



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *ENTEROCOCCUS SPP.* DE MUESTRAS DE UROCULTIVOS Y DETERMINACIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA: EN PACIENTES AMBULATORIOS (MUJERES ADULTAS), PROVENIENTES DEL ISSEMYM SATÉLITE Y DEL LABORATORIO CENTRAL DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI”.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
JOSE DAVID CARMONA GUERRERO**

ASESOR: M.C. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Aislamiento e identificación de enterococcus spp. de muestras de urocultivos
y determinación de susceptibilidad antimicrobiana: En pacientes ambulatorios
(mujeres adultas), provenientes del ISSEMYM y del laboratorio central del
Hospital de Especialidades del Centro Médico Siglo XXI.
que presenta el pasante: José David Carmona Guerrero
con número de cuenta: 9304819-6 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Agosto de 2009

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL MC. Andrea Angela Becerril Osnaya

SECRETARIO MC. Francisco López Mejía

PRIMER SUPLENTE QFB. Martha Patricie Campos Peón

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Leticia Badillo Solís

DEDICATORIAS

QUIERO AGRADECER A MI MADRE, POR HABER CREIDO EN MI Y APOYARME EN TODOS ESOS MOMENTOS DE FLAQUEZA, AHORA ESA ETAPA CULMINA AQUÍ.

GRACIAS POR TU APOYO: DAVID.

CONOCÍ MUCHA GENTE DURANTE LA CARRERA, A TODOS ELLOS QUIERO AGRADECER LOS BUENOS MOMENTOS EN LOS CUALES CONVIVIMOS, CON QUIENES PASE BUENOS MOMENTOS EN LAS FIESTAS, AQUELLOS QUE APORTARON PARA ENRIQUECER MI ESPIRITU (TANTO BUENAS COMO MALAS).

“EL TRABAJO MAS IMPORTANTE NO ES EL DE LA TRANSFORMACIÓN DEL MUNDO, SINO EL DE LA TRANSFORMACIÓN DE NOSOTROS MISMOS”.

CAROL BOITILA.

INDICE

pag.

1. INTRODUCCION _____	7
2. GENERALIDADES _____	9
2.2 ESTRUCTURA BACTERIANA _____	11
2.3 ENTEROCOCOS COMO AGENTE CAUSAL DE INFECCIONES EN EL SER HUMANO _____	15
2.4 EL RIÑÓN, ANATOMIA Y FUNCIONES _____	19
2.5 IDENTIFICACION Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD _____	21
2.6 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS _____	29
3. OBJETIVO GENERAL _____	51
4. OBJETIVOS PARTICULARES _____	51
5. JUSTIFICACION _____	52
6. METODO _____	53
7. RESULTADOS _____	57
8. ANALISIS DE RESULTADOS _____	62
9. CONCLUSIONES _____	65
10. SUGERENCIAS _____	67
11. BIBLIOGRAFIA _____	72

INDICE	Pag.
I INDICE DE FIGURAS _____	4
II INDICE DE TABLAS _____	4
III INDICE DE GRAFICAS _____	5
IV INDICE DE ABREVIATURAS _____	6
V. ANEXOS _____	68

I INDICE DE FIGURAS.	Pag.
FIGURA 1 Modelo de la pared celular de las bacterias gram positivas _____	12
FIGURA 2 Peptidoglicano componente principal de la pared celular _____	14
FIGURA 3 Sistema para la identificación y antibiograma microbiológico Vitek 60 ____	32
FIGURA 4 Diagrama de flujo _____	56
 II INDICE DE TABLAS.	
TABLA 1 Características para la identificación de especies de <i>Enterococcus</i> _____	24
TABLA 2 Genotipos de resistencia para vancomicina _____	48
TABLA 3 Repaso sobre las funciones del gen operón van A _____	50
TABLA 4 Tarjeta de identificación con las pruebas bioquímicas para diferenciar a los <i>Enterococcus faecalis</i> _____	58
TABLA 5 Tarjeta de identificación con las pruebas bioquímicas para diferenciar a los <i>Enterococcus faecium</i> _____	58
TABLA 6 Significado y abreviaturas _____	58
TABLA 7 Modalidad clínica para diferenciar las IVU _____	70

III NDICE DE GRAFICAS.

Pag.

GRAFICO1 Bacterias aisladas en los cultivos positivos _____ 57

GRAFICO 2 Relación en porcentaje de los cultivos totales _____ 59

GRAFICO 3 Resistencia de EVR vs. Antimicrobianos, representado en porcentaje ___ 60

GRAFICO 4 Resistencia y sensibilidad de los antimicrobianos contra EVS _____ 61

IV INDICE DE ABREVIATURAS.

EVS : Enterococos vancomicina sensibles

EVR : Enterococos vancomicina resistentes

IVU : Infección en vías urinarias

CDC : Control y prevención de enfermedades

MIC : Mínima concentración inhibitoria

UFC/ml : Unidad Formadora de Colonia /ml

S :Sensible

I : Intermedio

R : Resistente

NCCLS : National committee for clinical laboratory standards

BEA : Azida bilis esculina

CNA : Columbia colistina ácido nalidíxico

ECSA : Enterococcosel agar (Becton Dickinson New York USA)

PBP : Protein binding penicillin

PMN : Polimorfonucleares

GPI : Gram positive identification

GPS : Gram positive susceptibility

NaCl : Cloruro de sodio

PABA : Acido - para – aminobenzoico

DNA : Acido desoxirribonucleico

MSCRAMM: Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules

QRDR: Quinolone resistance-determining region

1.0 INTRODUCCION

Los Enterococos son importantes agentes causales de infecciones adquiridas en la comunidad y nosocomiales; en realidad, en el curso de los últimos 6 años, se han transformado en la segunda causa más frecuente de infecciones nosocomiales en los Estados Unidos y en la tercera causa más frecuente de bacteremia nosocomial. Debido a su resistencia a las penicilinas y cefalosporinas de diversas generaciones, a la adquisición de resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos y en la actualidad a la reciente aparición de resistencia a la vancomicina, estas bacterias con frecuencia están involucradas en sobreinfecciones graves en pacientes que están en tratamiento con estos antimicrobianos.

Enterococcus faecalis es el aislamiento más frecuente y está asociado al 80 a 90 % de las infecciones enterocócicas humanas. *Enterococcus faecium* se encuentra en segundo lugar y se aísla del 10 al 15 % de las infecciones.

Los factores que determinan la patogenicidad de los enterococos no se conocen bien. Algunas cepas de *E. faecalis* y de *E. faecium* producen una citolisina que funciona como hemolisina frente a eritrocitos humanos, de conejo, de caballo y bovinos (pero no de carnero), la cual es tóxica para ciertos tipos de células eucariontes. La sustancia de agregación es una proteína ligada a la superficie, codificada por un plásmido, que produce la aglutinación de los microorganismos para facilitar el intercambio de plásmidos. Se cree asimismo que esta sustancia actúa en la adherencia de los enterococos a las células de los epitelios intestinal y renal, y a las vegetaciones cardíacas en un modelo experimental de endocarditis. Las cepas de *E. faecalis* también producen feromonas, que son pequeños péptidos secretados por los microorganismos que producen transferencia de DNA plasmídico por conjugación entre cepas. También parece que estas mismas moléculas pueden funcionar como quimiotácticas para los neutrófilos, lo que colabora en el aumento de la respuesta inflamatoria a la infección. Los ácidos lipoteicoicos constituyen el antígeno grupo D de los enterococos y también pueden ser factores de virulencia por inducción de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón, lo que lleva a la modulación de la respuesta inmune. Algunas cepas de *E. faecalis* aparentemente producen también una bacteriocina codificada por plásmidos de 7.4 kDa, denominada AS-48, que posee actividad lítica para un amplio espectro de bacterias gram positivas y gram negativas. Por último, algunas cepas de *E. faecalis* producen diversas enzimas extracelulares, como gelatinasa y hialuronidasa.

Las especies de Enterococos producen infecciones complicadas del tracto urinario, bacteremia, endocarditis, infecciones intraabdominales y pelvianas, infecciones de tejidos blandos y heridas, sepsis neonatal, y raramente meningitis. Han sido asociadas con cistitis, pielonefritis, prostatitis y abscesos perinefríticos; la mayoría de estas infecciones son de origen nosocomial o se asocian con anomalías estructurales o intervenciones instrumentales en el tracto urinario. Los factores de riesgo para el desarrollo de bacteremia son: inmunodepresión o el debilitamiento producidos por prematuridad, diabetes, tumores malignos e infecciones de localización profunda (por ej.,

úlceras por decúbito infectadas en forma secundaria), intervenciones instrumentales previas en el tracto gastrointestinal, genitourinario o respiratorio, hospitalización prolongada, y el uso de antibióticos de amplio espectro con poca o ninguna acción contra enterococos. Los microorganismos en general acceden al torrente circulatorio a través del tracto urinario.

Los antibióticos glicopeptídicos; como la vancomicina son usados en tratamientos serios cuando hay una alta resistencia por microorganismos gram positivos estos han sido usados en la clínica desde los años 30, en 1986, se aísla el primer caso de enterococo resistente a la vancomicina, desde entonces estos aislamientos se han diseminado alrededor del mundo. En 1998, arriba del 20 % de los aislamientos fueron por enterococos resistentes a vancomicina en Estados Unidos.

Los glicopéptidos actúan en los organismos gram positivos por la inhibición en la biosíntesis de la pared celular, el glicopéptido es una molécula larga compuesta de siete péptidos básicos en su estructura que son substituidos con cinco o siete anillos aromáticos con diferentes azúcares. El mecanismo de acción no se realiza con las enzimas, es el sustrato de estas, el precursor del pentapéptido peptidoglicano, los glicopéptidos forman complejos en la superficie celular con la D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) terminación final del precursor del pentapéptido peptidoglicano. Estas uniones involucran la interacción de cinco enlaces de hidrógeno, que bloquean la subsecuente transglicosilación y transpeptidación de esta etapa de la biosíntesis de la pared celular, es donde se inhibe el entrecruzamiento de estos precursores y se llega a la pérdida de la integridad estructural de la pared celular, lo cual lleva a la muerte celular.

En la composición de la pared celular con la terminación del pentapéptido en D-Ala-D-Ala con una terminación diferente en el aminoácido se modifica la susceptibilidad del blanco. Esta modificación del pentapéptido puede contener a D-Ala-D-lactato (D-Lac) o a D-Ala-D-serina (D-Ser). Los residuos que contienen D-Ala-D-Lac tienen una muy baja afinidad para vancomicina más que los residuos que contienen D-Ala-D-Ala esto se debe a la pérdida de los enlaces de hidrógeno, los residuos con terminación D-Ala-D-Ser tienen una mediana afinidad en el decremento para vancomicina comparado con los residuos con terminación en D-Ala-D-Ala.

La resistencia al glicopéptido precursor del peptidoglicano puede estar presente constitutivamente o ser inducido por glicopéptidos.

2.0 GENERALIDADES

2.1 ENTEROCOCCUS COMO UN MIEMBRO DE LA MICROFLORA DEL INTESTINO EN HUMANOS.

El cuerpo humano, con estado de salud normal, está colonizado por una comunidad microbiana, lo que constituye la “microflora normal”. Esta comunidad puede ser detectada en el tracto respiratorio alto, cavidad oral, tracto intestinal distal, vagina y piel (1, 2). Cada una de estas regiones del cuerpo es bioquímicamente e histológicamente distinto debido a las características secretoras epiteliales y glandulares, la prevalencia de los factores fisicoquímicos en cada región del cuerpo provee las condiciones que selecciona la apropiada adaptación microbiana cada sitio de colonización del cuerpo representa un ecosistema definido único en su género.

2.1.1 ENTEROCOCCUS COMO MINORÍA, PERO IMPORTANTE MIEMBRO DE LA MICROFLORA EN UN ADULTO.

Los *Enterococcus* es un miembro minoritario de la comunidad bacteriana comúnmente habitando el Intestino largo en humanos adultos (3). Análisis moleculares han demostrado que esta bacteria representa no más del 1% de la microflora intestinal en adultos. La importancia médica del *Enterococcus* estaba lejos de tener peso por el número relativamente pequeño en el contenido del Intestino, de cualquier manera actualmente las especies de *Enterococcus* tienen una categoría entre las primeras causas de infecciones nosocomiales en humanos (4).

1 TANNOCK, G.W. (ed). 1999. Medical Important of the Normal Microflora, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

2 TANNOCK, G. W. 1995. Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body. Chapman and Hall, London, United Kingdom.

3 SGHIR, A., G. Gramet, A. Suau, V. Rochet, P. Pochart, and J. Dore. 2000. Quantification of Bacterial groups within the human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 66:2263-2266.

4 EDWARDS, D. D. 2000. Enterococci attract attention of concerned microbiologists. ASM News 66:540-545.

5 MC CORMICK, J. K., H. Hirt, G. M. Dunny, and P. M. Schlievert. 2000. Pathogenic Mechanisms of enterococcal endocarditis. Curr. Infect. Dis. Rep. 2:315-321.

6 MURRAY, B. E. 1990. The life and times of the Enterococcus. Clin. Microbiol. Rev. 3:46-65.

2.1.2 PREVALENCIA DE LAS ESPECIES DE ENTEROCOCCUS EN HUMANOS.

De 17 especies de *Enterococcus* descritos, *Enterococcus faecalis* y *faecium*, se detectan comúnmente en heces humanas, *Enterococcus durans* se encuentra en pequeñas proporciones en adultos humanos sanos(4 , 5 , 6).

Enterococcus faecalis es la explicación de la mayoría de las infecciones enterococales en humanos, representa un 80% a 90% de los aislamientos clínicos, *Enterococcus faecium* en menor frecuencia (menos del 10%) pero a pesar de esto tienen significancia por la alta incidencia en resistencia a múltiples agentes bacterianos (6 , 7).

2.1.3 SURGIMIENTO DE PATÓGENOS PROBLEMÁTICOS.

Los enterococos son importantes agentes causales de infecciones adquiridas en la comunidad y nosocomiales; en realidad, en el curso de los últimos 6 años, se han considerado la segunda causa más frecuente de infecciones nosocomiales en los Estados Unidos y la tercera de bacteremia nosocomial. debido a su resistencia a las penicilinas y cefalosporinas de diversas generaciones, la resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos y en la actualidad a la reciente aparición de resistencia a la vancomicina. El *Enterococcus* resistente a la vancomicina (ERV) fue detectado por primera vez en Estados Unidos en 1989. El centro para el control y prevención de enfermedades (CDC) publicó recomendaciones para el control de la resistencia a vancomicina estas recomendaciones hicieron énfasis en lo siguiente:

1)_ La necesidad de pericia en el laboratorio para detectar *Enterococcus* resistentes a vancomicina

6 Idem 46-65.

7 DEVRIESE, L. A., and B. Pot. 1995. The genus *Enterococcus*, p. 327-367. In B. J.B. Wood and W. H. Holzapfel (ed.), *The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom

2)_ La importancia clínica de mejorar las prácticas de control, particularmente detección y aislamiento oportuno de pacientes colonizados o infectados con EVR.

El uso ampliamente difundido de aminoglucósidos en el marco clínico en los años 70 y 80 se asoció con la adquisición por parte de los *Enterococcus* de genes que codifican enzimas que modifican los aminoglucósidos, impidiendo su actividad intra – celular. Estas enzimas (adeniltransferasas, acetiltransferasas o fosfotransferasas), confieren un alto nivel de resistencia, resultado en concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) de 500 ug/ml o más.

Casos de diarrea y colitis pseudomembranosa asociadas con antibióticos eran causadas por *Clostridium difficile*. Debido a que la recomendación original para el tratamiento de colitis asociada con *C.difficile* fue vancomicina administrada vía oral se estableció el escenario para el evento de transferencia genética que creó el *Enterococcus* Resistente a Vancomicina(10 , 8).

2.2 ESTRUCTURA BACTERIANA.

2.2.1 CONSTITUYENTES DE LA PARED CELULAR DEL ENTEROCOCCUS SP.

La pared celular del enterococo puede representar un 27 % a 38% en peso seco de la célula, tres constituyentes centrales son generalmente reportados, péptidoglicano, ácidos teicoicos y polisacáridos, algunas proteínas también son mencionadas. El péptidoglicano representa un 35% a 40% de la pared celular .Y los otros dos constituyentes de la célula , el polisacárido que contiene rhamnosa y el ácido teicoico de ribitol (9,11).

8 WILLIAM R. Jarvis, MD; Ronda L. Sinkowitz-cochran, MPH 2000. Surgimiento de patógenos Problemáticos Asociados con el Cuidado de la Salud. Rev.1-16.

9 SALTON, M. R. J. 1964. The Bacterial Cell Wall. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

10 SHOCKMAN, G. D., and J.T.Martin.1968.Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*.IV. Electron microscopic observations of autolysin and lysozyme action. J. Bacteriol. 96:1803-1810.

11 SHOCKMAN,G. D., and J. F. Barrett. 1983. Structure fuction, and assembly of cell walls of gram- positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 27:501-514

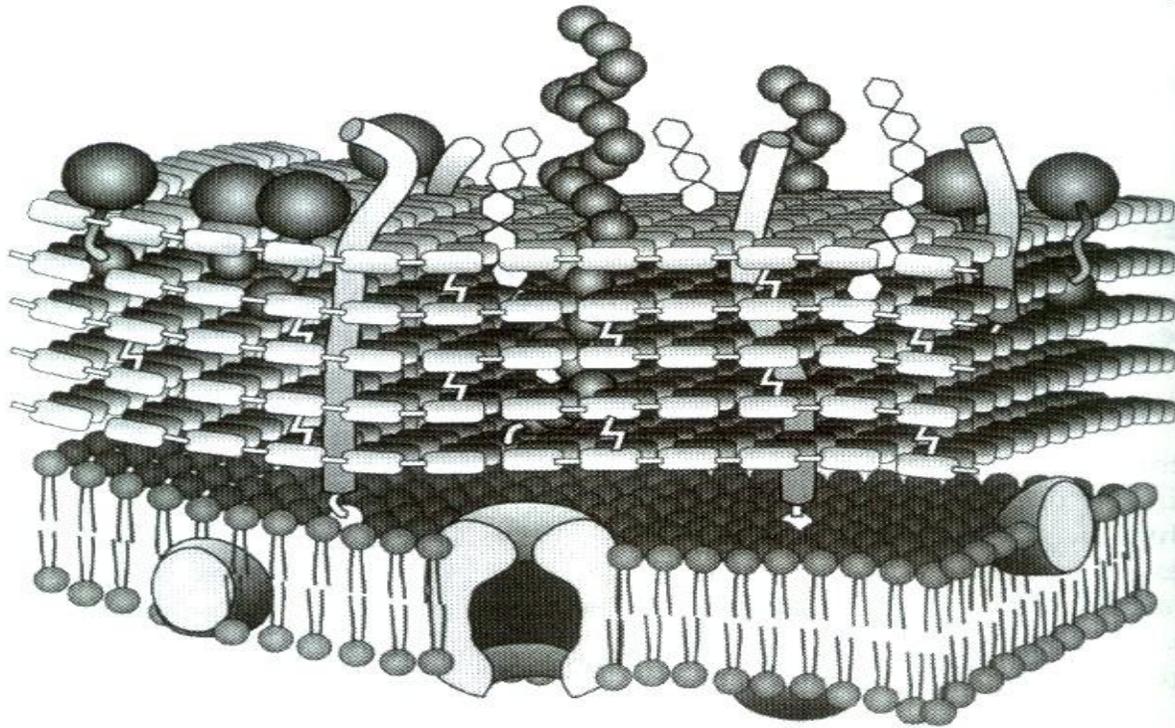


FIG. 1 Modelo de la pared celular de las bacterias gram positivo. La multicapa del péptido glicano puede cubrir la membrana citoplasmática, el cuál esta compuesto de proteínas, ácido lipoteicoico, ácido teicoico, polisacáridos y proteínas. Modificado de la referencia (82).

2.2.2 PÉPTIDOGLICANO.

El péptidoglicano es una malla rígida formada por unas cadenas lineales de polisacáridos, unidas a través de péptidos. A su vez, el polisacárido está formado por la repetición de disacáridos de N-acetilglucosamina (GlcNac, NaG,G) y de N-acetilmurámico (Mur Nac,Nam,M).

El ácido N-acetil murámico se encuentra unido a un tetrapéptido. Este péptido es inhabitual, puesto que contiene aminoácidos tanto en forma D como en forma L (en la naturaleza normalmente no se encuentran aminoácidos en forma D). Los aminoácidos tipo diamino que figuran en tercera posición son esenciales para el entrecruzamiento de la cadena de péptidoglicano.

Como ejemplos de aminoácidos tipo diamino pueden citarse la lisina y los ácidos

diaminopimélico y diaminobutírico, el entrecruzamiento con el péptido se forma entre la amina libre del aminoácido tipo diamino que se encuentra en la tercera posición del péptido y la D-alanina (D-ala) que está en la cuarta posición de otra cadena para alargar el entrecruzamiento. La forma precursora del pentapéptido posee una D-alanina extra que es liberada durante la formación del entrecruzamiento, en las bacterias gram-positivas, el péptidoglicano forma múltiples capas y presenta a menudo una conformación tridimensional, con la que se consigue una pared celular muy fuerte y rígida (12, 13 , 14 ,15).

12 ARCHIBALD, A. R., I. C. Hancock, and C. R. Harwood. 1993. Cell wall structure, synthesis, and turnover, p. 381-410. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*. ASM Press, Washington, D. C.

13 GHUYSEN, J. M. 1968. Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism *Bacteriol. Rev.* 32:425-464.

14 ROGERS, H. J., H. R. Perkins, and J. B. Ward. 1980 *Microbial Cell Walls and membranes*. Chapman and Hall, London, United Kingdom.

15 SHELEIFER, K. H., and O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36:407-477

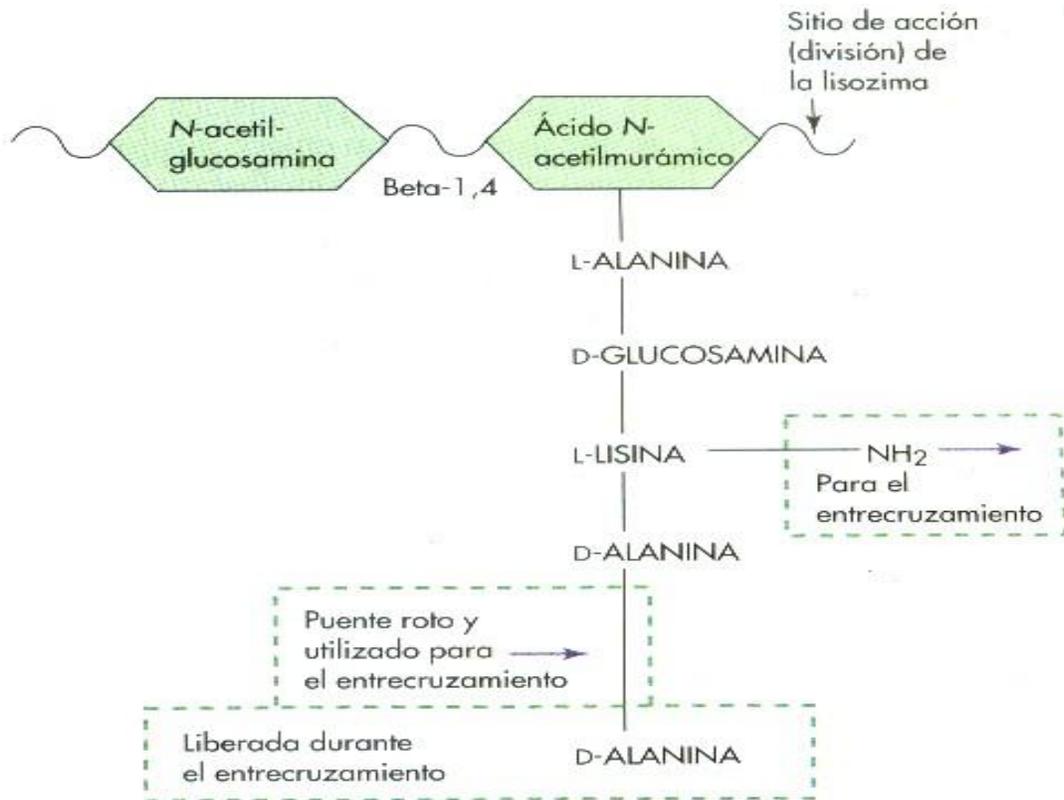


FIG. 2 Péptido glicano componente principal de la pared celular formada por unas cadenas lineales de polisacáridos, unidas a través de péptidos. Tomado de la referencia (81).

2.2.3 ACIDOS TEICOICOS.

En adición al anclaje de la membrana se encuentran los ácidos lipoteicoicos, muchas bacterias gram positivas incluyendo al *Enterococcus* sintetizan en la pared celular al ácido teicoico, los polímeros de ácidos teicoicos consiste en cualquiera de los dos componentes, glicerol fosfato o ribitol fosfato de unidades repetitivas los cuáles presentan sustituciones por glicolisación y D-alanilación, como en el citoesqueleto de los ácidos lipoteicoicos y los ácidos teicoicos son generalmente sintetizados por un sistema de enzimas por separado conteniendo residuos enantiomeros de glicerolfosfato (12).

12 ARCHIBALD, A. R., I. C. Hancock, and C. R. Harwood. 1993. Cell wall structure, syntesis, and turnover, p. 381-410. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*. ASM Press, Washington, D. C.

81 ELMER W. Koneman et. al. *Diagnostico microbiológico texto y atlas a color* 5ta edición. Ed. Medica Panamericana. Mexico D.F 1999.

2.2.4 POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR.

Mientras que el antígeno del gpo. D de los estreptococcus es el ácido lipoteicoico. La diferenciación de los restantes grupos de lancefield se basa en las diferencias antigénicas entre la predominancia estructural del carbohidrato“ C” en la pared celular en estos grupos. Para el grupo A, Mc Carty demostró que el polisacárido específico contiene glucosamina y ramnosa (16). Kitada et. al.caracterizo la composición química del polisacárido de los grupos C y G (17, 18). El grupo C se encontró contiene una alta proporción de N-acetilgalactosamina. El grupo G contiene un alta proporción de ramnosa en adición de glucosa, N-acetilglucosamina (18), el grupo B de *Streptococcus* su polisacárido consiste de ramnosa, galactosa, N-acetilglucosamina, y fósforo (19). Dentro del grupo Lancefield, por lo menos se han identificado mínimo tres distintos antígenos inmunológicos se cree que pueden ser carbohidratos, reportes de la caracterización química de este “tipo” de antígenos sugiere que los determinantes antigénicos son polisacáridos de los otros serogrupos de *Streptococcus* de Lancefield. Estos polisacáridos se determino contienen ramnosa, hexosamina y hexosa. Usando *Enterococcus faecalis* var. *Zymogenes*, ahora identificado como *Enterococcus faecalis* y *enterococcus durans*. (20 , 21 , 22 – 26).

16 MC CARTY, M., and S. I. Morse. 1964. Cell wall antigens of gram-positive bacteria. Adv. Immun. 6:249-285.

17 KITADA, K., and M. Inoue. 1996. Immunochemical characterization of the carbohydrate antigens of serotype k and Lancefield group G “Streptococcus milleri”. Oral Microbiol. Immunol. 11:22-28.

18 KITADA, K., T. Yakaushiji, and M. inoue. 1993. Immunochemical Characterization of the carbohydrate antigens of serotype c/Lancefield group C “Streptococcus milleri.” Oral Microbiol. Immunol. 8:161-166.

19 DE CUENINCK, B. J., G. D. Shockman, and R. M. Swenson. 1982. Group B, type III streptococcal cell wall: composition and structural aspects revealed through Endo-N-acetylmuramidase-catalyzed hydrolysis. Infect. Immun. 35:572-581.

20 BLEIWEIS, A. S., and R. M. Krause. 1965. The cell walls of group D streptococci: The immunochemistry of type I carbohydrate. J. Exp. Med. 122:237-249.

21 BLEIWEIS, A. S., F. E. Young, and R. M. Krause. 1967. Cell walls of group D streptococci . J. Bacteriol. 94:1381-1387.

22 ELLIOT, S. D. 1959. Group and type-specific polysaccharides of group D streptococci. Nature 184:1342.

23 ELLIOT, S. D. 1962. Teichoic acid and the group antigen of group D streptococci Nature 193:1105-1106.

24 ELLIOT, S. D. 1960. Type and group polysaccharides of group D streptococci.J. Exp. Med. 111:621-630.

25 PAZUR, J. H. 1982. beta-D-glucose-1-phosphate: a structural unit and immunological determinant of a glycan from streptococcal cell walls. J. Biol. Chem. 257:589-591.

26 PAZUR, J. H., A. Cepure, J. A. Kane, and W. W. Karakawa. 1971. Glycans from streptococcal cell walls: glycosyl-phosphoryl moieties as immunodominant groups in heteroglycans from group D and group L streptococci. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43:1421-1428.

2.3 ENTEROCOCOS COMO AGENTE CAUSAL DE INFECCIONES EN EL HUMANO.

2.3.1 INFECCIONES POR ENTEROCOCCUS.

Los *Enterococcus* son el tercer patógeno común aislado de las infecciones de torrente sanguíneo, frecuentemente reportado en infecciones de sitio quirúrgico y unidades de cuidados intensivos, y el segundo más común en patógenos nosocomiales en los Estados Unidos. Los *Enterococcus* son responsables de tres de cuatro casos en infecciones nosocomiales en torrente sanguíneo por cada 10,000 pacientes dados de alta en hospitales. Esta bacteria contribuye significativamente a la mortalidad del paciente como también a la hospitalización del mismo. La habilidad del enterococo para adquirir, acumular y transferir elementos genéticos, tales como plásmidos y transposones vía conjugación es una de las mejores razones, lo cuál incrementa la importancia como un patógeno nosocomial. La transferencia de determinantes de resistencia de los enterococos a otras bacterias Gram (+) más virulentas como *Staphylococcus*, han sido observadas in vitro. El primer aislamiento de la cepa *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina se realizó de un paciente previamente colonizado por un EVR, lo cual sugiere la posibilidad de un intercambio in “vivo” a la característica de resistencia a vancomicina. Los *Enterococcus* pueden causar una variedad de síndromes clínicos incluyendo endocarditis, bacteremia, meningitis e infecciones del tracto urinario (8).

2.3.2 PATOGENICIDAD DE LOS ENTEROCOCOS

El mecanismo por el cual el comensal se transforma en un patógeno no han sido bien entendidos, una hipótesis es que el enterococo normalmente coloniza el tracto intestinal y son detenidos por los mecanismos del hospedador, pero en algún punto

desarrolla características que ocupan nuevos nichos por una depresión del sistema inmune del hospedador. Este desequilibrio puede inducir la translocación del microorganismo del lumen del Intestino a torrente sanguíneo, eventualmente resultando en una propagación sistémica, el éxito en la evasión de las defensas del hospedador puede deberse a un exitoso incremento a la patogenicidad para el hospedador y subsecuentemente a una enfermedad, adicionándose también infecciones de un origen por cateterismo, venoso biliar, cuerpos extraños, tracto urinario, cirugías de heridas o de cavidad oral. Estudios han demostrado que los enterococos pueden también ser transmitidos a través de las manos de los trabajadores de cuidados intensivos, instrumentos quirúrgicos o de paciente a paciente (8).

2.3.3 COLONIZACION

Los enterococos normalmente colonizan el tracto gastrointestinal en los humanos sanos, un número de factores de adhesión de los enterococos han sido identificados los cuáles les confieren la capacidad de unión a la mucosa y otras superficies epiteliales lo cual facilita la colonización y la formación de vida vegetativa. La adhesión a los tejidos del hospedador es considerado como un prerrequisito para el establecimiento de una infección en muchas bacterias. La sustancia de agregación (AS), es un factor de virulencia de los enterococos que al parecer media la unión específica del enterococo al epitelio intestinal, células del epitelio renal, neutrófilos humanos y macrófagos, AS se encuentra unida a la superficie (glicoproteína), codificada por un plásmido (sex-pheromone) que media la agregación entre la bacteria y facilita la transferencia del plásmido. AS aumenta la internalización del enterococo y permite una supervivencia intracelular. En algunos estudios, AS al parecer es más común en hospitales, que en estudios de gabinete, en otros estudios no se ha encontrado diferencia.

Otra proteína de superficie celular, Ace (adhesina del colágeno de *Enterococcus faecalis*) la cuál exhibe fuertes similitudes con la proteína de unión colágeno Cna de *S. Aureus*, este componente de superficie específico de *E. faecalis* corresponde a la familia de los MSCRAMM, mediando ciertas uniones al colágeno, y quizá juegue un rol en la patogénesis de endocarditis. Similarmente, la adhesina de *E. faecalis* (Efa A) es una proteína de superficie, muestra gran similitud con diversas adhesinas de *streptococcus*, es un antígeno putativo en endocarditis y ha demostrado un rol potencial biológico en un modelo de peritonitis en ratones.

Otro factor de colonización putativo es la proteína de superficie (Esp), es una proteína asociada a la pared celular. Esp ha demostrado que contribuye a la colonización y persistencia de algunas cepas de *E. faecalis* durante la ascensión en infecciones del tracto urinario, y también parece juega un rol primario mediando la adhesión del enterococo a la superficie y así forma un biofilm (8).

8 WILLIAMS R. Jarvis, MD; Ronda L. Sinkowitz-cochran, MPH 2000. Surgimiento de patógenos Problemáticos Asociados con el Cuidado de la Salud. Rev.1-16.

2.3.4 FACTORES DE VIRULENCIA SECRETADOS

Los enterococos también secretan moléculas que son putativas como factores de virulencia por ejemplo, citolisina/hemolisina toxina codificada en un operón consiste de ocho genes, localizado en un plásmido (pheromone-responsive) o en el cromosoma, la citolisina muestra hemólisis (contra eritrocitos humanos, caballo y conejos) y tiene actividad bactericida contra otras bacterias gram positivas. La gelatinasa (Gel E) es una zinc metalloendopeptidasa extracelular secretada por *E. faecalis* acciona homológamente como la gelatinasa de las especies de *Bacillus spp.* y la elastasa de *P.aeruginosa* esta es co-transcrita con la serina Proteasa S prE y regulada por el locus (quórum-sensing-fsr). La Gel E puede hidrolizar gelatina, caseína, hemoglobina y otros péptidos bioactivos. Lo cual se conoce puede ser un potente quimio-atrayente y puede por lo tanto modular la respuesta del hospedador esto puede también jugar un rol importante en la severidad en enfermedades sistémicas (27). La gelatinasa, serina proteasa. Si bien las proteasas bacterianas se piensa que su función principal es la de proveer nutrientes peptídicos al microorganismo. Este quizá también causa daño directa o indirectamente al tejido del hospedador, en tales casos las proteasas sean factores de virulencia. Causando indirectamente la degradación del tejido conectivo del hospedador por activación de la matriz de las metaloproteasas del hospedador (28 , 29 ,36), al evadir los procesos críticos del hospedador facilita la invasión microbiana y la supervivencia en el medio ambiente del hospedador, la evasión al sistema inmune es la llave para degradar entre otros a las inmunoglobulinas y las vías del

27 STEFANIE, K. M. Hufnagel, Ch. Theilacker, J. Huebner. 2004. Enterococcal Infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *vaccine* 22:822-830.

28 BURNS, E. H., Jr., A. M. Marciel, and J. M. Musser. 1996. Activation of a 66 kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease, *Infect. Immun.* 64: 4744-4750.

29 BOYCE, J. M., S. M. Opal, *et. al.* 1992. Emergence and nosocomial Transmission of ampicillin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1032-1039.

36 OKAMOTO, T., T. Akaike, *et. al.* 1997. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J. Infect. Dis.* 170:1549-1556.

complemento (31 , 32 , 33 , 34). Esto ayuda a los procesos de virulencia de otras bacterias, dos proteasas han sido descritas para *E. faecalis* llamadas gelatinasa (metaloproteasa) y serina proteasa, las dos son reguladas y autorreguladas por el gen *fsr*. la producción de la gelatinasa y por lo tanto el fenotipo Gel pueden ser fácilmente detectado usando el agar Todd-Hewitt suplementado con 3% de gelatina o el agar Soya Trypticase suplementado con 1.5% de leche descremada. Un estudio por Kohnen et.al, demostró aproximadamente el 72% de aislamientos de *E. faecalis* de un total de 864 muestras fueron productores de gelatinasa. En reportes recientes también se ha demostrado en un pequeño porcentaje de aislamientos estos contienen el gen Gel E pero no producen la gelatinasa (35).

2.3.5 INMUNIDAD INATA CONTRA INFECCIONES RESPUESTA DEL HOSPEDADOR CONTRA INFECCIONES DE ENTEROCOCCUS.

Sorprendentemente se conoce poco acerca del mecanismo de defensa del hospedador contra infecciones de enterococos, y sólo pocos estudios han tratado de investigar esta área sistémica, la supervivencia en el hospedador de los enterococos estos deben evitar exitosamente los mecanismos de defensa tanto específicos como inespecíficos del hospedador, los patógenos Gram positivos poseen factores como la cápsula de polisacárido con función antifagocítica, proteínas de superficie como la proteína-M , o toxinas lo que asegura su supervivencia en el hospedador.

31 PLAUT, A. G. 1983 The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 37:603-622.

32 PROKESOVA, L., B.et.al. 1992. Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. Immunol. Lett.31:259-265.

33 SHULTZ, D. R., and K. D. Miller. 1974. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. Infect. Immun. 10:128-135.

34 SUNDQVIST, G., J. Carlsson, B. Herrmann, and A. Tarkivik. 1985. Degradation of human immunoglobulins G and M and complements factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. J. Med. Microbiol. 19:85-94.

35 FARROW, J. A., D. Jones, B. A. Phillips, and M. D. Collins. 1983. Taxonomic studies on some group D streptococci. J. Gen. Microbiol. 129:1423-1432.

Después de la translocación o introducción al torrente sanguíneo los enterococos son susceptibles a su muerte mediada por los neutrófilos, llevándose a cabo principalmente por el complemento y la opsonización por anticuerpos, ciertas cepas de enterococos también han demostrado ser capaces de sobrevivir dentro de las células fagocíticas, los cuáles sirven como vehículos para los enterococos y transportarlos a través de la pared del intestino y diseminarlo a distintos órganos.

Las fallas de las células fagocitarias para matar intracelularmente a los enterococos puede conducirlos a expandirse de forma sistémica, sin embargo la fagocitosis de los enterococos representa un éxito de los mecanismos de defensa del hospedador, ciertos autores concluyen que el carbohidrato estructural es el responsable para la resistencia a la muerte por las células fagocíticas (27).

2.4 EL RIÑÓN, ANATOMIA Y FUNCIONES.

2.4.1 FISILOGIA DEL RIÑÓN

La unidad funcional del riñón es la nefrona. En el glomérulo se filtran cada día unos 180 litros de líquido de la sangre, este líquido es un ultra centrifugado de sangre, ya que los elementos corpusculares y las macromoléculas no se filtran. El filtrado contiene sustancias de pequeño peso molecular en una concentración parecida a la del plasma, un 99% del ultra centrifugado se reabsorbe en el túbulo contorneado proximal o distal.

2.4.2 REGULACION DEL VOLUMEN DE ORINA

Un adulto sano debe excretar unos 500 ml / día de orina para eliminar los productos metabólicos innecesarios o perniciosos (cuando la capacidad de concentración renal

27 STEFANIE, K. M. Hufnagel, Ch. Theilacker, J. Huebner. 2004. Enterococcal Infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. vaccine 22:822-830.

es normal). Cuando no se alcanza esta cantidad se habla de oliguria (< 300 ml de orina / día), la cantidad de orina puede superar en casos poco frecuentes los 20 L / día (en la diabetes insípida).

2.4.3 ASPECTO MACROSCOPICO (ANATOMIA)

Los riñones son órganos pares rojizos en forma de frijol, localizados justo arriba de la cintura entre el peritoneo y la pared posterior del abdomen. Debido a su posición por detrás del peritoneo en la cavidad abdominal se dice que son órganos retroperitoneales. Los riñones se localizan entre la última vértebra lumbar, posición en la cual están protegidos en parte por los pares de costillas undécimo y duodécimo. El riñón derecho está un poco más abajo que el izquierdo debido a que el hígado ocupa un espacio considerable arriba del riñón derecho. En el adulto un riñón normal mide de 10 a 12 cm. de largo, de 5 a 7 cm. de ancho y 3 cm. de espesor, y tiene una masa de 135 a 150 g (79).

2.4.4 HISTOLOGIA (NEFRONA)

La unidad funcional del riñón es la nefrona, la cual está formada por un túbulo con funciones tanto secretoras como excretoras. La porción secretora está contenida en gran parte en la corteza y consta de un corpúsculo renal y de la parte secretoria del túbulo renal la porción excretoria de este túbulo está en la médula. El corpúsculo renal está compuesto del glomérulo vascular el cual hace saliente dentro de la cápsula de Bowman, cuyo epitelio se continúa con el del túbulo contorneado proximal. La porción secretoria del túbulo renal consta de: túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal.

La porción excretoria de la nefrona es el tubulo colector, el cuál se continua con el extremo de la rama ascendente del túbulo contorneado distal.

2.4.5 TEJIDO DE SOSTEN

El estroma renal esta formado por tejido conjuntivo laxo, contiene vasos sanguíneos, capilares nervios y linfáticos.

2.4.6 VEJIGA

La vejiga es un tejido muscular hueco sirve como receptáculo para la orina, la vejiga del adulto tiene una capacidad de 400 a 500 ml. La mucosa de la vejiga esta formada por epitelio de transición. Por debajo de este hay una submucosa bien desarrollada, formada en su mayor parte por tejido conjuntivo laxo y elástico, por fuera de la submucosa está el músculo vesical, constituido por la mezcla de fibras musculares lisas, distribuidas al azar en forma longitudinal, circular y espiral.

2.5 IDENTIFICACION Y PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD.

2.5.1 CARACTERISTICAS PARA LA IDENTIFICACION DE ESPECIES DE ENTEROCOCCUS.

Antes del advenimiento y uso generalizado de las técnicas genéticas para análisis taxonómicos, los enterococos se diferenciaban de los estreptococos y taxa relacionados por su capacidad de desarrollarse a 10°C y 45°C, desarrollo en presencia de 6.5% de NaCl, desarrollo a pH 9.6, capacidad de hidrolizar la esculina en presencia de 40% de Bilis, y producción de pirrolidonil arilamidasa (PYR), generalmente son no hemolíticos y en ocasiones alfa hemolíticos. Aunque se les considera catalasa negativos, a veces son débilmente catalasa-positivos.

TABLA 1 características para la identificación de especies de *Enterococcus*

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>		Producción de Ácido a partir:	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Hemólisis en ASA	γ, β	γ, α		adonitol	-	-
Antígeno grupo D	+/-	+/-		amidona	-/+	-
Desarrollo en agar bilis esculina	+	+		amigdalina	+	+
Desarrollo en caldo con NaCl al 6.5%	+	+		L-arabinosa	-	+
Desarrollo a 10°C	+	+		glucosa	+	+
Desarrollo a 45°C	+	+		glicerol	+/-	V
Motilidad	-	-		glucógeno	-	-
Pirrolidónilarginamidasa (PYR)	+	-		inositol	-	-
Leucina aminopeptidasa (LAP)	+	+		inulina	-	-
Hidrólisis de la esculina	+/-	+/-		manitol	+	+/-
Hidrólisis del hipurato	+/-	-/+		melobiosa	-	+/-
Arginina didhidrolasa	+	+		melezitosa	+/-	-
Alfa- galactosidasa	-	-		lactosa	-	+
Beta-galactosidasa	-	+		rafinosa	-	-
Beta-glucuronidasa	-	-		ribosa	+	+
Producción de H ₂ S	-	-		sorbitol	+/-	-
Producción de acetoína (VP)	ND	ND		sorbosa	-	-
Fosfatasa alcalina	ND	ND		sacarosa	+/-	V
				trehalosa	+	+
				D-xilosa	-	-/+

+, positivo; -, negativo; +/- la mayoría de las cepas positivas, algunas negativas; -/+ la mayoría de las cepas negativas, algunas positivas; V variable; ND, no se dispone de datos; ASA, agar sangre azida; adaptado de la Referencia (81).

81 ELMER W. Koneman et.al. Diagnostico microbiológico texto y atlas a color 5ta edición. Ed.Médica Panamericana. México D.F

2.5.2 METODOS USADOS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *ENTEROCOCCUS SPP.*

Basado en el sistema serológico de tipificación para enterococos desarrollado por Lancefield (1933), los *Enterococcus* reaccionan con el antisuero del grupo D. Esta observación esta de acuerdo con la clasificación sugerida por Sherman (1937) quien dividió a los *Streptococcus* en cuatro grupos:

enterococos, lácticos, viridians y pyogenes. De acuerdo con los criterios fisiológicos descritos por Sherman, los Enterococos son viables para crecer a temperaturas de 10 a 45° C, sobreviven por un tiempo de 30 min. a una temperatura de 60° C, crecen a un pH de 9.6 y en presencia de NaCl a una concentración de 6.5% (w/v). Porque tienen la habilidad de fermentar carbohidratos al isomero L-acido láctico, los enterococos son también conocidos como bacterias homo-fermentativas del acido láctico (LAB).

Básicamente los enterococos son bacterias Gram positivas anaerobias facultativos, para la detección de VRE en diferentes especies, numerosas variedades de medios y procedimientos de aislamientos se han publicado. La mayoría de las variaciones de los medios selectivos pueden diferir con respecto al antibiótico usado, tomando la revisión de diferentes formulaciones para el aislamiento de VRE se ha concluido que hasta ahora sólo un número limitado dan confianza de la comparación de los estudios realizados (38). Además, muchos de los experimentos descritos, no incluyen una evaluación estadística, según Edbery et. al. (1994), una modificación del agar sangre para *Campylobacter* puede ser usado para el aislamiento de VRE de especímenes de Gabinete, este hallazgo fue verificado por Shigei et. al.(2002) quien uso una marca comercial del medio de *Campylobacter* suplementado con vancomicina para la

búsqueda de VRE en muestras clínicas.

De la comparación de dos medios selectivos para la detección de VRE del tracto gastrointestinal, Barton y Doern (1995), concluyeron el medio azida bilis esculina (BEA), conteniendo el medio 8mg de vancomicina /L, también se utiliza el agar sangre columbia colistina ácido nalidíxico (CNA) suplementado con vancomicina con la misma concentración. Landman et.al (1996), comparando cinco medios selectivos y procedimientos para el aislamiento de VRE de pacientes y sugiriendo el medio ECSA conteniendo 60mg de aztreonam y 64mg de vancomicina /L para ser utilizados en rutina. Satake et.al. (1997) empleo tres diferentes medios selectivos y cinco diferentes agar de medio selectivo y concluyo que el medio ECSA o el medio BEA suplementado con 6mg de vancomicina /L ,son excelentes para la búsqueda de VRE en muestras fecales (38).

2.5.3 MEDIO DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO DE ENTEROCOCOS. CPS ID 2

Medio de cultivo utilizado para el aislamiento e identificación de *Enterococcus faecalis*

PRINCIPIO

El medio CPS ID 2 consiste en una base de nutrientes combinando 2 peptonas (peptona de soya y L-triptófano). Los dos substratos cromogénicos son adicionados directamente al medio para revelar la correspondiente actividad enzimática. La detección de indol y TDA es fomentada por la presencia del triptófano en el agar.

2.5.4 CARACTERIZACION DEL MEDIO CPS ID 2.

- 1) Enumeración y aislamiento de las bacterias responsables en las infecciones urinarias, por la inoculación estandarizada usando una asa calibrada.

38 KONRAND, J. D., Helmut K. M., Wolfgang K. 2003. Methods used for the Isolation, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. International J. of Food Microbiol. 88:147-164.

2) Identificación directa por la detección de la actividad enzimática de las bacterias con mayor frecuencia en los aislamientos de estas infecciones. *E. coli* se observa una coloración espontánea (rosa burgonia), estas colonias producen β – glucuronidasa (β -GUR) y por el color azul que es revelada por la reacción del reactivo 1 (dimetil amino cinemaldehído DMACA), cuando se pone en contacto con la cepa esto indica que posee la enzima triptofanasa (prueba de indol).

Enterococcus, se observa una coloración espontánea en azul de las cepas porque liberan la enzima β - glucosidasa (β - glu). *Proteus*, se observan de color café y cuando se pone a reaccionar con el reactivo 2 (cloruro férrico 10 %) tiene la capacidad de detectar la triptofanodesaminasa (TDA) (73,74,75,76,77).

2.5.5 IMPORTANCIA DE LA CMI.

La prueba de sensibilidad por difusión en disco descrita por Bauer y Kirby ha sido el estándar en los estudios de rutina de antimicrobianos durante muchos años. Con esta metodología, el agente antimicrobiano se eluye del disco y difunde hacia el agar que lo rodea. Dependiendo del fármaco, del metabolismo y de la sensibilidad del microorganismo en cuestión, tras la incubación se forman zonas de no crecimiento de diámetros variables alrededor del disco. Los tamaños de las zonas se utilizaron para

73 DE MONCLOS M. Carret G. 1992. Optimisation de l'examen cyto-bactériologique Urinaire spectrabio-logique. 92/2. 49-53.

74 HARREWYN. L. Bissardon. O. Mounier. M. et. al. 1990. Identification et Numeration Rapide des gemmes urinaires sur boite contenant des substrats chromogenes Et fluorogenes. Revue Francaise des Laboratorios. 1990. 212:73-77.

75 KILLAN. M. Bulow. P. 1979. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Use of a glucuronidase detecting agar medium (PGUA Agar) for identification of *E. coli* in primary cultures of urine samples. Acta path. Microb. Scand., 87:271-276.

76 MANAFI. M. Kneifel. W. Bascomb. S. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostic. Microb. Rev. 55:348-355.

77 RALOVICH. B. Ibrahim. G. A. M. Fabian .A. et. al. 1991. Beta-D-glucuronidase (BDG) activity of Gram-Negative bacteria. Acta Microbiologica Hungaritas 38:283-291.

desarrollar estándares interpretativos para antimicrobianos de uso común y microorganismos comunes de rápido crecimiento.

Este método informa cualitativamente (sensible, intermedio o resistente) de la sensibilidad relativa de estos microorganismos en suero. El resultado obtenido puede mostrar poca correlación con la sensibilidad real del microorganismo en otras localizaciones corporales diferentes del suero. Algunos microorganismos considerados resistentes pueden ser sensibles a niveles más altos alcanzables clínicamente, y otros considerados sensibles puede que no respondan al tratamiento en localizaciones corporales donde no se alcanza la concentración adecuada. Se han detectado algunos déficits con el método de difusión en disco:

1. Resultados incongruentes en microorganismos moderadamente sensibles o moderadamente resistentes.
2. Resultados incongruentes en localizaciones corporales distintas en suero.
3. Incapacidad para indicar la adecuación de varios fármacos ante los cuáles el microorganismo aparece como sensible.

Una limitación importante de los informes “S, I, R” obtenidos por la técnica de Kirby-Bauer es que estas determinaciones se basan principalmente en concentraciones de antimicrobianos alcanzables en suero de las dosis estándares según el prospecto del fármaco (habitualmente vía oral).

2.5.6 SIGNIFICADO DE LA CMI.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la mínima concentración de un agente antimicrobiano (expresada en microgramos por mililitro) que inhibe el crecimiento in-vitro de un microorganismo. Los resultados de la CMI son más cuantitativos que cualitativos, permiten detectar grados distintos de sensibilidad o resistencia y no se ven

influidos por las propiedades de difusión del antimicrobiano. El método de CMI proporciona una información más precisa con la cual se puede seleccionar el tratamiento antimicrobiano adecuado y asegurar la dosis y la vía de administración más apropiadas para conseguir una concentración inhibitoria in vivo en el lugar de la infección.

Con la CMI cuantitativa:

- 1) La sensibilidad se puede determinar para dosis y vías de administración distintas de las prescritas habitualmente.
- 2) Puede relacionarse con mayor precisión la sensibilidad y la concentración de antimicrobiano alcanzable en la orina, la bilis u otros fluidos corporales, que pueden variar ampliamente de la concentración alcanzable en suero (36).

2.5.7 INTERPRETACION DE LAS CMI

Que se considere un determinado organismo “sensible” o “resistente” a un agente antimicrobiano específico no siempre refleja con exactitud la respuesta in-vivo del antimicrobiano, como los antimicrobianos alcanzan distintas concentraciones en diferentes sitios del cuerpo, el valor de la CMI se puede correlacionar con distintas dosis y vías de administración. Una regla general del tratamiento antimicrobiano es que la concentración del fármaco alcanzada in- vivo debe ser entre dos y cuatro veces el valor de la CMI in vitro. Esta pauta tiene que seguirse debido a la fluctuación del nivel sérico del fármaco tras la inyección o la administración oral, el nivel máximo en suero normalmente desciende rápidamente hasta un nivel mínimo mucho más bajo, A pesar de esto, el nivel sérico esperado sigue siendo útil para predecir la sensibilidad o la resistencia de una cepa bacteriana, la determinación in vitro de la CMI no es el único factor que debe considerarse para la selección del agente antimicrobiano deben considerarse otros factores:

1. Mecanismo de acción del antimicrobiano.
2. Características de unión a proteínas del fármaco.
3. Edad, peso y estado general de salud del paciente. Este incluye factores como función renal y hepática, alergias del paciente y enfermedad de base no infecciosa.
4. Toxicidad potencial del fármaco.
5. Interacción con otros medicamentos.
6. Lugar de la infección, incluidos factores como obstrucción, absceso o cuerpo extraño.
7. Vía de administración.
8. Patogenicidad del microorganismo infeccioso.
9. Eficacia clínica del fármaco.

Todas estas consideraciones deben ser analizadas adecuadamente antes de poder seleccionar el agente apropiado.

Hay varios métodos de informar al médico de las CMI:

- I. Informar únicamente del valor numérico de las CMI y hacer que el médico, basándose en sus conocimientos, decida el antimicrobiano y la vía de administración más apropiados.
- II. Informar de la CMI y de la interpretación S-I-R recomendada por el Comité Nacional de Normas de Laboratorios clínicos de EE.UU. (NCCLS, National committee for Clinical Laboratory Standards).
- III. Informar de la CMI y de una interpretación cualitativa S-I-R por el método de Kirby-Bauer (36).

36 Okamoto, T., T. Akaike, *et.al.* 1997. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. J. Infect. Dis. 170:1549-1556.

2.5.8 CMI DEL SISTEMA VITEK.

El sistema automatizado VITEK para la identificación microbiana, utiliza pequeñas tarjetas de plástico del tamaño de un naipe totalmente selladas compuestas por 30 pocillos de lectura que contienen los substratos de identificación.

La capacidad del VITEK para identificar los microorganismos depende de los medios especiales utilizados en las tarjetas, tanto para promover como para inhibir el crecimiento de los organismos, las tarjetas son inoculadas con suspensiones bacterianas ajustadas a un estándar de turbidez de Mc Farland. Los medios rehidratados con el inóculo preparado e incubados posteriormente sufren cambios debido a la reacción con los substratos, manifestados por cambios en color por el cambio de pH y cambio de turbidez la cual manifiesta desarrollo o inhibición del crecimiento de los microorganismos. El lector VITEK mide la cantidad de luz que pasa a través de cada pocillo; según aumenta el crecimiento bacteriano la cantidad de luz disminuye. Esta medición se realiza y se graba cada hora, comenzando en la hora 0 hasta un máximo de 15 horas, cuando se alcanza un umbral predeterminado en el pocillo de control positivo y una hora mínima de llamada para el microorganismo ID, comienza el análisis de la CMI. Hay una relación matemática entre la tasa de crecimiento de un microorganismo en presencia de un antibiótico y su CMI. Por lo tanto, las lecturas obtenidas para cada pocillo se comparan con la curva estándar establecida experimentalmente para cada combinación microorganismo/antibiótico; esto es similar a utilizar curvas estándar con estándares de química clínica y muestras de pacientes para determinar un resultado de química clínica comparando varios puntos de datos con la curva de crecimiento estándar, se determina rápidamente una CMI

exacta con lo cual los resultados están a disposición de los médicos en cuestión de horas (36).

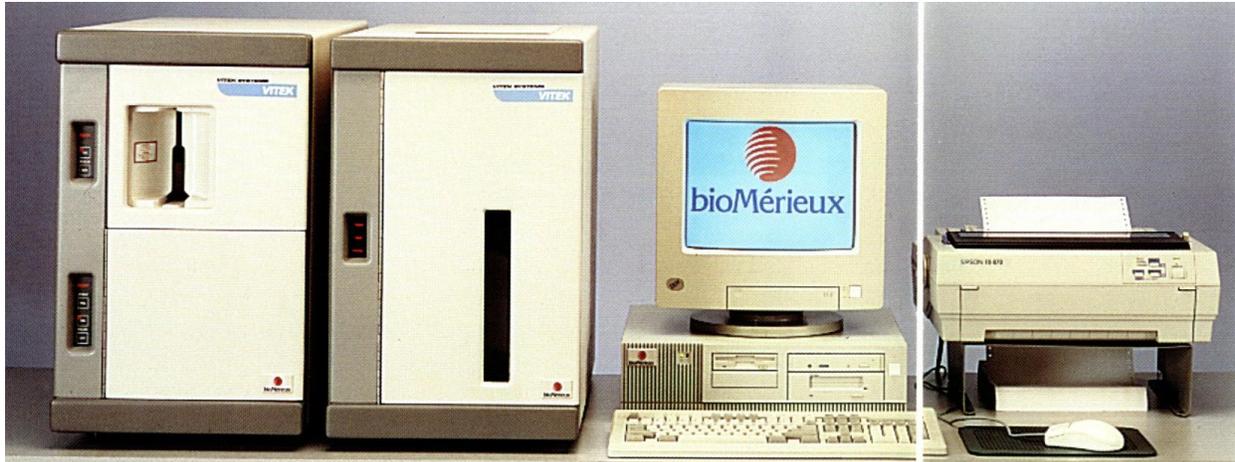


FIG. 3. Sistema para la identificación y antibiograma microbiológico Vitek 60

2.6 RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS.

2.6.1 IMPORTANCIA DE LOS PLASMIDOS EN LA RESISTENCIA DE ENTEROCOCOS.

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA bicatenarias (dsDNA) separadas del DNA cromosómico de una célula. Estos DNA extracromosómicos se encuentran naturalmente en bacterias, levaduras y algunas células eucariontes superiores, existen en relación parasitaria o simbiótica con la célula huésped. El tamaño de los plásmidos varía desde unos pocos miles de pares de bases hasta más de 100 - Kilobases (Kb). Al igual que el DNA cromosómico de la célula huésped, el DNA del plásmido se duplica antes de cada división celular, durante la división celular por lo menos una copia del DNA del plásmido se agrega a cada célula hija, lo cual asegura la continuidad de la propagación del plásmido en generaciones sucesivas de la célula huésped.

36 Okamoto, T., T. Akaike, *et.al.* 1997. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. J. Infect. Dis. 170:1549-1556.

Muchos plásmidos naturales contienen genes que proporcionan algún beneficio a la células huésped, por lo que cumple con la parte de la relación simbiótica correspondiente al plásmido, por ejemplo, algunos plásmidos bacterianos codifican enzimas que inactivan antibióticos, estos plásmidos de resistencia a fármacos han pasado a ser un problema importante en el tratamiento de varios patógenos bacterianos comunes. A medida que se amplió el uso de los antibióticos, evolucionaron plásmidos que contenían varios genes de resistencia a fármacos y confieren a las células huéspedes resistencia simultánea contra distintos antibióticos. Muchos de ellos también contienen “genes de transferencia”, que codifican proteínas capaces de formar un tubo macromolecular, o pilus, a través del cual se transfiere una copia del plásmido a otras células huésped de la misma especie bacteriana o de especies relacionadas. Estas transferencias son responsables de la diseminación rápida de plásmidos resistentes a fármacos, con lo que se expande la cantidad de bacterias resistentes a antibióticos en un medio determinado, por ejemplo un hospital. La lucha contra la diseminación de plásmidos resistentes a fármacos es un importante desafío para la medicina moderna (78).

2.6.2 PROPIEDADES Y MECANISMO DE ACCION DE LOS ANTIBIOTICOS UTILIZADOS EN INFECCIONES DE VIAS URINARIAS.

2.6.2.1 QUINOLONAS

Desde hace años se ha contado con algunos de los miembros originales de esta clase de antimicrobianos sintéticos y en particular el ácido nalidíxico, para tratar infecciones de vías urinarias; los productos de esta categoría tienen importancia

78.- HARVEY Lodish et. al. 2003. “Biología celular y molecular”. Trad. Dr.Karen Mikkelsen. Dr. Jorge Negrete. 4ta. edición. Editorial Médica Panamericana España

relativamente pequeña por su limitada utilidad terapéutica y la aparición rápida de resistencia bacteriana. Contra estos inconvenientes, la introducción más reciente de las 4-quinolonas cloradas como *ciprofloxacina* y la *ofloxacina* constituye un progreso terapéutico particularmente importante pues ambos poseen amplia actividad antimicrobiana y son eficaces después de ingeridas para combatir diversas enfermedades infecciosas.

A) PROPIEDADES QUIMICAS.

Las 4-quinolonas contienen una fracción de ácido carboxílico en la posición 3 del anillo fundamental. Las nuevas fluoroquinolonas también contienen flúor en posición 6 y muchos de estos compuestos contienen una fracción piperazínica en la posición 7.

B) MECANISMO DE ACCION.

Se necesita que estén separados los cordones de la doble hélice del DNA para que haya replicación o transcripción a ácido ribonucleico. Sin embargo, todo lo que separe a los cordones ocasiona un “desenrollado” o un “superenrollado” positivo excesivo del DNA, ante el punto de separación. Para eliminar este obstáculo mecánico, la enzima bacteriana DNA girasa es la encargada de la introducción continua de superespiras negativas en el DNA; una reacción que depende de ATP y requiere el corte de ambas cadenas de DNA para que pase el segmento de este a través del espacio así producido; una vez terminado el paso, se sellan de nuevo las espirales de las cadenas. Los fármacos inhiben el superenrollamiento de DNA mediado por la girasa a concentraciones que guardan relación neta con las necesarias para inhibir la proliferación bacteriana (0.1 a 10 µg/ml). Las mutaciones del gen que codifica el polipéptido de la subunidad A confiere resistencia a dichos medicamentos. Las células

eucarióticas no contienen DNA girasa. Sin embargo, incluyen una DNA topoisomerasa de tipo II, desde los puntos de vista teórico y mecánico, elimina los super-enrollamientos positivos del DNA de eucariotes para evitar su enrollamiento durante la réplica. Las quinolonas inhiben la topoisomerasa de tipo II de eucariotes sólo a concentraciones mucho mayores (100 a 1000 ug/ml). La ciprofloxacina es más activa que la norfloxacina contra *Pseudomona aeruginosa*, enterococos y neumococos; las cifras de MIC₉₀ varían de 0.5 a 6 ug/ml. Los estudios clínicos comparativos señalan norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol son igualmente eficaces en el tratamiento de infecciones de vías urinarias (39).

C) RESISTENCIA A QUINOLONAS.

La primera flouroquinolona que se utilizó en la clínica fue ciprofloxacina, las cuales fueron desarrolladas para el tratamiento de infecciones contra bacterias gramnegativas, la actividad de la ciprofloxacina contra enterococos es de moderada a buena, la resistencia a las quinolonas es común entre los aislamientos clínicos, las nuevas flouroquinolonas moxifloxacina y gatifloxacina tienen una actividad in vitro contra Enterococos, pero los aislamientos resistentes a ciprofloxacina son generalmente también resistentes a moxifloxacina y gatifloxacina. Las quinolonas inhiben a la bacteria por interacción con las topoisomerasas tipo II, DNA girasa y topoisomerasa IV, las cuales son esenciales para la replicación del DNA bacteriano. Con la DNA girasa de *E. coli*, las quinolonas se unen al complejo de DNA y DNA girasa, y no solamente con la DNA girasa (40), la DNA girasa es el blanco común primario para la actividad de las quinolonas contra bacterias gram negativas como es *E. coli*, y la topoisomerasa IV es

39 GOODMAN AND GILMAN. "Las bases farmacológicas de la terapeutica 10ma edición Trad. Dr. José Rafael Blengio Pint. Dr. Bernardo Rivera Muñoz. Dr. Guillermo. Mc Graw-Hill. Interamerican Editores. México. 2003.

40 Shen, L. L., W. E. Kohlbrenner, D. Weigl, and J. Baranowski. 1989. mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. Appearance of unique norfloxacin binding sites in enzyme-DNA complexes. J. Biol. Chem. 264:2973-2978.

el blanco típico de las quinolonas para las bacterias gran positivas como es *S. aureus* (41), la ADN girasa y la topoisomerasa IV son tetrámeros formados por dos subunidades A y dos subunidades B, Gyr A y Gyr B para la ADN girasa y Par C y Par E para la topoisomerasa IV. (42).

La resistencia a las quinolonas no ha sido bien estudiada en los enterococos, comparado con los *Staphylococcus* y *Pneumococos*. Las mutaciones en los enterococos en el gen par C es el resultado de la substitución de uno o dos aminoácidos en el área que corresponde a la región que determina la resistencia a las quinolonas (QRDR), en la *E. coli* el gen Gyr A quizá es el primer paso a la resistencia a las quinolonas. Con una mutación en el QRDR en el gen del enterococo Par C puede ser el siguiente paso por el cual este asociado con un alto nivel de resistencia a las quinolonas. Esta explicación preliminar esta soportada por resultados de diversos estudios, en el aislamiento de *E. faecalis* con mutación en el gen Par C pero no en el gen Gyr A (43) tiene un nivel bajo a la resistencia a las quinolonas. Ahora los *E. faecalis* aislados con mutación en el gen Gyr A pero no en el gen Par C la MIC de las quinolonas fueron altas. Pero en los aislamientos de *E. faecalis* con mutación en ambos genes Par C y Gyr A la MIC fue intermedio. La sustitución de los aminoácidos del gen Gyr A se ha encontrado que es en la posición 83 y 87 y en el gen Par C en la posición 80 y 84 (44,45,46).

41 Hooper, D. C. 2000. Mechanisms of fluoroquinolone resistance, p. 685-693. in V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), Gram Positive Pathogens. ASM Press, Washington, D.C.

42 Wang, J. C. 1996. DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. 65:635-692.

43 Kanematsu, E., T. Deguchi, et al. 1998. Alterations in the Gyr A subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 42:433-435.

44 EL AMIN, N., S. Jalal, and B. Wretling 1999. Alterations in Gyr A and ParC associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 43:947-949.

45 KORTEN, V., W. M. Huang, and B. E. Murray. 1994. Analysis by PCR and direct DNA sequencing of gyr A mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 38:2091-2094.

46 TANKOVIC, J., F. Mahjoubi, P. Courvalin, J. Duval, and R. Leclercq. 1996. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. and role of mutations in the DNA gyrase gyr A gene. Antimicrob. Agents. Chemother. 40:2558-2561.

2.6.2.2 PENICLINAS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS .

A) PROPIEDADES QUIMICAS.

La estructura básica de las penicilinas, incluye un anillo tiazolidina (A) unido a otro Anillo beta-lactámico (B) unido a una cadena lateral (R).El propio núcleo de penicilina es el elemento estructural fundamental de actividad biológica; la transformación metabólica o la alteración química de esta parte de la molécula hace que se pierda toda acción bacteriana importante. La cadena lateral es la que rige muchas de las características antibacterianas y farmacológicas de un tipo particular de penicilina. Se han producido penicilinas naturales con base en la composición química del medio de fermentación utilizado para el cultivo de *Penicillium*.

B) MECANISMO DE ACCION.

Las paredes de las bacterias son esenciales para su proliferación y desarrollo normales. El peptidoglucano es un componente heteropolimérico de la pared bacteriana que da a ella su estabilidad mecánica rígida gracias a su estructura en forma de entramado con innumerables “entrecruzamientos”. En microorganismos gram positivos , la pared tiene 50 a 100 moléculas de espesor pero en las bacterias gramnegativas sólo es de una a dos moléculas. El peptidoglucano posee cadenas de glucano que son cadenas lineales de dos aminoazucres alternantes (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) que están entrecruzadas por cadenas peptídicas.

La biosíntesis del péptidoglucano incluye unas 30 enzimas bacterianas y puede considerarse en tres etapas. La primera es la formación de un precursor, ocurre en el citoplasma. El producto, un uridindifosfato (UDP)-acetilmuramil pentapéptido y se acumula en las células cuando se inhiben las etapas posteriores de la síntesis.La última reacción en la vía sintética del compuesto es la adición de un dipéptido, la D-alanil-

D-alanina. La síntesis del dipéptido entraña racemización previa de L-alanina y condensación catalizada por la D-alanil-D-alanina sintetasa. En las reacciones de la segunda fase, se unen UDP-acetilmuramil-pentapéptido y UDP-acetilglucosamina (con liberación de nucleótidos de uridina) para formar un polímero largo. La tercera etapa, la final, incluye la terminación de los enlaces cruzados (entramado); se logra por una reacción de transpeptidación fuera de la membrana celular. La propia transpeptidasa se liga y está en la membrana. El residuo de glicina terminal del puente de pentaglicina se une al cuarto residuo del pentapéptido (D-alanina) y libera al quinto residuo (también D-alanina). Es precisamente esta última etapa de la síntesis del peptidoglucano, la que inhibe los antibióticos beta-lactámicos. Los modelos estereoscópicos indican que la conformación de la penicilina es muy semejante a la D-alanil-D-alanina. La transpeptidasa probablemente es acilada por la penicilina, es decir, al parecer se forma la enzima piniciloil con rotura de la ligadura R-CO-N-R del anillo beta-lactámico (39).

C) MECANISMOS DE RESISTENCIA A LAS PENICILINAS.

La mínima concentración inhibitoria (MIC) de ampicilina para enterococos los rangos típicos se encuentran entre 1.0 a 16 ug/ml. En contraste, la MIC de ampicilina para otros streptococos el rango esta entre 0.006 a 0.25 ug/ml (47). Los aislamientos clínicos de enterococos en particular *E. faecium* (y raramente *E. faecalis*), han venido incrementando la resistencia a ampicilina. Los enterococos poseen al menos cinco o más de nueve diferentes PBP (48). Los anticuerpos que se forman para PBP₅ de

39 GOODMAN AND GILMAN. "Las bases farmacológicas de la terapeutica 10ma edición Trad. Dr. José Rafael Blengio Pint. Dr. Bernardo Rivera Muñoz. Dr. Guillermo. Mc Graw-Hill. Interamerican Editores. México. 2003.

47 FONTANA, R., M. Ligozzi, F. Pittaliga, and G. Satta. 1996. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* 2:209-213.

48 WILLIAMSON, R., L. Gutmann, T. Horaud, F. Delbos, and J.F. Acar. 1985. Use of penicillin-binding proteins for the identification of enterococci. *J.Gen.Microbiol.* 132:1929-1937.

E. faecalis, sugiriendo que esta PBP tiene alguna homología en su estructura (49). Deduciendo que es un aminoácido de su secuencia estructural la PBP₅ de *E. faecium* muestra una homología con la PBP₅ de *E. hirae* y con la PBP₅ de *E. faecalis* (50,51).

Una de las mutaciones en la hipersusceptibilidad a la penicilina es no producir PBP₅ (53) una de las mutaciones de *E. hirae* es la hiperproducción de PBP₅ con un crecimiento normal en presencia de concentraciones de penicilina que saturan a las otras PBP pero no a PBP₅ (53). Las cepas de *E. faecium* que expresan el gen (psrfm) resistente a penicilina tienen un 74% de homología con el gen regulador (psr) de *E. hirae*, lo cual sugiere que la regulación de el gen de PBP₅ en *E. faecium* puede ser similar al de *E. hirae* (51). Los casos de resistencia bacteriana a los antibióticos beta-lactámicos son causados por la incapacidad del compuesto para penetrar en su sitio de acción. En bacterias gram-positivas, el polímero peptidoglucano esta muy cerca de la superficie del germen patógeno y solamente macromoléculas superficiales (capsulas) quedan por fuera del peptidoglucano. Las moléculas pequeñas de un antibiótico beta-lactámico penetran fácilmente en la capa externa de la membrana citoplasmática y las PBP, sitio en que ocurren las etapas finales de la síntesis del peptidoglucano. En términos generales, las bacterias grampositivas generan una cantidad de beta-lactamasa secretada en forma extracelular. Gran parte de estas enzimas son penicilinasas. La información para la penicilinasas estafilocócica esta codificada en un

49 LIGOZZI, M., M. Aldegheri, S. C. Predari, and R. Fontana. 1991. Detection of penicillin-binding proteins immunologically related to penicillin-binding protein 5 *Enterococcus hirae* ATCC 9790 in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* FEMS Microbiol. Lett. 83:335-340.

50 LIGOZZI, M., F. Pittaluga, and R. Fontana. 1996. Modification of penicillin binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 40:354-357.

51 ZORZI, W., X. Y. Zhou, et al. 1996. Structure of the low-affinity penicillin-binding protein-5 PBP₅fm in wild-type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium* J. Bacteriol. 178:4948-4957.

53 LIGOZZI, M., F. Pittaluga, and R. Fontana. 1993. Identification of a genetic element (psr) which negatively controls expression of *Enterococcus hirae* penicillin-binding protein 5. J. Bacteriol. 175:2046-2051.

plásmido y este puede autoreplicarse. La enzima es inducible por sustratos y 1% del peso seco de la bacteria puede ser penicilinas. En bacterias gram negativas, las beta-lactamasas aparecen en cantidades relativamente pequeñas pero están situadas en el espacio periplásmico entre las membranas interna y externa de la bacteria.

Las enzimas de la síntesis parietal se encuentran en la superficie externa de la membrana interna, razón por la que estas beta-lactamasas se hallan situadas estratégicamente para brindar protección máxima del microorganismo. Las beta-lactamasas de bacterias gram negativas son codificadas en los cromosomas o por plásmidos y pueden ser de tipo constitutivo o inducibles. Los plásmidos son transferibles entre una y otra bacteria por conjugación; las enzimas en cuestión hidrolizan a las penicilinas, cefalosporinas o a ambos fármacos(54).

2.6.2.3 SULFONAMIDAS (TRIMETOPRIM / SULFAMETOXAZOL).

A) PROPIEDADES QUIMICAS

Las sulfonamidas se utilizan básicamente en el tratamiento de infecciones de vías urinarias; en combinación con el trimetoprim, se usan a menudo también para combatir otitis, bronquitis, sinusitis y neumonía por Pneumocystis. La aparición de resistencia a estos medicamentos ha limitado su utilidad en otras situaciones. La introducción del trimetoprim en combinación con el sulfametoxazol constituyó un progreso importante en la obtención de antimicrobianos clínicamente eficaces y representó la aplicación práctica de una consideración teórica, es decir, dos fármacos actúan en fases seriadas en la vía de una reacción enzimática obligada en bacterias, el resultado de la combinación sería la sinergia. Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) varían

54 PERICHON, B., B. Casadewall, P. Reynolds, and P. Courvalin. 2000. Glycopeptide-resistant Enterococcus faecium BM4416 is a VanD-type strain with an impaired D-alanine: D-alanine ligase. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1346-1348

de 0.1 ug/ml, en el caso de *C.trachomatis*, a 4 a 64ug/ml para *Escherichia coli*. Las cifras plásmaticas máximas del fármaco alcanzables in vivo son de 100 a 200 ug/ml (39).

B) MECANISMO DE ACCION.

Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido para-aminobenzoico (PABA) y por tal razón, impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis de ácido fólico. De modo más específico las sulfonamidas son inhibidores competitivos de la dihidropteroato sintetasa, la enzima bacteriana que incorpora PABA en el ácido dihidropteroico precursor inmediato del ácido fólico. Los microorganismos sensibles sintetizan su propio ácido fólico. Uno de los medicamentos más activos que muestra efecto sinérgico cuando se emplea con una sulfonamida es el trimetoprim, este es un inhibidor competitivo potente y selectivo de la dihidrofolato reductasa microbiana, la enzima reduce el dihidrofolato en tetrahidrofolato. Se necesita esta forma reducida de ácido fólico para reacciones de transferencia de un solo carbono. Por esa razón, la administración simultánea de una sulfonamida y de trimetoprim induce bloqueos seriados en la vía por la que los microorganismos sintetizan tetrahidrofolato a partir de moléculas precursoras. Se ha corroborado la hipótesis de que la combinación mencionada posee efectos antimicrobianos sinérgicos in vivo e in vitro (39).

C) MECANISMOS DE RESISTENCIA A SULFONAMIDAS.

La resistencia a las sulfonamidas quizá sea consecuencia de la alteración de la constitución enzimática de una bacteria; tal modificación se caracteriza por:

39 GOODMAN AND GILMAN. "Las bases farmacológicas de la terapeutica 10ma edición Trad. Dr. José Rafael Blengio Pint. Dr. Bernardo Rivera Muñoz. Dr.Guillermo.Mc Graw-Hill. Interamerican Editores. México. 2003.

Alteración en la enzima que utiliza PABA la dihidropteroato sintetasa. Mayor capacidad de destruir o inactivar al fármaco. Una vía metabólica alternativa para la síntesis de un metabolito esencial. Mayor producción de un metabolito esencial o de un antagonista del compuesto, la bacteriostasis inducida por las sulfonamidas es antagonizada en forma competitiva por PABA. Estos no afectan las células de mamífero por este mecanismo porque necesitan ácido fólico preformado y no lo sintetizan; por tal razón son similares a las bacterias no sensibles a sulfonamidas que utilizan ácido fólico preformado (39).

2.6.2.4 AMINOGLUCOSIDOS.

A) PROPIEDADES QUIMICAS

Los aminoglucósidos consiste en dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucósidos a un núcleo de hexosa que por lo común está en una posición central. La hexosa o aminociclitol es una estreptidina (como en la estreptomycin) o una 2-desoxiestreptamina (característica de todos los demás aminoglucósidos disponibles) (39).

B) MECANISMO DE ACCION DE LOS AMINOGLUCOSIDOS.

Los aminoglucósidos difunden por medio de canales acuosos formados por porinas, proteínas que se encuentran en la membrana externa de bacterias gramnegativas y de este modo penetran el espacio periplásmico. El transporte ulterior de aminoglucósidos por la membrana citoplasmática (interna) depende del transporte de electrones, en parte por la interacción de un potencial de membrana (negativo interior) para impulsar el paso de dichos antibióticos al interior de la bacteria; esta fase de transporte ha sido llamada fase I que depende de energía. Es cinético –

limitante y puede ser bloqueada por cationes divalentes como el calcio y magnesio, hiperosmolaridad, disminución del pH y anaerobiosis.

Los aminoglucósidos después de penetrar por la membrana citoplasmática se ligan a polisomas e interfieren en la síntesis proteínica al causar una "lectura errónea" y terminación prematura de la traducción de mRNA. Las proteínas aberrantes producidas pueden ser insertadas en la membrana bacteriana con lo cual se altera la permeabilidad y se estimula el paso de más aminoglucósido. Esta fase del transporte de aminoglucósidos es llamada fase II que depende de energía (EDP₂).

El sitio de acción primaria de los aminoglucósidos en el interior de las células es la subunidad ribosómica 30 S que consiste de 21 proteínas y una sola molécula de RNA de 16 S, cuando menos tres de estas proteínas y quizá el RNA ribosómico 16 S contribuyen adecuadamente al sitio de unión con estreptomicina y las alteraciones de estas moléculas afectan en grado sumo la unión y la acción ulterior de dicho antibiótico. Por ejemplo, la sustitución de lisina por asparagina en posición 42 de una proteína ribosómica (16 S) evita la unión del fármaco y cada mutante resultante es resistente a la estreptomicina (39).

C) RESISTENCIA MICROBIANA A LOS AMINOGLUCOSIDOS.

Las bacterias pueden ser resistentes a la actividad antimicrobiana de los aminoglucósidos porque penetran al interior de la bacteria, por la escasa afinidad del compuesto por el ribosoma bacteriano o debido a que el medicamento es inactivado por enzimas de la bacteria. Un aspecto preocupante en el tratamiento de las infecciones por enterococos es la elaboración de enzimas inactivadoras de aminoglucósidos mediada por plásmidos.

Enzimas diferentes son las encargadas de inactivar gentamicina y estreptomina y por ello, una proporción pequeña de cepas de enterococos resistentes a gentamicina serán sensibles a la estreptomina. Otro factor adicional de complicación es la capacidad de los enterococos para “adquirir” plásmidos que codifican beta-lactamasas y la resistencia a vancomicina (39).

2.6.2.5 DEL IMIPENEM.

A) PROPIEDADES QUIMICAS

El imipenem se obtiene de la tienamicina, un compuesto producido por *Streptomyces cattleya*; es inestable, pero el imipenem, un derivado N-formimidol, es estable (39).

B) MECANISMO DE ACCION DEL IMIPENEM.

El imipenem a semejanza de otros antibióticos beta-lactámicos, se unen a proteínas de penicilina, entorpece la síntesis de la pared bacteriana y causa la muerte de microorganismos sensibles. Es muy resistente a la hidrólisis por parte de casi todas las Beta-lactamasas. El imipenem es el medicamento más activo de que se dispone (in-vitro) contra muy diversas bacterias. Se distribuye en el comercio en combinación con cilastatina, fármaco que inhibe la degradación de dicho antibiótico por acción de una dipeptidasa en túbulos renales (39).

2.6.2.6 PROPIEDADES QUIMICAS DE LA NITROFURANTOINA.

A) PROPIEDADES QUIMICAS

Es un nitrofurano sintético se utiliza para evitar y tratar infecciones de vías urinarias(39).

39 GOODMAN AND GILMAN. “Las bases farmacológicas de la terapéutica 10ma edición Trad. Dr. José Rafael Blengio Pint. Dr. Bernardo Rivera Muñoz. Dr. Guillermo. Mc Graw-Hill. Interamerican Editores. México. 2003.

B) MECANISMO DE ACCION DE LA NITROFURANTOINA.

Las enzimas que reducen la nitrofurantoína al parecer son de máxima importancia para su activación. Se forman productos intermediarios fuertemente reactivos, y son los que explican la capacidad que posee la nitrofurantoína para lesionar al ácido desoxirribonucleico. Las bacterias reducen al fármaco con mayor rapidez que las células de mamíferos y, según expertos, ello explica su actividad antimicrobiana selectiva. Las bacterias sensibles a fármacos rara vez se tornan resistentes durante la terapéutica (39).

2.6.2.8 GLICOPEPTIDOS .

B) MECANISMO DE ACCION

Los glicopéptidos actúan en los microorganismos Gram positivos por inhibición en la biosíntesis de la pared celular. Los microorganismos Gram negativos son inherentes a la resistencia porque en la parte externa de su pared celular no se encuentra el sitio de acción de los glicopéptidos.

Los glicopéptidos son moléculas largas compuestas de siete péptidos básicos en su estructura que son substituidos con cinco a siete anillos aromáticos y diferentes azúcares. Estos agentes no actúan en las enzimas para la biosíntesis de la pared celular como lo hacen las penicilinas, actúan en el sustrato de estas enzimas, en el precursor pentapéptido del peptidoglicano. Los glicopéptidos forman complejos en la parte externa de la superficie de la pared celular con la D-alanina-D-alanina(D-Ala-D-Ala) la terminación del precursor pentapéptido del peptidoglicano. Estas uniones

39 GOODMAN AND GILMAN. "Las bases farmacológicas de la terapéutica 10ma edición Trad. Dr. José Rafael Blengio Pint. Dr. Bernardo Rivera Muñoz. Dr. Guillermo. Mc Graw-Hill. Interamerican Editores. México. 2003.

involucran la interacción de cinco enlaces de hidrógeno y la obstrucción de la subsecuente transglicosilación y la transpeptidación de los pasos en la biosíntesis de la pared celular. Este es el resultado en la prevención de los entrecruzamientos de estos precursores, lo cuál guía a la pérdida en la integridad de la pared celular y esto lleva a la muerte celular (73,74,75).

C) MECANISMOS BIOQUIMICOS PARA OBTENER RESISTENCIA A LOS GLICOPEPTIDOS.

Los mecanismos bioquímicos para la resistencia de los glicopéptidos en los entero – cocos involucran la modificación o cambio en el sitio de acción en la pared celular, esto es en la composición del pentapéptido en la terminación de D-Ala-D-ala en una de las terminaciones se remueve un aminoácido diferente para inactivar la susceptibilidad. Esta modificación del pentapéptido puede contener a D-Ala-D-lactato (D-Lac) o a D-Ala-D-Serina (D-Ser). Los residuos que contienen D-Ala-D-Lac tienen Mucho más baja afinidad para vancomicina que los que contienen residuos de D-Ala-D-Ala porque la causa es la pérdida de los enlaces de hidrógeno (76). Los residuos con terminación en D-Ala-D-Ser tienen un decremento en afinidad para vancomicina comparada con los residuos con la terminación D-Ala-D-Ala (56).

Los enterococos vancomicina resistentes tienen esta habilidad para realizar y utilizar estas alternativas en la resistencia a los glicopéptidos en los precursores del peptidoglicano pueden ser presentados constitutivamente o ser inducibles por los glicopéptidos existen diferentes mecanismos genéticos para expresar estos fenotipos en los enterococos.

56.- **Billot-Klein, D., D. Blanot, L. Gutmann, and J. van Heijenoort.** 1994. Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin to N-acetyl-D-alanyl-D-alanine and N-acetyl-D-alanyl-D-serine. *Biochem. J.* 304:1021-1022.
73 DE **MONCLOS M. Carret G.** 1992. Optimisation de l'examen cytobactériologique Urinaire spectrabio. 92/2. 49-53.
74 **HARREWYN. L. Bissardon. O.Mounier. M. et. al.** 1990. Identification et Numeration Rapide des gemmes urinaires sur boite contenant des substrats chromogenes Et fluorogenes. *Revue Francaise des Laboratorios.* 1990. 212:73-77.
75 **KILIAN. M. Bulow. P.** 1979. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Use of a glucuronidase detecting agar medium (PGUA Agar) for identification of *E. coli* in primary cultures of urine samples. *Acta path. Microb. Scand.,* 87:271-276.
76.- **Manafi. M. Kneifel. W. Bascomb. S.** 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostic. *Microb. Rev.* 55:348355.

REVISION DE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA GENETICA DE LOS GLICOPEPTIDOS.

Seis diferentes grupos de genes median la resistencia a los glicopéptidos los cuáles se han descubierto en los enterococos (Tabla 2). Cinco de estas se conocen porque tienen ciertas características mientras uno Van C, es una propiedad intrínseca del enterococo (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum* y *E. flavescens*). Estos mecanismos son genotípicamente y fenotípicamente distintos e involucran a la bacteria para adquirir una compleja maquinaria enzimática, las cuales son responsables para sentir la presencia de glicopéptidos en el medio ambiente, para el cambio en la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de ser susceptible y pasar a un fenotipo resistente eliminando así a los precursores del peptidoglicano normal así la célula puede sintetizar casi exclusivamente precursores para la resistencia.

El grupo de Van A es un mediador que induce un alto nivel de resistencia tanto para vancomicina (MIC > 64 ug/ml) y teicoplanina (MIC > 16 ug/ml). Este es adquirido usualmente a través de el transposón Tn 1546 o con el miembro relacionado con la familia del transposón Tn₃ (55,56). El grupo de Van B induce un bajo o alto nivel de resistencia a vancomicina (MIC > 10 000 ug/ml) pero ninguno para teicoplanina (57,58, 59,60).

Esto es porque usualmente está presente en el cromosoma, pero quizá también es

55 ARTHUR, M., C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* 175:117-127.

56 BILLOT-KLEIN, D., D. Blanot, L. Gutmann, and J. van Heijenoort. 1994. Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin to N-acetyl-D-alanyl-D-alanine and N-acetyl-D-alanyl-D-serine. *Biochem. J.* 304:1021-1022.

57 EVERS, S., D.F. Sham, and P. Courvalin. 1993. The vanB gene of vancomycin resistance *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala:D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC. *Gene* 124:143-144.

58 EVERS, S., P.E. Reynolds, and P. Courvalin. 1994. Sequence of the vanB and ddl Genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine: D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene* 140:97-102.

59 QUINTILIANI, R., Jr., S. Evers, and P. Courvalin. 1993. The vanB gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *J. Infect. Dis.* 167:1220-1223.

60 WILLIAMSON, R., S. Al-Obeid, J. H. Shlaes, F. W. Goldstein, and D. M. Shlaes 1989. Inducible resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366. *J. Infect. Dis.* 159:1095-1104.

transportado en un plásmido (61). La diseminación a esta resistencia, puede ocurrir por la transferencia de un material genético de cadena larga, el cuál contiene el transposón Tn 1547 (62,63). La transferencia a la resistencia de Van B en cono – mitancia con la resistencia con ampicilina ha sido notado con el transposón Tn - 5382 (64). El operón de Van D media un moderado nivel de resistencia para vancomicina (64 a 128 ug/ml) y para teicoplanina (4 a 64 ug/ml). Este se encuentra presente en el cromosoma y no puede ser inducido por una transferencia (65,66). Los grupos de Van E y Van G causan un bajo nivel de resistencia a vancomicina (MIC < 16 ug/ml), y estos se cree que pueden ser adquiridos o inducibles, se ha

Genotipo	Vancomicina MIC (ug/ml)	Teicoplanina MIC	Localización	Expresión	Precursor	Especies
van A	64-1,000	16-512	Plásmido Cromosoma	Inducible	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> y 7 especies de <i>Enterococcus</i>
van B	4-1,000	<1	Plásmido Cromosoma	Inducible	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>
van C	2-32	<1	Cromosoma	Constitutivo	D-Ala-D-Ser	<i>E. casseliflva-vus</i> , <i>E. gallinarum</i>
van D	64-128	4-64	Cromosoma	Constitutivo	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecium</i>
van E	16	0.5	?	Inducible	D-Ala-D-Ser	<i>E. faecalis</i>
van G	<16	<0.5	?	?	?	<i>E. faecalis</i>

Tabla 2 genotipos de resistencia para vancomicina. Adaptado de la referencia (83).

61 RICE, L.B., L. L. Carias, C. J. Donskey, and S. D. Rudin. 1998. Transferable Plasmid-mediated VanB-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:963-964.

62 QUINTILIANI, R., Jr. and P. Courvalin. 1994. Conjugal transfer of the vancomycin Resistance determinant van B between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 119:359-363.

63 QUINTILIANI, R., Jr., and P. Courvalin. 1996. Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 AND IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis*. *BM4281. Gene* 172:1-8.

64 CARIAS, L. L., S. D. Rudin, C. J. Donskey, and L. B. Rice. 1998. Genetic Linkage and co-transfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistance *Enterococcus faecium* isolate. *J. Bacteriol.* 180:4426-4434.

65 CASADEWALL, B., and P. Courvalin. 1999. Characterization of the vanD glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* 181:3644-3648.

66 PERICHON, B., P. Reynolds, and P. Courvalin. 1997. VanD-type glycopeptides resistance *Enterococcus faecium*. *BM4339. Antimicrob. Agents Chemther.* 41:5016-2018

83 GHOLIZADEH, Y., and P. Courvalin. 2000. Acquired and intrinsic glycopeptide Resistance in enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 1511-517.

Intentado la transferencia de Van E y Van G pero sin ningún éxito (67,68).

Van A

El fenotipo de Van A fue el primero en ser descrito y es el primero con mayor características conocidas (Tabla 3). Esta adquisición es usualmente con la presencia del transposón Tn 1546 (55). El operón resistente a Van A compromete siete genes, tres (Van H, Van A, Van X), involucrados directamente en la resistencia con el glicopéptido, dos (Van R y Van S) involucrados en la regulación a la resistencia y uno (Van Y) responsable para remover los precursores normales de la pared celular. La función del gen Van Z todavía es desconocida.

El primer paso en la expresión de resistencia es el contacto del glicopéptido con el medio ambiente de la bacteria, a partir de un enlace externo transmembranal del segmento de Van S, una proteína cinasa (Fig 2). Estos conducen a la autofosforilación de los residuos de histidina citoplasmática de Van S y la subsecuente transferencia del grupo fosforilado al residuo aspartato de Van R, el regulador responsable.

55 idem

67 FINES, M., B. Perichon, P. Reynolds, D. F. Sahm, and P. Courvalin. 1999. vanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis*. BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2161-2164.

68 MCKESSAR, S. J., A. M. Berry, J. M. Bell, J. D. Turnidge, and J. C. Paton. 2000. Genetic characterization of vanG, a novel resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3224-3228

Gene	Proteína	Función
Van S	proteína cinasa	Siente la presencia de los glicopéptidos y fosforila Van R.
Van R	regulador responsable	Activa la transcripción de los mecanismos de resistencia.
Van H	deshidrogenasa	Conversión de piruvato a lactato.
Van X	dipeptidasa	Rompimiento el enlace dipeptídico D-Ala-D-Ala, ya formado.
Van Y	carboxipeptidasa	Hidrólisis unicamente de D-Ala-D-Ala precursor pentapéptido.
Van A	ligasa	Ligando alanina con lactato para formar D-Ala-D-Lac.

Tabla 3 repaso sobre las funciones del gen del operón Van A Adaptado de la referencia(83)

La fosforilación de Van R une la secuencia del promotor de Van H activando así la transcripción. Este también se une a la propia región del promotor por lo cual pasa de un enlace a la amplificación de las señales para activar la transcripción de Van R a los genes de Van S (69). La Van H es una alfa-cetoreductasa la cuál inicia el paso para la producción del precursor que contiene D-Ala-D-Lac por la reducción de piruvato a D-Lac(70), Van H es una ligasa dispeptidasa ATP-dependiente, ligando a la D-Ala. Este precursor se encuentra unido al UDP-N-acetil muramida tripéptido para ser incorporado en el peptidoglicano de la pared celular. Los precursores normales D-Ala-D-Ala comienzan la formación por una D-Ala-D-Ala ligasa (Ddl) son removidos por Van X, que es una dipeptidasa zinc-dependiente de esta manera empieza la bacteria a producir los precursores resistentes en la pared celular (71).

La Van Y es una carboxipeptidasa remueve cualquier D-Ala-D-Ala contenida en el pentapéptido y en el citoplasma se pueda eliminar para que actué la Van X (72).

69 ARTHUR, M., C. Molinas, and P. Courvalin. 1992. The VanS-VanR two component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* 174:2582-2591.

70 ARTHUR, M., C. Molinas, T. D. Bugg, G. D. Wright, C. T. Walsh, and P. Courvalin. 1992. Evidence for in vivo incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:867-869.

71 REYNOLDS, P. E., F. Depardieu, S. Dutka-Malen, M. Arthur, and P. Courvalin. 1994. Glycopeptide resistance mediated by the enterococcal transposon Tn1546 Requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.* 13:1065-1070.

72 ARTHUR, M., F. Depardieu, L. Cabanie, P. Reynolds, and P. Courvalin. 1998. Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol. Microbiol.* 30:819-830

3.0

OBJETIVO GENERAL

Aislar al Enterococo Vancomicina Resistente de pacientes adultas con IVU., utilizando un medio selectivo

4.0

OBJETIVOS PARTICULARES

1)_ Aislar e identificar al *Enterococcus spp.* en pacientes adultos mujeres (entre 45-80 años), con IVU por medio de pruebas bioquímicas primarias y secundarias.

2)_ Determinar la susceptibilidad antimicrobiana, para el *Enterococcus spp.* a partir de los antibióticos de primera y segunda elección.

3)_ Hacer una relación estadística exponiendo la frecuencia de aislamiento de *Enterococcus* así como de los agentes patógenos encontrados a partir de la muestras clínicas trabajadas.

5.0

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Los *Enterococcus* pueden causar infecciones en el tracto urinario, torrente sanguíneo, endocarditis, vías biliares y heridas por quemaduras, teniendo en consecuencia un problema importante para su estudio, al incremento a la resistencia contra múltiples antibióticos, subrayando la necesidad de tener un mejor entendimiento en los mecanismos de virulencia de estos patógenos ya que estos cuentan con diversos factores de virulencia.

6.0 METODO.

6.1 SUJETOS DE ESTUDIO.

Mujeres con IVU con una edad entre 45 – 80 años.

6.2 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

Microscopio zeiss

S.S.F. estéril

Placas CPS ID2

Estufa bacteriológica

Mechero Fisher

GPS (gram positive susceptibility)

Tubos de ensayo 50x10 mm.

Asa calibrada de 0.001 ml.

Placas de soya tripticaseína

Reactivos para tinción gram

GPI (gram positive identification)

Sistema de identificación y antibiograma microbiológico marca Biomerieux Vitek 60

El equipo consta de:

Unidad de control computarizado

Módulo de llenado y sellado

Dosificador dilutor manual

Colorímetro Vitek

Módulo de lectura de tarjetas

Terminal monocromática

Terminal monocromática

Impresor de matriz de punto

6.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

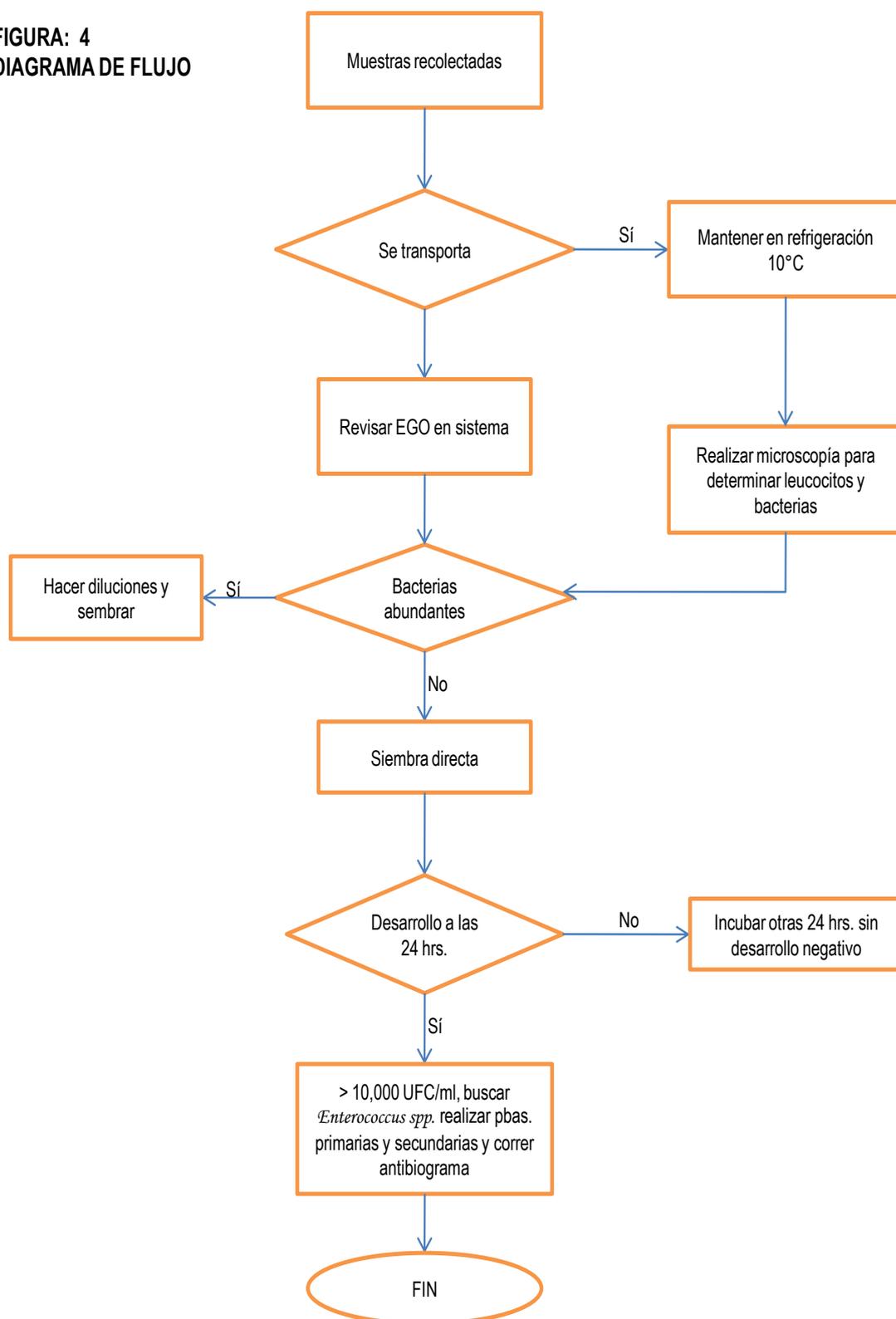
El presente trabajo se realiza con muestras de mujeres adultas entre una edad de 45 a 80 años del ISSEMYM satélite y el Hospital de Especialidades CMS XXI, teniendo una duración de 2 meses, recolectando la información de 275 muestras.

Se procesan muestras clínicas del hospital, y serán transportadas al laboratorio de bacteriología en una nevera donde se mantendrán a una temperatura de 10°C.

En el laboratorio, se les realiza la técnica de microscopía para determinar la cantidad de leucocitos y bacterias que contienen las muestras provenientes del ISSEMYM, a las muestras del hospital de especialidades se revisan los registros del día en el sistema y determinar que correspondan con los datos especificados y revisar el EGO realizado en el área de urianálisis. Si la cantidad de bacterias encontrados es abundante, se procede a realizar diluciones hasta 1:3 de la muestra en tubos de ensaye que contengan S.S.F. estéril, de la última dilución se realiza un sembrado masivo en la placa CPS ID2 con asa calibrada de 0.001 ml. Ahora sino se realizo dilución se siembra directo, se dejan incubar las cajas petri durante 24 hrs, para después observar el crecimiento. Si no hay crecimiento o hay un crecimiento ligero de colonias se dejan incubando otras 24 hrs. Para que exista un buen crecimiento colonial. Si a las 48 hrs no hay crecimiento se tomará como cultivo negativo, si hay crecimiento bacteriano se procede a contar el número de colonias que hay en la caja. Para sospechar de una bacteriuria deben ser mayor o igual a 10,000 UFC/ml, si la cuenta es viable, se observa la coloración de la colonia y su tamaño, si esta es azul y pequeña se sospecha de *Enterococcus spp*, se procede hacer una tinción gram para asegurarse que son coco bacilos gram positivos y se realiza una prueba de catalasa la cuál debe ser negativa. Se toma una colonia y se resiembra en un agar nutritivo y se incuba 24 hrs.

Para realizar la identificación bioquímica y la susceptibilidad a los antimicrobianos se procede a marcar las tarjetas correspondientes (GPI y GPS). Se prepara el inóculo de la bacteria resuspendiendo una colonia y ajustar al Mc Farland adecuado (% T Red 80-88% para ser usado en GPS y GPI que corresponde a 0.5 de Mc - Farland), colocar las tarjetas con su respectivo inóculo en el módulo de llenado y sellar las tarjetas y colocarlas en el módulo incubador/lector y esperar resultados.

FIGURA: 4
DIAGRAMA DE FLUJO



7.0 RESULTADOS.



Grafico 1. El gráfico muestra a las bacterias más representativas en IVU donde el eje X representa a las bacterias aisladas y el eje Y el número de cultivos, de un muestreo el cuál está representado de un total de 275 muestras.

1.- EVR (Enterococos Vancomicina Resistentes).

2.- EVS (Enterococos Vancomicina Sensible).

3.- *Enterococcus faecalis* / *Escherichia coli*.

4.- *Escherichia coli*.

5.- *Candida tropicalis*.

6.- *Proteus mirabilis*.

7.- *Morganella morganii*.

8.- *Pseudomona aeruginosa*.

9.- *Staphylococcus epidermidis*.

TARJETA DE IDENTIFICACION PARA GRAM POSITIVAS

PB +	BAC +	OPT +	HCS -	6NC +	10B +
40B +	ESC +	ARG +	URE -	TZR +	NOV +
DEX +	LAC -	MAN +	RAF -	SAL +	SOR +
SUC -	TRE +	ARA -	PYR +	PUL -	INU -
MEL -	MLZ +	CEL +	RIB +	XYL -	CAT -

TABLA 4. Representa las pruebas bioquímicas con las que se diferencia a los *Enterococcus faecalis* en el sistema VITEK dando un 99% en su identificación.

TARJETA DE IDENTIFICACION PARA GRAM POSITIVAS

PB +	BAC +	OPT +	HCS +	6NC +	10B +
40B +	ESC +	ARG +	URE +	TZR +	NOV +
DEX +	LAC +	MAN +	RAF -	SAL +	SOR -
SUC -	TRE +	ARA +	PYR -	PUL -	INU -
MEL +	MLZ -	CEL +	RIB +	XYL -	CAT -

TABLA 5. Representa las pruebas bioquímicas con las que se diferencia a los *Enterococcus faecium* en el sistema VITEK dando un 99% en su identificación.

SIGNIFICADO Y ABREVIATURAS

PB	Peptona base	ESC	Esculina	HCS	Hemicelulosas	SOR	Sorbitol	INU	Inulina
BAC	Bacitracina	ARG	Descarboxilasa de base arginina	DEX	Glucosa	SUC	Sucrosa	MEL	Melobiosa
OPT	Optoquina			LAC	Lactosa	TRE	Trealosa	MLZ	Melecitosa
6NC	NaCl 6%	URE	Urea	MAN	Manitol	ARA	Arabinosa	CEL	Celobiosa
10B	Bilis 10%	TZR	Tetrazolio rojo	RAF	Rafinosa	PYR	Piruvato	RIB	Ribosa
40B	Bilis 40%	NOV	Novobiocina	SAL	Salicina	PUL	Pulanán	XYL	Xilosa

TABLA 6. Significado de las abreviaturas de las pruebas bioquímicas de la tarjeta de identificación para bacterias gram positivas (GPI) gram positive identification.

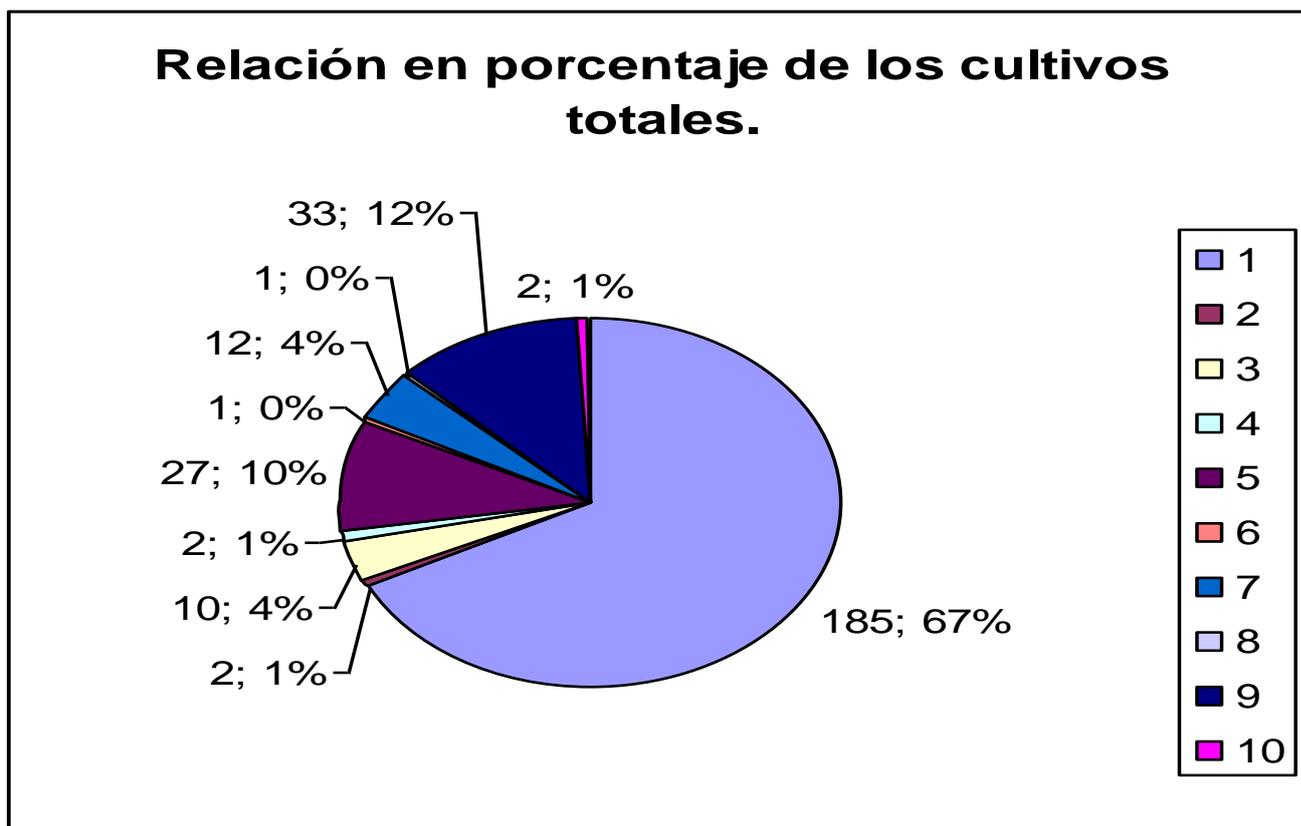


Grafico 2. Representación en porcentaje de las bacterias detectadas en los cultivos, observando que *Enterococcus - faecalis* vancomicina resistente representa un 4% del total.

- 1.- Cultivos sin desarrollo.
- 2.- *Candida tropicales*.
- 3.- EVR.
- 4.- *Proteus mirabilis*.
- 5.- EVS.
- 6.- *Morganella morganii*.
- 7.- *Enterococcus faecalis* / *Escherichia coli*.
- 8.- *Pseudomonas aeruginosa*.
- 9.- *Escherichia coli*.
- 10.- *Staphylococcus epidermidis*.

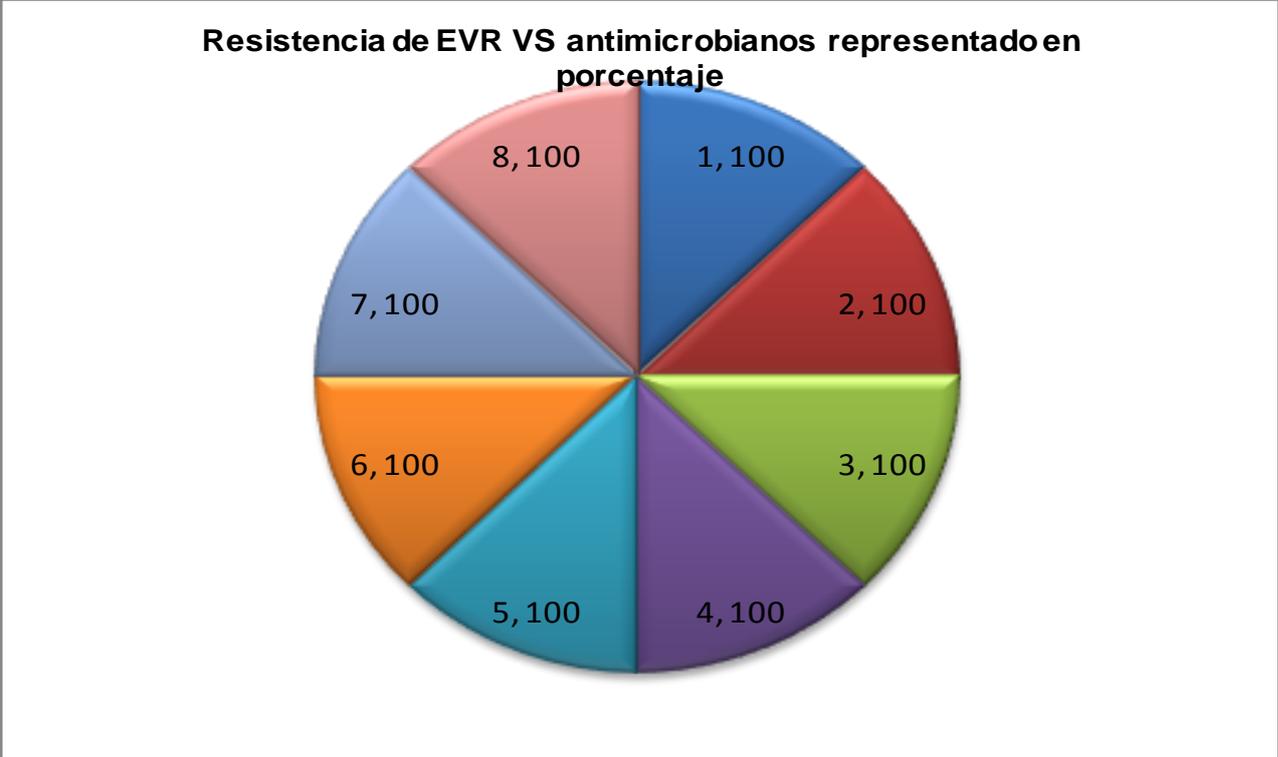


Figura 5. El número representa al antibiótico (abajo mencionado) utilizado en el antibiograma y el número 100 es el porcentaje en resistencia de los Enterococos vancomicina resistentes aislados.

- 1.- Ampicilina.
- 2.- Penicilina-G
- 3.- Streptomycina-2000
- 4.- Nitrofurantoina.
- 5.- Tetraciclina.
- 6.- Gentamicina-500
- 7.- Ciprofloxacina.
- 8.- Vancomicina.



Figura 6. Los EVS presentan una gran variedad en la sensibilidad y resistencia a los antimicrobianos en las IVU, la serie 1 representa los enterococos sensibles y la serie 2 a los enterococos resistentes del total de muestras positivas con EVS.

SERIE 1 : SENSIBILIDAD

SERIE 2 : RESISTENCIA

- | | |
|------------------------|--------------------|
| 1.- Ampicilina | 8.- Ciprofloxacina |
| 2.- Penicilina-G | 9.- Vancomicina |
| 3.- Streptomycina 2000 | |
| 4.- Nitrofurantoína | |
| 5.- Tetraciclina | |
| 6.- Gentamicina 500 | |

8.0 ANALISIS DE RESULTADOS.

Se realiza un estudio en pacientes adultas por infección en vías urinarias, demostrando de un total de 275 muestras que Enterococos vancomicina resistente se desarrollo en 10 cultivos, Enterococos vancomicina sensible en 27 cultivos mientras que *Escherichia coli* en 33 cultivos y en una sinergia entre *Enterococcus/Escherichia coli* en 12 cultivos (Fig. 3). La identificación del enterococo se basa en la utilización de la tarjeta GPI (gram-positive identification), la cual contiene las pruebas bioquímicas secundarias que nos ayudan a la identificación del género y especie en una bacteria gram positiva (Tabla 5), las pruebas bioquímicas primarias para la identificación del género son la tinción de gram que presenta cocobacilos gram positivos, la prueba de catalasa que es negativa y se realiza de forma externa pero se marca en la tarjeta de identificación y la prueba de bacitracina que se encuentra incluida en la tarjeta, en el caso de los enterococos para diferenciar la especie, estos son positivos a esculina, bilis al 10% y 40%, arginina, la prueba bioquímica PYR y UREA es esencial para la identificación pues *Enterococcus faecalis* es positiva para PYR y negativo para urea, *Enterococcus faecium* es negativo para PYR y positivo para urea.

Los carbohidratos son importantes y de gran ayuda, *Enterococcus faecalis* es negativo para melobiosa, lactosa, arabinosa, mientras que *Enterococcus faecium* es positivo para estos carbohidratos además para melecitosa, piruvato y sorbitol (ver tabla 5 y 6). Al determinar la actividad metabólica de los enterococos con las pruebas bioquímicas utilizadas nos asegura una buena identificación de la especie en cuestión, en el caso de enterococos vancomicina resistentes se logra aislar a la bacteria en forma representativa demostrando que puede convertirse en un patógeno emergente, encontrándose en tercer lugar de las bacterias que producen

IVU, la más común es *Escherichia coli*, en segundo lugar enterococos vancomicina sensible (fig. 3), la relación que guarda el enterococo en colón como biota normal es casi del 1%, es un porcentaje bajo siendo inversamente proporcional a su aislamiento en las IVU, solo atrás de *Escherichia coli*. El primoaislamiento que presenta *Enterococcus faecalis*/*Escherichia coli* es significativo teniendo 12 cultivos positivos (fig. 3). Pues su capacidad para adherirse al epitelio y las mucosas en los sitios de colonización, su habilidad para evadir la destrucción intracelular en los macrófagos que además le sirve como transporte para llegar a su nicho y las enzimas secretoras que ayudan a la degradación de algunos componentes estructurales del hospedador, han convertido a los Enterococos como riesgo en infecciones de vías urinarias. Ahora, es una bacteria fácil de transmitir, puesto que forma parte de nuestra flora común su transmisión se puede realizar por la misma persona, hablando en relación a IVU principalmente en mujeres, si ellas no tienen un cuidado en su aseo personal pueden infectarse fácilmente, y de aquí partimos para que pueda existir sinergismo con otras bacterias, principalmente Gram negativos como es el caso de *Escherichia coli* pues también forma parte de nuestra flora de colon, en tal caso si la paciente tiene una infección con otra bacteria la capacidad de presentar resistencia tanto de una como de otra puede ser muy alta. Enterococos vancomicina resistente es el 4% en aislamiento siendo un caso representativo en las IVU (fig. 4) por lo cual se debe tener cuidado en la determinación de su sensibilidad, ya que es totalmente resistente a todos los antibióticos utilizados en las IVU (fig. 5). Mientras que los Enterococos vancomicina sensible tienen un alta susceptibilidad a los antimicrobianos, principalmente de primera generación tales como ampicilina, penicilina-G, tetraciclina (fig. 6). Sí la infección es por un EVR, se debe cuidar el tratamiento ya que presentan cambios

fenotípicos, y genotípicos, lo cual implica cambios en la estructura de su pared celular como síntesis de enzimas que destruyen a los antibióticos y pierden su actividad farmacológica, o una producción acelerada de algunos componentes estructurales para que así el fármaco inhiba completamente el microorganismo con la concentración administrada.

Estos cambios son de forma genética, que pueden ser transmitidos por otras bacterias o inducidos, entonces los cambios nos lleva a un índice elevado en su erradicación ya que tienen un amplio espectro de resistencia a los antimicrobianos.

9.0 CONCLUSIONES.

1. En el presente trabajo se logra el aislamiento del *Enterococcus spp.*, a partir de muestras de orina de pacientes adultas en las cuáles se sospecha de IVU, pues se logro aislar en un 18% del total de los cultivos positivos siendo *Enterococcus faecalis* el microorganismo identificado.
2. Existen dos tipos de enterococos, hablando de susceptibilidad antimicrobiana, los vancomicina resistentes y los vancomicina sensibles, los primeros muestran un alta resistencia a la amplia gamma de antibióticos que se utilizan para las IVU, mientras que los vancomicina sensible su resistencia a los antimicrobianos es baja de esta manera se puede utilizar cualquier antibiótico para vías urinarias y erradicar la infección.
3. La frecuencia que se encontró para *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente es del 4% y del *Enterococcus faecalis* vancomicina sensible es del 10%, de esta forma se determina que el enterococo se ha convertido en un agente causal de IVU, mientras que *Escherichia coli* sigue siendo el agente patógeno más recurrente en las infecciones de vías urinarias representando un 37%, también estas dos bacterias presentaran un sinergismo en las IVU siendo un 4%, las otras bacterias que se aislaron pueden observarse en la figura 4.
4. El uso inadecuado de los antibióticos de amplio espectro en la clínica ha llevado a las bacterias aun alto índice de resistencia lo cual implica utilizar antibióticos semisintéticos o sintéticos los cuales pueden ocasionar daños colaterales en los pacientes.

5. La falta de información para la prevención de las IVU en los centros de salud, principalmente en las mujeres, por su anatomía son muy propensas a estas infecciones ,el médico debe estar conciente antes de dar el tratamiento debe realizar una buena clínica y tener resultados del laboratorio para determinar el antibiótico con el cual pueden eliminar a la bacteria, así se evita una mala utilización de los mismos.

10 SUGERENCIAS.

- **Delimitar la edad de los pacientes entre 65 – 80.**
- **Delimitar demográficamente a los pacientes en estudio.**
- **De los EVR, determinar que tipo de mecanismo de resistencia está influyendo en su resistencia.**

V. ANEXO I

INFECCIONES URINARIAS .(TERMINOLOGIA SOBRE INFECCION URINARIA).

INFECCION DEL TRACTO URINARIO

Presencia de microorganismos en el tramo urinario.

BACTERIURIA

Presencia de bacterias en la orina vesical.

BACTERIURIA SIGNIFICATIVA

Recuento de colonias igual o superior a 100,000 UFC/ml de orina recién emitida, o cualquier cantidad si la orina ha sido obtenida por punción suprapúbica.

BACTERIURIA OCULTA.

Bacteriuria significativa detectada por examen de una población aparentemente sana, es preferible este término que el de bacteriuria asintomática.

BACTERIURIA VESICAL.

Presencia de bacterias en orina obtenida de la vejiga por cateterismo o punción suprapúbica.

BACTERIURIA DEL TRAMO URINARIO SUPERIOR.

Presencia de bacterias en orina recogida directamente de la pelvis renal o uréter. Es indicativo de infección renal si se ha descartado la existencia de reflujo vesico-renal.

SINDROME MICCIONAL.

Síndrome clínico caracterizado por poliaquiuria y disuria. No es obligado que coexista con bacteriuria vesical. Debe evitarse usar el término de cistitis con este criterio.

CISTITIS BACTERIANA

Síndrome miccional con bacteriuria vesical, a menudo asociada a piuria y ocasionalmente a hematuria.

CISTITIS ABACTERIANA

Síndrome miccional con bacteriuria vesical. También se le ha llamado síndrome uretral, pero este término no es recomendable dado no existe evidencia de enfermedad uretral en la mayoría de los pacientes.

PIELONEFRITIS BACTERIANA AGUDA.

Síndrome clínico caracterizado por dolor lumbar, fiebre, ocasionalmente escalofríos, acompañado de bacteriuria, bacteremia, piuria y a veces, hematuria debida a lesión renal.

NEFRITIS INTERSTICIAL O NEFROPATIA TUBULO INTERSTICIAL CRONICAS.

Es preferible usar los dos anteriores términos al de pielonefritis crónica. Enfermedad inflamatoria crónica afecta al intersticio renal y a los túbulos ocasionando una progresiva deteriorización renal por fibrosis intersticial, con mayor afectación tubular que glomerular, puede deberse a :Infección bacteriana, factores inmunológicos, abuso de analgésicos, irradiación renal, nefropatía tóxica y factores no identificados.

CONCEPTO DE INFECCION BACTERIANA

La infección urinaria se define como la invasión microbiana del aparato urinario que sobrepasa la capacidad de los mecanismos de defensa del huésped, produce alteraciones morfológicas o funcionales y una respuesta inmunológica no siempre evidenciable.

TABLA 7 Modalidad clínica para diferenciar las IVU

MODALIDAD CLINICA	UFC/ml
CISTITIS SIMPLE	> 100
CISTITIS HEMORRAGICA	> 100
CISTITIS RECURRENTE	> 100
PIELONEFRITIS AGUDA	> 1000
BACTERIURIA ASINTOMATICA	> 100,000
INFECCIONES COMPLICADAS	> 100,000
BACTERIURIA DEL CATETER	> 100,000

Tomado de la referencia 79.

NUEVO CONCEPTO DE BACTERIURIA SIGNIFICATIVA CISTITIS SIMPLE

La cistitis simple se define como la inflamación aguda, ocasional y transitoria, de origen infeccioso de la vejiga urinaria. Se trata de una entidad común en generales de curso benigno.

CISTITIS RECURRENTE

La definición es la misma que la expresada para la cistitis simple y el hecho diferencial es la periodicidad de los cuadros. En principio se ha admitido que más de 3 episodios en un mismo año puede clasificarse como cistitis recidivante.

PIELONEFRITIS AGUDA NO COMPLICADA.

La pielonefritis aguda no complicada se define como la inflamación del parénquima renal y estructuras adyacentes (pelvis y cálices renales) de origen infeccioso con intenso infiltrado polimorfonuclear y en ausencia de una patología urológica subyacente.

PIELONEFRITIS AGUDAS COMPLICADAS

La pielonefritis aguda complicada se define como la inflamación del parénquima renal y estructuras adyacentes de origen infeccioso, con infiltrado polimorfonuclear en presencia de anomalías estructurales funcionales del aparato urinario, patologías condicionantes sistémicas o maniobras instrumentales de cualquier tipo.

HEMATURIA.

Es la presencia de sangre o de hematíes intactos en la orina. Pueden tener su origen en cualquiera de los tramos del tracto urinario, en las nefritis se presentan cuando se halla afectado el glomérulo (glomerulonefritis) y abundan más aun en la glomerulonefritis focal. En ciertas ocasiones en las pielonefritis por bacterias. En los cálculos que se hallan enclavados en la pelvis renal. En las cistitis pueden aparecer hematíes en el sedimento cuando las lesiones de la pared son profundas, se constata hematuría en las neoplasias de cualquiera de los tramos del aparato urinario.

PIURIA.

Leucocitos y otros componentes de pus en la orina, indica infección en el riñón u otros órganos urinarios .

DISURIA.

Si bien es un síntoma de presentación habitual asociado con las infecciones urinarias, la disuria con frecuencia puede ser resultado de una enfermedad de transmisión sexual causada por microorganismos como *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* y HSV.

11. BIBLIOGRAFIA.

ARCHIBALD, A. R., I. C. Hancock, and C. R. Harwood. 1993. Cell wall structure, synthesis, and turnover, p. 381-410. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*. ASM Press, Washington, D. C.

ARTHUR, M., C. Molinas, F. Depardieu, and P. Courvalin. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* 175:117-127.

ARTHUR, M., C. Molinas, and P. Courvalin. 1992. The VanS-VanR two component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium*. BM4147. *J. Bacteriol.* 174:2582-2591.

ARTHUR, M., *et. al.* 1992. Evidence for *in vivo* incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:867-869.

ARTHUR, M., *et. al.* 1998. Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide Resistance in enterococci. *Mol. Microbiol.* 30:819-830.

BLEIWEIS, A. S., and R. M. Krause. 1965. The cell walls of group D streptococci: The immunochemistry of type I carbohydrate. *J. Exp. Med.* 122:237-249.

BLEIWEIS, A. S., F. E. Young, and R. M. Krause. 1967. Cell walls of group D streptococci. *J. Bacteriol.* 94:1381-1387.

BURNS, E. H., Jr., A. M. Marciel, and J. M. Musser. 1996. Activation of a 66 kilodalton human Endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease, *Infect. Immun.* 64: 4744-4750

BOYCE, J. M., *et. al.* 1992. Emergence and nosocomial Transmission of ampicillin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1032-1039.

Boletín técnico. Guía de laboratorio para CMI. VITEK-R07.02 REV 0502.

BILLOT-KLEIN, D., D. Blanot, L.Gutmann, and J. van Heijenoort. 1994. Association constants for the binding of vancomycin and teicoplanin to N-acetyl-D-alanyl-D-alanine and N-acetyl-D-alanyl-D-serine. *Biochem. J.* 304:1021-1022.

CARIAS , L. L., S.D.Rudin, C. J.Donskey, and L. B. Rice. 1998. Genetic Linkage and cotransfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistance *Enterococcus faecium* isolate. *J. Bacteriol.* 180:4426-4434.

CASADEWALL, B., and P. Courvalin. 1999. Characterization of the vanD glycolipeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J. Bacteriol.* 181:3644-3648.

DEVRIESE, L.A., and B.Pot. 1995. The genus *Enterococcus*, p. 327-367. In B. J.B. Wood and W. H. Holzapfel (ed.), *The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. Blackie Academic and Professional, London, United kingdom

DE CUENINCK, B. J., G. D. Shockman, and R.M.Swenson. 1982. Group B, type III streptococcal cell wall: composition and structural aspects revealed through Endo-N-acetylmuramidase catalyzed hydrolysis. *Infect. Immun.* 35:572-581.

DE MONCLOS. M. Carret G. 1992. Optimisation de l'examen cytobactériologique Urinaire spectrabiole. 92/2. 49-53.

DEL TOUR, J., T. Ferain, M. Deghorain, E. Palumbo, and P. Hols. 1999. The Biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 159-184.

EDWARDS, D. D. 2000. Enterococci attract attention of concerned microbiologists. *ASM News* 66:540-545.

- ELLIOT, S. D. 1959. Group and type-specific polysaccharides of group D streptococci. *Nature* 184:1342.
- ELLIOT,S.D. 1962. Teichoic acid and the group antigen of group D streptococci *Nature* 193:1105-1106.
- ELLIOT, S. D.1960. Type and group polysaccharides of group D streptococci. *J. Exp. Med.* 111:621-630.
- EL AMIN, N.,S.Jalal,and B.Wretlind 1999. Alterations in Gyr A and Par C associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:947-949.
- EVERS, S., D.F.Sham, and P. Courvalin. 1993. The vanB gene of vancomycin resistance *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala:D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins Van A and VanC. *Gene* 124:143-144.
- EVERS, S.,P.E.Reynolds, and P. Courvalin. 1994. Sequence of the vanB and Genes encoding D-alanine: D-lactate and D-alanine: D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene* 140:97-102.
- ELMER W. Koneman et. al. *Diagnostico microbiológico texto y atlas a color* 5ta edición. Ed. Medica Panamericana. Mexico D.F 1999.
- FARROW, J.A.,D.Jones, B. A. Phillips, and M. D. Collins. 1983. Taxonomic studies on some group D streptococci. *J. Gen. Microbiol.* 129:1423-1432.
- FONTANA, R., M. Ligozzi, F. Pittaliga,and G.Satta.1996. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.* 2:209-213.
- FONTANA, R., *et. al.* 1983. identification of a streptococcal penicillin binding protein that reacts very slowly with penicillin. *J. Bacteriol.* 155:1343-1350.

FINES, M., *et. al.* 1999. vanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis*. BM4405. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2161-2164.

GERARD J. Tortora, Sandra Reynolds Grabowski. 2002. "Principios de anatomía y fisiología". 9 ed. Tr. Rubén Israel Sanchez Monsiváis. Ed. Oxford University Press. México, pp. 925.

GHOLIZADEH, Y., and P. Courvalin. 2000 Acquired and intrinsic glycopeptide Resistance in enterococci. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16: 511-517.

GHUYSEN, J. M. 1968. Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* 32:425-464.

GOODMAN AND GILMAN. "Las bases farmacológicas de la terapeutica 10ma ed. Trad. Dr. José Rafael Blengio Pint. Dr. Bernardo Rivera Muñoz. Dr. Guillermo. Mc - Graw-Hill. Interamerican Editores. México. 2003.

HOOPER, D. C. 2000. Mechanisms of flouoroquinolone resistance, p. 685-693. V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferretti, D.A. Portnoy, and J. I. Rood (ed.), *Gram-Positive Pathogens.* ASM Press, Washington, D.C.

HARREWYN. L. Bissardon. O. Mounier. M. *et. al.* 1990. Identification et Numeration Rapide des gemmes urinaires sur boite contenant des substrats chromogenes Et fluorogenes. *Revue Francaise des Laboratorios.* 1990. 212:73-77.

HARVEY Lodish *et. al.* 2003. "Biologia celular y molecular". Trad. Dr. Karen Mikkelsen. Dr. Jorge Negrete. 4ta. edición. Editorial Médica Panamericana España.

KANEMATSU, E., *et. al.* 1998. Alterations in the Gyr A subunit of DNA gyrase and the ParC Subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus feacalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:433-435.

KITADA, K., and M. Inoue. 1996. Immunochemical characterization of the carbohydrate antigens of serotype k and Lancefield group G "Streptococcus milleri". *Oral Microbiol. Immunol.* 11:22-28.

KITADA, K., T. Yakaushiji, and M. Inoue. 1993. Immunochemical Characterization of the carbohydrate antigens of serotype c/Lancefield group C "Streptococcus milleri." *Oral Microbiol. Immunol.* 8:161-166.

KILIAN, M. Bulow. P. 1979. Rapid identification of Enterobacteriaceae. Use of a glucuronidase detecting agar medium (PGUA Agar) for identification of *E. coli* in primary cultures of urine samples. *Acta path. Microb. Scand.*, 87:271-276.

KORTEN, V., W. M. Huang, and B. E. Murray. 1994. Analysis by PCR and direct DNA sequencing of *gyr A* mutations associated with fluoroquinolone Resistance in *Enterococcus faecalis* *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2091-2094.

KONRAD, J. D., Helmut K.M., Wolfgang K. 2003. Methods used for the Isolation, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 1. Media for isolation and enumeration. *International J. of Food Microbiol.* 88:147-164.

LIGOZZI, M., M. Aldegheri, S. C. Predari, and R. Fontana. 1991. Detection of penicillin-binding proteins immunologically related to penicillin-binding protein 5 *Enterococcus hirae* ATCC 9790 in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* *FEMS Microbiol. Lett.* 83:335-340.

LIGOZZI, M., F. Pittaluga, and R. Fontana. 1996. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:354-357.

LIGOZZI, M., F. Pittaluga, and R. Fontana. 1993. Identification of a genetic element (*psr*) Which negatively controls expression of *Enterococcus hirae* penicillin-binding protein 5. *J. Bacteriol.* 175:2046-2051.

MANAFI, M., Kneifel, W., Bascomb, S. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostic. *Microb. Rev.* 55:348-355.

MAEDA, H., and T. Yamamoto. 1996. Pathogenic mechanism induced by microbial proteases in microbial infections. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 377:217-226.

MURRAY, B. E. 1990. The life and times of the Enterococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65.

MCKESSAR, S. J., *et al.* 2000. Genetic characterization of van G, a novel resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3224-3228.

MC CORMICK, J. K., *et al.* 2000. Pathogenic Mechanisms of enterococcal endocarditis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2:315-321.

MC CARTY, M., and S. I. Morse. 1964. Cell wall antigens of gram-positive bacteria. *Adv. Immun.* 6:249-285.

OKAMOTO, T., *et al.* 1997. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J. Infect. Dis.* 170:1549-1556.

PAZUR, J. H. 1982. beta-D-glucose-1-phosphate: a structural unit and immunological determinant of a glycan from streptococcal cell walls. *J. Biol. Chem.* 257:589-591.

PAZUR, J. H., *et al.* 1971. Glycans from streptococcal cell walls: glycosylphosphoryl moieties as immunodominant groups in heteroglycans from group D and group L streptococci. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:1421-1428.

PLAUT, A. G. 1983. The IgA1 proteases of pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:603-622.

PROKESOVA, L., *et al.* 1992. Cleavage of human immunoglobulins by serine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *Immunol. Lett.* 31:259-265.

PERICHON, B., *et al.* 2000. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4416 is a Van D-type strain with an impaired D-alanine:D-alanine ligase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:1346-1348.

PERICHON, B., P. Reynolds, and P. Courvalin. 1997. Van D-type glycopeptides Resistance *Enterococcus faecium*. BM4339. *Antimicrob. Agents Chemther.* 41:5016-2018.

QUINTILIANI, R., Jr., S. Evers, and P. Courvalin. 1993. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *J. Infect. Dis.* 167:1220-1223.

QUINTILIANI, R., Jr. and P. Courvalin. 1994. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *van B* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 119:359-363.

QUINTILIANI, R., Jr., and P. Courvalin. 1996. Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 AND IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis*. BM4281. *Gene* 172:1-8.

ROGERS, H. J., H. R. Perkins, and J. B. Ward. 1980 *Microbial Cell Walls and membranes*. Chapman and Hall, London, United Kingdom.

RICE, L.B., L.L. Carias C.J. Donskey, and S.D. Rudin. 1998. Transferable, Plasmid-mediated Van B-type glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:963-964.

REYNOLDS, P. E., *et al.* 1994. Glycopeptide resistance mediated by the enterococcal Transposon Tn1546 Requires production of Van X for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.* 13:1065-1070.

RALOVICH, B.Ibrahim.G. A. M. Fabian .A. et. al. 1991. Beta-D-glucuronidase (BDG) activity of Gram-Negative bacteria. *Acta Microbiologica Hungaritas* 38:283-291.

SALTON, M. R. J. 1964. *The Bacterial Cell Wall*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

SUNDQVIST, G., J. Carlsson, B. Herrmann, and A. Tarkivik. 1985. Degradation of human immunoglobulins G and M and complements factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J. Med. Microbiol.* 19:85-94.

SHEN, L. L., *et.al.* 1989. mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. Appearance of unique norfloxacin binding sites in enzyme-DNA complexes. *J. Biol. Chem.* 264:2973-2978.

SHELEIFER, K.H.,and O.Kandler. 1792. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36:407-477.

SHOCKMAN,G.D.,and J. T. Martin. 1968. Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis*. IV. Electron microscopic observations of autolysin and lysozyme action. *J. Bacteriol.* 96:1803-1810.

SHOCKMAN,G.D.,and J. F. Barrett. 1983. Structure fuction, and assembly of cell walls of gram- positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 27:501-514.

SHULTZ, D. R., and K. D. Miller. 1974. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of complement components and complement-derived chemotatic and phagocytic factors. *Infect. Immun.* 10:128-135.

SGHIR, A., *et.al.* 2000. Quantificacion of Bacterial groups within the human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Envirion. Microbiol.* 66:2263-2266.

STEFANIE, K. M.Hufnagel, Ch.Theilacker, J.Huebner. 2004. Enterococal Infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities.*vaccine* 22:822-830.

TANNOCK,G.W. (ed). 1999. Medical Important of the Normal Microflora. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

TANNOCK, G. W. 1995. Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body. Chapman and Hall, London, United kingdom.

TANKOVIC, J., F.Mahjoubi, P. Courvalin, J. Duval, and R. Leclercq. 1996. Development of fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. and role of mutations in the DNA gyrase *gyr A* gene. *Antimicrob. Agents. Chemother.*40:2558-2561.

WANG, J. C. 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65:635-692.

WILLIAM R. Jarvis,MD; Ronda L. Sinkowitz-cochran, MPH 2000. Surgimiento de patógenos Problemáticos Asociados con el Cuidado de la Salud. *Rev.*1-16.

WILLIAMSON, R.,L. Gutmann, T. Horaud, F. Delbos, and J.F. Acar. 1985. Use of penicillin-binding proteins for the identification of enterococci. *J. Gen. Microbiol.* 132:1929-1937.

WILLIAMSON, R., *et.al.* 1989. Inducible resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366. *J. Infect.Dis.* 159:1095-1104.

ZORZI, W., *et.al.* 1996. Structure of the low-affinity penicillin-binding protein 5 PBP5_{fm} in wild type and highly penicillin-resistant strains of *Enterococcus faecium* *J. Bacteriol.* 178:4948-4957.