tanto, tendrían que formar parte de otro género, al que finalmente denominaron *Enterococcus* (22, 80).

Posteriormente, con base en estudios taxonómicos y filogenéticos, un considerable número de especies descritas recientemente se ha incluido en este género, tal es el caso de *Enterococcus cecorum* y *Enterococcus saccharolyticus* (22).

La tabla 1 muestra los grupos/especies del género *Enterococcus*, establecidos mediante hibridación DNA-RNA (22)

Tabla 1. Principales grupos y especies del género *Enterococcus*.

Grupo	Especies	Similitud de secuencia 16S rRNA
I	<i>E. durans</i> <i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i>	98.7-99.7%
II	<i>E. avium</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. pseudoavium</i>	99.3-99.7%
III	<i>E. casseliflavus/E. gallinarum</i>	99.8%
Líneas Individuales	<i>E. saccharolyticus</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. cecorum</i>	

Los enterococos se consideran comensales del tracto gastrointestinal y se les aísla a partir de ambientes diversos, debido a su diseminación a través del excremento de humanos y animales (70)

especies enterocóccicas son en su mayoría α -hemolíticas o no hemolíticas (4, 29, 36, 80).

Dada la elevada incidencia de los VRE en las infecciones intrahospitalarias, es conveniente tomar en cuenta que a las fórmulas originales del agar para enterococos y el agar BHI, se les puede agregar vancomicina a la concentración deseada (usualmente 6 $\mu\text{g/mL}$) y que en el medio selectivo Enterocóccico también pueden desarrollar otras especies bacterianas ajenas al género *Enterococcus* (4)

Es conveniente señalar que se han descrito nuevos medios selectivos para llevar a cabo el aislamiento de enterococos a partir de orina, algunos de los cuales contienen sustratos cromogénicos. En estos casos, *E. faecalis* y *E. faecium* suelen producir colonias de color azul en el CHROMagar, generalmente pequeñas, previa incubación a 35-37°C durante 18-24 h; no obstante, dicha incubación debe realizarse en la oscuridad para que la coloración implicada permanezca estable (22, 62, 87).

Ford y cols diseñaron un medio denominado agar cefalexina-aztreonam-arabinosa, el cual también resulta útil en los estudios epidemiológicos, sobre todo para detectar la presencia de *E. faecium* en heces de pacientes hospitalizados con riesgo de padecer infecciones enterocóccicas sistémicas. El medio contiene arabinosa (10 g/L), aztreonam (75 mg/L), cefalexina (50

mg/L) y rojo fenol (2 %) sobre la base agar Columbia y el desarrollo de *E. faecium* en él se caracteriza por la presencia de colonias blancas rodeadas de halos amarillos que indican la producción de ácido a partir de la arabinosa, por su parte, *E. faecalis* da lugar a colonias transparentes sin halos amarillentos, ya que no utiliza dicho carbohidrato (4, 22).

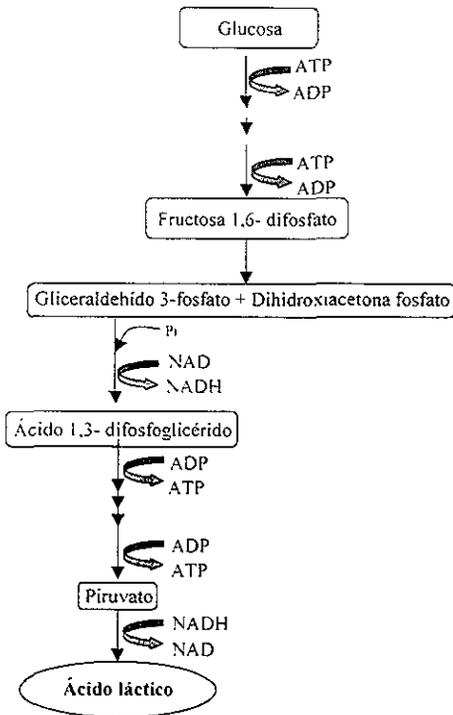
Otros medios sólidos que se han empleado exitosamente para aislar enterococos, son el CNA (agar Columbia-colistina-ácido nalidíxico) y el PEA (agar alcohol feniletílico); el primero corresponde a un medio selectivo y diferencial muy comúnmente utilizado para aislar microorganismos Gram positivos presentes en muestras clínicas, el cual permite detectar reacciones hemolíticas. Por otro lado, el medio PEA es selectivo y también incorpora sangre, a fin de que crezcan bacterias de crecimiento lento, usa como base agar tripticase- soya, con extracto de levadura, vitamina K y cistina. El alcohol feniletílico inhibe la síntesis de DNA -de manera reversible-, por lo que inhibe el crecimiento de las bacterias Gram negativas facultativas tales como las de la familia *Enterobacteriaceae* (4, 80)

1.4. Identificación bioquímica

Los enterococos son anaerobios facultativos, quimioorganótrofos con metabolismo fermentativo, reducen nitratos y poseen la capacidad para utilizar

diversos tipos de carbohidratos, efectuando la fermentación homoláctica, sin producción de gas, tal como lo indica el diagrama 1 (22, 42, 80)

Diagrama 1. Homofermentación láctica a partir de glucosa.



Si bien el único producto de la homofermentación láctica es el ácido láctico, en una heterofermentación los productos finales son ácido láctico, etanol y CO_2 . Esta diferencia está determinada en buena parte por la presencia o ausencia de la enzima "aldolasa" (enzima clave en la glucólisis) (13).

Adicionalmente, los microorganismos heterofermentadores sólo producen una mol de ATP a partir de glucosa, lo cual difiere en la homofermentación, en la que se generan dos moles de dicha molécula energética. Por otra parte, los heterofermentadores producen CO₂, mediante la descarboxilación del 6-fosfogluconato, lo cual es mínimo o no sucede con los homofementadores (13)

Cabe recordar que la ruta bioquímica a través de la cual la glucosa se metaboliza a piruvato es la de "Entner-Doudoroff", la cual es llevada a cabo por *Enterococcus faecalis* y no por muchos otros microorganismos Gram positivos (72).

Debido a sus limitadas capacidades biosintéticas, los enterococos suelen ser exigentes en cuanto a sus requerimientos de vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas. Además, son catalasa negativa, crecen entre los 10 y 45°C (con una temperatura óptima de 37°C) y a amplios rangos de pH, e inclusive, toleran concentraciones elevadas de hasta 7 % de NaCl y/o de 40 % de bilis (42, 80).

En general, se considera que actualmente no existe un criterio fenotípico definido que diferencia de manera confiable entre el género *Enterococcus* y otros microorganismos Gram positivos (22).

La tabla 2 enumera las principales características generales del género *Enterococcus*:

Tabla 2. Características generales del género *Enterococcus*.

Prueba		Prueba	
Resistencia a 40% de bilis	+	D-fructosa	+
β - Glucosidasa	+	Galactosa	+
Ureasa	-	β -Gentobiosa	+
Voges Proskauer	+ ^a	Glucosa	+
Leucinearilamidasa	+	Glucógeno	- ^e
β -Glucuronidasa	- ^b	D-Fucosa	-
Esculinasa	+	L-Fucosa	-
Acido, a partir de:		Lactosa	+ ^f
N-ac-glucosamina	+	Maltosa	+
Amigdalina	+ ^c	D-manosa	+
D-Arabinosa	- ^d	Ribosa	+ ^g
Arbutina	+	Trehalosa	+ ^h
Celobiosa	+	L- xilosa	-

CLAVES: a = negativo sólo en el caso de *E. saccharolyticus*; b = positivo en prácticamente todas las cepas de *E. cecorum*; c = negativo en algunas cepas de *E. columbae*; d = poco detectable en cepas de *E. avium*; e = positivo sólo en algunas cepas de *E. gallinarum*, *E. cecorum* y *E. columbae*; f = las cepas de *E. faecalis* aisladas de infecciones pueden presentar reacción negativa a la lactosa; g = negativo sólo para *E. flavescens*; h = las cepas de *E. faecalis* aisladas de infecciones presentan reacción negativa a la trehalosa.

Por razones prácticas, la identificación presuntiva del género *Enterococcus* suele fundamentarse en la suma de los siguientes resultados (22, 80):

- a) Cocos Gram positivos.
- b) Catalasa negativa.

- c) Capacidad para desarrollar en medios con 6.5 % de NaCl.
- d) Capacidad de crecimiento en medios con azida de sodio al 0.04 %.

Sin embargo, una vez comprobadas las características anteriores en el laboratorio, la actividad experimental debe complementarse realizando las pruebas de acidificación de ribosa y Voges-Proskauer (VP), si bien es conveniente tomar en cuenta que esta última no puede diferenciar a *S. bovis* de los enterococos, ya que dicha especie también presenta reacción positiva.

Los kits comerciales no son muy confiables para llevar a cabo la identificación de los enterococos, excepto cuando se trata de *E. faecalis* (29)

El sistema API Rapid STREP presenta un formato de galería que consta de 20 pruebas, tanto fisiológicas como cromogénicas y de utilización de carbohidratos. Las lecturas pueden efectuarse en dos ocasiones ya que, cuando no es posible establecer la identificación después de una incubación de 4 h, es necesario completar las 18 h, lo cual permite observar la producción de ácido a partir de 10 carbohidratos diferentes. Las evaluaciones correspondientes han demostrado que este sistema aporta una gran confiabilidad a los resultados asociados a los estreptococos del grupo D y que identifica entre el 74 y 92 % de las cepas del grupo *Viridans*; la base de datos del sistema es muy extensa e incluye la detección de estreptococos β -hemolíticos agrupables y, desde luego, la de las principales especies de

Enterococcus (*E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. faecium*, *E. avium* y *E. durans*), así como la de pediococos, aerococos, diversas especies de *Gemella*, *S. bovis* y *Listeria monocytogenes*. Por tal motivo, en la actualidad representa el microsistema más utilizado para identificar cocos Gram positivos (48)

A continuación se mencionan algunos aspectos de actual interés acerca de las principales pruebas utilizadas en la identificación de los enterococos.

LAP (leucina β -naftilamida)

Ésta determina la presencia de la enzima leucina aminopeptidasa y, conjuntamente con la de PYR, es muy útil para identificar estreptococos, enterococos y algunas otras bacterias similares. La forma comercial de esta prueba incluye discos en que se ha absorbido el sustrato y paneles de micropruebas cuyos resultados se obtienen en el término de 4 h o de una noche (API Rapid STREP) (22,48).

Los discos se "siembran" al ponerlos en contacto con una gota de una suspensión densa del microorganismo a probar y, 10 minutos después, se les agrega una gota de reactivo de detección (en caso de que éste no se hubiera encontrado previamente en el papel absorbente). El desarrollo de color rojo sobre el disco durante los siguientes 3 a 4 minutos indicará una

reacción LAP positiva; por el contrario, la coloración amarilla se interpretará negativa y, finalmente, las tonalidades rosas sugerirán positivas débiles (48)

Voges-Proskauer (producción de acetoína)

Esta prueba se basa en la producción de acetoína (acetilmetilcarbinol) a partir de glucosa. Facklam y Washington han descrito una variante de dicha prueba para aplicarla a estreptococos y enterococos consistiendo, concretamente, en inocular la mayor parte del crecimiento microbiano obtenido en placa después de 24 h de incubación, en 2 mL de caldo RMVP (22, 60).

Transcurridas 6 h de incubación a 35°C en el RMVP, se agregan el α -naftol y la potasa al tubo y, finalmente, éste se agita e incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos.

La prueba se considera positiva si el contenido del tubo adquiere una coloración roja o rosa (60).

Esta prueba, utilizada junto con la de producción de ácido a partir de ribosa, es muy útil y confiable, ya que mientras en ambas se observan resultados positivos con cualquier especie de enterococos, ello sólo ocurre con muy pocos estreptococos (por ejemplo, con *S. agalactiae* y *S. porcinus*) (22).

Acidificación de L-arabinosa

Ésta resulta positiva para numerosas especies de enterococos y negativa para los estreptococos, exceptuando a la especie *S. bovis*. Prácticamente todas las pruebas de fermentación de carbohidratos y de utilización de piruvato se realizan empleando como medio base al caldo infusión de corazón con púrpura de bromocresol, al cual se le adicionan el piruvato o el carbohidrato correspondiente, en concentraciones del 1 % y previamente esterilizados por filtración (5,22,37).

Pirrolidonil- β -naftilamida o pirrolidonil arilamidasa (PYR)

La prueba de PYR es presuntiva para identificar a los estreptococos A y D, la enzima que se detecta es la pirrolidonil arilamidasa y la técnica implicada consiste en sembrar el microorganismo en un medio líquido que contenga PYR (L-pirrolidonil- β -naftilamida), que después se incuba a 35°C durante 4 h. En ese lapso se hidroliza el PYR y la β -naftilamida libre se detecta agregando N,N- dimetilaminocinnamaldehído. La hidrólisis del PYR correlaciona con la aparición de un color rojo (22,48,80).

La prueba es muy sensible y específica para los estreptococos grupo A y para la mayoría de las especies de *Enterococcus*, exceptuando a las especies *E. cecorum*, *E. columbae* y *E. saccharolyticus*. Sin embargo, todos las cepas

enterocóccicas poseen la capacidad para hidrolizar a la leucina- β -naftilamida (80)

Cabe señalar que microorganismos tales como los lactococos, estreptococos y algunos estafilococos también son PYR positiva (48)

Capacidad para desarrollar en presencia de NaCl al 6.5%

Esta prueba se realiza para diferenciar entre el género *Enterococcus* y los estreptococos grupo D no enterococos, tales como *S. bovis* y *S. equinus*. No obstante, debe considerarse que, antes de realizarla, el microorganismo en cuestión sea sometido a la prueba de la hidrólisis de la esculina en presencia de bilis, para seleccionar previamente a las colonias esculinasa positiva (48,60,80)

Dichas colonias se resiembran posteriormente en agar BHI + 6.5 % de NaCl y la lectura se efectúa 24 a 48 h más tarde, considerando que la lectura es positiva cuando la cepa manifieste un evidente crecimiento en esta última placa (70)

Otros métodos descritos en la literatura (Fracklam y Washington) consisten en sembrar al microorganismo problema en cualquier medio rico adicionado de NaCl al 6.5 % y suplementado con azul de bromocresol. De esta manera.

previa incubación a 35°C por 72 h, los cambios de coloración indicarán el desarrollo de la bacteria (29)

Reacción de Lancefield

Esta prueba es de índole inmunológico y consiste en hacer reaccionar al carbohidrato "C" de la cepa problema con el suero anti-D de Lancefield. La técnica más utilizada es la de precipitación en capilar, previa introducción del suero correspondiente y del extracto ácido del carbohidrato "C", obtenido mediante la técnica de Lancefield (agregando HCl 0.2N en caliente a un cultivo líquido puro del microorganismo problema) (80).

Finalmente, el mismo capilar es enterrado en una capa de plastilina de aproximadamente 1 cm de espesor (de manera que permanezca en posición vertical) y, después de incubarse 24 h a temperatura ambiente, se realiza la lectura correspondiente, considerando que la prueba es positiva cuando se forma una zona de precipitación dentro del capilar, precisamente en la región en la que convergen suero y carbohidrato "C" (34).

Es oportuno citar que sólo cerca del 80 % de las especies de *Enterococcus* reaccionan con anticuerpos dirigidos contra el antígeno D de Lancefield, ya sea mediante ensayos de precipitación en capilar o de aglutinación en látex.

prueba positiva debido a que produce una pseudocatalasa que provoca una pequeña efervescencia (22,48, 80)

Las pruebas PYR y LAP están disponibles en el mercado en forma de pruebas rápidas como por ejemplo API Rapid STREP. Existe otra prueba comercial denominada Bacti Card Streptococcus que incluye pruebas de PYR, LAP y de hidrólisis de la esculina. Cuando se utiliza esta tarjeta junto con los resultados de la prueba de sensibilidad a la vancomicina, puede proporcionar identificación preliminar de especies de *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (48)

La tabla 3 muestra algunas características relevantes de los principales cocos Gram positivos facultativos (22).

Es importante mencionar que diversas especies de estreptococos también pueden dar reacción positiva a las pruebas anteriores. Por ejemplo: *S. bovis*, *S. suis* y *S. alactolyticus* dan reacción positiva con el suero anti-antígeno D. Adicionalmente, existen otros microorganismos tales como los pediocococos y algunas cepas de *Leuconostoc* que también presentan el antígeno D (80).

Tabla 3. Características asociadas a los principales cocos Gram positivos.

Característica	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Gemella</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>
Agrupación	pares y tetradas	cadena y pares	cadena cortas y pares	cadena cortas y pares	cadena pares	tetradas pares
Movilidad	-	d	-	-	-	-
Crecimiento a:						
10°C	+	+	-	+	+	ND
45°C	-	+	-	-	-	D
pH=9.6	+	+	ND	-	ND	D
Crecimiento con:						
6.5 % de NaCl	+	+	ND	-	d	D
40 % de bilis	+	+	ND	D	ND	D
Catalasa	- ^b	- ^c	-	-	-	-
Citocromos	-	ND	-	ND	-	-
Producto más común de fermentación	ND (ácido)	Lactato	Lactato	Lactato	Lactato, etanol	Lactato
Peptidoglicanos:						
Posición 1	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
Posición 2	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys
Mol % de G+C	35-40	34-42	30-35	38-40	38-44	34-42

- a. Símbolos: + = 90% o más de las cepas positivas; - = 90% o más de las cepas negativas; d = 11-89% de las cepas positivas; D = difiere la proporción de las especies; ND = no determinado.
- b. A veces se presenta una actividad de la catalasa débil (reacción de una pseudocatalasa).
- c. Puede producir una pseudocatalasa.

Por otro lado, el crecimiento en medios con 6.5 % de NaCl es compatible con los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* y *Leuconostoc*. Los pediococos y algunos lactococos son capaces de crecer a 45°C; mientras que *Leuconostoc* y la mayoría de los lactococos suelen desarrollar a 10°C, tal como también lo hacen los estreptococos (48).

La tabla 4 señala algunas pruebas de utilidad para diferenciar a los enterococos de otros cocos Gram positivos catalasa negativa (80).

Tabla 4. Algunas pruebas útiles para diferenciar a los enterococos de otros cocos Gram positivos catalasa negativa.

Género	Van	Gas	PYR	LAP	BE	NaCl	10°C	45°C	Mov	Hem
<i>Enterococcus</i>	S ^b	-	+	+	+	+	+	+	v	α/β/n
<i>Lactococcus</i>	S	-	+	+	+	v	+	V	-	α/n
<i>Vagococcus</i>	S	-	+	+	+	+	+	V	+	α/n
<i>Streptococcus</i>	S	-	- ^c	+	- ^d	- ^e	-	V	-	α/β/n
<i>Leuconostoc</i>	R	+	-	-	v	v	+	V	-	α/n

a. Abreviaturas y símbolos utilizados: Van (susceptibilidad a la vancomicina 30 µg); Gas (gas producido a partir de glucosa en medio MRS (Mann, Rogosa, Sharpe *Lactobacillus*); PYR (producción de pirrolidónil arilamidas); LAP (producción de leucina-β-naftilamida; BE (reacción con medio esculina-bilis); NaCl (crecimiento en medio con contenido de 6.5% de NaCl; Mov (movilidad); Hem (hemólisis positiva en agar sangre con contenido de 5% de sangre de borrego); α (hemólisis tipo alfa); β (hemólisis tipo beta); n (hemólisis negativa); S (susceptible); R (resistente); - (menor o igual a 5% de reacción positiva); + (mayor o igual a 95% de reacción positiva); v (reacción variable).

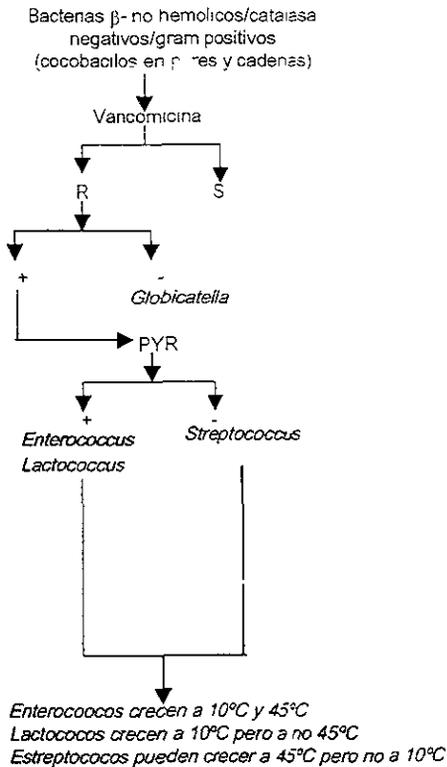
b. Algunas cepas son vancomicina resistentes; pero muestran una ligera zona de inhibición alrededor del disco; existen otras cepas vancomicina resistentes que crecen justo al lado del disco.

c. *Streptococcus pyogenes* y *S. porcinus* son PYR positivas; todas las demás especies son PYR negativas.

d. De los *S. Viridans*, el 5-10% dan reacción positiva en medio bilis-esculina.

e. Algunos estreptococos β-hemolíticos crecen en 6.5% de NaCl.

El siguiente diagrama muestra una guía para la identificación de bacterias catalasa negativas con ausencia de β -hemólisis (48):



Una vez que se establece que la bacteria en estudio es un coco Gram positivo, catalasa negativa que podría pertenecer a los enterococos o a algún otro género relacionado (*Lactococcus* o *Vagococcus*), la tabla 5 resultaría de particular utilidad (22, 80).

Tabla 5.

Característica	<i>avium</i>	<i>casseliflavus</i>	<i>cecorum</i>	<i>durans</i>	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i>	<i>gallinarum</i>	<i>hirae</i>
Movilidad	-	+	-	-	(-)	(-)	+	-
Antígeno D	D	?	+	?	+	D+	+	?
Crecimiento:								
A 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+
A 50°C	-	-	ND	-	(-)	(+)	-	-
En 6.5% NaCl	+	+	-	+	+	+	+	+
En 0.4% telurito	-	+	ND	-	+	-	(+)	-
Pigmento amarillo	-	+	-	-	-	-	-	ND
Hemólisis	α	ND	α	α, β	(β)	(α)	α, β	-
Prod. H ₂ S	+	-	ND	-	ND	ND	-	ND
NH ₄ de arginina	ND	ND	-	ND	ND	+	+	ND
α -Galactosidasa	D	?	?	?	-	D	+	?
PYR	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	+	+	ND	ND	ND	ND	+

CLAVES: + = 90% o más de las cepas positivas; (+) = 80-89% cepas positivas; d = 21-79% cepas positivas; (-) = 11-20% cepas positivas; - = 90% o más de las cepas negativas; α = usualmente α -hemolíticos, β = usualmente β -hemolíticos, (β) = a veces β -hemolíticos, α, β = α o β -hemolíticos, ND = no determinado, D = variable, D+ = usualmente positivo; D- = usualmente negativo; PYR = (pirrolidonil arilamidasa).

La desaminación de arginina se determina en caldo descarboxilasa de Moeller. La identificación de los enterococos a nivel de especie puede ser de utilidad y a veces crucial para el tratamiento adecuado de los pacientes y también para fines epidemiológicos.

Especies	Man	Sor	Arg	Ara	Sbl	Raf	Tel	Mot	Pig	Sac	Pyu	Mgp	Efro
Grupo I													
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	R
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	R
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	R
Grupo II													
<i>E. faecalis</i>	+*	-	+/-	-	+	-	+	-	-	+*	+	- ^a	R
<i>Lactococcus spp</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	S
<i>E. faecium</i>	+*	-	+	+	v	v	-	-	-	+*	-	-	S
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+*	+	v	+	-*	+*	+*	+	v	+	R
<i>E. gallinarum</i>	+*	-	+*	+	-	+	-	+*	-	+	-	+	R
Grupo III													
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	v	-	-	-	+	-	-	S
Grupo IV													
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	R
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	R
Grupo V													
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	R
<i>V. fluvialis</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	R

CLAVES: Man = manitol; Sor = sorbosa; Arg = arginina; Ara = arabinosa; Sbl = sorbitol; Raf = rafinosa; Tel = 0.04% telurito; Mov = movilidad; Pig = pigmento; Sac = sacarosa; Pyu = piruvato; Mgp = metil- α -glucopiranosido; Efro = efrotomicina (100 μ g); + = >90%; - = <10% positivo; v = variable; +* o -*, excepciones ocasionales (<3%); R, resistente; S, sensible; a = Algunas cepas dan reacción positiva después de 2 semanas de incubación.

Grupo I: Producen ácido a partir de manitol y sorbosa, pero no hidrolizan arginina. **Grupo II:** producen ácido a partir de manitol, pero no de sorbosa; hidrolizan arginina y sólo *E. faecalis* tolera el telurito y utiliza el piruvato. *E. casseliflavus* produce pigmentación amarilla. **Grupo III:** hidrolizan arginina, pero no producen ácido a partir de manitol, sorbosa o sorbitol. Fácilmente identificables por las reacciones con piruvato, arabinosa, rafinosa y sacarosa. **Grupo IV:** no producen ácido a partir de manitol y sorbosa ni hidrolizan la arginina. **Grupo V:** Incluye al género *Vagococcus*. Las especies incluidas pueden ser diferenciadas mediante las pruebas de arabinosa, rafinosa, piruvato, Mgp y movilida

1.5. Tipificación

Recientemente, el actual interés epidemiológico de los enterococos en el ambiente intrahospitalario ha conducido al diseño de diversas pruebas tendientes a llevar a cabo la tipificación de los aislamientos involucrados (8).

Las primeras técnicas consistieron en la descripción de los plásmidos contenidos y en el análisis del DNA cromosómico, mediante el uso de enzimas de restricción y la secuencial electroforesis; sin embargo, dichas metodologías han presentado problemas en cuanto a la interpretación de los resultados (24,80)

Otros procedimientos que se emplean con cierta frecuencia son el de separar electroforéticamente a las proteínas enterocócicas y el de reconocer las proteínas ribosomales de *E. faecalis* y *E. faecium* (1,48,80).

Los métodos más útiles en la tipificación de los enterococos incluyen el análisis del DNA cromosómico (con enzimas de restricción) y la técnica de PFGE (pulsed- field gel electrophoresis), así como el de PCR y RAPD-PCR (DNA polimórfico modificado al azar). La efectividad de ambas tecnologías es elevada, por lo que se consideran las más destacadas para analizar los brotes asociados a los VRE (23,58,80).

1.6. Detección de resistencia a los antibióticos

Las infecciones enterocócicas sistémicas tales como la endocarditis son comúnmente tratadas mediante la combinación de dos agentes antimicrobianos, uno de los cuales actúa a nivel de la pared celular (como los β -lactámicos o algún glucopéptido tipo la vancomicina) y un aminoglicósido (usualmente gentamicina o estreptomina). En general, esta clase de combinaciones actúa de manera sinérgica, incrementando ostensiblemente la acción antibacteriana total; sin embargo, cuando la cepa es resistente al agente que actúa a nivel de la pared celular o al aminoglicósido, no se genera el efecto sinérgico y, por lo tanto, la terapia fracasa (31).

De acuerdo con lo anterior, es importante detectar la posible resistencia a los antibióticos, para que el régimen terapéutico resulte efectivo.

Resistencia a aminoglucósidos. En virtud de que los aminoglucósidos muestran una escasa actividad contra los enterococos (su MIC fluctúa entre 8 y 256 $\mu\text{g/mL}$), ningún antimicrobiano de este grupo debe utilizarse como fármaco único. En los enterococos, la resistencia a los aminoglicósidos es adquirida, ya sea como resultado de mutaciones que provocan una disminución en la unión del agente antimicrobiano al ribosoma, o más

comúnmente, debido a la adquisición de nuevos genes que codifican para enzimas que modifican al fármaco (17,31)

La resistencia adquirida usualmente se asocia a MICs que se encuentran significativamente por arriba de los encontrados en pruebas rutinarias de susceptibilidad ($\geq 2000 \mu\text{g/mL}$) (40).

La gentamicina y la estreptomina son los únicos antibióticos que deben ser analizados de rutina, ya que todas las cepas de enterococos que son resistentes a la gentamicina, también lo son a otros aminoglicósidos, exceptuando a la estreptomina. Por lo tanto, la resistencia a esta última debe evaluarse de manera independiente (17, 53, 80, 83).

Los aislamientos clínicos de *E. faecium* muestran una resistencia intrínseca a la acción sinérgica de un aminoglucósido (amikacina, kanamicina, tobramicina o netilmicina) con algún agente activo anti-pared celular. Por su parte cepas de *E. faecalis* susceptibles a gentamicina suelen ser resistentes a kanamicina y amikacina (17).

A continuación se describen algunos métodos utilizados para la detección de niveles de resistencia elevados a aminoglucósidos:

a) **Monitoreo por dilución.** Las placas de agar BHI suplementadas con 500 μg de gentamicina por mL o 2000 μg de estreptomina por mL son inoculados

mediante goteo con 10 μL de la suspensión microbiana, de manera que el inóculo final sea de 10^6 CFU/gota. Los medios se incuban durante 24 h en aerobiosis y se procede a tomar la lectura: la presencia de más de una colonia, o un ligero crecimiento en película, son indicativos de resistencia. En el caso de las placas con estreptomina carentes de crecimiento, es conveniente reincubar durante un día más. La base agar Mueller-Hinton (MHA) puede sustituirse por agar BHI para preparar la gelosa sangre de carnero (46,48,80).

Las pruebas de resistencia a kanamicina aún no se han estandarizado, aunque se acostumbra emplear placas de agar BHI con 2000 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina (52).

b) **Monitoreo por microdilución.** Los medios líquidos implicados se preparan con 500 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina o 1000 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina y se siembran con un inóculo final de 5×10^5 CFU/mL, antes de proceder a incubar durante 24 h en ambiente aeróbico. Cualquier nivel de crecimiento debe interpretarse como resistencia y, como ya se mencionó, los tubos con estreptomina se reincuban cuando no se percibe desarrollo después de las primeras 24 h.

La concentración de estreptomina utilizada es de 1000 $\mu\text{g/mL}$, es decir, la mitad de la que se utiliza en agar, ya que el número total de células bacterianas empleadas en el monitoreo por dilución en agar (10^6 CFU/gota) es

20 veces mayor que la asociada al monitoreo por microdilución (5×10^4 CFU/0.1 mL -por pozo-) (46,80)

c) **Monitoreo por difusión en disco.** Las zonas de inhibición se determinan después de incubar 18-24 h en condiciones aerobias a 35°C: las mayores de 10 mm corresponden a cepas susceptibles en tanto que, las de 7 a 9 mm, usualmente se relacionan con resistencia, si bien es recomendable que las cepas involucradas sean evaluadas nuevamente, ya sea por el método de dilución en agar o por el de microdilución (48).

Las bacterias control que se sugieren -tanto para gentamicina como para estreptomycin-, son: *E. faecalis* ATCC 29212, como control susceptible, así como *E. faecalis* ATCC 51299, como control de resistencia (80).

Resistencia a penicilina y ampicilina

Comparados con los estreptococos, con los cuales se obtienen concentraciones mínimas inhibitorias de 0.12 $\mu\text{g/mL}$, los enterococos son resistentes a los antibióticos β -lactámicos, si bien *E. faecium* suele ser más resistente a penicilina que *E. faecalis*. las MICs para esta última son de 2 a 4 $\mu\text{g/mL}$. en cambio, los MICs para ampicilina son generalmente una dilución más baja que la estreptomycin. Esta resistencia relativa de la penicilina y ampicilina se debe a las diferencias entre las proteínas de unión a la

penicilina. Adicionalmente, la resistencia a agentes β -lactámicos puede ser mediado por la producción de β -lactamasas. Sin embargo, esto último sólo se ha observado en *E. faecalis* (53, 80).

Se pueden utilizar los resultados de susceptibilidad a la penicilina para predecir la susceptibilidad a ampicilina, amoxicilina, piperacilina y combinaciones de inhibidores de las β -lactamasas (53).

Recientemente se recomendó que en ausencia de resistencia a aminoglucósidos, las cepas de *E. faecium* para las cuales los MICs de penicilina son de $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ deben ser considerados potencialmente susceptibles al sinergismo con los aminoglucósidos. Se requieren de estudios adicionales para conocer los niveles de resistencia de la penicilina y ampicilina que se correlacionan con la ausencia de sinergismo (80).

Hay que tener cuidado ya que usualmente las pruebas para determinar el MIC para ampicilina son generalmente una dilución menor que en el caso de la penicilina; por lo tanto, es posible encontrar cepas que aparentemente son susceptibles a la ampicilina pero resistentes a la penicilina (28).

A continuación se describe algunos métodos para la detección de resistencia a la vancomicina: Los tres fenotipos más comunes de resistencia en los enterococos incluyen: (3, 26, 53, 54)

- a) Resistencia elevada a la vancomicina (MICs, ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$), acompañado por resistencia a la teicoplanina ($\geq 16\mu\text{g/mL}$) **Fenotipo Van A.**
- b) Baja resistencia a niveles elevados de vancomicina (MICs, 4 mg/L a 1000 mg/L), comúnmente sin resistencia a teicoplanina **Fenotipo Van B.**
- c) Resistencia intrínseca baja asociada con *E gallinarum*, *E casseliflavus* y *E flavescens* (MICs 4-32 mg/L) **Fenotipo Van C**

Los fenotipos Van A y Van B son comúnmente encontrados en *E. faecalis* y *E faecium* y no se han encontrado en otras especies. De acuerdo al Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (E.U.A) los puntos de corte en la resistencia a la vancomicina son. ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$ (susceptible), 8-16 $\mu\text{g/mL}$ (intermedio), ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ (resistentes) (80).

Los sistemas de detección Vitek y MicroScan son comúnmente aceptados para la detección de la resistencia de los enterococos a la vancomicina (10,46).

Finalmente, en cualquier infección debida a enterococos, los resultados del monitoreo para niveles elevados de resistencia de gentamicina y

realizadas con el agente activo de la pared celular; ya que el sinergismo no se espera si a ninguno de los agentes reportados es resistente (54, 80)

II. IMPORTANCIA CLÍNICA

2.1. Resistencia a antibióticos

Los enterococos son resistentes a una gran cantidad de antibióticos, tales como los aminoglicósidos, β -lactámicos y quinolonas. Por ejemplo, la resistencia a los aminoglicósidos se basa en su capacidad para bloquear el ingreso de dichos fármacos a nivel de la pared celular, motivo por el cual éstos deben utilizarse de forma combinada, junto con otros antimicrobianos que activan a esa cubierta bacteriana. Sin embargo, actualmente esta clase de terapéutica tiende a desaparecer, debido a que la resistencia a los aminoglucósidos se ha venido incrementando notablemente (17,28,40).

Los enterococos presentan resistencia intrínseca a antibióticos tales como la penicilina y, paralelamente, una resistencia adquirida a eritromicina, tetraciclina y vancomicina, entre algunos otros. En algunas regiones del orbe, más del 60 % de las infecciones por enterococos no responden a la administración de los antibióticos: en E.U.A., por lo menos el 90 % de las cepas clínicas de *E. faecalis* son resistentes a vancomicina, lo que resulta particularmente desafortunado, habida cuenta de que, en Europa y Norteamérica, las enfermedades asociadas a este agente causal han

registrado cada vez mayores tasas de mortalidad entre los pacientes hospitalizados (28).

Por otra parte, numerosos reportes de 1999 continúan revelando que *E. faecalis* predomina en las infecciones clínicas, si bien las cepas de *E. faecium* han incrementado su proporción respecto a aquélla en los hemocultivos positivos, la relación *E. faecalis*/*E. faecium* ha disminuído abruptamente, de 3.7/1 en 1996 a 1.9/1 en 1999; además, de las 1,263 cepas de *E. faecium* analizadas recientemente, el 31 % resultó resistente a ampicilina, estreptomicina, gentamicina y vancomicina, aunque llama aún más la atención el hecho de que dicha cifra asciende hasta 60-80 % hacia este último antibiótico y dichas cifras continúan incrementándose diariamente (28).

Cabe señalar que, en ambas especies bacterianas, los genes responsables de la resistencia a la mayor parte de los antimicrobianos se encuentran codificados en plásmidos o transposones y que los fenotipos más comunes son Van A (resistentes a vancomicina y teicoplanina), el cual representa el 60 % de los enterococos vancomicina resistentes (VRE) en E.U.A., seguido por el Van B (sólo resistente a vancomicina), cuyo porcentaje es de 40 % (26).

Rice y cols determinaron el mapa de restricción de la región Van B del genoma bacteriano y la secuencia de aminoácidos del transposón enterocócico Tn5382, lo que permitió establecer que este último también se

localiza en cepas detectadas en Hawai, Francia, Gran Bretaña y Escandinavia; es importante mencionar que la transferencia de dicho transposón suele implicar –simultáneamente- la adquisición de diversos factores de virulencia (40, 80).

Couvarlin y cols aislaron en el Instituto Pasteur cinco genes responsables de la resistencia a vancomicina, tres de los cuales también se asocian a la resistencia a otros glucopéptidos. Normalmente, la vancomicina se une a la terminación D-alanina-D-alanina de los peptidoglicanos situados en la pared celular, antes de ingresar al citoplasma bacteriano; en contraparte, los genes enterocócicos de resistencia, codifican para la síntesis de varias enzimas que interfieren en la producción de D-alanina-D-alanina, lo que se traduce en la inexistencia de receptores eficaces para el antibiótico (53,54).

En Gran Bretaña, Roper y cols analizaron una cepa de *E. faecium* que contenía la secuencia Van A y lograron determinar por Rayos X la estructura cristalina de la ligasa responsable de la biosíntesis alternativa de D-alanina-D-lactato, molécula que sustituye a las de D-alanina-D-alanina para conferir resistencia a la vancomicina (28).

Chris Walsh, de la Escuela de Medicina de Harvard, Boston, purificó cinco productos de genes enterocócicos responsables de la resistencia a vancomicina, e independientemente de que caracterizó sus respectivas

funciones -utilizando cepas mutantes-, también encontró que los fenotipos Van A y Van B presentan D-alanina-D-lactato en su pared celular (53,77).

De acuerdo con el TIGR (The Institute for Genomic Research), el 19 % del genoma de *E. faecalis* V583 codifica para proteínas de traslado y ensamble, lo que indica que el microorganismo produce una gran cantidad de transportadores cuya composición incluye moléculas de carbohidratos. Linda Banerjee, investigadora de dicha institución, identificó tres plásmidos en el genoma bacteriano, encontrando que dos de ellos poseen genes que codifican para un factor de virulencia denominado "sustancia de agregación" (AS) y que numerosas secuencias génicas presentan similitud con las implicadas en la expresión de las adhesinas y otros factores de virulencia del género, incluyendo algunos involucrados en la resistencia a antibióticos cuya síntesis depende de diversos elementos móviles (67,76).

Sin lugar a dudas, independientemente de los factores de virulencia de los enterococos, es indispensable establecer nuevas medidas para evitar y combatir la resistencia bacteriana a los antibióticos.

Una estrategia lógica consiste en el desarrollo de nuevos antibióticos aunque, obviamente, este proceso es lento y costoso y, desde luego, es claro que los próximos antimicrobianos no serán exitosos contra todos los agentes patógenos. Por lo tanto, se requiere de una coordinación multidisciplinaria

entre los médicos que prescriben medicamentos y los infectólogos; es decir, los grupos de trabajo deben involucrar a farmacéuticos, microbiólogos y especialistas en infectología, que monitoreen y controlen el uso de antibióticos, que documenten los casos de resistencia que aparezcan en el hospital y que enfatizen las medidas de control tendientes a evitar la diseminación de las cepas patógenas entre el personal y los pacientes del nosocomio (59).

Resistencia a β -lactámicos y aminoglucósidos

La resistencia adquirida a los antibióticos β -lactámicos se debe principalmente a la producción de β -lactamasas o a la modificación de las proteínas que reciben a las penicilinas (PBP). Cabe señalar que la resistencia ligada a las β -lactamasas se transfiere generalmente a través de plásmidos y frecuentemente se relaciona con la resistencia a la gentamicina (63).

Las β -lactamasas son penicilinasas homólogas a las codificadas por el gen *blaZ* de *S. aureus*. Sin embargo, a diferencia de ello, la penicilinasas de *E. faecalis* se produce de manera constitutiva, debido probablemente a la ausencia de una proteína represora (54)

Los enterococos adquieren resistencia a los aminoglucósidos a través de tres mecanismos diferentes: la alteración del sitio de unión en el ribosoma, la

interferencia con el transporte del antibiótico y la destoxicación enzimática del fármaco. Los primeros dos mecanismos suelen asociarse a mutaciones cromosómicas, en tanto que el tercero está mediado por plásmidos (14,17,24).

Cabe señalar que todas las cepas de *E. faecium* producen 6'-acetiltransferasa, codificada por el gen cromosómico *aac(6')-1_I*, que modifica a la mayoría de los aminoglicósidos disponibles comercialmente. Es decir, dicha enzima neutraliza la actividad bactericida de la penicilina y de los glicopéptidos administrados junto a algún aminoglicósido, excepto cuando este último no funge como sustrato (por ejemplo, cuando se trata de estreptomicina o gentamicina) (18,28).

Resistencia a glucopéptidos

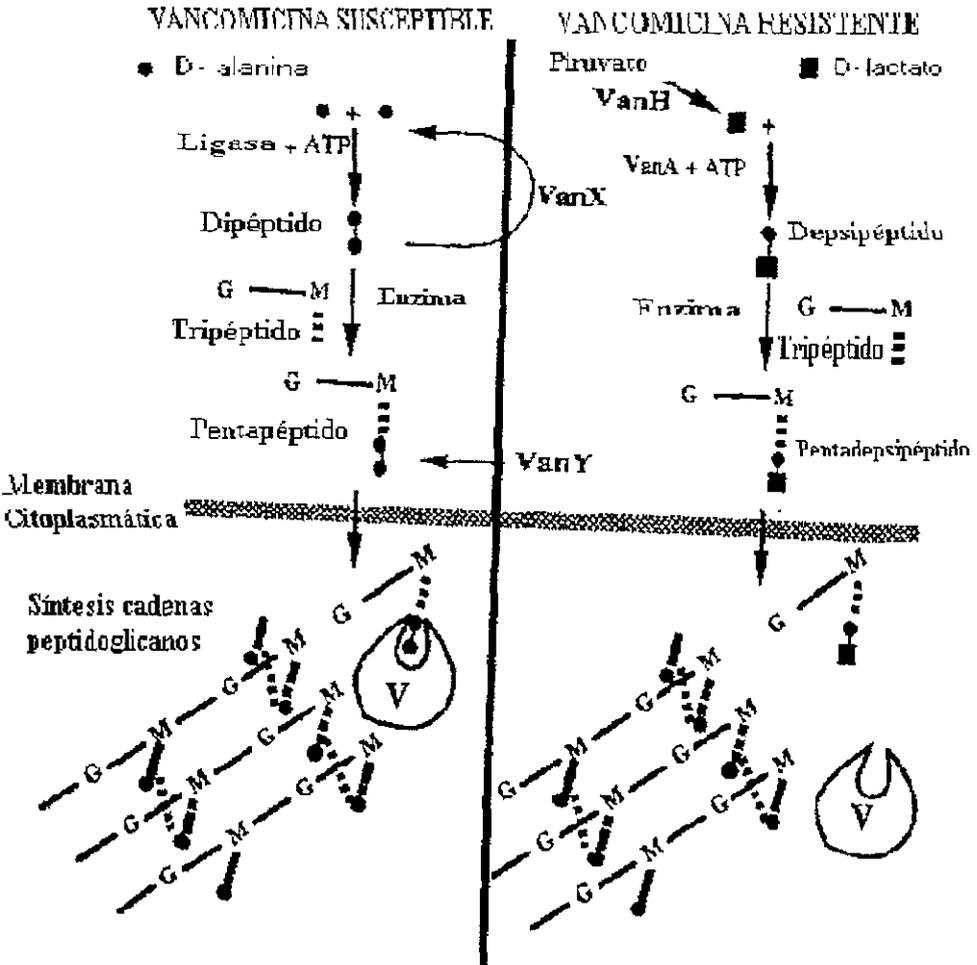
Los glucopéptidos son inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana y corresponden a grandes moléculas que forman complejos uniéndose -en la superficie celular- a la terminación peptidil-D-alanil-D-alanina de los precursores del peptidoglicano. De esta manera, se impide la síntesis de la pared celular vía el bloqueo de la transferencia de precursores citoplásmicos encargados de inducir el crecimiento de la cadena de peptidoglicanos (3, 53, 54).

En tal contexto, las proteínas VanA y VanH son ligasas, la primera de ellas con una amplia especificidad por el sustrato y, la segunda, que también actúa como deshidrogenasa, y actúan de manera conjunta para sintetizar el depsipéptido D-alanil-D-lactato, que reemplaza a la terminación D-alanil-D-alanina de los precursores del peptidoglicano. Esto último es de particular trascendencia, ya que dichos precursores modificados se pueden incorporar a la pared celular mediante la participación de enzimas codificadas por el cromosoma bacteriano –lo que contribuye a la continuación de la síntesis de la pared celular-, pero se traduce en una disminución radical en cuanto a la afinidad de la superficie microbiana por la vancomicina, lo que transforma a las cepas implicadas en clonas resistentes, ya que el antibiótico no impide la síntesis de pared celular (53).

Sin embargo, además de VanH y VanA, el proceso también requiere la participación de VanX, D,D dipeptidasa que hidroliza al dipéptido D-alanil-D-alanina, que compite con el D-alanina-D-lactato (53).

Los genes de resistencia *vanA*, *vanH* y *vanX* están regulados a nivel transcripcional por VanR y VanS, que se encuentran codificadas por genes posteriores a *vanH* y, al parecer, ambas están involucradas en la transmisión de señales que se generan como respuesta a la presencia de vancomicina en la superficie bacteriana (31,54).

El mecanismo a través del cual los enterococos resisten la acción de los glucopéptidos se muestra en la figura 1.



2.2. Patogenia

Para que ocurra la infección por enterococos, es necesario que el microorganismo colonice las mucosas del hospedero; una vez que ello se ha concretado, puede invadir la circulación sanguínea y, finalmente, produce diversas alteraciones patológicas de manera directa y/o indirecta, induciendo una severa respuesta inflamatoria (28, 31, 40, 80).

2.2.1. Colonización y translocación

Los enterococos colonizan el tracto gastrointestinal, merced a un equilibrio que les permite no ser eliminados por la movilidad del intestino, en tal sentido, se les detecta fácilmente en las heces fecales de los seres humanos, en concentraciones que fluctúan entre 10^5 y 10^7 UFC/g (40).

Por otro lado, la persistente colonización también se fundamenta en la resistencia del microorganismo a pHs ácidos, tales como los estomacales y glomerulares: la exposición de *E. faecalis* a un pH de 4.8 durante 15 a 30 minutos promueve su posterior adaptación a condiciones que alcanzan cifras de 3.2, lo cual resulta imposible de lograr para las mutantes deficientes o carentes de actividad ATPasa (bomba de protones) que no sobreviven a pH menores de 6 (40,55,59).

Los enterococos poseen capacidad para adherirse a la superficie de las células epiteliales del ileon y colón, pudiendo translocarse –bajo condiciones patológicas- desde el lumen del intestino delgado hasta los nódulos linfáticos, el hígado y el bazo (31,38)

En un paciente, la invasión de los enterococos puede originarse en la terapia antimicrobiana, la cual favorece la selección y propagación intestinales de las cepas resistentes y, consecuentemente, su translocación hacia el torrente circulatorio para dar lugar a graves septicemias. En tal contexto, es probable que los enterococos sean fagocitados por macrófagos o por las células epiteliales del intestino y atraviesen la pared intestinal, alcanzando las vías linfáticas (35,71)

En otro orden de ideas, Olmsted estudió la función que desempeña la AS, localizada precisamente sobre la superficie del microorganismo, observando que dicha proteína induce la internalización enterocócica en las células HT-29. Sin embargo, también encontró variaciones cuantitativas del proceso invasivo en las diferentes cepas examinadas, lo que sugiere la coparticipación de otros factores adicionales (27,31,38,40)

La gran mayoría de las cepas de *E. faecalis* produce ion superóxido (O_2^-), en mucha mayor concentración que la alcanzada por *E. faecium*. No obstante, aún se desconoce el papel que éste desempeña en la patogenicidad de los

enterococos, aunque se cree que confiere al microorganismo una mayor capacidad para sobrevivir a la fagocitosis y desplazarse a través de las células epiteliales del intestino, ocasionando su destrucción (38,41,55).

La simultánea colonización intestinal por enterococos multirresistentes y enterococos comunes propone una inexistente competencia entre ellos por el mismo nicho dentro del hospedero: los primeros presentan proteínas superficiales adicionales que les permiten establecerse en regiones diferentes, amén de algunas otras sustancias que capacitan a las clonas más virulentas para utilizar sustratos nutricionales alternativos, tales como la propia mucina del epitelio intestinal (31,40).

A partir del intestino, los enterococos pueden ingresar al torrente circulatorio, a través de abscesos o previa infección urinaria; sin embargo, el fenotipo hemolítico y resistente a gentamicina quintuplica las tasas de mortalidad relacionadas con otras cepas. Lógicamente, los individuos en mayor riesgo de fallecer por septicemia enterocócica incluye a los de edades menores y avanzadas, así como a los sometidos a tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro, tales como las cefalosporinas; no obstante, las cepas hemolíticas representan un importante factor de peligrosidad, como lo demuestra el hecho de que su DL_{50} para el ratón disminuye hasta en un 50 % (39,40,80).

Guzmán y cols analizaron la capacidad de diversas cepas de *E. faecalis* para adherirse a las células epiteliales del tracto urinario y a la línea celular cardíaca de Girardi; las cepas empleadas fueron aisladas tanto de pacientes con enfermedades urinarias como de individuos con endocarditis, cuya adherencia depende no sólo de moléculas proteicas sino, además, de un carbohidrato superficial (28,55).

Por otra parte, los enterococos representan el tercer agente causal más importante de endocarditis, ya que ocasionan aproximadamente el 5 a 20 % de los casos que involucran válvulas cardíacas naturales y el 6 a 7 % de los que incluyen dispositivos valvulares prostéticos; cabe mencionar que las cepas cultivadas previamente en suero incrementan su capacidad de unión a las células cardíacas Girardi y que dicha interacción es bloqueada si el microorganismo se expone con anterioridad a la acción del peryodato o cuando las células "blanco" se incuban en presencia de residuos específicos de azúcares que contienen D-galactosa y L-fructosa -inhibición competitiva-. Esto último confirma la posibilidad de que algún carbohidrato enterocócico participe de manera determinante en la adherencia enterocócica a las células cardíacas (61).

Por otra parte, se ha comprobado que la citolisina y la AS se encuentran codificadas por el plásmido pAD1 y que las clonas carentes de este último también pueden provocar endocarditis *in vivo*, lo que sugiere que ciertos

elementos genéticos y, por ende, sus respectivos productos, sólo incrementan la virulencia del microorganismo pero no necesariamente resultan indispensables en el proceso infeccioso (39).

Finalmente, después de una cirugía ocular, las posibles complicaciones incluyen una eventual participación de los enterococos; éstos suelen dar lugar a procesos muy severos y su adhesión a la superficie membranosa del vítreo es independiente de la síntesis de AS, lo que reitera que la adherencia de *E. faecalis* a los tejidos humanos involucra a varias adhesinas conformadas por carbohidratos y/o moléculas proteicas (11)

2.2.2. Respuesta inmune

Las infecciones enterocócicas ocurren, entre otras razones, debido a que el microorganismo resiste la acción de los mecanismos de defensa del hospedero, a través de cápsulas de polisacáridos, proteínas de superficie y toxinas, la mayoría de las cuales le confiere una eficaz actividad antifagocitaria. De acuerdo con Harvey, la importante participación de los neutrófilos depende del complemento y está muy escasamente relacionada con los anticuerpos (2,59).

Arduino analizó una cepa de *E faecium* resistente a la fagocitosis, encontrando que la naturaleza del material microbiano implicado era estable a

la acción de las proteasas, pero muy susceptible al peryodato, por lo que infirió que se trataba de carbohidratos (73,74).

Un estudio que comparó la eficacia de los neutrófilos contra los enterococos en distintos tipos de sueros, reveló que, a concentraciones de 0.5 %, el suero normal humano poseía suficientes anticuerpos anti-enterococos para reducir en casi 90 % el inóculo bacteriano original, cifras similares se obtuvieron con suero hipogamaglobulinémico al 5 % y, por ende, los sueros previamente adsorbidos con una cepa homóloga ejercían una escasa o nula actividad bactericida. Dichos resultados indican que los anticuerpos séricos promueven la opsonización y, por lo tanto, la erradicación de la bacteria (2,85).

2.2.3. Patología del daño tisular

Una vez que el microorganismo logra reproducirse en los tejidos, la última etapa de la patogénesis consiste en la inducción de alteraciones patológicas, generadas a través de la respuesta inflamatoria y/o mediante lesiones tisulares atribuibles directamente a exotoxinas y proteasas (40,80).

a) Daño tisular indirecto

Los ácidos lipoteicoicos, antígenos del supuesto grupo estreptocócico D, suelen modular la respuesta inmune del hospedero, independientemente de

que participan en el proceso de adherencia, así como en el recambio y la rápida propagación de material genético (40).

Mientras los conejos inoculados -vía intravenosa- con cepas enterocóccicas deficientes en AS y EBS (por *Enterococcus binding substance*), a razón de 10^8 UFC/mL, no desarrollan signo patológico alguno, los que reciben proporciones equivalentes de clones EBS^+AS^- o EBS^-AS^+ si desarrollan inflamación pericárdica; lógicamente, los inoculados con enterococos EBS^+AS^+ mueren, aunque evidencian una inflamación ligera característica de la participación de superantígenos (24,40,80).

b) Daño tisular directo

La citolisina y la gelatinasa (metaloproteasa de zinc) parecen llevar a cabo relevantes funciones patogénicas: la primera provoca la ruptura de las membranas pertenecientes a otras bacterias, así como las de los glóbulos rojos y las células de mamíferos; es decir, actúa como bacteriocina y exotoxina, e inclusive, es probable que se encuentre involucrada en la primera etapa asintomática de la infección intestinal, la cual se caracteriza por colonización y diseminación enterocóccicas, así como por toxemia y daño tisular. Si bien las citolisinas de los enterococos se constituyen por tres subunidades, sólo una funge como activador enzimático y representa uno de

los "blancos" contra los cuales se pretende desarrollar inhibidores terapéuticos (25,36).

Los modelos experimentales murinos han permitido demostrar que las clonas productoras de citolisina ocasionan septicemias persistentes. a diferencia de las que no producen dicha molécula; además, la citotoxina provoca reducción de la función retinal de los conejos y/o la propia destrucción de la retina en sólo 24 h. Sin embargo, la incuestionable existencia de otros factores enterocócicos de patogenicidad y el hecho de que sólo cerca de la mitad de las cepas clínicas sintetiza citolisina, representan elementos suficientes para confirmar que ésta no es indispensable en la patogenia asociada a *E. faecalis* (11,40,80).

Dupont y cols demostraron que la elaboración de gelatinasa por parte de numerosas cepas de enterococos disminuye la DL₅₀, si bien los estudios implicados presentan ciertas limitaciones, debido a que las clonas Gel^r utilizadas en el comparativo fueron generadas mediante mutagénesis. El gen *gelE* codifica para dicha proteasa, la cual degrada a la gelatina, caseína, hemoglobina y ciertos péptidos, incluidas las feromonas de *E faecalis*; al parecer, estas últimas moléculas corresponden a sustancias bioactivas que poseen actividad quimiotáctica, en tal sentido, es obvio que si la gelatinasa cuenta con la capacidad de escindir feromonas, una de sus aparentes

funciones consiste en modular o modificar la respuesta inmune del hospedero contra el microorganismo (36)

2.3. Patología

2.3.1. Bacteremia

En los años de 1970, con el desarrollo de antibióticos β -lactámicos, las bacteremias eran causadas predominantemente por bacilos Gram negativos (*Enterobacteriaceae*) y no por cocos Gram positivos como *S. aureus*. Sin embargo, hacia los años 80s, cambió esa situación dentro de los nosocomios y los microorganismos Gram positivos volvieron a aparecer en escena (27,50).

La invasión bacteriana de la sangre representa el 6 % de todas las enfermedades intrahospitalarias, existiendo dos tipos de bacteremias: las primarias y las secundarias. Las primarias ocurren por la introducción accidental de la bacteria en la sangre, mediante infusión intravenosa, prótesis, catéteres, endoscopías, hemodiálisis o nutrición parenteral. Por otro lado, las bacteremias secundarias se presentan previa infección en alguna zona del organismo: tracto urinario, tracto respiratorio o tejidos cutáneo-subcutáneos (posterior a intervenciones quirúrgicas o quemaduras). Además, las bacteremias aparecen en neonatos o pacientes de edad avanzada, ya que las defensas de ambos grupos etarios resultan insuficientes (32,56,72).

Cabe señalar que, en el caso de los enterococos, éstos suelen detectarse en la sangre del enfermo aproximadamente una semana después de que éste ha ingresado al hospital.

Por otra parte, las infecciones del sistema circulatorio que tienen lugar debido a fallas del sistema inmune representan una de las principales causas de muerte en los pacientes hospitalizados, si bien su frecuencia y epidemiología han venido cambiando conforme lo ha hecho la Medicina (43,71).

Por ejemplo, se estima que los episodios intranosocomiales anuales de bacteremia ascienden a 250,000 en EUA y que, adicionalmente, cuando este tipo de patologías se presenta en las unidades de cuidados intensivos, la mortalidad alcanza cifras de 35 %, después de brindarle al paciente una atención intrahospitalaria de 24 días adicionales, con un exceso en costos de cuarenta mil dólares por individuo (43)

2.3.2. Endoftalmitis

Después de una cirugía ocular, las diversas complicaciones a considerar incluyen a las de origen enterocóccico. Los enterococos suelen dar lugar a procesos muy severos y su adhesión a la superficie membranosa del vítreo no depende de la síntesis de sustancia de agregación, lo que reitera que la

adherencia de *E. faecalis* a los tejidos humanos es de naturaleza muy compleja, involucrando a varias adhesinas conformadas por carbohidratos y/o moléculas proteicas (11,40)

2.3.3. Endocarditis

La endocarditis infecciosa corresponde a la infección de una o más válvulas cardíacas; en tal contexto, en dos terceras partes de los casos suele haber alguna patología cardiovascular preexistente (50, 81).

Durante la edad pediátrica, la localización inicial del cuadro implica a una válvula anormal o a otros defectos congénitos del endocardio en tanto que, en los adultos, en quienes la patología es más frecuente, la infección se implanta sobre las válvulas que manifiestan cambios fibróticos, o bien, en las pertenecientes a individuos con antecedentes de fiebre reumática (50).

Los enterococos ocupan el tercer lugar como agentes etiológicos de endocarditis, seguidos por los estreptococos y *S. aureus* (6).

La endocarditis enterocócica predomina en el sexo masculino, con una frecuencia hombre/mujer de 2:1 y una edad promedio mayor a los 60 años (28).

La secuencia patogénica inicia con un episodio bacterémico, originado a partir de lesiones cutáneas, manipulaciones dentales, operaciones en rinofaringe, exploraciones endoscópicas de la vías genitourinarias o abscesos pulmonares. Por otro lado, los principales factores predisponentes de endocarditis son las lesiones estructurales del corazón y la implantación de válvulas protéticas; sin embargo, también es importante la inserción de catéteres intravasculares (50, 81)

El período de incubación de la endocarditis puede variar entre unos pocos días (sobre todo cuando se trata de patologías agudas) y 6 a 12 meses (en las endocarditis subagudas y postoperatorias). Cabe señalar que la mayoría de los centros médicos reportan una incidencia de 2 a 4 % de endocarditis después de las cirugías valvulares (51,61,81).

2.3.4. Infección de heridas postquirúrgicas

Este tipo de cuadros constituye la tercera causa más común (17 %) de enfermedades nosocomiales, estimándose que aproximadamente un 5 a 12 % de los pacientes intervenidos quirúrgicamente desarrolla infección postoperatoria. Cuando la intervención involucra al tracto gastrointestinal, respiratorio o genitourinario, las posibilidades de infección en el endocardio se calculan en un 30 %, ya que se trata de regiones anatómicas con una gran cantidad de microorganismos de la flora habitual, y la falta de higiene o de

cuidado puede provocar la patología; de hecho, las bacterias que más frecuentemente se aíslan a partir de infecciones en heridas, son: *S. aureus*, los estafilococos coagulasa negativa y *Enterococcus sp* (35,50).

2.3.5. Infección urinaria

Los enterococos son patógenos comunes en infecciones del tracto urinario (UTI). Este tipo de infección es la más frecuente en pacientes ubicados en unidades de cuidados intensivos (66).

Las infecciones del tracto urinario son las más frecuentes en el ambiente hospitalario. Representan un 39% de las enfermedades nosocomiales y están frecuentemente relacionadas con el uso de catéteres. Las bacterias más frecuentemente aisladas de este tipo de infección son: *E. coli*, *Enterococcus sp* y *Pseudomonas aeruginosa* (30,57).

En términos generales, las infecciones de las vías urinarias se pueden dividir en tres grupos: uretritis, cistitis y pielonefritis y su adecuado diagnóstico depende del método de recolección: el de micción media, el sondeo uretral y la punción suprapúbica, pues la contabilidad es mayor en el primero y menor en el último de los mencionados, debido a que elimina la posibilidad de contaminación accidental de la muestra (50)

Las vías urinarias son normalmente estériles (con excepción de la porción más inferior de la uretra) gracias a una serie de mecanismos de defensa, el más importante de los cuales es el flujo libre de la orina en todo su trayecto y el vaciamiento completo de la vejiga. Cabe señalar que las vías de acceso de los microorganismos pueden ser la hematógena y la ascendente e inclusive, que el tubo digestivo es el principal reservorio de bacterias potencialmente uropatógenas. Otros factores que favorecen las infecciones urinarias incluyen a la obstrucción del flujo urinario, la acidez de la orina, los traumatismos, el ayuno prolongado, la litiasis, la diabetes, etc (30,55)

2.4. Epidemiología

Actualmente, el género *Enterococcus* ha adquirido una mayor importancia clínica, debido a su participación en las enfermedades intranosocomiales. Durante las décadas de los 50s y 60s, los cocos Gram positivos representaban las bacterias más comunes en las infecciones intrahospitalarias; empero, las Gram negativas -tales como las enterobacterias- incrementaron su relevancia dentro de los nosocomios a partir de los 70s, situación que volvió a modificarse en los últimos años, al resurgir los cocos Gram positivos, a través de *S. aureus*, *S. epidermidis* y los enterococos (28,40,50).

La tabla 6 muestra las bacterias más frecuentes provenientes de pacientes con bacteremias en 7 hospitales mexicanos (50).

Tabla 6. Porcentaje de los microorganismos más frecuentes causantes de bacteremias ocurridas en 7 hospitales mexicanos*.

Hospital	ECP	GN	ECN	<i>Enterococcus</i>	<i>Candida</i>
Instituto Nacional de Cancerología	4.8	55.5	12.9	8.8	7
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias	9.9	75.0	—	—	12.4
Instituto Nacional de la Nutrición	4.4	46.8	5.1	14.1	25.0
Hospital Infantil de México	4.31	59.4	18.7	1.0	—
Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI	15.0	37.4	30.0	4.0	6.0
Hospital General de León, Gto.	8.0	75.0	7.0	—	ND
Hospital General Gabriel Mancera	—	33.0	10.4	—	32.8

ND = No disponible

* = Rangel FS y cols, Epidemiología de las infecciones nosocomiales, Salud Pub. Mex., 1998 (en prensa).

CLAVES: ECP (estafilococos coagulasa positivo), GN (Gram negativo), ECN (estafilococos coagulasa negativo)

En las enfermedades intrahospitalarias, las fuentes de transmisión pueden ser exógenas o endógenas, en el primer caso, el personal médico y paramédico, quienes suelen poseer una flora habitual resistente a los antibióticos de uso

común, representan el principal foco infeccioso. Por otra parte, las fuentes endógenas involucran a la flora bacteriana de los propios enfermos (72).

Actualmente, la resistencia de los enterococos a la vancomicina constituye un problema especialmente grave en el ambiente intrahospitalario, ya que a pesar de diversos esfuerzos, la incidencia de las infecciones nosocomiales debidas a VRE (por *vancomycin-resistant enterococci*) continúa incrementándose en EUA. En general, se ha venido reportando que las infecciones intrahospitalarias por VRE, progresan a partir de casos esporádicos monoclonales hacia una endemicidad policlonal (9,38,41,45).

En 1995, el Center for Diseases Control (CDC) publicó las siguientes recomendaciones destinadas a prevenir la diseminación de resistencia a la vancomicina (41):

1. El uso limitado de la vancomicina.
2. La educación del equipo de salud.
3. La documentación de metodologías asociadas a la detección exacta de VRE en los laboratorios de Infectología.
4. La descripción de las precauciones durante el contacto del personal de salud con pacientes infectados con VRE.

resistentes a múltiples antibióticos, lógicamente esto continúa garantizando la *diseminación enterocócica* entre los internos (43,82).

Las infecciones ocurridas en las zonas de convalecencia representan un importante factor de mortalidad en individuos de avanzada edad cabe señalar que el 40 % de los medicamentos prescritos dentro de los hospitales corresponde precisamente a *antimicrobianos*, lo que induce el predominio de microorganismos multiresistentes en el ambiente intranosocomial. Entre los factores asociados a la aparición de patógenos resistentes a antibióticos en las áreas de convalecencia, destacan (7)

- a) La transferencia de pacientes desde las zonas de cuidados intensivos
- b) El uso excesivo de antibióticos de amplio espectro
- c) Diversos factores de riesgo asociados al tratamiento o diagnóstico de la enfermedad del paciente: *tubos de alimentación por endoscopia, úlceras, desnutrición, inmunosupresión*
- d) Piel en mal estado.

La *tabla 7* muestra las observaciones de Mylotte y cols en cuanto a la relación del órgano "blanco" con distintos patógenos intrahospitalarios (65) :

III. FACTORES DE VIRULENCIA

3.1. La sustancia de agregación (AS)

Si bien las infecciones provocadas por enterococos se han incrementado de manera sobresaliente desde hace poco más de diez años, el conocimiento de los mecanismos de virulencia implicados aún representa una asignatura pendiente para los numerosos especialistas que en la actualidad estudian el fenómeno (49,78).

Sin embargo, es claro que la mayor parte de las investigaciones se han encontrado con una molécula, conocida como sustancia de agregación (AS), cuya participación en la patogenicidad de las principales cepas clínicas aparenta ser trascendental en la patogenia (49,67,76,78,86).

La AS es una proteína superficial de los enterococos en la que, al parecer, destaca una relevante secuencia de aminoácidos: Arg-Gly-Asp o Arg-Gly-Asp-Ser. Su expresión reside en el plásmido pAD1, específicamente en el gen *asa1*, cuya presencia incrementa considerablemente la adherencia e internalización enterocócica en los macrófagos, previa interacción de la superficie bacteriana con las integrinas CD11b, CD18 y CR3 de las células de defensa del humano (49,78).

Es oportuno señalar que existen varios tipos de AS, todos ellos codificados por distintos plásmidos inducibles por feromonas y cuyos genes presentan secuencias similares entre sí ; por obvio, dichos genes reciben denominaciones asociadas al nombre del plásmido implicado. Por ejemplo: el *asc10* forma parte del plásmido pcF10 y el *asa1* integra al pAD1 y al cAD1^a (25,67).

Al margen de algunos otros papeles que pudieran comprobarse en el futuro, la sustancia de agregación (AS) desempeña funciones trascendentales en los siguientes eventos.

- a) Participación en la conjugación de plásmidos.
- b) Adherencia a tejidos del hospedero
- c) Promoción de la fagocitosis
- d) Estimulación de la supervivencia intracelular del microorganismo.

3.1.1. Participación en la conjugación de plásmidos

Entre diferentes clonas del género *Enterococcus*, la promoción de la conjugación plasmídica inicia cuando las bacterias que fungen como potenciales receptoras liberan al medio ciertos péptidos, denominados feromonas, que promueven la movilización de diversos plásmidos, desde los

enterococos donadores hacia ellas. Además, las células enterocóccicas que ya poseen un determinado plásmido, detienen la elaboración del péptido específico homólogo, pero continúan excretando otros que inducen su apareamiento con clonas que cuenten con moléculas plasmídicas de las que aquéllas carecen (14,24,49)

A tal respecto, entre los plásmidos inducibles por las feromonas, destacan el pCF10 -que confiere resistencia a la tetraciclina- y, desde luego, el pAD1, uno de los principales productores de AS la cual, entre otras funciones, suele *participar precisamente en la formación de agregados constituidos por las células donadoras y receptoras* -junto con otra molécula conocida como "sustancia de unión enterocóccica" o EBS (por *enterococcus binding substance*)-, para facilitar e intensificar la transferencia plasmídica (14,25).

Todos los eventos de transferencia de plásmidos en bacterias requieren de cuatro pasos críticos: (24,89)

1. Contacto directo entre la célula donadora y receptora
2. Formación de un canal que permita la transferencia del DNA.
3. Transferencia del plásmido o del segmento de DNA a través del canal.
4. Estabilización del DNA en el nuevo huésped, ya sea por replicación autónoma o mediante su integración en el genoma.

* La letra "c" deriva del inglés *cumpling*

Las principales características de las etapas implicadas son:

1. Primera etapa. Ésta involucra la síntesis de una feromona (heptapéptido) difusible, denominada cCF10, por parte de las células que fungen como potenciales receptoras. Dicha feromona es reconocida por un receptor codificado por el plásmido contenido en la célula donadora.
2. Segunda etapa. La unión de una a cinco moléculas de feromona en la célula donadora induce un proceso de transmisión de señales que da como resultado la expresión de distintas funciones relacionadas con la transferencia de plásmidos. Una de estas funciones implica la síntesis de la sustancia de agregación (AS), la cual posee la capacidad de unirse a la sustancia de unión (EBS) ubicada sobre la superficie de la célula receptora. La agregación entre células donadoras y receptoras también es promovida por una proteína denominada Asc10, codificada por el gen *prgB*, situado en el plásmido pCF10.
3. Tercera etapa. Después de la unión inicial de las células donadora y receptora, se forma un canal que permite la transferencia del plásmido, desde la célula donadora a la receptora. La transferencia se lleva a cabo en forma unidireccional.

Cabe agregar que diversos aislamientos clínicos de *E faecalis* presentan un máximo de tres plásmidos conjugativos, cada uno de los cuales codifica para distintas características fenotípicas y responde a distintas feromonas. Por otra parte, la proteína Asc10 promueve la conjugación participando en la formación de agregados; dicha afirmación se basa en los siguientes hallazgos (67):

- Durante la conjugación inducida por feromonas sexuales, se promueve la expresión de Asc10 y, como consecuencia, la formación de agregados.
- Las cepas que presentan de manera constitutiva los genes regulatorios y estructurales asociados a la proteína Asc10, forman agregados de células con otras clonas enterocóccicas.
- Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra Asc10 inhiben la formación de agregados enterocóccicos.

Es importante reiterar que la EBS está presente en las células receptoras y que corresponde a un ácido lipoteicoico codificado por genes cromosómicos; sin embargo, dicha EBS también se localiza en diversas células donadoras, por lo que los cultivos líquidos de estas últimas suelen autoagregarse al adicionar feromonas^b (25).

^b La autoagregación no se basa en la interacción de las AS de las células receptora y donadora; además, la síntesis de la AS en la célula donadora es independiente de que ésta elabore EBS

Por otra parte, se ha observado que las bacterias que contienen al plásmido pAD1 también excretan una molécula específica denominada iAD1, la cual actúa como inhibidor competitivo de la feromona cAD1, por ello, las células potencialmente receptoras deben ubicarse lo suficientemente cerca de su donador, a fin de que la cAD1 pueda inducir la conjugación^c (24).

La molécula iAD1 tiene una secuencia peptídica: Leu-Phe-Val-Val-Thr-Leu-Val-Gly, que se encuentra en el extremo carboxílico de lo que parece ser un precursor de 22 aminoácidos, el cual presenta una secuencia señal cuyos cuatro primeros residuos de aminoácidos están cargados positivamente, en tanto que el resto de la molécula es de naturaleza hidrofóbica. Probablemente, la secuencia del precursor resulte trascendental para la inserción o transporte de iAD1 en o a través de la membrana (24,67).

Además, recientemente se ha observado que la secreción de cAD1 puede verse afectada considerablemente por el grado de aireación del cultivo bacteriano; sin embargo, tal fenómeno no ocurre con otro tipo de feromonas, tales como la cPD1 y la cAM373 (64,90)

El sistema de feromonas asociado a la transferencia de plásmidos cuenta con una ventaja muy obvia: los genes de un plásmido no serán activados, excepto

^c Tanto cAD1 como iAD1 son octapéptidos de naturaleza hidrofóbica y presentar una homología cercana al 50 %

cuando exista una bacteria receptora que aún no los contenga, ello, desde luego, garantiza una mayor conservación energética (14).

3.1.2. Adherencia a los tejidos del hospedero

La región de la AS en la que radica la capacidad de adherencia pudo detectarse incubando macrófagos con distintas cepas de enterococos: una AS⁻, otra sintetizaba a la proteína completa y, las restantes, producían AS carentes de un cierto segmento. Los hallazgos más relevantes del experimento fueron los siguientes (78):

- Las carencias amplias en el extremo N-terminal de la AS reducían un 40 % la adherencia bacteriana a macrófagos.
- Las pequeñas faltantes en el extremo N-terminal se traducían en efectos menores: la adherencia resultaba tres veces mayor que la asociada a las cepas AS⁻.
- Las carencias en el extremo C-terminal de la AS sólo disminuían en 10 % la adherencia; de hecho, ésta resultaba 3.3 veces mayor que la observada en las cepas AS⁻.
- Las grandes ausencias que abarcaban los extremos N-terminal y C-terminal reducían una escasa adherencia, comparable a la de las cepas AS⁻.

En conclusión, el trabajo en cuestión permitió establecer que el extremo N-terminal de la AS resulta indispensable para que el microorganismo pueda concretar su adhesión a las células eucariotes

Por otra parte, la previa incubación de macrófagos con el péptido Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), ratificó que la AS desempeña una función esencial en la adherencia: se observó que las cepas AS⁺ que se agregaban 40 minutos después de dicho péptido, sólo lograban adherirse a los fagocitos en proporciones aproximadas del 34 % (24)

Análogamente, la adición simultánea de microorganismos y RGDS a modelos experimentales renales, se traducía en inhibiciones de sólo 20 % en la adherencia enterocócica a las células tubulares, tal como ocurre en los clásicos ensayos de inhibición competitiva (49).

Es importante señalar que los receptores de la AS en las células humanas corresponden a moléculas proteicas superficiales, conocidas como integrinas^d β_2 , que se localizan en la superficie de numerosos leucocitos, e inclusive, de las células epiteliales y endoteliales. La detección del residuo "blanco" con el que interactúa la AS, se basó en experimentos que incluían la preincubación

^d Las integrinas deben su nombre al hecho de que al interactuar con su ligando bacteriano desencadenan modificaciones en la membrana de la célula eucariote que las posee, a fin de que el microorganismo implicado sea ingresado; por lo regular, constan de dos subunidades, α y β , las cuales varían según el tipo celular que las presenta; por ejemplo: las β_1 se ubican en la superficie apical de las células intestinales

de macrófagos humanos con anticuerpos dirigidos contra distintas cadenas α de las integrinas CD11a, CD11b y CD11c, encontrándose que la región implicada era precisamente esta última (25,28,40).

Mención aparte merecen las sustancias que fungen como matrices extracelulares de los tejidos eucariotes; en tal sentido, destacan la colágena, los proteoglicanos y diversas glicoproteínas estructurales tales como la fibronectina (Fn) y la laminina (Ln), todos los cuales suelen ser utilizados como receptores alternos de numerosos microorganismos que aspiran a colonizar el tejido en turno (79).

La colágena contiene una secuencia tripéptida repetitiva Gly-X-Y, en donde X y Y frecuentemente son prolina o hidroxiprolina. Por otro lado, la laminina está constituida por 3 polipéptidos, los cuales se asocian para formar una estructura cruzada que contribuye a la estabilidad de los tejidos y a la generación de señales celulares(80).

En los tejidos normales, la matriz extracelular está cubierta por células endoteliales o epiteliales y, por lo tanto, suele no estar disponible para actuar como receptora de bacterias. Sin embargo, cualquier tipo de lesión puede exponerla, promoviendo la colonización microbiana. Durante la década pasada se comprobó ampliamente que microorganismos tales como los estafilococos y estreptococos expresan componentes de superficie que

reconocen moléculas de la matriz extracelular. A tal respecto, en *E. faecalis* se ha descrito un gen denominado *ace*, que codifica para una proteína cuya organización estructural reconoce diversas moléculas de la matriz extracelular (79).

De cualquier manera, la AS representa uno de los principales protagonistas de la adherencia enterocócica a diversos tipos celulares, no obstante, las numerosas cepas involucradas en patologías humanas muestran diferentes afinidades por los distintos tejidos: estudios *in vitro* han demostrado que los aislamientos provenientes de infecciones del tracto urinario (UTI) se adhieren más eficazmente a las células tubulares que los asociados a endocarditis (EN); por el contrario, estos últimos evidencian mayor afinidad por las células cardíacas de Girardi que los obtenidos mediante urocultivo (14)

Es importante subrayar que *E. faecalis* cuenta con receptores en el endotelio de las válvulas del corazón -lo que resulta trascendental en el desarrollo de EN aguda en válvulas cardíacas previamente sanas- y que las cepas implicadas suelen presentar una baja adherencia a los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), en comparación a la observada con cepas provenientes de UTI (24,51)

De hecho, previa incubación de 1 h en suero^e, las cepas causantes de UTI y EN se adhieren en mayor grado a las células cardíacas y renales que a los PMNs, lo que sugiere que ciertas proteínas séricas afectan la interacción entre el microorganismo y dichos fagocitos. Sin embargo, esta posibilidad prácticamente se ha descartado, al obtenerse los mismos resultados a 4°C (temperatura a la cual disminuye notablemente cualquier tipo de reacción) (30,39,57).

Cabe mencionar que la adherencia de *E. faecalis* a las células del tracto urinario también depende de que las adhesinas contengan al disacárido D-glucosa-D-manosa, en tanto que la llevada a cabo sobre las células cardíacas de Girardi reside en moléculas que presentan D-galactosa, a este respecto, se ha logrado comprobar que los aislamientos provenientes de UTI y EN cuentan con ambos azúcares y que, en contraste, los asociados a EN sólo expresan al segundo de ellos; de hecho, las cepas relacionadas con UTI evidencian *in vitro* un alto grado de adherencia a las células cardíacas (24).

Las bacterias adheridas a modelos experimentales de células renales suelen cuantificarse mediante ensayos de ELISA (por *enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizándose anticuerpos anti-*E. faecalis* preparados en conejo; la reacción se revela agregando un segundo anticuerpo: anti-y globulina de

^eNumerosos autores afirman que ocurre una mayor producción de AS cuando el cultivo se preincuba en suero.

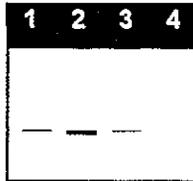
conejo marcado con fosfatasa alcalina, cuyo sustrato es la p-nitrofenilfosfato. La técnica se lleva a cabo en 30 minutos y la lectura se realiza a una $\lambda = 405$ nm (49).

Con base en lo anterior, Kreft y cols encontraron que las cepas *E. faecalis* AS⁺ dan lugar a lecturas mayores, sólo comparables a las obtenidas con clones AS⁺ y con las que poseen plásmidos asociados a la elaboración de feromonas; estos hallazgos reiteran el importante papel de la AS, tanto en lo referente a la agregación bacteriana como a la adherencia de los enterococos sobre células humanas (49).

La subunidad α_6 de las integrinas se expresa en las células tubulares del riñón humano. Además, la β_1 integrina (receptor) de la fibronectina también se puede encontrar en las células epiteliales de los túbulos del riñón (30,39).

Finalmente, cabe señalar que la adherencia de *E. faecalis* a los cultivos de células tubulares renales está mediada por la adhesina Asa1, es decir, a la AS asociada al plásmido pAD1, inducible –a su vez– por feromonas sexuales (49).

En otro estudio realizado por Kreft y cols, se llevó a cabo un Western blot para observar la producción de AS en presencia de suero.^f Los resultados obtenidos fueron los siguientes: (49)



- La banda 1 corresponde a la AS elaborada por una cepa cuyos genes asociados a dicha proteína se expresan de manera constitutiva.
- La banda 2 se relaciona con la AS de una clona que contiene al plásmido pAD1 y a cuyo cultivo se le adicionaron una feromona sexual sintética y 50 % de suero fetal de becerro.
- La banda 3 implica a la AS de la cepa que posee al plásmido pAD1, pero cultivada en ausencia de feromona sexual sintética (sólo con 50 % de suero fetal bovino).
- El carril 4 corresponde a la misma cepa que contiene al plásmido pAD1, cultivada sin feromona sexual ni suero fetal bovino (no aparece banda).

En conclusión, dicho ensayo demostró que la presencia de feromonas potencia la producción de AS y que el suero resulta suficiente e indispensable en la elaboración; esto último sugiere que algún componente sérico podría

^f Las cepas de enterococos fueron cultivadas en medio Todd-Hewitt

promover la expresión de los genes correspondientes. En tal contexto, Helmut Hirt y cols (Universidad de Minnesota) han encontrado mediante estudios basados en SEM (por *scanning electron microscopy*) que la albúmina plasmática de mamíferos induce la producción de la AS (28).

3.1.3. Promoción de la fagocitosis

Si bien numerosas infecciones debidas a enterococos son de origen endógeno, en ello podría resultar determinante el hecho de que los macrófagos fungan como vehículo que concreta la translocación del microorganismo, desde el intestino hasta el sistema linfático y el torrente circulatorio (39,67-78).

A este respecto, todo parece indicar que la AS promueve que los enterococos se adhieran a dichos fagocitos, que faciliten secuencialmente la fagocitosis, e inclusive, que sobrevivan intracelularmente (78)

Por lo que respecta a la adherencia, diversos trabajos han revelado que la presencia del gen *asa1* incrementa la eficacia del evento y que, inclusive, éste se puede inhibir de manera competitiva mediante la preincubación de los macrófagos con anticuerpos que reconocen específicamente a las integrinas CD18 y CD11b –también presentes en los linfocitos- pero, sobre todo, a las CR3, las cuales se expresan de manera constitutiva en los monocitos (68,39).

En referencia a los PMNs, las moléculas superficiales involucradas son las integrinas $\alpha\beta3$ (conocidas como integrinas de respuesta a leucocitos), una proteína denominada IAP (por integrin-associated protein) y la L-selectina. En tal sentido, en la fagocitosis independiente de la opsonización participan tanto la CR3 como un complejo $\alpha\beta3$ /IAP y la L-selectina; ésta es trascendental en la interacción de los neutrófilos con las células endoteliales y en la potenciación de las características adherentes de la CR3 (74,85).

Estudios recientes han revelado que la adherencia enterocócica no sólo requiere de las integrinas CR3, sino también de las otras moléculas antes señaladas, ya que el proceso puede inhibirse con anticuerpos dirigidos contra estas últimas (74).

Cabe recordar que los neutrófilos PMNs representan un componente crítico de la defensa antibacteriana del hospedero: dichas células suelen ser las primeras en llegar a los tejidos afectados, para intentar el englobamiento y destrucción del agente patógeno, lo cual ocurre más eficazmente mediante la opsonización por C3b o por los anticuerpos IgG. Al parecer, un evento clave del proceso fagocitario involucra la interacción entre la integrina CR3 (CD11b/CD18) y la molécula C3b, ya que eficientiza la ingestión de la bacteria, el desplazamiento de los gránulos lisosomales hacia el fagosoma y

la respuesta oxidativa e hidrolítica que provocan la eventual muerte y degradación de la bacteria (74).

En otro orden de ideas, los trabajos realizados con cepas AS⁺ y AS⁻ indican que la adhesión a macrófagos humanos no sólo está mediada por la AS, puesto que las clonas AS⁻ también se adhieren aunque en grados considerablemente menores. Sin embargo, las cepas AS⁺ también disminuyen el ataque oxidativo en su contra por parte de los macrófagos e incrementan la velocidad de fagocitosis (78)

Numerosos autores han demostrado que el complemento es de gran relevancia en la opsonización de *E. faecalis* y que los anticuerpos IgG provenientes de los pacientes infectados funcionan como opsoninas, aunque sorprende que esto sólo ocurre en presencia de C3b. Aparentemente, las opsoninas IgG están dirigidas contra un carbohidrato superficial de los enterococos, ya que la opsonización/fagocitosis asociada a PMNs es inhibida cuando los anticuerpos son preincubados con carbohidratos purificados provenientes de *E. faecium*. A este respecto, la composición de los carbohidratos superficiales de esta especie, es: 47 % de fucosa, 41 % de glucosa, 6 % de galactosa, 3 % de ramnosa, 2 % de N-acetilgalactosamina y 1 % de N- acetilglucosamina (78).

En un experimento tendiente a definir la vía del complemento involucrada en la promoción del ataque por PMNs, se inhibió la vía clásica agregando una solución de EDTA-MgCl₂; de esa manera, se pudo demostrar que la vía alterna del complemento resulta suficiente para promover la erradicación del agente infeccioso (73).

Adicionalmente, ciertas feromonas relacionadas con el plásmido pAD1, en particular la iAD1, ejercen actividad quimiotáctica hacia los neutrófilos, lo cual sugiere que tales sustancias podrían influir en el curso de la infección enterocócica, incrementando o modificando la respuesta del individuo.

Llama la atención una hipótesis en el sentido de que cepas intracelulares de enterococos son las que más frecuentemente convierten las UTI en severas pielonefritis y, posteriormente, en graves bacteremias, durante las cuales el microorganismo modifica ciertas sustancias de superficie para incrementar su resistencia a la fagocitosis y, de esa manera, impulsar la colonización e invasión de las células endoteliales (39).

Stephen y cols analizaron la influencia de dos moléculas codificadas por el plásmido pCF10, la sustancia de agregación Asc10 y la proteína Sec10 involucrada en el mecanismo de exclusión superficial¹⁹ -encargada de prevenir la transferencia de plásmidos entre dos células donadoras-, sobre la

internalización de *E. faecalis* en los enterocitos HT-29^h (consultar la tabla 8). Dichos autores encontraron que la invasividad de las cepas Sec10⁻Asc10⁻ es menor que la de las Asc10⁺Sec10⁺ y las Asc10⁺Sec10⁻. Es decir que, muy probablemente, la molécula Sec10 no desempeñe un papel importante en la invasividad, si bien es preciso tomar en cuenta que las pobres internalizaciones *in vitro* no necesariamente son reproducibles *in vivo*, habida cuenta de que el área superficial de la mucosa intestinal es infinitamente mayor (67).

Tabla 8. Capacidad de internalización de *E. faecalis* y otras bacterias

CEPA	Bacterias intracelulares	GRUPO
<i>L. monocytogenes</i> hemolítica	6.2 ± 0.1	A
<i>L. monocytogenes</i> no hemolítica	4.9 ± 0.2	B
<i>S. typhimurium</i>	4.8 ± 0.2	B
<i>E. faecalis</i> Asc10 ⁺ Sec10 ⁺	4.7 ± 0.2	B
<i>E. faecalis</i> Asc10 ⁺ Sec10 ⁻	4.5 ± 0.2	B
<i>E. faecalis</i> Sec10 ⁺ Asc10 ⁻	3.6 ± 0.1	C
<i>P. mirabilis</i>	2.8 ± 0.2	D
<i>E. faecalis</i> no invasiva	1.9 ± 0.1	E
<i>E. coli</i>	1.9 ± 0.2	E

⁹ La exclusión superficial ocurre después de la agregación, probablemente con base en la inhibición de la formación del canal o de la movilidad del DNA

^h En este trabajo se cuantificaron las bacterias intracelulares, previa eliminación de las extracelulares mediante la adición de bacteriófagos

Al margen de ello, los exámenes sobre invasividad enterocócica con microscopía electrónica sugieren que el microorganismo se internaliza mediante un mecanismo que implica a su propia envoltura y a las microvellosidades apicales de los enterocitos, antes de que se forme la vacuola o fagosoma correspondiente (86).

3.1.4. Estimulación de la supervivencia intracelular del microorganismo

Weeks y cols (1999) observaron que cuando las cepas AS⁺ se inoculaban intraperitonealmente en ratones, el microorganismo era engullido después de un breve periodo, pero sobrevivía durante lapsos prolongados dentro de las células fagocíticas -merced a su capacidad para inhibir la respuesta oxidativa-.

En otras palabras, los enterococos invaden el sistema linfático y el torrente circulatorio, evadiendo o neutralizando los mecanismos de defensa natural del hospedero. En tal contexto, Gentry y cols demostraron que *E. faecalis* sobrevive más tiempo dentro de los macrófagos peritoneales de ratón que *Lactococcus lactis* y las cepas no diarreagénicas de *E. coli*, aunque no lograron establecer los factores de virulencia involucrados; de hecho, sólo pudieron plantear que, como la citolisina y la gelatinasa no participaban en la supervivencia celular, resultaba posible que la AS fuera una de las moléculas responsables (28).

Trabajos posteriores tampoco han logrado determinar los factores enterocócicos implicados en la supervivencia intramacrofágica, si bien no se ha descartado que dicha propiedad resida en la AS; a tal respecto, se ha demostrado que ésta interactúa con la molécula macrofágica CR3 y promueve el ingreso microbiano a los macrófagos sin inducir un ataque oxidativo (78).

Dicho mecanismo, conocido como "fagocitosis/opsonización independiente", propone que la unión de AS a CR3 -en ausencia de iC3b- resulta en una poco eficiente activación de PMNs contra los enterococos. Ello es congruente con el hecho de que los fagosomas que contienen *E. faecalis* ingresados vía el mecanismo AS/opsonina independiente son mucho más grandes que los que engloban bacterias internalizadas mediante opsonización. Lo anterior sugiere que existe alguna diferencia significativa en la maduración del fagosoma, dependiendo de la participación o la ausencia de CR3 durante el proceso fagocitario, lo que quizá también podría influir en la supervivencia intracelular de *E. faecalis* AS⁺ (2,73,78)

Evidentemente, uno de los aspectos importantes en la maduración normal de los fagosomas reside en el fenómeno de acidificación. De hecho, se cree que un pH intrafagosómico de 4 a 5 promueve la actividad de diversas enzimas granulocíticas de los PMNs, incluyendo a la mieloperoxidasa (MPO), lo cual incrementa el efecto antimicrobiano. A tal respecto, se ha observado que ocurre una reducción en la acidificación fagosómica (pH=5.9) inducida por las

bacterias AS⁺, contrastante con pHs intrafagosómicos de 4.5, los cuales caracterizan el caso de las cepas AS⁻. Por obvio, este podría representar uno de los mecanismos involucrados en la resistencia de *E. faecalis* AS⁺ hacia los PMNs (78)

Adicionalmente, el hecho de que el tratamiento de la endocarditis por enterococos requiere de una terapia combinada durante lapsos prolongados, también apoya la teoría de la invasividad del microorganismo: éste no puede ser erradicado por los medicamentos que no difunden hacia el interior de las células infectadas (28).

Por otro lado, ciertos estudios han demostrado que las cepas de *E. faecalis* provenientes de pacientes con endocarditis y bacteremia producen un 60 % más de ion superóxido, en comparación con los aislamientos asociados a personas aparentemente sanas.

En la Universidad de Oklahoma, Mark Huycke y cols inocularon cepas de *E. faecalis* en ratones y posteriormente detectaron la presencia de radicales libres en el contenido intestinal. Así mismo, al poner en contacto células epiteliales de intestino con enterococos productores de iones superóxido, ocurrió un claro daño en el DNA de las primeras. De acuerdo con esta clase de observaciones, las clonas enterocóccicas productoras de superóxido podrían provocar la aparición de tumores en el hospedero, amén de resultar

más resistentes al ataque de la mieloperoxidasa de los PMNs, enzima que convierte al peróxido de hidrógeno en ácido hipocloroso (31,40).

3.2. Hemolisina

La hemolisina de *E. faecalis* fue inicialmente denominada pseudo-hemolisina, debido a que su actividad hemolítica en agar sangre con eritrocitos provenientes de determinadas especies mamíferas no es reproducible a partir del sobrenadante de los cultivos líquidos (25).

La pseudo-hemolisina es una citolisina capaz de destruir células eucarióticas y procarióticas, es lábil a pH de 6.6 cuando se le incuba a 37°C por 30 minutos y estable en presencia de oxígeno. Los eritrocitos de humano, caballo, vaca y conejo resultan más susceptibles a su acción biológica que los hematíes de oveja y cabra (25,36).

De acuerdo con Glimore y Haas de la Universidad de Oklahoma, la citolisina debe desempeñar un importante papel en la primera fase de la infección por enterococos, la cual es asintomática y se sitúa en el tracto gastrointestinal. Algunos de los eventos involucrados en esta primera fase de la infección incluyen a la penetración en los tejidos humanos, así como a una toxemia directa y a cierto daño tisular que antecede a la segunda fase, en la que ocurre la aparición de los síntomas. Dichos autores han identificado tres

subunidades de la citolisina extracelular, las cuales interactúan para provocar la lisis celular; en este sentido, una de las subunidades, conocida como enzima activadora, está siendo un relevante objeto de estudio, ya que se espera que en el futuro inmediato puedan diseñarse medidas terapéuticas dirigidas a neutralizar su trascendental participación con base en la administración de proteasas (28).

Si bien la citolisina de *E. faecalis* está codificada por el plásmido pAD1, algunos de los genes auxiliares se localizan en el cromosoma bacteriano. Al margen de que la presencia del plásmido pAD1 contribuye a la severidad de las endoftalmis provocadas por esta especie, la producción de la citolisina está regulada por la expresión de los genes asociados a las moléculas A (cyl A) y L (cyl B) y por la secreción de esta última (que depende de la disponibilidad de ATP) (15,16,24)

El componente L (precursor de la sustancia lítica) posee un peso molecular de 11,000 Da, en tanto que el de la molécula A es de 27,000 Da; ésta presenta una carga netamente negativa a pH neutro, se sintetiza inicialmente como un péptido señal, se excreta como zimógeno, se asocia a la pared celular, actúa como serín-cinasa y, al parecer, contribuye a la inmunidad y a la actividad de la citolisina (25,36).

Por su parte, el componente L participa en la formación de un canal de transporte, que atraviesa prácticamente la membrana citoplasmática, para permitir el paso de la hemolisina. Cabe señalar que los promotores de los componentes A y L son distintos, por lo que su transcripción y traducción no ocurren en forma simultánea (25,36).

De hecho, la síntesis y secreción del componente L se detienen al disminuir los niveles de ATP pero, en ese momento, la molécula A parece influir en la reactivación correspondiente (25,36)

La citolisina desempeña relevantes funciones patogénicas: actúa como toxina, provocando la ruptura del sistema membranoso de los glóbulos rojos y de otras diversas células humanas, e inclusive, de otras bacterias (fungiendo como bacteriocina) (11)

Los modelos experimentales murinos han permitido demostrar que las clonas productoras de citolisina ocasionan septicemias persistentes, a diferencia de las que no la sintetizan y que, además, dicha citotoxina provoca la disminución de la función retinal de los conejos y/o la propia destrucción de la retina en sólo 24 h, sin embargo, la incuestionable existencia de muchos otros factores enterocócicos de patogenicidad y el hecho de que sólo cerca de la mitad de las cepas clínicas sintetice citolisina, reiteran que ésta no representa

un elemento indispensable en el origen de las enfermedades debidas a *E. faecalis* (11,36).

En otras palabras, existen diversas evidencias de que la producción de hemolisina suele estar relacionada con la severidad de los cuadros patológicos¹ las infecciones causadas por clonas citolíticas provocan una disminución mayor de la función neuroretinal en modelos animales que las mutantes no citolíticas, manifestando una pérdida casi total de la arquitectura retinal. Evidentemente, algunos autores que trabajan con microscopía electrónica han observado que la destrucción ocurre principalmente en las capas posteriores del ojo, lo que sugiere que la citolisina posee la capacidad de penetrar hasta dichos estratos (11).

Si bien los resultados experimentales demuestran la contribución de la citolisina a una mayor virulencia en *E. faecalis*, los mecanismos implicados en el daño tisular aún son desconocidos. No obstante, es muy probable que dicha citotoxina induzca la liberación de mediadores inflamatorios a partir del tejido dañado o de las células fagocitarias y que, de esa manera, se desencadene una reacción inflamatoria que origine la destrucción tisular. Cabe agregar que las cepas que presentan un transposon específico aún en estudio experimentan la inactivación de algunos genes ligados a la síntesis de

¹ En un modelo intraperitoneal en ratones, Ike y cols demostraron que las cepas de *E faecalis* citolíticas son diez veces más tóxicas que las cepas que no presentan citolisina.

citolisina, lo que se traduce en un menor progreso de las patologías inducidas en modelos animales (40).

En otro orden de ideas, también existen evidencias epidemiológicas de una probable relación entre la producción de hemolisina y la elevada frecuencia de resistencia a antibióticos: en la Universidad de Wisconsin se obtuvieron 40 % de cepas enterocócicas hemolíticas, en su mayoría resistentes a los aminoglicósidos. Al margen de ello, la exposición de cepas de *E. faecalis* productoras de citolisina a dosis medianamente letales de bacitracina y vancomicina provoca la disminución de la actividad citolítica (25,36)

Por último, se ha observado que la citolisina de *E. faecalis* inhibe el crecimiento de algunos estreptococos que habitan normalmente en la cavidad oral, incluyendo a las especies que contribuyen a la generación de caries dentales (36).

3.3. Gelatinasa

Dupont y cols demostraron que la elaboración de gelatinasa por parte de numerosas cepas de enterococos disminuye la DL₅₀, si bien los estudios implicados presentan ciertas limitaciones, debido a que las clonas Gel^r utilizadas en el comparativo fueron generadas por mutagénesis (31).

El gen *gelE* codifica para dicha proteasa, la cual degrada a la gelatina, caseína, hemoglobina y otros péptidos bioactivos, incluidas las feromonas quimiotácticas de *E. faecalis*, en tal sentido, es obvio que si la gelatinasa cuenta con la capacidad de escindir feromonas enterocócicas, una de sus relevantes funciones podría consistir en modular o modificar la respuesta inmune del hospedero contra el microorganismo (24,36).

3.4. Bacteriocinas (enterocinas)

Las bacteriocinas son péptidos activos de membrana que ejercen actividad antimicrobiana contra bacterias relacionadas con la cepa productora. La producción de bacteriocinas ha sido descrita tanto en microorganismos Gram positivos como en Gram negativos (15,16).

Las bacteriocinas pueden ser de tres clases: (31)

Clase I. Son sintetizadas en los ribosomas y sufren de modificaciones a nivel post-traduccionales hasta dar lugar a un péptido activo. Actualmente, la nisina es la más estudiada, es producida por *Lactococcus lactis* y se le ha aplicado para preservar alimentos tales como los quesos.

Clase II: Son pequeñas, estables al calor y también son sintetizadas en los ribosomas, aunque no sufren de modificaciones post-traduccionales, con excepción de la ruptura del péptido líder.

Clase III: Son de elevado peso molecular y lábiles al calor

Las bacteriocinas producidas por los enterococos se conocen como enterocinas y, en su mayor parte, pertenecen a la clase II, tal como sucede con las enterocinas A, B, L50A y L50B. Éstas no sufren modificaciones post-traduccionales, su secreción no requiere la presencia de un péptido señal y presentan similitud con las hemolisinas de los estafilococos, aunque no poseen actividad hemolítica (31).

Cabe señalar que, en algunas cepas de *E. faecalis*, la expresión de bacteriocinas está regulada por feromonas codificadas por plásmidos conjugativos (16).

Las enterocinas son activas contra cepas de enterococos, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium*. La actividad anti-*Listeria* resulta congruente, ya que este género y los enterococos se encuentran filogenéticamente relacionados. Finalmente, por lo que toca al efecto anti-*Clostridium*, éste es muy afortunado y se aplica para impedir el desarrollo de estos microorganismos en los quesos empacados (15).

Adicionalmente, Nes y cols, investigadores de la Universidad de Agricultura de Noruega, comprobaron que diversas cepas virulentas de *E. faecalis* obtenidas de diversos alimentos fermentados sintetizan numerosas

enterocinas (bacteriocinas de enterococos), de las cuales la A y la B ejercen una especial actividad bactericida sobre otras clonas de enterococos, lactobacilos, clostridios, listerias y *pediococos*. A ambas sustancias se han sumado la enterolisina A y la bacteriocina circular AS-48 de *E. faecalis*; esta última fue descubierta por Antonio Gálvez en España y funge como agente bactericida para otros patógenos, incluido el género *Salmonella* (15,28).

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO Y TRATAMIENTO

4.1. Diagnóstico por el laboratorio

El diagnóstico de laboratorio de las enfermedades ocasionadas por *E. faecalis* se basa fundamentalmente en la aplicación de metodologías microbiológicas, si bien afortunadamente y, aunque de manera paulatina, empieza a extenderse el empleo de pruebas de índole molecular que le aportan una mayor velocidad y confiabilidad a los resultados (1,80).

Es oportuno señalar que, en el caso de los enterococos, las metodologías microbiológicas son exactas y precisas, habida cuenta de que se trata de un microorganismo que desarrolla relativamente rápido, manifestando características fenotípicas específicas y fáciles de evidenciar (22).

Por lo general, la muestra clínica en turno se puede sembrar en agar sangre de carnero¹, e inclusive, en agar cefalexina-aztreonam-arabinosa, en el medio CHROMAgar y en agar para enterococos con 6 µg/mL de vancomicina. De esta manera, previa incubación de las placas, durante 18 a 24 h a 35-37°C y,

¹ Lógicamente, en el caso de la endocarditis, la muestra clínica corresponde a la sangre venosa del paciente, la cual se siembra en medios tales como el bifásico de Ruiz Castañeda o alguna formulación líquida, como el BHI o el tripticase-soya-caldo, en todos los casos, adicionados de un anticoagulante no tóxico para los agentes bacterianos. Una vez que se observa desarrollo en ellos, se procede a resembrar en placas de agar sangre de carnero o en alguno de los mencionados en el párrafo correspondiente

al margen de concretar el aislamiento de la cepa responsable del cuadro, las colonias correspondientes se diferenciarán con facilidad, tomando como base el tipo de hemólisis, la fermentación de arabinosa (positiva para *E. faecium* y negativa para *E. faecalis*) y la coloración azul de las colonias desarrolladas en el CHROMAgar; además, podría empezarse a sospechar sobre la posibilidad de que el agente etiológico fuera resistente a vancomicina (4,22,62).

Evidentemente, otros medios sólidos adecuados para llevar a cabo el aislamiento de los enterococos pueden incorporarse a la metodología, sumándolos a los antes mencionados o sustituyendo a algunos de ellos; en este sentido, se pueden tomar en cuenta el CNA (agar Columbia-colistina-ácido nalidíxico) y el PEA (agar alcohol feniletílico), los cuales contienen sangre de carnero y, en caso de los urocultivos, es conveniente considerar el empleo del agar Brolacín, para llevar a cabo la cuenta de colonias, cuando el espécimen se ha obtenido por la técnica de media micción (4,80).

Una vez que se han diferenciado macroscópicamente las colonias de *Enterococcus*, se realizan extensiones teñidas y algunas pruebas que permiten confirmar su presencia; en tal contexto, la observación de cocos Gram positivos y catalasa negativa, capaces de crecer en presencia de 6.5 % de NaCl y/o de azida de sodio al 0.04 %, representa un avance en la identificación y representa una fórmula (tamiz) para ahorrar material y

reactivos que se emplean a continuación en la caracterización bioquímica (22,48).

La mencionada identificación bioquímica puede llevarse a cabo mediante el empleo de kits comerciales tales como el sistema API Rapid STREP de 20 pruebas, o bien, del sistema Vitek. Sin embargo, también se puede efectuar preparando los medios correspondientes y distribuyéndolos en tubos. La lectura e interpretación de las pruebas seleccionadas deberá fundamentarse en el contenido de las tablas 3, 4 y 5, localizadas en el capítulo I del presente trabajo (10,48).

El sistema VITEK2 es una metodología automatizada que provee de distintas pruebas bioquímicas y de susceptibilidad para la identificación de la mayoría de enterococos de importancia clínica. Esta prueba consiste de pozos vacíos, un incubador y una computadora. Este sistema detecta crecimiento bacteriano y cambios metabólicos en los distintos micropozos mediante detección basada en fluorescencia. Se utiliza la tarjeta ID-GPC para la identificación y la AST-P516 para pruebas de susceptibilidad a antibióticos. La tarjeta ID-GPC es una placa con 64 pozos de los cuales 18 se encuentran vacíos y 46 contienen pruebas bioquímicas y de inhibición. En particular contiene las siguientes pruebas: 22 pruebas enzimáticas para aminopeptidasas y -osidasas. Cabe señalar que los sustratos utilizados para la detección de aminopeptidasas están unidos al 7-amino-metilcumarina (7AMC) mientras que los sustratos

están unidos al 7-amino-metilcumarina (7AMC) mientras que los sustratos para la detección de -osidasas están usualmente unidas a 4-metilumbeliferona (4MU). En la tabla 9 se mencionan los sustratos utilizados en las 22 pruebas de detección (10,33):

Tabla 9. Sustratos utilizados en el sistema VITEK.

Detección de aminopeptidasas	Detección de - osidasas
4MU- α -L arabinofuranósido	Alanina- 7 AMC
4MU- α - galactósido	Arginina- 7 AMC
4MU- α -D- glucósido	Aureasa
Ac. 4MU- α -D-N- acetilneuramínico	Histidina- 7AMC
4 MU- β - D- galactósido	Ac. α - glutámico- 7AMC
4MU- β -D- glucósido	Teonina - 7AMC
4MU- β -D- glucurónido	Leucina- 7AMC
4MU- β - D- manósido	Lisina - 7AMC
4MU-N- acetil- β -D- glucosaminida	Fenilalanina- 7AMC
4MU- fosfato.	Prolina - 7AMC
	Ac. Piroglutámico- 7AMC
	Tirosina- 7AMC

Las 16 pruebas de fermentación incluídas en la tarjeta ID-GPC incluyen: D- rafinosa, amigdalina, arbutina, D- galactosa, glicerol, D- glucosa, L- arabinosa, lactosa, D- maltosa, D- manitol, N- acetilglucosamina, salicina, D- sorbitol, D- trehalosa, D- melibiosa, D- xilosa.

En el sistema VITEK también se incluyen pruebas de descarboxilasas para ornitina y arginina y pruebas adicionales como son: ureasa, piruvato, optoquina, novobiocina, polimixina y crecimiento en medio con 6.5% NaCl.

Por otro lado, la tarjeta AST-P516 tiene 64 pozos que incluyen 20 pruebas de agentes antimicrobianos a distintas concentraciones: ampicilina, benzilpenicilina, cefuroxima, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, imipenina, kanamicina, levofloxacina, nitrofurantoina, norfloxacina, ofloxacina, quinupristina/dalfopristina, estreptomina, teicoplanina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol y vancomicina (33).

Adicionalmente, la suspensión de microorganismos que se utiliza para el inóculo en el sistema VITEK2 se prepara a partir de medios de cultivo de bacterias incubadas durante 18 a 24 horas en agar Columbia con 5% de sangre de carnero. Finalmente las soluciones se preparan en solución salina estéril (0.45% NaCl) a una turbidez equivalente a 0.5 Mc. Farland. Los resultados finales se obtienen automáticamente después de un mínimo de 4 horas y un máximo de 15 horas (33).

El sistema VITEK2 es de fácil manejo y rápida detección y los resultados obtenidos son confiables (10).

Dada la resistencia de numerosas cepas enterocóccicas que fungen como agentes etiológicos de enfermedades humanas, es necesario que las actividades diagnósticas sean complementadas con pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, mediante el monitoreo por dilución en agar,

por microdilución o por difusión en disco, de acuerdo con lo señalado en el capítulo I del presente trabajo (46,80)

Por lo que se refiere a las técnicas moleculares, la detección de los enterococos se basa en la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Ésta corresponde a una metodología que amplifica (multiplica) alguno de los segmentos de DNA específico de los enterococos, con el objeto de poderlo identificar mediante alguna prueba complementaria, la cual puede ir desde una simple electroforesis en gel de poliacrilamida teñida con bromuro de etidio hasta un southern-blot, un RFLP (restriction field length polymorfism) o un PFGE (pulsed field gel electrophoresis) (23,72,84).

En la PCR, se requieren los *primers* adecuados para seleccionar el segmento "blanco" de DNA a amplificarse, una DNA polimerasa y los dNTP's (desoxirribonucleótidos trifosfatados) ATP, TTP, CTP y GTP; cada ciclo de aproximadamente tres minutos consta de tres eventos: a) la desnaturalización del DNA; b) el alineamiento de los *primers* (iniciadores); y c) la elongación de las nuevas cadenas de DNA. El primero tiene lugar a 94-96°C, el segundo a 45-60°C y, el último, a 70-75°C; por tal motivo, es necesario un termociclador, en el que se programe un cambio importante de temperatura cada 60 segundos y, por otro lado, es conveniente que la DNA polimerasa no sea susceptible a las temperaturas de 90°C o mayores. A este último respecto, la

enzima adecuada es la Taq polí I de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* (72).

Evidentemente, la PCR también es útil desde el punto de vista de la tipificación de las cepas implicadas, si bien es preciso sustituir a los *primers* asociados a la diferenciación de la especie por algún pool de iniciadores obtenido en el laboratorio de cada hospital. Dicha modificación se conoce como RAPD-PCR y tiene su explicación en el hecho de que los *primers* destinados a la identificación de *E. faecalis* no podrían diferenciar entre dos o más clones de la misma especie (23,80).

La adecuada identificación de los enterococos a nivel de especie es importante para llevar a cabo una adecuada terapia, particularmente en el caso de endocarditis, debido a la susceptibilidad que presenta la especie a los β -lactámicos y glucopéptidos. Entre las metodologías desarrolladas para la detección de enterococos basados en PCR se cuentan la detección del gen *tuf*, que codifica para el factor de elongación EF-Tu involucrado en la formación de cadenas de péptidos. Los *primers* que se utilizan, corresponden a regiones conservadas del genoma de distintas especies de enterococos. La tabla 10 muestra los *primers* que amplifican el segmento correspondiente al gen *tuf* presente en el género *Enterococcus* (19).

Tabla 10. *Primers* utilizados para la amplificación del gen *tuf*.

Primer	Secuencia	Posición del nucleótido
<i>Enterococcus</i>		
Ent1	5'- TACTGACAAACCATTTCATGATG- 3'	618-639
Ent2	5'- AAC TTCGTCACCAACGCGAAC- 3'	708-729

Un ensayo de PCR descrito por Dudka-Malen y cols aplica para la detección de cuatro genotipos asociados a la resistencia a glucopéptidos (VanA, VanB, VanC-1 y VanC-2). En esta metodología, la PCR se emplea para la identificación simultánea de especies de enterococos y la resistencia a glucopéptidos. La identificación se lleva a cabo mediante la amplificación y detección de los genes *ddl*_{E. faecalis} y *ddl*_{E. faecium} que codifican para D-alanina: D-alanina (D-Ala: D-Ala) ligasas. En cambio, la detección de resistencia está basado en la búsqueda específica de genes que codifican para enzimas relacionadas con resistencia a glucopéptidos. La resistencia de tipo VanA y VanB se deben a la incorporación de D-alanil-D-lactato (D-Ala-D-Lac) en los precursores de peptidoglicanos que provoca la disminución de la afinidad por glucopéptidos (26,58)

La tabla 11 muestra las posiciones y secuencias de los oligodesoxinucleótidos. Cabe señalar que se seleccionaron *primers* de tamaño similar (17 a 19 bases) y contenido de GC entre 37-53% para evitar

variaciones en la temperatura de alineación y para permitir el uso de seis pares en una sola reacción (26)

Adicionalmente se han descrito ensayos de PCR en donde es posible inocular directamente una colonia del microorganismo en la mezcla de la reacción de PCR, esto permite la disminución de tiempos de análisis. En contraste con la hibridación DNA-DNA en donde se requieren llevar a cabo numerosos subcultivos con el objeto de obtener cantidades de DNA adecuadas (69).

4.2. Tratamiento

Los casos de endocarditis humana provocados por enterococos resistentes a la gentamicina y a los glucopéptidos pueden tratarse con la combinación de ampicilina y una fluoroquinolona, ya que estos microorganismos son susceptibles a la ampicilina y han mostrado baja resistencia a las fluoroquinolonas (83).

El régimen terapéutico vía intravenosa debe mantenerse durante un mínimo de seis semanas, sobre todo cuando la fiebre no cede dentro de las primeras 48 a 72 h. En las endocarditis por enterococos se requiere de dosis altas hasta por 10 a 14 días; evidentemente, la mayoría de los tratamientos de

Tabla 11. *Primers* utilizados para la detección simultánea de especies de enterococos y de resistencia a glucopéptidos.

Gen amplificado	Producto de PCR	Par	Secuencia (5'-3')	Posición	Contenido GC (%)
<i>VanA</i>	732	A1	+GGGAAAACGACAATTGC	175-191	53
		A2	-GTACAATGCGGCCGTTA	907-891	53
<i>VanB</i>	635	B1	+ATGGGAAGCCGATAGTC	173-189	53
		B2	-GATTCGTTCTCGACC	807-791	53
<i>vanC-1</i>	822	C1	+GGTATCAAGGAAACCTC	246-272	53
		C2	-CTCCGCCATCATAGCT	1067-1051	50
<i>vanC-2, vanC-3</i>	439	D1	+CTCCTACGATTCTCTTG	455-486	47
		D2	-CGAGCAAGACCTTTAAG	885-869	47
<i>ddl E faecalis</i>	941	E1	+ATCAAGTACAGTTAGTCT	98-116	38
		E2	-ACGATTCAAAGCTAACTG	1038-1021	39
<i>ddl E faecium</i>	550	F1	+TAGAGACATTGAATATGCC	NA	37
		F2	-TCGAATGTGCTACAATC	NA	39

endocarditis inicia con algún tratamiento empírico, después de haberse recolectado seis muestras de sangre para hemocultivo en 24 horas. Inclusive, en los casos de endocarditis clínica y/o serológica relacionados con hemocultivos negativos es conveniente tomar en cuenta la participación de enterococos, por lo que resulta adecuado aplicar la combinación sinérgica antes señalada.

El índice de recaídas de la endocarditis enterocócica es muy elevado cuando sólo se administra penicilina; por tal motivo, deben incluirse la estreptomina o la gentamicina (61,83)

Sin embargo, puesto que existen numerosas cepas de enterococos resistentes a los aminoglucósidos (17, 54) es necesario comprobar la susceptibilidad del agente causal mediante pruebas de susceptibilidad *in vitro*; de hecho, quizá la gentamicina sea el aminoglucósido más adecuado (o *menos inadecuado*), ya que la resistencia a estreptomina es más común que la gentamicina, y la nefrotoxicidad de esta última suele neutralizarse con menos dificultad. En general, se recomienda un régimen de cuatro a seis semanas, aplicando 4 millones de unidades de penicilina, cada cuatro horas, acompañadas por 1 mg/kg de gentamicina, cada 8 horas. Si el paciente es alérgico a la penicilina, ésta se puede sustituir por vancomicina, a razón de 1 g cada 12 horas (81)

En otro orden de ideas, las oxazolidininas representan una nueva clase de antibióticos sintéticos que inhiben el inicio de la síntesis proteica, al unirse selectivamente a la subunidad ribosomal 50S. El Linezolid es la primera oxazolidinina que se desarrolló, ejerce una acción bacterostática sobre los enterococos resistentes a la vancomicina y, al igual que las estreptograminas quinupristina/dalfopristina son aceptados por la FDA para el tratamiento de pacientes con infecciones por VRE (20,68,88).

Tal como puede inferirse de lo antes señalado, existen diferentes opciones para efectuar el tratamiento de endocarditis humana provocada por VRE. En este sentido, es oportuno mencionar que la la quinupristina/dalfopristina resulta eficaz en la terapéutica de la endocarditis por *E. faecium*, aunque sólo en una proporción de 4 de cada 9 casos (21,88).

Este último agente, conocido comercialmente como Synercid, corresponde a la combinación de estreptogamina A (dalfopristina) y estreptogamina B (quinupristina), los cuales actúan de manera sinérgica inhibiendo la síntesis proteica bacteriana. Desafortunadamente, ya se han reportado casos de cepas productoras de acetiltransferasa que modifican y neutralizan a la estreptogamina A (20).

La aparición de resistencia enterocócica a la vancomicina, observada más frecuentemente en *E. faecium*, ha conducido a nuevos retos terapéuticos ya que, adicionalmente, este microorganismo es también resistente a muchos otros antibióticos. Los estudios han demostrado que la nitrofurantoína es más activa contra *E. faecalis* que contra *E. faecium* y que numerosos enterococos resistentes a la vancomicina y teicoplanina son susceptibles a la quinupristina/dalfopristina. Así mismo, trabajos *in vitro* han comprobado la eficacia de la nitrofurantoína contra *E. faecalis* y *E. faecium*, aún cuando se trata de cepas VanA y VanB positivas, lo cual resulta congruente con resultados clínicos que sugieren a dicho antimicrobiano como adecuado para tratar infecciones urinarias debidas a VRE (91).

En general, las infecciones ocasionadas por enterococos resistentes a glucopéptidos se pueden tratar con la administración de penicilina G, ampicilina o amoxicilina combinados con algún aminoglucósido (53).

En resumen, los enterococos exhiben una resistencia intrínseca a diversos antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos, por lo que el tratamiento requiere de combinaciones entre algún agente que actúe contra la síntesis de pared celular y un aminoglucósido. Sin embargo, la terapéutica asociada a pacientes afectados por VRE es aún más problemática, especialmente cuando las cepas también son resistentes a ampicilina y/o a algunos aminoglucósidos. Por este

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO Y TRATAMIENTO

motivo, destacan los resultados exitosos con el Linezolid sumado a la gentamicina, en lo referente al tratamiento de las bacteriemias ocasionadas por VRE (44).

CONCLUSIONES

- Los enterococos han adquirido recientemente una mayor relevancia en el campo de la salud pública, en virtud del notable incremento de infecciones nosocomiales debidas a este microorganismo. las cuales frecuentemente se transmiten y se propagan entre los internos vía el instrumental clínico y/o a través de las manos del propio personal médico y paramédico. En tal sentido, resulta indispensable establecer nuevas medidas tendientes a prevenir la diseminación de esta bacteria en el ambiente intrahospitalario.
- Aún no se conocen con certeza todos los factores de virulencia de los enterococos; hasta ahora, los más estudiados son la sustancia de agregación (AS), la citolisina, la gelatinasa y las bacteriocinas.
- La AS representa el más destacado factor de virulencia de los enterococos; corresponde a una proteína superficial, codificada por el plásmido pAD1, que incrementa la adherencia e internalización del microorganismo a los macrófagos, promueve la supervivencia intrafagocitaria y participa en la conjugación de plásmidos y en la adherencia enterocócica a diversos tejidos humanos.

- Los enterococos implicados en las actuales infecciones nosocomiales son multirresistentes, e inclusive, la mayor parte de las cepas no son susceptibles a la acción de la vancomicina, antimicrobiano perteneciente al grupo de los glucopéptidos que venía representando la opción más efectiva en la terapéutica correspondiente. Dicha resistencia se asocia a mutaciones al azar pero, sobre todo, a un eficaz mecanismo de conjugación de plásmidos potenciado por la participación de feromonas.
- La participación del laboratorio clínico resulta determinante tanto en la detección de los focos infecciosos intrahospitalarios como en el diagnóstico y la selección del tratamiento de las enterococcias. En este aspecto, los métodos microbiológicos existentes suelen ser confiables, aunque su exactitud, sensibilidad y rapidez son menores que los aportados por las técnicas moleculares.

1. Angeletti SA, Lorino G, Gherardi G, Battistoni F.: Routine molecular identification of enterococci by gene-specific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing, *Journal of Clinical Microbiology*, 2001; 39(2): 794-797
2. Arduino RC, Murray BE, Rakita RM: Roles of antibodies and complement in phagocytic killing of enterococci, *Infection and Immunity*, 1994; 62(3): 987-993.
3. Arthur M, Quintiliani R.: Regulation of Van A- and Van B-Type glycopeptide resistance in enterococci, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001; 45 (2): 375-381.
4. Atlas RM.: *Handbook of Microbiological Media*, USA, CRC Press, 1993; pp. 343-345. 338-339.
5. Audisio MC, Oliver G, Apella MC.: Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*, *International Journal of Food Microbiology*, 2001; 63: 235-241
6. Bishara J, Sagie A, Samra Z.: Polymicrobial endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1999; 18: 674-675.
7. Bonomo RA.: Multiple antibiotic-resistant bacteria in Long- term- care facilities: an emerging problem in the Practice of Infectious Diseases, *Clinical Infectious Diseases*, 2000; 31: 1414-1422.
8. Bonten MJM, Hayden MK, Nathan C.: The epidemiology of patient colonization and environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci: the challenge for infection control, *Lancet*, 1996; 348: 1615-1619.
9. Boyle JF, Soumakis SA, Rendo A, Herrington JA.: Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci, *Journal of Clinical Microbiology*, 1993; 31 (5) 1280-1285.

10. Braak N, Goessens Wil, Belkum A, Verbrugh HA.: Accuracy of the VITEK 2 System to detect glycopeptide resistance in enterococci, 2001; 39(1): 351-353.
11. Bradley DJ, Rajeshwari VA, Gilmore MS.: *Enterococcus faecalis* localization in experimental endophthalmitis: Role of plasmid- encoded aggregation substance, Infection and Immunity, 1998; 66(2): 843-848.
12. Brock TD, Madigan MT.: Microbiología, México, Prentice Hall, 1993; pp.836-837.
13. Butaye P, Devriese LC, Haesebrouck F.: Phenotypic distinction in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains between susceptibility and resistance to growth-enhancing antibiotics, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999; 43 (10): 2569-2570.
14. Buttaro BA, Antiporta MH.: Cell associated pheromone peptide (cCF10) production and pheromone inhibition in *Enterococcus faecalis*, Journal of Bacteriology, 2000; 182: 4926-4933.
15. Callewaert R, Hugas M, Vuyst DL : Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages, International Journal of Food Microbiology, 2000; 57: 33-42.
16. Campo R, Tenorio C, Jiménez DR, Rubio C.: Bacteriocin Production in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus* isolates of different origins, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001; 45(3): 905-912.
17. Chow JW.: Aminoglycoside resistance in enterococci, Clinical Infectious Diseases, 2000; 31: 586-589.
18. Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P.: Characterization of the chromosomal *aac(6')-II* gene specific for *Enterococcus faecium*, Antimicrobial Agents Chemotherapy. 1993; 37: 1896-1903.
19. Danbing KE, Picard FJ, Martineau F, Ménard C.: Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci, Journal of Clinical Microbiology, 1999; 37(11): 3497-3503.

20. Davis DV, McApline JB, Pazoles CJ, Talbot MK. *Enterococcus faecalis* multi-drug resistance transporters: Application for antibiotic discovery, *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*, 2001. 3(2): 179-184
21. Deforges L, Legrand P, Tankovic J.: Case of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection associated with a transjugular intrahepatic portosystemic shunt that was treated with quinupristin/dalfopristin after bacteremia persisted with alatrofloxacin therapy, *Clinical Infectious Diseases*, 1999, 29 : 954-955.
22. Devriese LA, Pot B, Collins MD.: Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of the phylogenetically distinct enterococcal species and species groups, *Journal of Applied Bacteriology*, 1993; 75: 399-408.
23. Donabedian S, Hershberger E, Thal LA, Chow JW, Clewell DB.: PCR fragment length polymorphism analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38(8): 2885-2888.
24. Dunny GM, Cleary PP.: " Gene Transfer" y "Cell-Cell interactions and conjugal transfers events mediated by the pheromone inducible plasmid transfer system" y "Comparative analysis of cAD1 and cCF10- induced aggregation substances of *Enterococcus faecalis*" en *Genetic and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*, American Society of Microbiology, 1991, Washinton,D.C, USA.
25. Dunny GM, Cleary PP.: "Comparative analysis of cAD1 and cCF10- induced aggregation substances of *Enterococcus faecalis*" en *Genetic and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*, American Society of Microbiology, 1991, Washington D.C., USA.
26. Dudka MS, Evers S, Courvalin P.: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*; 33(1): 24-27.
27. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, y cols.: Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection, *Clinical Infectious Diseases*, 1995; 20: 1126-1133.

28. Edwards DD: "Enterococci attract attention of concerned microbiologists" en *ASM News*, USA, 2000; 66 (9): pp.540-545
29. Facklam RR, Collins MD.: Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme, *Journal of Clinical Microbiology*, 1989; 27 (4): 731-734.
30. Feringham D, Wilson APR, Quintana AI, Grüneberg RN.: *Enterococcus* species in urinary tract infection, *Clinical Infectious Diseases*, 1992; 15: 295-301.
31. Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME.: Enterococci at the crossroads of food safety?, *International Journal of Food Microbiology*, 1999; 47: 1-24.
32. Garbutt JM, Ventrapragada M: Association between resistance to vancomycin and death in cases of *Enterococcus faecium* bacteremia, *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 30: 466-472.
33. Garrote FG, Cercenado E, Bouza E: Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci, *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38(6): 2108-2111.
34. Garza VR, *Manual de Prácticas de Bacteriología*, Facultad de Química, UNAM.
35. Giacometti A, Cirioni O, Schimizzi AM, Prete MS.: Epidemiology and microbiology of surgical wound infectious, *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38 (2): 918-922
36. Gilmore SG.: "*Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin" en *Genetic and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci*, American Society of Microbiology, 1991, Washington D.C., USA.
37. Gloria MD, Carvalho S, Teixeira LM, Facklam RR.: Use of tests for acidification of methyl- α -D-glucopyranoside and susceptibility to efrotomycin for differentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera, *Journal of Clinical Microbiology*, 1998; 36 (6) 1584-1587.
38. Gordts B, Landuyt HV, Ieven M, Vandamme P.: Vancomycin- resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients, *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; 33 (11): 2842-2846.

39. Guzman C, Pruzzo C. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infection and Immunity*. 1989, 57: 1834-1838.
40. Hancock LE, Gilmore SM: "Pathogenicity of Enterococci" en *Gram Positive Pathogens*, 2000, USA, ASM Press. 2000, pp 251-258.
41. Hayden MK.: Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci, *Clinical Infectious Diseases*, 2000; 31: 1058-1065.
42. Jolt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JJ. "Gram-positive cocci" en *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA, Williams and Wilkins, 1994; pp. 528, 535, 538-539.
43. Karchmer AW.: Nosocomial bloodstream infectious: organisms, risk factors, and implications, *Clinical Infectious Diseases*. 2000; 31 (Suppl 4): S139-143.
44. Kauffman CA: Successful treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia with linezolid after failure of treatment with synergid (quinupristin/ dalfopristin), *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 30: 403-404.
45. Kim WJ, Weinstein RA, Hayden MK.: The changing molecular epidemiology and establishment of endemicity of vancomycin resistant in enterococci at one hospital over a 7-year period, *Journal of Infectious Diseases*, 1999, 179: 163-171.
46. Kohner PC, Patel R, Uhl J, Garin KM.: Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion, and automated Vitek Methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp. to vancomycin, *Journal of Clinical Microbiology*, 1997; 35(12): 3258-3263
47. Kollef MH: Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients, 2000; 31(Suppl 4): S131-S138.

58. Malen SD, Evers S, Courvalin P.: Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; 33(1) 24-27.
59. Mc Gowan JE.: The impact of changing pathogens of serious infections in hospitalized patients, *Clinical Infectious Diseases*, 2000; 31 (Suppl 4): S124-S130.
60. Mc.Faddin J.: "Enterobacteriaceae y otras bacterias intestinales" en *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia médica*, México, Ed. México Panamericana, 1991; pp. 258-274
61. Megran DW.: Enterococcal endocarditis, *Clinical Infectious Diseases*, 1999; 15 63-71.
62. Merlino J, Siarakas S, Robertson GJ.: Evaluation of CHROMagar orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species, *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34 (7): 1788-1793.
63. Murray BE.: β -lactamase producing enterococci, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1992; 36: 2355-2359.
64. Muscholl SA.: Cloning and functional analysis of Asa 373, a novel adhesin unrelated to the other sex pheromone plasmid- encoded aggregation substances of *Enterococcus faecalis*, *Molecular Microbiology*, 1999; 34(3): 620-630.
65. Mylotte JM, Graham R, Kahler L.: Epidemiology of nosocomial infection and resistant organisms in patients admitted for the first time to an acute rehabilitation unit, *Clinical Infectious Diseases*, 2000. 30: 425-432.
66. Nicolle LE.: Urinary tract infection in Long-Term- Care Facility Residents, *Clinical Infectious Diseases*, 2000; 31: 757-761.
67. Olmsted B, Dunny M.: A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *The Journal of Infections Diseases*, 1994; 170: 1549-1556.

68. Patel R, Rouse MS, Piper KE, Steckelberg.: Linezolid therapy of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* experimental endocarditis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001; 45 (2): 621-623
69. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK.: Multiplex PCR detection of *van A*, *van B*, *van C-1*, and *van C-2/3* genes in enterococci, 1997; 35(3): 703-707.
70. Pinto B, Pierotti R, Canale G, Reali D.: Characterization of faecal streptococci as indicators of faecal pollution and distribution in the environment, *Letters in Applied Microbiology*, 1999; 29: 258-263.
71. Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP.: Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6- year validated, a population based model, *Clinical Infectious Diseases*, 1997; 24: 1068-1078.
72. Prescott.: *Microbiology, USA*, Mc Graw Hill, 4a. edición, 1999; pp. 168-169, 499-502.
73. Rakita RM, Quan VC.: Specific antibody promotes opsonization and PMN- mediated killing of phagocytosis-resistant *Enterococcus faecium*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2000, 28: 291-299.
74. Rakita RM, Vanek NN. : *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation, *Infection and Immunity*, 1999; 67: 6067-6075.
75. Rince A, Flahaut S, Auffray Y.: Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*, *International Journal of Food Microbiology*, 2000; 55: 87-91.
76. Sartingen S, Rozdzinski E.: Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro, *Infection and Immunity*, 2000; 68: 6044-6047.

77. Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JA: Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infectious in Europe, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999; 43 (10): 2542-2546
78. Sigurd D, Albrecht M.: Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst, *Infection and Immunity*, 2000; 68: 4900-4906.
79. Sreedhar R, Xiang Q: *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and Laminin as well as Collagen Type I, *Infection and Immunity*, 2000; 68: 5218-5224.
80. Swenson JM, Hindler JA, Peterson LR.: "Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance" en *Manual of Clinical Microbiology*, USA, ASM Press, 1999; pp. 1563-1566.
81. Tierney L et al.: "Endocarditis infecciosa" en *Diagnóstico clínico y tratamiento*, Manual Moderno, 32ª edición, México, 1997: pp.322-324.
82. Trick WE, Kuehnert MJ, Quirk SB.: Regional dissemination of vancomycin- resistant enterococci resulting from interfacility transfer of colonized patients, *The Journal of Infectious Diseases*, 1999; 180: 391-396.
83. Tripoli MF, Locatelli A, Adinolfi LE, Andreana A, Utili R.: Successful treatment with ampicillin and fluoroquinolones of human endocarditis due to high-level gentamicin-resistant enterococci, *European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease*, 1998; 17: 734-736
84. Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG.: Improved pulsed-field gel electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci, *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38 (11): 4242-4245.
85. Vanek NN, Simon SI.. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3- mediated mechanism, 1999; 26: 49-60.
86. Wells C, Moore A.: Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial

internalization by cultured enterocytes, *Infection and Immunity*, 2000; 68: 7190-7194.

87. Willinger B, Manafi M.: Evaluation of a new chromogenic agar medium for the identification of urinary tract pathogens, *Letters in Applied Microbiology*, 1995; 20 300-302.
88. Winston DJ, Emmanouilides C, Kroeber A, Hindler J.: Quinupristin/Dalfopristin therapy for infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 30: 790-797.
89. Wirth R.: Sex pheromone and gene transfer in *Enterococcus faecalis*, *Res Microbiol*, 2000; 151: 493-496.
90. Xu Y, Singh KV, Qin X, Murray BE.: Analysis of a gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide Biosynthesis, *Infection and Immunity*, 2000; 68(2): 815-823.
91. Zhanel GG, Hoban DJ, Karlowsky JA.. Nitrofurantoin is active against vancomycin-resistant enterococci, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001; 45 (1): 324-326.