



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

TOLERANCIA A VANCOMICINA EN
Staphylococcus aureus METICILINO
RESISTENTES AISLADOS EN PROCESOS
INFECCIOSOS PEDIÁTRICOS EN EL
HIMFG.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

INFECTOLOGIA

PRESENTA:

Dr. Guillermo Francisco Rosales Magallanes

ASESORES DE TESIS:

DRA. NORMA VELAZQUEZ GUADARRAMA

DRA. MARGARITA NAVA FRIAS



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**TOLERANCIA A VANCOMICINA EN *Staphylococcus aureus*
METICILINO RESISTENTES AISLADOS EN PROCESOS
INFECCIOSOS PEDIÁTRICOS EN EL HIMFG.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA

PRESENTA

Dr. GUILLERMO FRANCISCO ROSALES MAGALLANES

TUTOR DE TESIS

Dra. Margarita Nava Frías
Hospital Infantil de México Federico Gómez

ASESOR DE TESIS

Dra. Norma Velázquez Guadarrama
Hospital Infantil de México Federico Gómez

MÉXICO, D. F.

Febrero 2010

AGRADECIMIENTOS

- ✦ A mi Padre, Dios gracias por enseñarme que puede existir una segunda oportunidad en la vida en la cual podremos demostrar ser mejores y que dentro de tus *propósitos* no existen los *accidentes*.
- ✦ A mi padre, gracias por tus consejos por mostrarme siempre tu fuerza, que existen aun los milagros y que debemos aprender de nuestros errores.
- ✦ A mi madre por enseñarme el valor de la vida, por tu incansable fuerza de mantener tus brazos en alto, por mostrarme el corazón de Dios y que siempre existe algo de magia.
- ✦ A mis hermanas, gracias por confiar siempre en mí, por demostrarme su cariño incondicional, eso siempre lo llevo conmigo.

INDICE

• Antecedentes	1
• Definiciones	5
• Tolerancia	6
• Resistencia intermedia a Vancomicina	7
• Engrosamiento de la pared celular	11
• Planteamiento del problema	12
• Justificación.....	13
• Metodología	14
• Plan de análisis	18
• Resultados	18
• Discusión	26
• Conclusiones	30
• Perspectivas.....	31
• Bibliografía	32

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1 Evolución de la resistencia antimicrobiana de <i>S. aureus</i>	5
Figura 2 Esquematización de las características y el comportamiento de <i>S. aureus</i> de acuerdo a sus mecanismos de resistencia.....	9
Tabla 1 Mecanismos implicados en la resistencia intermedia a Vancomicina. ...	10
Tabla 2 Origen de aislamientos de cepas tolerantes a vancomicina en el HIMFG en el periodo de 2004-2009.....	19
Tabla 3 Características y comportamiento clínico de pacientes con aislamientos de <i>Staphylococcus aureus</i> Meticilino resistente.....	21
Tabla 4 Patología de base de la población estudiada.....	22
Tabla 5 Días de estancia hospitalaria. Comparativo.....	23
Tabla 6 Días de manejo antimicrobiano con vancomicina. Comparativo.....	24
Tabla 7 Esquema de defunciones y características de cada paciente.....	25

Tolerancia a vancomicina en *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes aislados de procesos infecciosos pediátricos en el HIMFG.

Rosales Magallanes G.F, *Velázquez Guadarrama N., *Nava Frías M.

Departamento de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez

ANTECEDENTES

Staphylococcus aureus, Meticilino resistente (SAMR) tolerante a Vancomicina ha emergido como agente en infecciones nosocomiales, ya se ha estudiado este fenómeno en otros microorganismos demostrando un impacto sobre el pronóstico de los pacientes.

OBJETIVO GENERAL. Describir las características clínicas de los pacientes con aislamiento de cepas de *S. aureus* tolerantes a Vancomicina aisladas de procesos infecciosos con relevancia clínica.

METODOLOGIA Estudio descriptivo, transversal de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en el laboratorio de bacteriología, excluyéndose cepas repetidas y no asociadas a infección. Determinación de títulos bactericidas y bacteriostáticos, MIC, de genes reguladores Gen Mec A y casete cromosomal, tolerancia a Vancomicina. Revisión de expedientes clínicos.

RESULTADOS. Para fines de este estudio 43 cepas de SAMR cumplieron con los criterios de inclusión; de estas 14 (32.5 %) fueron tolerantes a vancomicina y 29 (67.4%) no tolerantes, siendo terapia quirúrgica y UCIN los servicios de origen. Se inicio vancomicina en los 43 pacientes, negativización de cultivos 15 vs 6 días en aquellos con no tolerantes, estancia de 112 vs 64 días en cepas no tolerantes, siendo la patología de base determinante principal. Mortalidad de 21% en tolerantes.

DISCUSION

El aislamiento de cepas tolerantes guarda relación directa con el uso indiscriminado de antibióticos. Con relación a los factores de riesgo que incrementan la morbimortalidad incluyendo procedimientos por procesos mórbidos asociados; Debemos concientizar, capacitar y fomentar evitar presión antibiótica innecesaria para evitar emergencia de gérmenes tolerantes.

TÍTULO DEL PROYECTO

Tolerancia a vancomicina en *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes aislados de procesos infecciosos pediátricos en el HIMFG.

1. ANTECEDENTES

Staphylococcus aureus, (gr. Staphy= racimo de uvas, Kokkus= grano de frambuesa), es un microorganismo ubicuo, coco gram positivo, catalasa y coagulasa positivo, se agrupa como racimo de uvas, anaerobio facultativo, obtiene su energía por dos vías, la fermentativa y respiratoria. Patógenos para los humanos; forman parte de la microbiota humana, colonizando piel y mucosas, particularmente narinas. Su virulencia esta determinada por diversos factores bacterianos que controlan su agregación, penetración y evasión de los mecanismos de defensa,^{3,4} lo cual presumiblemente se combina con los factores ambientales y del huésped, contribuyendo a su transmisión. Comprende 36 especies, con 16 subespecies; la fermentación de manitol, ayuda a diferenciarlo de las demás especies de *Staphylococcus*. La proliferación ocurre a temperaturas de 6.5°C a 46°C, (optima de 37°C), su morfología colonial en Agar sangre se caracteriza por ser de colonias de 1-4mm de diámetro, amarillo doradas por la producción de carotenoides, también producen hemolisinas solubles.

Se ha conocido mucho acerca de su genética y microbiología en las décadas pasadas, aún no se han aclarado completamente los mecanismos patogénicos involucrados que le confieren su carácter de patógeno invasivo.

Es uno de los principales agentes etiológicos causantes de bacteriemias, infecciones del tracto respiratorio inferior, corazón, piel y tejidos blandos, por mencionar algunos¹. Se ha involucrado en eventos pandémicos el fago tipo 80/81 a mediados de los 50s. El surgimiento de cepas productoras de penicilinasas ha favorecido su supervivencia e involucro en infecciones nosocomiales; la introducción de medidas de prevención contribuyen a su control y disminución².

Aunque las infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus* no eran prevalente en los años 80, actualmente nuevos retos han surgido, la frecuencia de bacteriemias relacionadas a catéteres intravenosos y dispositivos protésicos han incrementado en forma considerable. En años recientes ha incrementado su Prevalencia en infecciones comunitarias de muchas áreas de Estados Unidos y del mundo. En 1997 se reportan los primeros casos de fracaso terapéutico por *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) definidos por concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre 8-16 µg/ml; así mismo, se han identificado en una misma colonia bacteriana cepas con resistencia heterogénea (hVISA) (CIM = 4 µg/ml), donde la resistencia esta mediada por una respuesta bacteriana hacia el antibiótico, desarrollando engrosamiento de la pared celular con el objetivo de disminuir la penetración, afectando la llegada del antibiótico a su blanco principal que son los monómeros de peptidoglicano en la membrana plasmática. Esto ha llevado a la realización de múltiples estudios en los cuales se ha demostrado la desregulación de genes que favorecen la *susceptibilidad disminuida*, la cual se define como la resistencia intermedia de *S. aureus* frente a los glucopeptidos esto según los valores de corte que son de 8-16 µg/ml.

Con respecto a la epidemiología, la incidencia de las infecciones causadas por SAMR (*Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente) es variable según los diversos estudios realizados, ya que su determinación depende de cultivos específicos y más recientemente de piel y tejidos blandos que fueron tratados de

manera empírica sin que se hayan obtenido cultivos. Según los Centros para la Prevención y Control de la Enfermedades (CDC) la incidencia de infección en niños blancos y negros menores de 2 años de edad es de 16/100,000 y 70/100,000 en Atlanta, y de 18/100,000 y 40/100,000 en Baltimore.

En la actualidad *S. aureus* continúa siendo uno de los patógenos más importantes y versátiles de la especie humana, ocupando un lugar preponderante en las infecciones de piel y tejidos blandos, osteomielitis, neumonía, endocarditis y bacteriemias, cuyo tratamiento se hace cada vez más complejo debido a la gran capacidad del microorganismo de desarrollar resistencia a los antibióticos mediante una amplia gama de mecanismos que incluyen la producción de enzimas, la síntesis de blancos moleculares de baja afinidad por los antimicrobianos, las mutaciones o modificación enzimática (e.g., metilación) de proteínas o ácidos nucleicos, la generación de formas persistentes de crecimiento lento con defectos en el transporte de electrones (conocidas como variantes de colonias pequeñas) y las alteraciones en la síntesis o la estructura de la pared celular. El tratamiento de las infecciones estafilocócicas ha evolucionado desde el inicio de la era antibiótica como consecuencia de la emergencia de la resistencia y el desarrollo de nuevos antibacterianos⁵. La penicilina empezó a utilizarse ampliamente a partir de 1944, y tan solo 2 años después, la resistencia en *S. aureus* mediada por la producción de β -lactamasas alcanzaba 6% de los aislamientos; para 1948 este porcentaje superaba 50%. Durante los años 50 se diseminaron las cepas resistentes a la penicilina, así como a los antibióticos recién introducidos eritromicina, cloranfenicol, estreptomina y tetraciclina. El problema se solucionó temporalmente a comienzos de la década del 60 con el desarrollo de las primeras cefalosporinas, cefalotina y cefaloridina, estables frente a la

betalactamasa estafilocócica, reemplazadas luego por las 6-acil penicilinas, meticilina, nafcilina y oxacilina. Infortunadamente, en 1961, el mismo año en que la meticilina alcanzó el mercado, se aisló la primera cepa de *S. aureus* resistente (MRSA, por methicillin-resistant *S. aureus*), productora de una proteína ligadora de

penicilina (PBP, por penicillin-binding protein) adicional, PBP 2A o 2', con muy baja afinidad por los β -lactámicos. Después de una diseminación inicial durante los años 60, MRSA declinó casi hasta cero en los años 70, para reaparecer a mediados de la década del 80⁶. Desde entonces es un problema creciente en los hospitales, donde alcanza hasta 50% de los aislamientos, y ha empezado a extenderse a la comunidad. Los glicopéptidos han sido el pilar del tratamiento de las infecciones por MRSA desde la introducción de estos antibióticos en 1958; sin embargo, el aislamiento de *Enterococcus* resistentes (VRE, vancomycin-resistant *Enterococcus*) y de *Staphylococcus* coagulasa-negativos con susceptibilidad disminuida a finales de la década de 1980, hicieron temer la aparición de resistencia en *S. aureus*⁷. Casi una década después, en 1997, se reportó en Japón la primera cepa con una concentración inhibitoria mínima (CIM) para vancomicina de 8 $\mu\text{g/ml}$ y el primer aislamiento con una CIM $>32 \mu\text{g/ml}$ se registró en Estados Unidos a mediados de 2002. (figura.1)

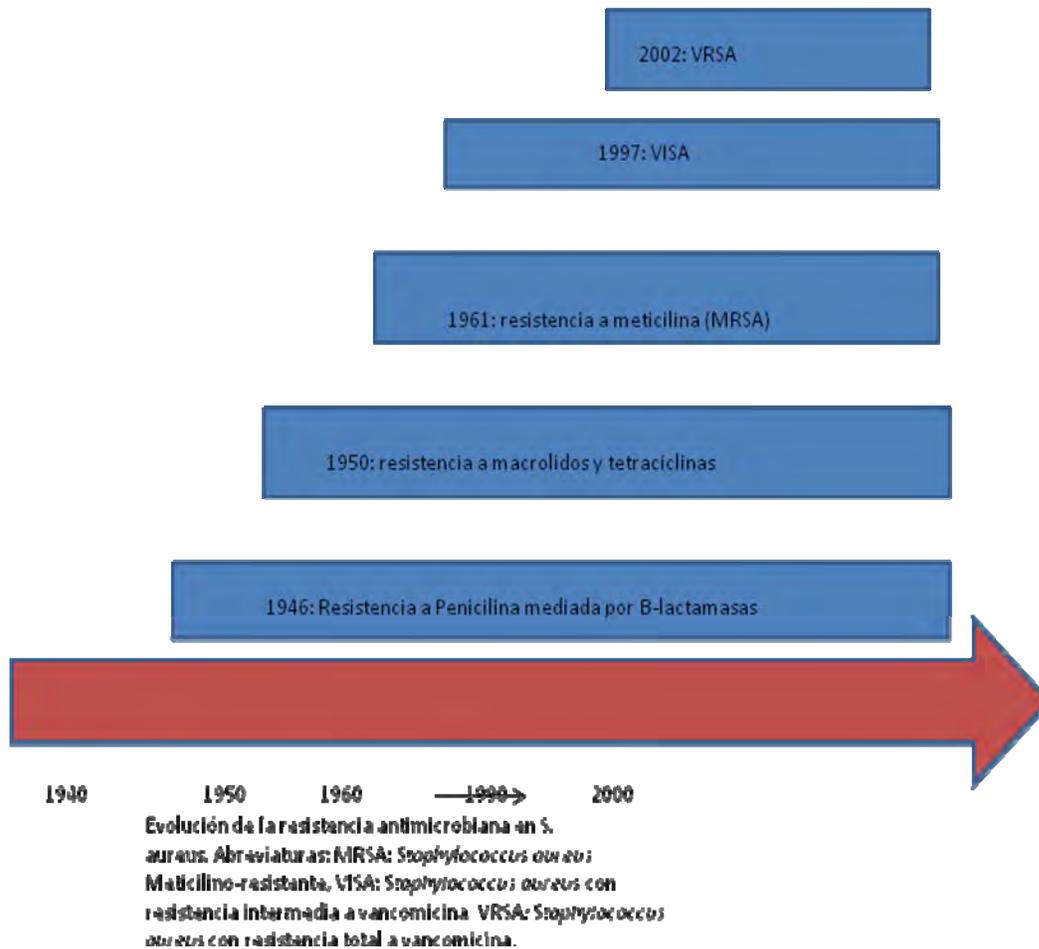


Fig. 1. Evolución de la resistencia antimicrobiana de *S. aureus* desde el descubrimiento de la Penicilina en 1928 que posteriormente se comercializo en 1940 apareciendo las primeras cepas con resistencia hasta el año 2000 que se reportan cepas con tolerancia a glucopeptidos. Tomado de Rodríguez C.A., Vesga O. Biomédica 2005; 25:575-87

1.1 Definiciones: VISA, hVISA, VRSA.

La determinación de los patrones de susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* de acuerdo a los Clinical Laboratory Standards Institute, antes NCCLS (CLSI) de los Estados Unidos ⁸ y la Sociedad Francesa de Microbiología (SFM) ⁹ establecen tres categorías: sensible (CIM ≤ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), intermedio (CIM entre 8 y 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y

resistente (CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$); mientras que la Sociedad Británica para Quimioterapia Antimicrobiana (BSAC) y el Grupo Suizo de Referencia para Antibióticos (SRGA) establecen 2 categorías: sensible (CIM ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$) y resistente (CIM ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$)^{10, 11}. Esto ha llevado al uso impreciso de los acrónimos VISA (vancomycin-intermediate *S. aureus*) y VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*). Debido a que las cepas VISA y VRSA aisladas son resistentes también a teicoplanina, se han propuesto los términos GISA y GRSA (para glycopeptide intermediate y glycopeptide-resistant *S. aureus*); sin embargo, las diferencias en los puntos de corte entre los diferentes estudios reportados para este antibiótico, y el aislamiento de cepas resistentes a teicoplanina sensibles a vancomicina, no hacen recomendable la terminología GISA y GRSA. Para fines del presente trabajo, nuestra revisión se ceñirá a los acrónimos VISA y VRSA de acuerdo con las definiciones del CLSI¹².

Existe otra categoría correspondiente a cepas de *S. aureus* con CIM = 4 $\mu\text{g/ml}$ (sensibles) en las pruebas estándar, pero que presentan subpoblaciones con CIM 8-16 $\mu\text{g/ml}$ al realizar un perfil de análisis poblacional (PAP, del inglés population analysis profile); fenómeno denominado hetero-VISA (hVISA).

1.2 TOLERANCIA

El fenómeno de tolerancia a la vancomicina se ha definido por varios autores dentro de la clasificación de Sabath como la relación que tiene la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración inhibitoria mínima (CIM) ≥ 32 (CBM/CIM ≥ 32)²⁹.

La tolerancia es la capacidad de un microorganismo de dejarse inhibir en su crecimiento, pero sin ser eliminado, a las concentraciones logradas en un fluido; es decir, la CBM está muy separada de la CIM. Es fácil lograr CIM, pero sin llegar a la CBM: inhibe el microorganismo, pero no lo mata. Este fenómeno es la tolerancia, la que se define como la capacidad de algunas especies de tolerar ciertos antimicrobianos (no todos), o sea, estos antimicrobianos las inhiben, pero no las eliminan. Esta propiedad está presente en *Enterococcus*, *Streptococcus* (algunos tipos) y *Staphylococcus*, y se manifiesta, en mayor o menor grado, frente a betalactámicos, glicopéptidos y aminoglucósidos. La tolerancia está presente en ciertos géneros, pero no es forzoso que todos los integrantes de ese género la presenten; por ejemplo, no todos los *Staphylococcus* ni todos los *Streptococcus* presentan tolerancia, como ocurre en el caso del *Enterococcus* que la presenta en todos los casos. En ciertos casos, se puede contrarrestar la tolerancia mediante la combinación sinérgica de dos antimicrobianos ²⁹.

1.3 Resistencia intermedia a vancomicina: cepas VISA

En 1997, Hiramatsu et al ¹³ reportaron el aislamiento en Japón de una cepa MRSA en un paciente de 4 meses de edad sometido a cirugía cardíaca quien, después del procedimiento, presentó fiebre y signos de infección en la herida quirúrgica. Recibió 29 días de terapia con vancomicina (45 mg/kg/día) sin respuesta, por lo que se agregó arbekacina (aminoglicósido aprobado en Japón para MRSA). Después de una mejoría inicial reapareció la fiebre y se formó un absceso subcutáneo, por lo que el tratamiento se cambió a ampicilina-sulbactam más arbekacina, y el paciente fue dado de alta 17 días después.

La cepa SAMR aislada, denominada Mu50, tenía una CIM para vancomicina de 8 µg/ml determinada por microdilución en caldo. Desde entonces

se han reportado cepas VISA en Europa, Estados Unidos, Asia y Brasil. El grupo colombiano de resistencia antimicrobiana (RESCOL), tras analizar 296 aislamientos nosocomiales de *S.aureus* en el período 2001-2002 encontró 52% de resistencia a meticilina, pero ninguna cepa VISA mediante la técnica de tamizaje en agar infusión cerebro corazón (BHIA, Brain-Heart infusion Agar) con 6 µg/ml de vancomicina según recomendación del CLSI y de los CDC. Debe anotarse que el método empleado por los investigadores de RESCOL para detectar VISA tiene una muy baja sensibilidad (22%). Los casos reportados de infecciones por VISA no permiten establecer factores de riesgo específicos; sin embargo, se encuentran algunos puntos comunes: los pacientes presentaban enfermedades de base similares (cáncer, diabetes mellitus e insuficiencia renal), la mayoría habían sido sometidos a diálisis y tenían bacteriemias asociadas con catéteres o material protésico, y habían sido expuestos a dosis plenas de vancomicina por períodos muy prolongados (entre 6 y 18 semanas) 3 a 6 meses antes de la detección de la infección por VISA ¹⁴.

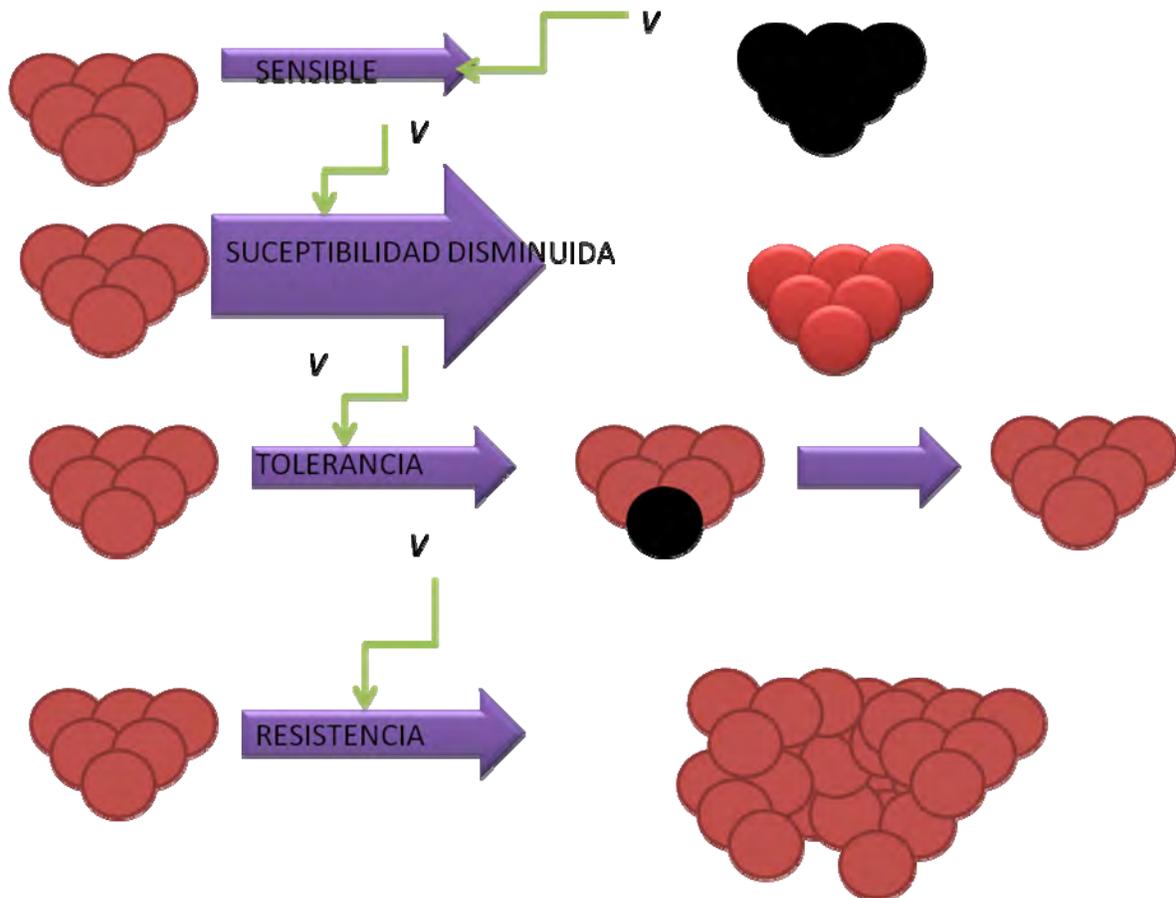


Figura2. Esquematación de las características y el comportamiento de *S. aureus* de acuerdo a sus mecanismos de resistencia. En la primera secuencia se describe la presencia de gérmenes sensibles que son lisados posterior a la exposición de Vancomicina (V); aquellos con susceptibilidad disminuida que tras la exposición a (V) engrosan su pared como mecanismo de resistencia; tolerancia que tras la administración de (V) algunas bacterias se mantienen viables generando cepas hijas ya con capacidad de sobrevivir a concentraciones mayores; resistentes aquellas que tras la exposición de (V) continúan su reproducción de manera logarítmica

Tabla 1. Mecanismos implicados en la resistencia intermedia a Vancomicina.

Tomado de Rodríguez C.A., Vesga O. Biomédica 2005; 25:575-87

MECANISMOS

ENGROSAMIENTO DE LA PARED CELULAR

Incremento de monómeros de peptidoglucano

Sobreexpresión de PBP 2 y 2^a

Aumento de la captación de GlcNAc

DISMINUCION DEL ENTRECRUZAMIENTO

Disminución en la amidación de los muropeptidos

Reducción en la expresión de PBP 4

El principal componente de la pared celular de *S.aureus* es el peptidoglucano, una matriz de polisacárido compuesta de subunidades alternantes de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNac). El paso inicial en la producción del monómero de peptidoglucano es la formación de glucosamina- 6-fosfato (GlcNH₂-6-P) a partir de glucosa, fructosa o glucosamina importadas al citoplasma desde el medio exterior. Luego GlcNH₂-6-P se modifica en GlcNH₂-1-P y es acetilada para formar UDP-GlcNAc, la cual se combina con enolpiruvato derivado de glucosa para formar UDP-MurNac.

Una L-alanina se incorpora luego al residuo UDPMurNac, seguida por D-glutamato, L-lisina, y Dalanil- D-alanina para formar un pentapéptido, constituyendo así el nucleótido de Parks ¹⁴.

Existen por tanto 2 tipos de blanco para la vancomicina: en primer lugar, los residuos libres de D-Ala-D-Ala en las capas terminadas de peptidoglicano y, en segundo, los monómeros de peptidoglicano que emergen de la membrana plasmática, los cuales son el sustrato de las transglicosilasas. La unión del glicopéptido a los primeros blancos no interfiere con la síntesis de peptidoglicano, pero sí con la transpeptidación.

1.4 ENGROSAMIENTO DE LA PARED CELULAR.

El mecanismo de resistencia a vancomicina ha sido estudiado extensamente en la primera cepa VISA, Mu50 (tabla1). Las pruebas bioquímicas y la microscopía electrónica indican que esta cepa produce mayores cantidades de peptidoglicano (debido a la mayor incorporación de GlcNAc, la mayor concentración de monómeros de peptidoglicano y la mayor producción de PBP2y 2A), y que su pared celular es más gruesa (entre 30 y 40 capas de peptidoglicano). Como consecuencia, un mayor número de moléculas de vancomicina pueden ser atrapadas antes de llegar a la membrana citoplasmática, donde actúan las transglicosilasas. Este mecanismo se ha denominado “atrapamiento de afinidad”. Además del engrosamiento de la pared, se ha observado una disminución en el grado de entrecruzamiento (cross-linking) de las cadenas de peptidoglicano, lo cual aumenta el número de D-Ala-D-Ala libres en las capas externas de la pared y por tanto más antibiótico puede ser atrapado antes de llegar al sitio de acción ²¹. Se han planteado 2 hipótesis para explicar este fenómeno: la disminución de la amidación de los muropéptidos y la reducción en la expresión de la PBP4.

Como ya se mencionó, durante las fases previas a la transferencia de los precursores de la pared celular a través de la membrana, el D-glutamato del

pentapéptido es convertido por amidación (a partir de L-glutamina que se transforma en L-glutamato al donar el grupo NH_4^+) en D-glutamina. Sin embargo, en Mu50 se encuentra una mayor proporción de muropéptidos no amidados²⁴, los cuales se consideran pobres sustratos para las transpeptidasas, lo que, en consecuencia, genera menos entrecruzamientos²⁵. El anabolismo del peptidoglicano es altamente dependiente de la disponibilidad de L-glutamina, que actúa como donante de grupos NH_4^+ para convertir fructosa-6-fosfato en GlcNH₂-6-P en la producción de UDPGlcNAc, y para producir UDP-MurNAc por medio del fosfoenolpiruvato (figura 2). La regeneración de L-glutamina a partir de L-glutamato está mediada por la enzima glutamina sintetasa, que es una de las más estrictamente reguladas en las bacterias²⁷. La vía de regulación de la glutamina sintetasa en *S. aureus* no se conoce, pero las vías intermedias son las mismas que en *Escherichia coli*, en la cual la enzima es inhibida por la GlcNH₂-6-P y activada por la presencia de 2-cetoglutarato o L-glutamato^{27,28}. En la cepa Mu50 existe evidencia de que la célula utiliza preferencialmente glucosa en lugar de glucosamina para producir peptidoglicano y, por tanto, las reservas de L-glutamina se repletan debido a la mayor producción de GlcNH₂-6-P y, subsecuentemente, GlcNAc²⁵. Lo anterior lleva a que la L-glutamina disponible para la amidación del D-glutamato en el pentapéptido de los precursores también disminuya y, en consecuencia, haya una menor transpeptidación²⁹.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de vancomicina en SAMR, es la primera línea de manejo terapéutico. A falta de respuesta clínica y microbiológica en algunos pacientes al tratamiento con vancomicina, surge la sospecha de la existencia de cepas tolerantes vs resistentes a vancomicina. Sin embargo, a nivel mundial son pocos los estudios

de aislamientos de cepas con dichas características; por lo que nos hacemos la siguiente pregunta:

¿Cuáles son las características clínicas de los pacientes ante el fenómeno de tolerancia a la vancomicina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de procesos infecciosos en el HIMFG?

3. JUSTIFICACION

A nivel mundial existen reportes de 30 hasta 70% de infecciones nosocomiales ocasionadas por SAMR, asimismo, las infecciones comunitarias por estos mismos microorganismos van en aumento.

En el HIMFG, se atienden pacientes con riesgo de desarrollo de infecciones por SAMR dado la presencia de multi-invasión por dispositivos que gracias a su composición son rápidamente colonizados por estos, esto ha favorecido el uso extendido de antimicrobianos del tipo de los glicopéptidos. Existen pocos reportes de cepas resistentes a este tipo de antibióticos. Por otra parte, a nivel mundial, son cada vez más los reportes de cepas con susceptibilidad disminuida a vancomicina. Sin embargo, en el HIMFG, como en muchos otros centros hospitalarios, aún no hay reportes de dichos aislamientos. Por otra parte, se ha observado que en cocos Gram positivos como *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus* sp, ha surgido el fenómeno de tolerancia a vancomicina, llevando a los pacientes a ha incrementar la falla al tratamiento con vancomicina incluso ocasionando la muerte.

No existe una evidencia concreta en la literatura que nos hable acerca del impacto clínico que pudiera tener el fenómeno de tolerancia a vancomicina en los aislamientos de SAMR, por lo que el presente trabajo pretende describir las características clínicas de los pacientes con infecciones relacionadas a SAMR tolerantes a vancomicina.

4. OBJETIVO GENERAL

Describir las características clínicas de los pacientes con aislamiento de cepas de *S. aureus* tolerantes a Vancomicina aisladas de procesos infecciosos con relevancia clínica.

5. HIPÓTESIS

El fenómeno de tolerancia a vancomicina en *S. aureus* condiciona mayor estancia hospitalaria, fracasos de tratamientos y mortalidad en pacientes pediátricos con procesos infecciosos relacionados.

6. METODOLOGIA

6. 1 Tipo de estudio: Descriptivo, transversal.

Tamaño de la muestra: Muestra por conveniencia: 43 cepas de SAMR

Tolerantes a vancomicina: 14

No tolerantes a vancomicina: 29

6.2 Criterios de inclusión: Se incluyeron expedientes de pacientes pediátricos con aislamientos positivos de SAMR con y sin tolerancia a vancomicina procedentes de procesos infecciosos.

6.3 Criterios de exclusión: Pacientes que hayan tenido aislamientos de patógenos diferentes a *S. aureus* y aquellos que clínicamente no tuvieron eventos infecciosos asociados a SAMR.

6.4 Criterios de eliminación: Pacientes en los que se aisló SAMR que no se le montaron pruebas para definir tolerancia y en todos aquellos que hayan presentado susceptibilidad disminuida y expedientes clínicos con información incompleta.

6.5 Variables:

Independientes: infección por *S. aureus* tolerante a Vancomicina

Dependiente: características clínicas de los pacientes.

El presente estudio consta de dos fases:

1. Fase microbiológica

Se evaluó a través de pruebas básicas de identificación; morfología colonial, tinción de gram, pruebas de catalasa y coagulasa, fermentación de manitol y crecimiento en caldo BHI con NaCl al 15%.

Se determinó susceptibilidad microbiológica para vancomicina así como los títulos bactericidas y bacteriostáticos a través de la medición de las CMI así como determinación de asociación de genes reguladores accesorios (GRA).

a. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Se realizó la CIM siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI), en dilución en agar a diferentes antibiótico; cada uno de los cuales forma parte del esquema habitual de tratamiento para infecciones estafilocócicas y pertenecen a grupos distintos de acuerdo a la CLSI.

Las determinaciones se realizaron utilizando los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (por sus siglas en inglés CLSI). Empleándose la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 como cepa control de la técnica. Los antibióticos se prepararon de acuerdo a la siguiente fórmula;

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg)}}$$

Potencia ($\mu\text{g/mg}$)

- Se prepararon diluciones seriadas del antibiótico en cuestión, y se distribuyeron en placas de agar Mueller Hinton (MH).
- Se preparó una suspensión equivalente al 0.5 de McFarland de cada uno de los aislados, a la cual se le realizó una dilución 1:10 (1.5×10^8 células/mL), posteriormente se colocó en un replicador, depositando sobre las placas con antibióticos aproximadamente de 1.5 a 3×10^5 de cada aislado.
- Se incubó 24 horas / 35°C .
- Los resultados se interpretaron según los lineamientos de la CLSI.

b. Identificación del gen *mecA* y tipificación de *SCCmec* por PCR-Múltiple

El ensayo por PCR múltiple se realizó de acuerdo con Zhang y col, con algunas modificaciones; la mezcla de reacción contiene 9 pares de oligos, incluyendo los oligos únicos y específicos para los tipos y subtipos del *SCCmec* I, II, III, IVa, IVb, IVc, IVd, y V, y los oligos para el gen *mecA*.

Para la realización de la PCR se parte de una alícuota de 2µL (100ng) de DNA puro, a la cual se le adicionó una mezcla de reacción de 23µL (buffer 1X, 2.5mM de MgCl₂, 0.2mM de; dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 1.0U de *Taq* DNA polimerasa, oligonucleotidos y agua libre de nucleasas. La amplificación se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguidos por 10 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de alineamiento a 65°C, y 1.5 minutos de extensión a 72°C y otros 25 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C, y 1.5 minutos a 72°C, terminando con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Como controles, se utilizó un control de amplificación y los controles correspondientes al elemento *SCCmec*: tipo I, tipo II, tipo III y tipo IVa (USA 300 y MW2).

c. Determinación de tolerancia a vancomicina

Se empleó la técnica descrita por Moise y col., donde se mide la muerte logarítmica a las 24 horas de adicionar 16 mg/L de vancomicina a un inóculo inicial de 10⁷-10⁸ cfu/mL en caldo Mueller-Hinton.

2. Fase clínica

Se evaluó a través de la revisión de expedientes clínicos el impacto en los pacientes a través de las diferentes variables a considerar. Haciéndose un análisis estadístico así como observacional en aquellos pacientes tratados anterior y actualmente con Vancomicina así como de sus características clínicas.

7. PLAN DE ANÁLISIS

Se realizó análisis de frecuencia simple, medidas de tendencia central y de dispersión utilizando el paquete estadístico SPSS versión 16.

8. Limitaciones del estudio: El tamaño de la muestra y la calidad de la información contenida en los expedientes clínicos.

9. RESULTADOS

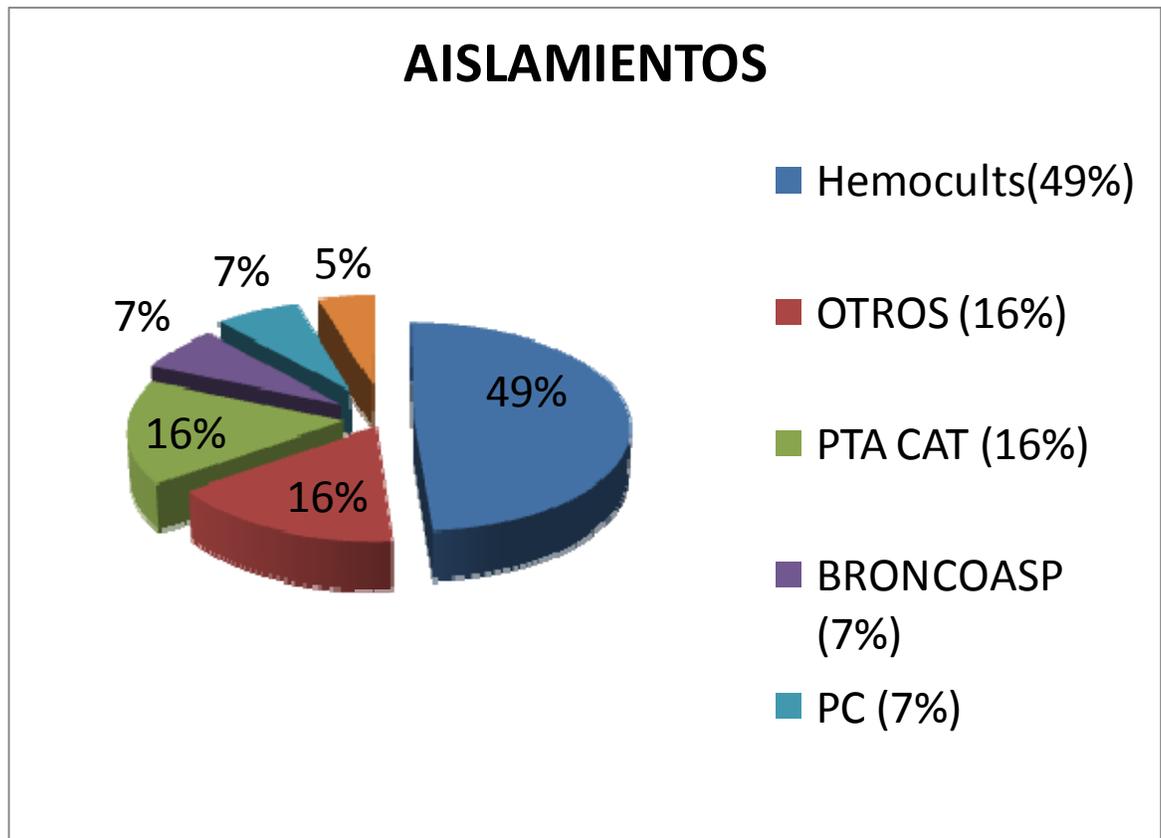
Del cepario del HIMFG se obtuvieron 75 cepas de SAMR; 32 (42.6%) no fueron integradas al estudio por ser aislamientos duplicados, contaminantes o provenir de colonizaciones.

Para fines de este estudio 43 cepas de SAMR cumplieron con los criterios de inclusión; de estas 14 (32.5 %) fueron tolerantes a vancomicina y 29 (67.4%) no tolerantes. Las cepas se obtuvieron de: sangre, líquidos corporales, heridas quirúrgicas, dispositivos intravasculares así como de derivación ventrículo-peritoneal. (Tabla 2)

9.1 Características de pacientes

Los pacientes con cepas tolerantes y no tolerantes a vancomicina, presentaban edades que variaron entre 6 días a 15 años de edad, con una media de 3 años 7 meses, con predominio del sexo masculino (tabla 4).

Tabla 2. Origen de aislamientos de cepas tolerantes a vancomicina en el HIMFG



En ambos grupo (cepas no tolerantes y tolerantes) las patologías de base correspondió en 41- 50% a cardiopatías congénitas variables (tabla 5), seguido de atresia intestinal con 17.2% (n=5).

Los servicios donde se aisló la mayor proporción de cepas tolerantes fue el de terapia quirúrgica seguido de la Unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) vs las no tolerantes que se aislaron de la UCIN seguido de terapia intermedia. En ambos grupos se colocaron dispositivos intravasculares (n=43) requiriendo recambio en 28% de aquellos con cepas tolerantes (n=4) en más de dos ocasiones por infección relacionada a los mismos. Los pacientes con cepas tolerantes mostraron datos de respuesta inflamatoria sistémica (RIS) en numero de 5 (35%) en comparación con los no tolerantes 13 (44%), la proteína C reactiva se elevo en ambos grupos en la misma proporción 3 en cada grupo. Los días de estancia hospitalaria oscilaron entre los 12-437 días en el grupo de pacientes en los que se aislaron cepas tolerantes con una media de 112 días, comparándose con aquellos con cepas no tolerantes que variaron de 10 a 180 días, con una media de 64 días en los mismos.

Una vez confirmado aislamiento se le inicio manejo con vancomicina al 100% de los pacientes con cepas tolerantes (14 pacientes), vs al grupo de pacientes con cepas no tolerantes, en los que solo se inicio vancomicina en 55% de ellos (n=16); se utilizaron dos antimicrobianos en 3 pacientes que presentaban patología infecciosa en la que se sospecho participación de bacterias gram negativas nosocomiales. La duración media del tratamiento con vancomicina fue de 6 a 15 días. En el caso de cepas tolerantes, los cultivos se hicieron negativos tras 15 días en promedio de tratamiento con vancomicina vs la media en aquellos no tolerantes que fue de 6 días, ninguno tuvo recaídas. Se reportaron tres

defunciones en el grupo de pacientes en los que se aislaron cepas tolerantes. La mortalidad en este grupo fue de 21% (Ver tabla 3) .

Tabla 3. Características y comportamiento clínico de los pacientes con infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente

Variable	Cepas tolerantes	No tolerantes
N=	14	29
Edad promedio	3A7m	4A2m
Sexo predominante	Masculino (n=8)	Masculino (n=19)
Patología predominante	Cardiopatía congénita (n=7)	Cardiopatía congénita (=12)
Servicios	Terapia quirúrgica	UCIN
RIS	5	13
Días de estancia	112 días	64 días
Días de antibiótico	15 días	6 días
Mortalidad	3 pacientes	----
Hemocultivos de control	2	1
Negativización	Si	Si
Reincidencia	No	No

Tabla 4. Patología de base asociadas en la población estudiada.

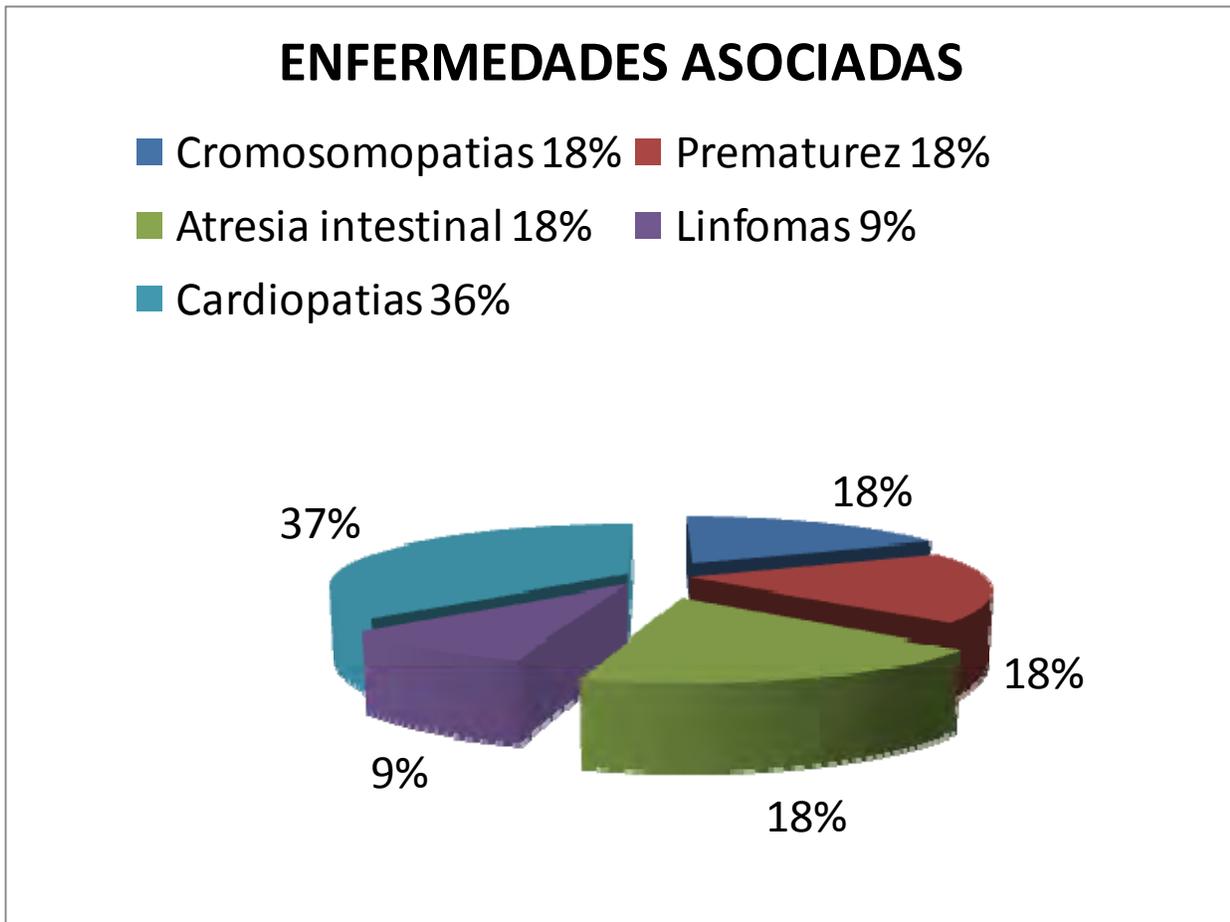


Tabla 5. Días de estancia hospitalaria con comparativo.

	CEPAS TOLERANTES	SENSIBLES
N	14	29
MEDIA	<u>112 DIAS</u>	<u>64 DIAS</u>
MEDIANA	77 DIAS	45 DIAS
MODA	180 DIAS	23 DIAS
MINIMO	12 DIAS	10 DIAS
MAXIMO	437 DIAS	180 DIAS

Tabla6. Días de manejo antimicrobiano con vancomicina. Comparativo

	CEPAS TOLERANTES	NO TOLERANTES
N	14	29
MEDIA	<u>15 DIAS</u>	<u>6 DIAS</u>
MEDIANA	15 DIAS	14 DIAS
MODA	14 DIAS	14
MINIMO	1 DIA	1 DIAS
MAXIMO	21 DIAS	21 DIAS

TABLA 7. Esquema de defunciones y características de cada paciente.

Edad	Sexo	Patología de base	Diagnostico infectologico	Esquema antimicrobiano	Días de vancomicina	Aislamientos	Días de estancia
15a	M	Tetralogía de fallot	Neumonía nosocomial	Cefepima + amikacina + vancomicina	14	148D, 378D, HC931	23
13A	M	PO LAPE, ULCERA GASTRICA PERFORADA	NEUMONIA ABSCEDADA	PIPERACILINA TAZOBACTAM/IMIPENEM	1	HC690	120
3m 18d	M	Prematurez, Síndrome de Down , Hemorragia intracraneana Hidrocefalia	CHOQUE SEPTICO	MEROPENEM + AMIKACINA + VANCOMICINA (SE CAMBIO AL 6TO DIA POR TEICOPLANINA POR PATRON DE SUSCEPTIBILIDAD)	6DIAS	HC17	95

En el grupo de cepas sensibles no se reportaron defunciones.

10.DISCUSION:

En el cepario del Laboratorio de Bacteriología Intestinal, se recuperan anualmente 2,000 cepas de las cuales 67.5% son cocos gram positivos del genero *Staphylococcus* (n=1350), de estas 10% corresponden a la especie *S. aureus*. Se han reportado en la literatura la aparición de cepas tolerantes a vancomicina por primera vez en Estados Unidos a finales de la décadas de los 90's³⁰, y se han reportado en diversas series un incremento de la aparición de cepas resistentes a meticilina de hasta 72-76%, de un numero de aislamientos los cuales se han duplicado en los últimos 3 años, tratándose de definir la relación de su aparición en la comunidad específicamente por sus capacidades de virulencia, designándose clonas USA300 por los CDC por su capacidad de diseminarse rápidamente en la comunidad³¹

En nuestro hospital no ha sido una excepción ya que en los últimos años se han reportado aparición de cepas tolerantes, dada las características de los pacientes que sufren diferentes patologías de base, las cuales consideramos han contribuido a la necesidad de estancias hospitalarias prolongadas, multi- invasión así como verse sometidos a presión antibiótica lo cual favorece a la colonización de los mismos, contribuyendo por ende a la necesidad de mas días con vancomicina, así como más días de estancia hospitalaria y costos, teniendo un impacto directo en la sobrevida de nuestros pacientes la cual disminuye considerablemente.

Se tomaron en cuenta algunas variables las cuales encontramos una correlación dependiente a la patología de base, como lo son la estancia hospitalaria y la presencia de dispositivos intravasculares. Estas variables se han visto directamente influenciadas por la patología de fondo encontrando una relación directa entre las mismas para el pronóstico de nuestros pacientes.

Ya se han descrito además en distintas publicaciones con relación a los factores de riesgo que contribuyen a incrementar la morbi-mortalidad los cuales incluyen la necesidad de procedimientos complejos por procesos mórbidos asociados así como colocación de prótesis, catéteres de drenaje, válvulas cardíacas, entre otros favoreciendo la colonización por estos agentes, así como la presión antibiótica innecesaria, el uso inapropiado de los antimicrobianos generando aparición de estos patógenos ³².

Con las observaciones realizadas en este estudio tras la realización del análisis estadístico se ha visto que incrementa el número de días de estancia, necesidad de mas días de manejo antimicrobiano, así como aumento en la mortalidad, incrementando con esto los costos por paciente, días/cama, estancias prolongadas aumentando el riesgo de aparición de complicaciones, desde las sobre infecciones por agentes nosocomiales y por oportunistas, necesidad de multiinvasión, cayendo en un círculo vicioso que aumenta más la morbi-mortalidad.

Ya se ha discutido previamente en el uso apropiado de antimicrobianos con el fin de homogeneizar manejos y disminuir las resistencias bacterianas, tema que ha sido manejado en simposios internacionales y paneles de expertos, aun y a pesar de esto existe presión por parte de los servicios por el manejo en ocasiones no justificado de glucopeptido en el paciente críticamente enfermo, siendo esto uno de los principales generadores de esta tendencia actual con *Staphylococcus aureus* ³³.

El fenómeno de tolerancia se ha analizado previamente en distintos trabajos desde su aparición, reportándose prevalencia de hasta un 18% en Hospitales Sudamericanos, comparados con nuestro hospital donde en los últimos años ha habido un incremento de las mismas, así como los reportes de aparición de cepas

tolerantes en la comunidad como previamente he comentado, habiendo un incremento en la aparición de resistencias a diversos antibióticos que van desde un 36-44% en un estudio previamente realizado en nuestro hospital ³⁴ ocupando en quinto lugar de aislamientos *Staphylococcus aureus*, hasta el 2003 en el CMNSXXI no se habían reportado aislamientos de cepas con tolerancia a Vancomicina ³⁴, y desde su aparición en nuestro hospital ha tenido una trascendencia clínica por el incremento en los costos de manejo, observándose que en servicios claves como los son la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) de nuestro hospital aparición de estas cepas, en Urgencias y Terapia Intermedia comparados con otras series que reportan las Unidades de manejo de pacientes en estado crítico los sitios donde mayormente se han aislado las mismas cepas ³⁵ encontrándose incidencias de hasta 37% y hasta 68% de aislamientos en la comunidad, en reportes de Japón y en Estados Unidos. Por lo que debemos insistir en los programas de control y uso discriminado de antimicrobianos, clínicas de catéteres en las que se promueva la poca manipulación y curación apropiada de los mismos, programas que han tenido éxito en otros hospitales de nuestro país, reportando una tasa de colonización y por lo tanto de bacteriemias menores al 1%. (INCMNSZ)

Se han analizado en estudios anteriores la tolerancia a vancomicina en otros patógenos, como lo son *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus sp.* ³⁶ ya estando bien descritos que existe impacto clínico en los pacientes que se encuentran con procesos infecciosos relacionados a los mismos, en nuestro estudio analítico observamos una tendencia a disminución de los días de hospitalización, así como los días de tratamiento con vancomicina y la mortalidad en nuestros pacientes, a pesar de ser una pequeña muestra, no podemos hacer un análisis comparativo ya que no existen en nuestro hospital estudios en los cuales se haga esta determinación considerando prudente dar un seguimiento al mismo siendo este solamente la antesala de un estudio mayor a posteriori, siendo

de suma importancia determinar las causalidades y poder definir así cual es el peso de *Staphylococcus aureus* y su participación en la mortalidad de los mismos, ya se ha discutido en párrafos anteriores la asociación de factores de riesgo (Fig. 3) y su incremento en la morbi-mortalidad encontrando una tendencia escalonada en nuestros pacientes que se encontraron con una asociación de dos o más factores que es directamente proporcional con relación a la mortalidad, aun así insistimos en dar un seguimiento a este estudio.

11.CONCLUSIONES

1. En los pacientes de los que se aislaron SAMR tolerantes y no tolerantes a vancomicina, no se apreciaron diferencias entre edad, sexo, desarrollo de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica y valores de reactantes de fase aguda.
2. En ambos grupos de pacientes con aislamiento de SAMR tolerantes y no tolerantes, predominó aquellos con cardiopatía congénita.
3. El 100% de nuestros pacientes tuvieron dispositivos intravasculares.
4. Los servicios donde predominó el aislamiento de ambos tipos de cepas de SAMR fueron la UCIN y Terapia Quirúrgica e intermedia.
5. Los pacientes de la UCIN cursaron con el mayor tiempo de estancia hospitalaria (hasta con 437 días), esto secundario a comorbilidad asociada, múltiples eventos de infecciones nosocomiales.
6. La falta de respuesta clínica a vancomicina, condicionó un mayor número de días de manejo antibiótico.
7. De acuerdo a los hallazgos encontrados en las cepas estudiadas, es importante señalar, que los servicios donde se hace uso indiscriminado de la vancomicina, se está presentando el fenómeno de tolerancia a glucopeptidos en cepas de SAMR, preámbulo del riesgo de aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a vancomicina en nuestro hospital.

12. PERSPECTIVAS

1. Promover y concienciar sobre el uso racional de antibióticos, con el fin de evitar el uso indiscriminado de los mismos, con especial énfasis en servicios donde se está presentando el fenómeno de tolerancia.
2. Formación de la clínica de catéteres en los cuales haya personal especializado que se encargue exclusivamente de la manipulación de dispositivos intravasculares con el fin de disminuir el riesgo de colonización de los mismos.
3. Implementar vigilancia epidemiológica activa que involucre la implementación de estrategias de capacitación en el personal implicado en eventos infecciosos nosocomiales.
4. Fomentar la comunicación interdepartamental en los distintos servicios de nuestro hospital con el fin de normar un pensamiento uniforme con respecto al manejo y control de antibióticos.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Diekema DJ, Pfaller MA, and Schmitz FJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the sentry antimicrobial surveillance program, 1997 -1999. Clin Infect Dis 2001;32(Suppl 2):S114–32
2. Henry R. Shinefield, MDa,*, Naomi L. Ruff, PhDb Staphylococcal Infections: A Historical Perspective, Infect Dis Clin N Am 23 (2009) 1–15
doi:10.1016/j.idc.2008.10.007
3. Carlos Andrés Rodríguez, Omar Vega, *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina ; Biomédica 2005;25:575-87
4. Moreillon P, Que Y-A, Glauser M. *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal toxic shock) in: Mandell G, Benett J, Dolin R. editors. Mandell, Douglas and Benett's principles and practices infectious diseases. 6th ed. Vol2. Philadelphia: Elseiver Churchill Livingstone; 2005. P. 2321-51
5. Classics in infectious diseases "On Abscesses" Alexander Orgston (1844-1929). Rev Inf Dis 1984;6:122-8
6. Shinefield HR. Bacterial interference: its effects on nursery-acquired infection with *Staphylococcus aureus*. The Georgia epidemic. Am J Dis Child 1963;105:663-73
7. Williams RE. Investigations of Staphylococcal infection acquired in Great Britain's hospitals. Pub Health Rep 1958;73:961-70
8. Clinical laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. Sixth Edition. CLSI document M7-A6; 2003
9. Comité de l'antibiogramme de la société Française de microbiologie. Communiqué. Pathol Biol 1998; 46:1-16
10. Olsson-Liljequist B, Larsson P, Walder M, Miorner H. Antimicrobial susceptibility testing in Sweden. Scand J Infect Dis 1997;105:13-23
11. Ploy MC, Grélaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 1998;351:1212

12. Bierbaum G, Fuchs K, Lenz W, Szekat C, Sahl HG. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:691-6.
13. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46:765-6.
14. Avison MB, Bennett PM, Howe RA, Walsh TR. Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:255-60
15. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46:765-6.
16. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin- Illinois 1999. *MMWR Mortal Wkly Rep* 2000; 48:1165-7.
17. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, Maupin PS, Tenover FC, Hill BC et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerging Infect Dis* 1999; 5:147-9.
18. Kim MN, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol* 2000; 38:3879-81.
19. Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS, Cui L et al. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22:443-8
20. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63:174-229.
21. Hiramatsu K. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resist Updat* 1998; 1:135-50
22. Watanakunakorn C. Mode of action and in vitro activity of vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 1984; 14:7-18.
23. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, and Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:199-209
24. Hanaki H, Labischinski, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K. Increase in glutamine nonamidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *S. aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:315-20

25. Cui L, Murakami H, Kuwahara-Aria K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine non-amidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2276-85.
26. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmel CG et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5-14.
27. Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: Role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. *Biochemistry* 1998; 37:12802-10.
27. Bruckner R, Bassias J. Carbohydrate catabolism pathways and regulation in staphylococci. In: Fishetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, editors. *Gram Positive Pathogens*. Washington DC: ASM Press; 2000. P.339-44.
28. Linnett PE, Strominger JL. Amidation and crosslinking of the enzymatically synthesized peptidoglycan of *Bacillus stearothermophilus*. *J Biol Chem* 1974; 249:2489-9
29. Sabath LD. Staphylococcal tolerance to penicillins and cephalosporins. En: Schlessinger D, editor. *Microbiology*. ASM Press, Washington D.C., 1979, p. 299-303.
30. Naimi TS, LeDell KH, Boxrud DJ, et al. Epidemiology and clonality of community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996–1998. *Clin Infect Dis* 2001; 33:990–6.
31. McDougal LK, Steward CD, Killgore GE, Chaitram JM, McAllister SK, Tenover FC. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: establishing a national database. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5113–20.
32. Levy SB. The challenge of antibiotic resistance. *Sci Am*. 1998; 278(3):46-53.
33. Variabilidad e idoneidad de la prescripción antibiótica *Rev. Esp Enf Inf* 1999. Volumen 17 - Número 6 p. 292
34. Resistencia en bacterias aisladas en pacientes con infecciones Nosocomiales *Enf INF Microbiol* 2007 27 (1): 15-21
35. CDC updates *S aureus*: tolerance in United States 1997. *MMWR* 1997; 46:813-815
36. Arias CA, Reyes J, Zuñiga M, Cortés L, Cruz C, Rico CL et al. Multicentre surveillance of antimicrobial resistance in enterococci and staphylococci from Colombian hospitals, 2001-2002. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:59-68.
37. Mandell, Benett & Dolin, *Principles and practice of infectious diseases* 6th Ed.