



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

**DETECCIÓN DE *Enterococcus faecium* RESISTENTE A
VANCOMICINA COMO AGENTE CAUSAL DE
INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS EN UN HOSPITAL DE
TERCER NIVEL**

T É S I S

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

**PRESENTA:
SERGIO ALEJANDRO PÉREZ SOLÍS**

**DIRECTOR DE TÉSIS
M. EN C. JUAN CARLOS BRAVATA ALCÁNTARA
HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO**

**ASESORES INTERNOS
M. EN C. MANUEL ORDUÑA SÁNCHEZ
Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO**



Ciudad de México 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Y pocas son las palabras que puedan expresar la inmensa gratitud que tengo hacia los involucrados en este proyecto, sin embargo y a pesar que pueda dejar de lado a algún participe me hago la tarea de mencionarlos uno a uno.

Mi director de tesis el maestro Juan Carlos Bravata a pesar de la inconstancia que tuve, no dejó de creer en mí, siendo la personal más paciente y comprensible que he conocido en mi vida, agradezco todo el empeño, tiempo y dedicación que ofreció, su grandeza nace de la formación de mentes.

A mi padre Luis Federico su sabiduría y fortaleza me llenaron de coraje en los momentos más difíciles, eres la mano que me brinda continuidad en cada caída, eres mi mejor amigo y más grande mentor, te amo papá.

A mi madre Lucia Citlali una luz que cobija, un abrazo caluroso, una caricia afable y momento de paz en medio de la adversidad, la calma y el sosiego, paz en mi alma y cordura en mis decisiones eso y más representas para mí en este proyecto gracias por ayudarme a mantenerme ecuánime, te amo mamá.

A mis hermanos Fernando, Mario y Andrea son tan cercanos, compañeros de vida y gran soporte; muchas gracias por sus palabras y consejos, siempre estuvieron ahí mientras escribía.

A mis amigos, Antar, Carlos, Neftalí, Claudia por ser la palabra incesante y motivante al intento de claudicar, la palmada en la espalda y el hombro para apoyarse, a Monserrat porque sin tí no hubiese iniciado, no hubiese continuado, eres inspiración en todo sentido.

A la Maestra Wendti González, desde el vamos, la gran admiración que le tengo, la inspiración que forjó en cada palabra, el apoyo incondicional y majestuoso, la pieza que completo el rompecabezas y la sabiduría de la enseñanza representa no solo en el proyecto si no en mi vida, eternamente agradecido.

Mis mentores de laboratorios del gobierno, Alejandro Sánchez tocayo siempre has sido mi inspiración para ser el mejor químico, Ana Saucedo fuiste la base para este proyecto y más que una amiga, te agradezco tanto.

A mis profesores, en especial Oscar Moreno: gracias por compartir sus conocimientos y experiencias; son la luz del conocimiento que me permite ver más adelante.

Gracias a ti que lees este proyecto por inmortalizar mis palabras y perpetuar mi trabajo.

*“No te rindas, por favor no cedas, aunque el frío queme, aunque el miedo
muerta, aunque el sol se esconda, y se calle el viento, aún hay fuego en tu
alma, aún hay vida en tus sueños. porque la vida es tuya y tuyo también el
deseo, porque cada día es un comienzo nuevo, porque esta es la hora y el
mejor momento”*

Mario Benedetti

Índice

Agradecimientos	II
Índice	IV
Índice de Abreviaturas	V
1. Resumen.	Vi
2. Introducción.	1
3. Marco teórico.	2
3.1 Anatomía del Tracto Urinario.	2
3.2 Microbiota normal de Tracto Urinario.	3
3.3 Infección del Tracto Urinario.	4
3.3.1 Clasificación de las ITUs	5
3.3.2 Factores de Riesgo.	9
3.3.3 Cuadro Clínico.	10
3.3.4 Fisiopatología de la ITU.	13
3.3.5 Epidemiología.	16
3.3.6 Tratamiento.	18
3.4 Descripción del Género.	20
3.4.1 Factores de virulencia relacionados e ITU.	21
3.4.2 Resistencia a Antibióticos del Género.	21
3.5 Caracterización fenotípica convencionales.	28
3.6 Caracterización fenotípica mediante equipos automatizados.	31
3.7 Caracterización genotípica.	33
3.7.1 Caracterización genotípica mediante la técnica de PCR.	35
3.7.1.1 Determinación genotípica de género bacteriano mediante PCR del gen 16S.	37
3.7.2 Tipificación genotípica mediante la técnica ERIC-PCR.	39
4. Antecedentes.	42
5. Justificación.	43
6. Planteamiento del problema.	44
7. Hipótesis.	45
8. Objetivos.	45
8.1. Objetivo General.	45
8.2. Objetivos Específicos.	45
9. Materiales y métodos.	46
9.1 Tipo de estudio.	46
9.2 Población de estudio.	46
9.3 Criterios de inclusión.	47
9.4 Criterios de exclusión.	47
9.5 Criterios de eliminación.	47
9.6 Material Biológico.	48
9.7 Reactivos.	48
9.8 Instrumentos y equipos.	49
9.9 Metodología.	50
9.9.1 Extracción de DNA de DNA de las cepas de <i>E. faecium</i>	51
9.9.2 Amplificación para identificación de <i>E. faecium</i> por PCR de la región 16s rRNA.	53
9.9.3 Purificación del amplicón 16s rRNA.	54
9.9.4 Secuenciación del gen ribosomal 16s rRNA.	54
9.9.5 Amplificación para identificación de los genes Van A y Van B.	55
9.9.6 Tipificación molecular de cepas de <i>Enterococcus faecium</i> por ERIC-PCR	56
10. Diagrama de Flujo.	57
11. Variables.	57
12. Análisis estadísticos.	57
13. Resultados y discusión de resultados.	58
14. Consulta de Expedientes y factores de riesgo ORENUC.	58
14.2 Caracterización convencional y por equipo automatizado de las cepas.	63
14.3 Determinación de resistencia fenotípica a Vancomicina.	63
14.4 Amplificación para identificación de <i>E. faecium</i> por PCR de la región 16S rRNA.	65
14.5 Detección de genes de vancomicina VAN A y VAN B por PCR de punto final.	66
14.6 Tipificación molecular de cepas de <i>E. faecium</i> por ERIC-PCR.	67
15. Conclusiones.	69
16. Referencias Bibliográficas.	71

Índice de Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ASC	Agar Sangre de Carnero
BLASTn	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
BLEE	Betalactamasas de espectro extendidos
CG	Cirugía General
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DM	Diabetes Mellitus
DPI	Diálisis Peritoneal Intermitente
EAU	European Association of Urology
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ERC	Enfermedad Renal Crónica
ERIC – PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction
ESKAPE	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. cloacae</i>
ESIU	EAU Section of Infections in Urology
EVR	Enterococos Vancomicina Resistentes
GBS	Estreptococo del Grupo B
GO	Gineco Obstetricia
HAS	Hipertensión Arterial Sistémica
IRC	Insuficiencia Renal Crónica
ITU	Infección del Tracto Urinario
LAP	leucina aminopeptidasa
MBN	Microbiota Normal
MI	Medicina Interna
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reacción en cadena de la polimerasa.
Pyr	L-pirrolidonil-β-naftilamida
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RHOVE	Red de Vigilancia Epidemiológica
SINAIS	Sistema Nacional de Información en Salud
TU	Tracto Urinario
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatógena

1. Resumen

En un Hospital de Especialidades al Sur de la Ciudad de México se reportaron 147 casos de pacientes hospitalizados, con Infección en Vías urinarias con infección por *E. faecium* durante 2019, de los cuales 7 presentaron resistencia a la vancomicina.

A partir de muestras de orina, se aislaron cepas circulantes de *E. faecium*, que por medio de estudios epidemiológicos y técnicas moleculares se determinó su naturaleza y gravedad.

Se estableció el patrón de categorización clínica antimicrobiana según grupos fenotípicos para factores de riesgo: Nefrológicos (N= 60.2%), Extraurogenitales (E= 56.2%) y 75 ambos (EN= 51.4%) y la incidencia de casos con resistencia a vancomicina (mujeres 2.7% y hombres 2%), se determinó el patrón fenotípico (resistencia <32 µg/mL) y genotípico de resistencia a vancomicina (Genes *vanA* y *vanB*). Se caracterizaron mediante PCR del gen 16S (identidad <95%) y se estableció la relación clonal mediante ERIC-PCR encontrando dos perfiles clonales.

Se confirma la diseminación de *E. faecium* vancomicina resistente en pacientes con hospitalización prolongada, tratados con esquemas empíricos de antibióticos y que presentan factores de riesgo para infecciones de Vías Urinarias complicadas.

2. Introducción.

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son causadas por bacterias que colonizan los órganos del sistema urinario, junto a respuesta inflamatoria acompañado de bacteriuria y piuria: microbiológicamente catalogado como un recuento de más de 100,000 UFC/ml en urocultivo, tomando en cuenta una recolección adecuada de la muestra (Procop y col., 2017).

Las infecciones del tracto urinario representan la principal causa de consulta y hospitalizaciones en pacientes de todas las edades, las mujeres tienen un mayor riesgo de contraer una infección del tracto urinario que los hombres, es la principal infección en nosocomios (Johansen y col., 2011).

Las ITU pueden ser causadas por una variedad de bacterias y hongos, pero los patógenos más comunes son *Escherichia coli* Uropatógena. (UPEC), seguida de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Proteus mirabilis*. (Neugen y col., 2020).

Las ITU son algunas de las infecciones bacterianas más comunes y afectan a 150 millones de personas cada año en todo el mundo (Raza y col., 2018). En 2007, sólo en los Estados Unidos hubo un estimado de 10,5 millones de visitas al consultorio por síntomas de ITU (que constituyen el 0,9% de todas las visitas ambulatorias) y de 2 a 3 millones de visitas al servicio de urgencias (Gorrie y col., 2019, Bautista y col., 2013, García y col., 2018). En el presente estudio nos centramos en las infecciones por *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) vancomicina resistente como agente causal de infecciones complicadas en el tracto urinario.

3. Marco teórico.

3.1. Anatomía del Tracto Urinario.

Para entender el proceso de la ITU es necesario tener en mente la anatomía de este, debido a que su clasificación y fisiopatología dependen de la misma.

Las vías urinarias son el sistema de drenaje del organismo para eliminar la orina, que está compuesta de toxinas y exceso de líquido. El tracto urinario incluye dos riñones, dos uréteres, una vejiga y una uretra.

Para fines del estudio se tomará en cuenta como:

Vías urinarias altas: Riñones, uréteres.

Vías urinarias bajas: Vejiga, uretra, próstata. (Tortora & Derrickson, 2010).

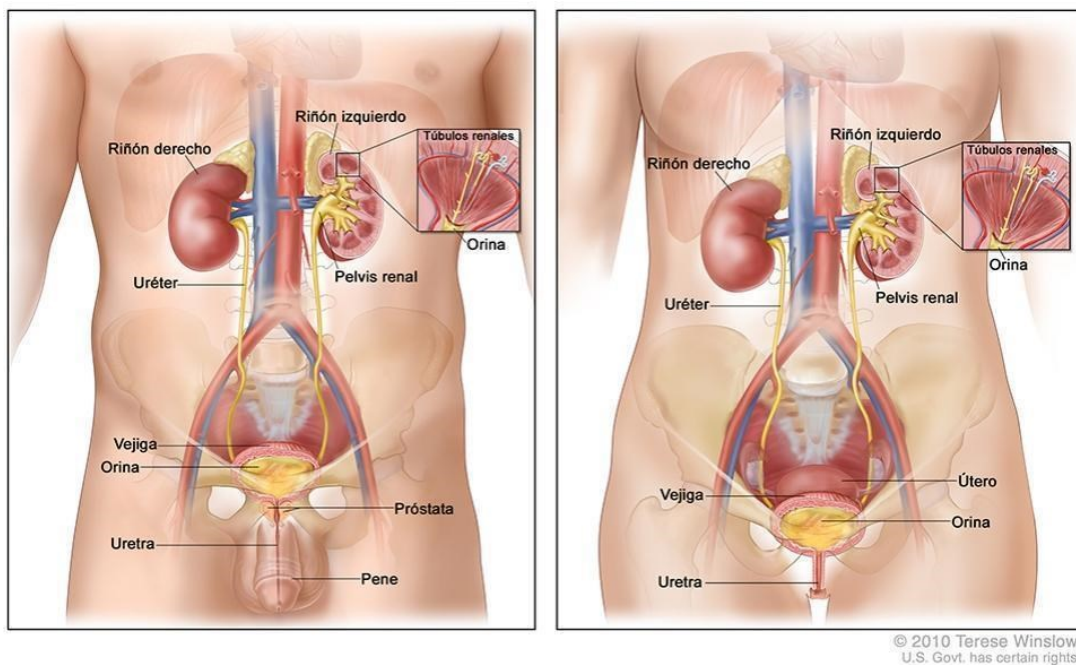


Figura 1 Esquema Anatómico del Sistema Urinario, obtenido de Terese Winslow LLC, Medical And Scientific Illustration julio 2022.

Las infecciones en el tracto urinario dependen de múltiples factores, descritos en diferentes modelos epidemiológicos que explican estos factores: la triada epidemiológica propuesta por Gordis en 1996, las asociaciones causales de Álvarez-Martínez (2004), relaciones causas directas e indirectas de enfermedad de Rottman (2012) y Goldis (2014), sin embargo, en todos los modelos de infección involucra un agente causal (Organización Panamericana de la Salud, 2002).

Por este motivo es imperante tener en cuenta los criterios para excluir una infección de la que no lo es, muchos casos son tratados con antibiótico por el hecho de presentar bacterias desde el examen general de orina, siendo casos de infección inaparente o presencia de bacterias de Microbiota Normal.

Una década atrás se creía que el tracto urinario (TU) era estéril cuando no se tenía una infección clínicamente identificable, evidencia reciente sugiere que el tracto alberga una comunidad microbiana residente inclusive cuando los cultivos tradicionales son negativos (Karstens y col., 2016, Neugen y col., 2020).

3.2. Microbiota normal del Tracto Urinario

La microbiota normal (MBN) del TU varía durante el desarrollo biológico de la persona. Las diferentes sucesiones microbiológicas que se producen en el TU dependen principalmente de los hábitos higiénicos, comportamiento sexual, entre otros que afectan cualitativa y cuantitativamente la composición de la MBN.

La MBN varía entre sexos, edades, partiendo que el TU es estéril, y siendo más abundante en la mujer que en el hombre debido a cuestiones anatómicas.

Mediante nuevas técnicas mejoradas de cultivo de orina se han identificado una comunidad bacteriana diversa que reside dentro del tracto urinario, dentro de los que destacan los géneros *Lactobacillus sp*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, y *Actinomyces sp* (Hilt y col., 2014), sin embargo, esta diversidad y abundancia en la microbiota varía conforme a grupos de edades y sexo, siendo más diverso en el género masculino de 70 años en adelante, hasta el momento no se ha determinado la importancia, ni función de la microbiota del TU (Lewis y col., 2013, Magistro & Stief, 2019).

Actualmente conforme a las investigaciones realizadas el desequilibrio en el microbioma urinario puede contribuir al desarrollo de síntomas del TU inferior. (Magistro & Stief, 2019).

3.3. Infección del Tracto Urinario

Para la toma de decisiones clínicas, la investigación, el laboratorio clínico, enseñanza, epidemiología es importante la definición y delimitación de las ITU.

La ITU es un término que describe un conjunto de infestación y multiplicación de microorganismos que involucran cualquier parte del TU, riñones, uréteres, la vejiga, la uretra; de las infecciones bacterianas más comunes, causadas por especies tanto Gram negativas como Gram positivas.

Se clasifica de acuerdo a 4 criterios: presentación clínica, gravedad de los síntomas, patrón de infección, clasificación propuesta por la Asociación Europea de Urología (EAU) a través de la Sección de Infecciones de Urología (ECDC, 2021), con base en los estudios presentados por Bjerklund Johansen (2011).

3.3.1. Clasificación de las ITUs

3.3.1.1. Presentación Clínica.

- Uretritis (uretra).
- Cistitis (vejiga).
- Pielonefritis (riñón).
- Urosepsis (torrente sanguíneo).
- Infección de la glándula accesoria masculina.

3.3.1.2. Gravedad de los síntomas.

- No Complicada
- Complicada
- Urosepsis
- Asociada a Cateterización

3.3.1.3. Patrón de infección

- Aguda
- Crónica
- Recurrente

ITU No Complicada: Se presenta como cistitis o pielonefritis agudas, el cuadro clínico característico incluye tenesmo vesical, urgencia y escozor miccional, acompañado o no por hematuria terminal, dolor hipogástrico, dolor lumbar y rara vez febrícula o fiebre, náuseas y vómito.

Se encuentran los siguientes grupos:

- Embarazadas.

- Sin alteraciones anatómicas o funcionales del TU.
- Sin comorbilidades.

ITU Complicada: Asociada con alteraciones anatómicas o funcionales del aparato genitourinario y/o presencia de enfermedad sistémica que contribuya al deterioro de la capacidad inmunitaria.

Es decir, cuando no cumple criterios de No Complicada:

- Hombres.
- Embarazadas.
- Alteraciones del tracto urinario (espasmo de vejiga, fiebre inexplicable, absceso intrarrenal, absceso perinéfrico).
- Enfermedades concomitantes.
- Recién nacido y niños pequeños.
- Pacientes de edad avanzada (espasmo de vejiga, confusión, etc.)
- Comorbilidades asociadas (DM, HAS, etc.) (Johansen y col., 2011).

Urosepsis

Disfunción orgánica que atenta contra la vida por una respuesta desregulada del huésped a una infección originada en el tracto urinario, signos y síntomas de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (anomalías en la temperatura corporal, aumento en frecuencia cardíaca, aumento en frecuencia respiratoria y recuento de glóbulos blancos elevado), puede agravarse o presentarse como su forma grave, presentando disfunción orgánica (Johansen y col., 2011, Porat y col., 2023).

Asociada a Cateterización

Ya sea transitorio (colocación por periodo no mayor a 30 días) o permanente (periodos de 30 días o mayores), si se presenta infección dentro de las 48 horas posteriores a la colocación de la sonda en el tracto urinario: fiebre sin clínica focal, signos de disreflexia, bacteriuria, hematuria relacionada con recambios traumáticos de la sonda, piuria intensa (mayor a 50 leucos por campo), hematuria macroscópica (30%), litiasis vesical o renal (Martínez & Mensa, 2005).

Patrón de Infección

Recurrente

Reaparición de síntomas de tres o más episodios al año o dos en los últimos 6 meses posteriores a un tratamiento antibiótico, aparentemente exitosos de una infección previa, puede deberse a litiasis infecciosa, prostatitis crónica, fístulas vaginales o intestinales, divertículos vesicales infectados, cuerpos extraños, entre otras (Johansen y col., 2011).

Las infecciones urinarias que ascienden a los riñones pueden provocar pielonefritis y urosepsis potencialmente mortal. Algunos casos de ITU pueden durar décadas y, cuando son refractarios a la terapia con antibióticos, en última instancia pueden requerir la extracción de la vejiga.

Las infecciones urinarias son causadas tanto por bacterias gramnegativas como grampositivas, así como por ciertos hongos. El agente causal más común de las ITU complicadas es UPEC. Entre las bacterias implicadas en las ITU complicadas después de UPEC en prevalencia se encuentra *Enterococcus spp*, *K. pneumoniae*, *Candida spp*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y

Estreptococo del grupo B como se observa en la Figura 2 (Flores-Mireles y col., 2015).

Partiendo de los modelos de causa para la infección, las bacterias cuentan con factores de patogenicidad y virulencia que les permiten infectar al hospedero, es necesario que además del agente causal se encuentren las condiciones necesarias para infestar al hospedero y que se presente la infección, dentro de estos factores se incluyen aquellos que vulneran el estado de salud de un paciente, no basta con un agente causal para producirse la infección, aunque estos son los principales agentes infecciosos requiere de un hospedero que cuente con las condiciones necesarias para su desarrollo: condiciones como sistema inmune deprimido, enfermedades concomitantes, etc.

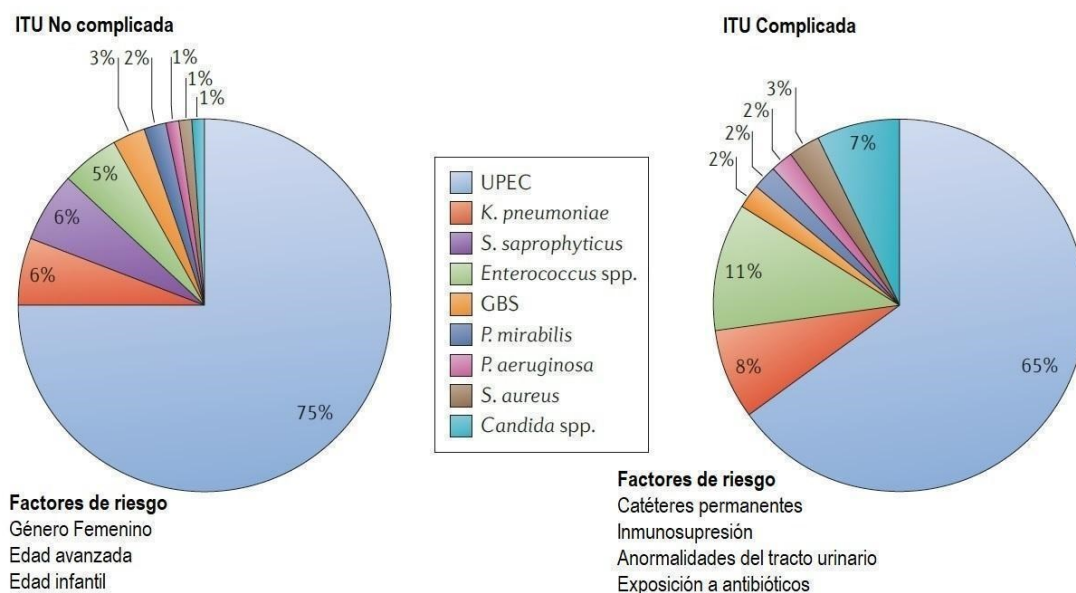


Figura 2. Epidemiología de las infecciones del tracto urinario tomada de: Flores-Mireles A, Walker N, Caparon M, Hultgren S. Urinary tract infections. epidemiology, mechanisms of infection and treatment options.

3.3.2. Factores de Riesgo

Los factores de riesgo de ITU son clasificados de acuerdo a la exposición del huésped a uropatógenos potenciales: el riesgo relevante para producir las tres infecciones de mayor importancia (Cistitis, Pielonefritis, urosepsis), que incrementen la colonización por los uropatógenos y aquellos que hacen que el huésped responda a las enfermedades que causan la colonización (Johansen y col., 2011, Flores-Mireles y col., 2015, Foxman, 2014).

En 2011 se realizó un metaanálisis donde se consideran fenotipos ORENUC, tomando en cuenta estas características (Johansen y col., 2011), que en conjunto con un agente causal desencadenan la ITU; fueron organizados los factores de riesgo de la siguiente manera, ver tabla 1.

Una vez que se presentan las condiciones necesarias de un hospedero susceptible (factores de riesgo) para que se establezca el agente causal, conforme a su grado de infectividad y pasado el periodo de incubación, se presentan síntomas característicos dependiendo de la zona y gravedad de la infección, estos síntomas engloban un cuadro clínico.

Tabla 1 Factores de Riesgo asociados a fenotipos ORENUC

Fenotipo	Categoría de factor de riesgo	Ejemplos de factores de riesgo
O	Sin factor de riesgo conocido	Mujeres premenopáusicas por lo demás sanas.
R	Factores de riesgo de ITU recurrente, pero sin riesgo de un resultado más grave.	Comportamiento sexual (frecuencia, espermicida) Deficiencia hormonal en la posmenopausia Tipo secretor de ciertos grupos sanguíneos Diabetes mellitus bien controlada.
E	Factores de riesgo Extraurogenitales con riesgo de desenlace más grave.	Prematuridad, recién nacido El embarazo. Género masculino. Diabetes mellitus mal controlada Inmunosupresión relevante (no bien definida).
N	Enfermedades nefropáticas con riesgo de evolución más grave.	Insuficiencia renal relevante (no bien definida). Nefropatía poliquística. Nefritis intersticial, por ejemplo, debido a analgésicos.
U	Factores de riesgo urológicos con riesgo de resultados más graves, que pueden resolverse durante la terapia.	Obstrucción ureteral por cálculo ureteral. Trastornos vesicales neurogénicos bien controlados. Catéter urinario externo transitorio de corta duración. Bacteriuria asintomática.
C	Catéter urinario permanente y factores de riesgo urológicos no resolubles con riesgo de evolución más grave.	Catéter urinario externo de larga duración. Obstrucción urinaria no resoluble. Alteraciones de la vejiga neurogénica mal controladas.

Datos obtenidos de: Truls. E. Bjerklund Johansen, et al, Critical review of current definitions of urinary tract infections and proposal of an EAU/ESIU classification system, Ent. J. Antimicrobiano. Agentes, 2011; 385 (2011): 64 – 70.

3.3.3. Cuadro Clínico

3.3.3.1. ITU No Complicada

El cuadro clínico depende de su localización, la cistitis se asocia con disuria, polaquiuria, urgencia miccional de manera menos frecuente dolor suprapúbico y hematuria; la pielonefritis se asocia clásicamente con dolor en fosa renal fiebre mayor de 38°C y escalofríos, menos recurrente se acompaña con náuseas y vómito (Johansen y col., 2011, Porat y col., 2023, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009).

3.3.3.2. ITU Complicada

Los síntomas clásicos de infección de vías urinarias (disuria, polaquiuria, urgencia miccional) (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009). Cuando además de los datos de infección de vías urinarias, se presenta prurito o flujo vaginal, considerar otras alternativas diagnósticas y realizar examen pélvico; en caso de existir complicaciones, tales como abscesos renales o perirrenales, se puede presentar fiebre, sensación de masa y sensibilidad en el flanco.

Los signos de respuesta inflamatoria sistémica reflejan mayor severidad del padecimiento y son: taquicardia y taquipnea o deshidratación, con ataque al estado general (Johansen y col., 2011, Porat y col., 2023, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009).

3.3.3.3. Infección de vías urinarias bajas recurrente

Las recurrencias pueden ser recaída o reinfección.

En las reinfecciones generalmente, los lapsos entre cada cuadro son largos y asintomáticos; cada cuadro se resuelve completamente y después de un tiempo generalmente largo se presenta un nuevo cuadro y por lo regular es ocasionado

por otro germen. En las recaídas la bacteriuria posterior a un cuadro de ITU persiste, los lapsos entre episodios son cortos y generalmente sintomáticos, usualmente obedecen al mismo microorganismo.

La mayoría de las mujeres con recurrencia de ITU presentan reinfección. Estas pacientes es poco probable que presenten anormalidades estructurales como causa de la recurrencia (Johansen y col., 2011, Porat y col., 2023, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009).

ITU en pacientes con sonda vesical

Síntomas inespecíficos como fiebre o fiebre intermitente, escalofríos, hipersensibilidad en flanco o suprapúbica, cambios en las características de la orina, deterioro mental o del estatus, pueden ser manifestaciones de ITU sintomática en pacientes con sonda, la ausencia de fiebre no excluye ITU.

Los síntomas y signos clínicos no son recomendados para predecir ITU sintomática en pacientes con sonda vesical. La presencia de episodios febriles en pacientes con sonda por largo tiempo se asocia con el desarrollo de anormalidades tales como litos o complicaciones renales (Johansen y col., 2011, Porat y col., 2023, Martínez & Mensa, 2005, Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009).

La ITU Complicadas comprenden una fisiopatología que inicia con infestación del TU que van incrementando respecto al tiempo de infección o debido a la inserción de sondas contaminadas con el microorganismo, pueden o no partir de una ITU No Complicada (Johansen y col., 2011).

3.3.4. Fisiopatología de la ITU

Las ITU no complicadas comienzan cuando los uropatógenos que residen en el intestino contaminan el área periuretral y pueden colonizar la uretra. La migración posterior a la vejiga y la expresión de pilis y adhesinas dan como resultado la colonización e invasión de las células superficiales en paraguas. Las respuestas inflamatorias del huésped, incluida la infiltración de neutrófilos, comienzan a eliminar las bacterias extracelulares. Algunas bacterias evaden el sistema inmunitario, ya sea a través de la invasión de la célula huésped o mediante cambios morfológicos que resultan en resistencia a los neutrófilos, y estas bacterias se multiplican y forman biopelículas. Estas bacterias producen toxinas y proteasas que inducen daño a la célula huésped, liberando nutrientes esenciales que promueven la supervivencia bacteriana y el ascenso a los riñones. La colonización del riñón da como resultado la producción de toxinas bacterianas y el daño del tejido del huésped. Los uropatógenos (UPEC, *K. pneumoniae* y *S. saprophyticus*) causan infecciones no complicadas en el tracto urinario, tienen la capacidad de unirse directamente al epitelio de la vejiga, compuesto por células superficiales, células intermedias o transicionales y células basales; La unión se lleva a cabo en las uroplaquinas α_3 y β_1 de la membrana apical de la célula superficial.

Las ITU complicadas, inician cuando las bacterias se unen a un catéter urinario, un cálculo renal o vesical, o cuando quedan retenidas en las vías urinarias por una obstrucción física (*P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *Enterococcus spp*).

Si no se trata, las infecciones urinarias pueden finalmente progresar a bacteriemia si el patógeno cruza la barrera epitelial tubular en los riñones.

Los uropatógenos que causan ITU complicadas siguen los mismos pasos iniciales que los descritos para las ITU no complicadas, incluida la colonización periuretral, la progresión a la uretra y la migración a la vejiga. Sin embargo, para que los patógenos causen infección, la vejiga debe estar comprometida. La causa más común de una vejiga comprometida es el cateterismo. Debido a la sólida respuesta inmunitaria inducida por el cateterismo, el fibrinógeno se acumula en el catéter, lo que proporciona un entorno ideal para la unión de uropatógenos que expresan proteínas de unión a fibrinógeno (*E. faecium*, *E. faecalis*). La infección induce la infiltración de neutrófilos, pero después de su unión inicial a los catéteres recubiertos de fibrinógeno, las bacterias se multiplican, forman biopelículas, promueven el daño epitelial y pueden sembrar la infección de los riñones, donde la producción de toxinas induce daño tisular. Si no se tratan, los uropatógenos que causan infecciones urinarias complicadas también pueden progresar a bacteriemia al cruzar la barrera de células epiteliales tubulares (Flores-Mireles y col., 2015).

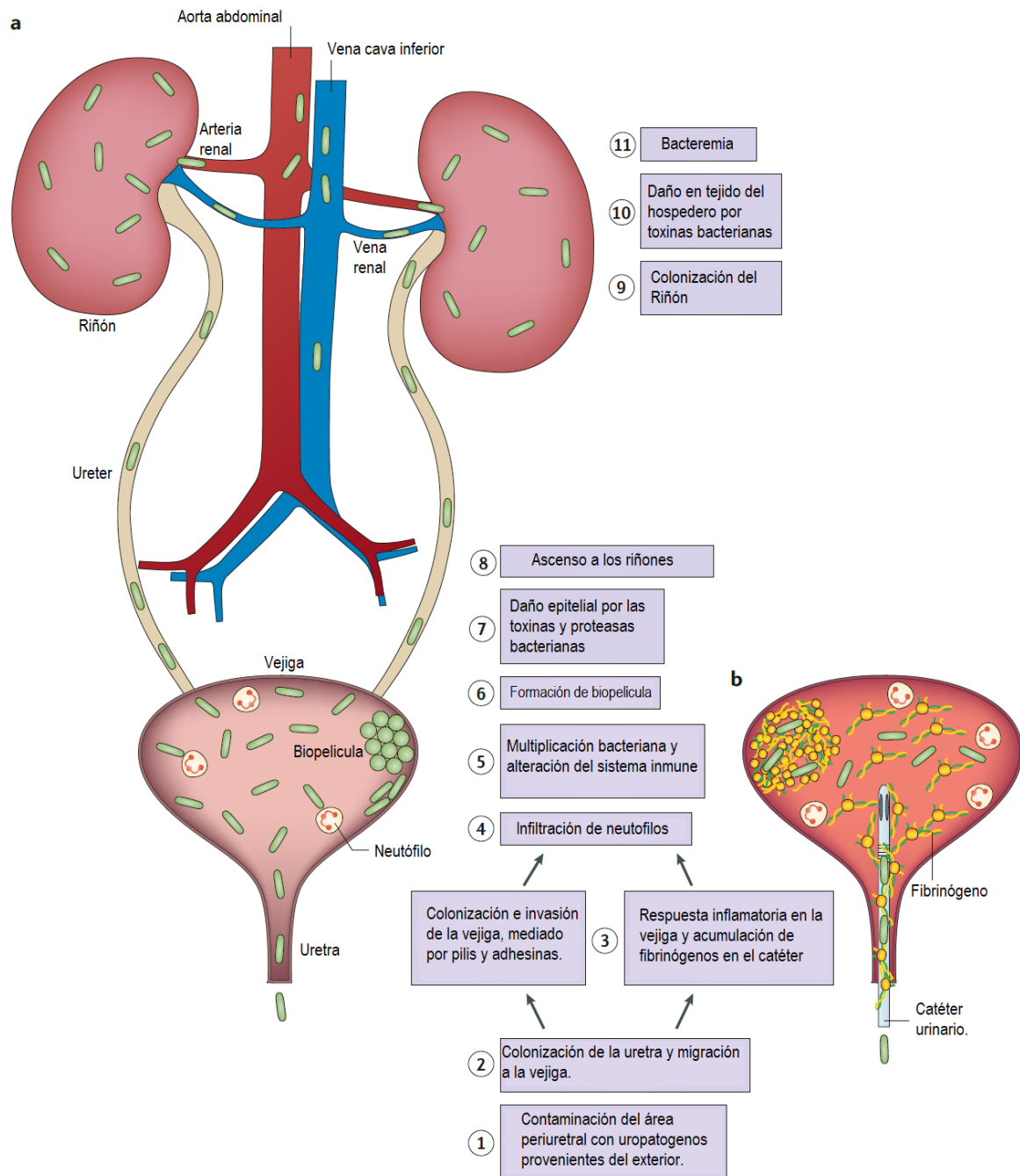


Figura 3 Patogenia de las infecciones del tracto urinario tomada de: Flores-Mireles A, Walker N, Caparon M, Hultgren S. Urinary tract infections. epidemiology, mechanisms of infection and treatment options

3.3.5. Epidemiología

De acuerdo con la secretaria de salud, el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), así como los datos reportados por la Red de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), a través del informe anual, durante 2016. En México aproximadamente entre el 62.7% de las infecciones asociadas a la atención de la salud tienen su origen en un foco urinario, ocupando el tercer lugar en frecuencia de las infecciones asociadas a la salud, generalmente debidas a un sondaje vesical. Las principales infecciones asociadas a la salud notificadas en la RHOVE, las cuales por orden de frecuencia fueron: bacteriemia con 24%, le sigue neumonía e infecciones de vía urinarias con 20.7 y 15.7 % respectivamente (Dirección General de Epidemiología 2016). Las infecciones del tracto urinario (ITU) en individuos con sondas urinarias representan un desafío significativo para la salud pública debido a su alta incidencia y consecuencias médicas graves. Son una de las principales causas de bacteriemia nosocomial, lo que resulta en la proliferación de microorganismos resistentes a múltiples antibióticos. Entre estos patógenos, se destacan los gramnegativos que producen betalactamasas de espectro extendido (BLEE), contribuyendo así a la resistencia antimicrobiana.

Enterococcus sp representa el 11 % de infecciones Complicadas. En el presente estudio nos centramos en las infecciones relacionadas a *E. faecium* vancomicina resistente, el cual en las últimas dos décadas la aparición de enterococos resistentes a la vancomicina es alarmante debido a la alta tasa de mortalidad (Raza y col., 2018), de manera inherente presenta resistencia a diversas clases de antibióticos (Gorrie y col., 2019), penicilinas y cefalosporinas principalmente. En Europa conforme el informe de vigilancia de 2018 de la Red Europea de

Resistencia a los Antimicrobianos, los porcentajes de resistencia a la vancomicina tuvieron un creciente aumento del 10.5% en 2015 al 17.3% en 2018 (ECDC 2021, Piezzi y col., 2009); en España la resistencia a la vancomicina es inferior al 5 % (Cercenado, 2016), en Estados Unidos la situación es más grave cerca del 30% de todas las infecciones por *E. faecium* son resistentes a vancomicina (CDC 2019).

En México se ha realizado reportes de aislamientos de *E. faecium* vancomicina resistente en algunos Hospitales del país, pocos son los casos que se han encontrado, es una problemática emergente que requiere especial atención sobre todo en unidades pediátricas y de cuidados intensivos (Girón-González y col 2003, Bautista y col., 2013, Reina-Bautista y col., 2013, García y col., 2018).

La importancia clínica del género *Enterococcus sp* está directamente relacionada con su resistencia a los antibióticos, todos los enterococos exhiben una menor susceptibilidad a la penicilina G (18 – 30 mU/día), ampicilina (12 g/día) o gentamicina (1-1.5 mg/kg/8 h), así como un alto nivel de resistencia a la mayoría de las cefalosporinas. Para muchas cepas, su nivel de resistencia a la ampicilina no excluye por lo que sigue siendo el tratamiento de primera elección.

Debido a esta resistencia intrínseca radica la importancia de conocer los tratamientos de acuerdo con el tipo de infección, zona de infección, nivel de gravedad, factores de riesgo, clasificar la infección para que el tratamiento sea de inicio efectivo, con base en las guías de atención establecidas en el sistema de salud en México (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009).

3.3.6. Tratamiento

Infección aguda del tracto urinario bajo

En México existen guías para la estandarización del tratamiento de infección en el TU, estas están dirigidas a pacientes de acuerdo con grupos específicos (Infección aguda, no complicada de TU en la mujer, ITU no complicadas en menores de 18 años en el primer y segundo niveles de atención, infección recurrente de vías urinarias y existen esquemas para tratamiento de acuerdo con la gravedad de los síntomas, (Tabla 2-1, 2-2 y 2-3).

En el caso del tratamiento para ITU Complicadas debe estar relacionado al factor de complicación subyacente, tomando en cuenta un inicio de tratamiento de acuerdo a las recomendaciones de la Tabla 2-3 con duración de 14 días, sin embargo, es obligatorio realizar un cultivo y acompañar el tratamiento con un control de sensibilidad antibiótica (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009, Instituto Mexicano del Seguro Social COMEGO, 2009, Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia 2014).

Tabla 2-1 Tratamiento Cistitis Aguda No Complicada

Antibiótico	Dosis	Duración
Nitrofurantoína	100 mg, c/8 h	5 a 7 días
Ciprofloxacino	250 mg, c/12 h	3 días
Ciprofloxacino de liberación prolongada	500 mg, c/24 h	3 días
Fosfomicina	3g única dosis	
Trimetoprima- Sulfametoxazol	160/800 mg, c/12h	3 días

Tabla 2-2 Pielonefritis Aguda No Complicada

Antibiótico	Dosis	Duración
Ciprofloxacino	500 mg, c/12 h	14 días
Ciprofloxacino de liberación prolongada	1g, c/24 h	14 días
Levofloxacino	500 mg, c/24 h	14 días
Ceftibuteno	400 mg, c/24 h	14 días
Cefixima	400 mg, c/24 h	14 días

Tabla 2-3 ITU Complicada

Antibiótico	Dosis	Duración
Ciprofloxacino	400 mg IV, c/12 h	14 días
Levofloxacino	500 mg IV, c/24 h	14 días
Ceftriaxona	1 g IV, c/12 h	14 días
Cefotaxima	1 g IV, dosis titulada	14 días
Amikacina	15 mg/kg/día IV, c/24 h	14 días
Gentamicina	3.5 a 5 mg/kg/día IV, c 24 h	14 días
Vancomicina	30 - 50 mg/kg/día	Dosis única

Tablas obtenidas de: Guía de Referencia rápida Diagnóstico y tratamiento de la ITU aguda no complicada en la mujer, IMSS México 2009.

Infección recurrente de vías urinarias guía práctica clínica, Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia, 2014.

Resistencia bacteriana y comorbilidades presentes en pacientes urológicos ambulatorios con urocultivos positivos. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 56(4), 347-353.

3.4. Descripción del Género

E. faecium es una bacteria perteneciente a grupo de cocos Gram positivos no formadores de endoesporas, agrupándose en pares o cadenas cortas, no móviles, anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo (de amplio rango de carbohidratos con producción principalmente de L(+) - ácido láctico, pero no de gas), producen un pH final de 4.2 a 4.6; de requerimientos nutricionales complejos, catalasa negativos o, más comúnmente, positivo débil (Procop y col., 2017, Raza y col., 2018, Gorrie y col., 2019, García y col., 2018, Reina-Bautista y col., 2013, Murray, 2009), presentan crecimiento en caldo con NaCl 6.5% a 10 y 46 °C pH 9.6 e hidrolizan la esculina en presencia de sale biliares al 40%. La mayoría de los *Enterococcus sp* hidrolizan L-pirrolidonil-β-naftilamida (PYR) y tienen antígeno del grupo D de Lancefield (los diferencian del género *Streptococcus sp* del grupo D). Todas las cepas producen leucina aminopeptidasa (LAP), pueden presentar hemólisis de tipo α y γ y en agar sangre siendo esta última la más frecuente (Flores-Mireles y col., 2015).

Son bacterias de baja virulencia y limitada capacidad patógena, pero con gran resistencia a antibióticos intrínseca y extrínseca (Bautista y col., 2013), considerados un problema en las unidades de cuidados intensivos de los grandes hospitales, donde suelen causar una variedad de infecciones (bacteriemia, endocarditis, Infecciones urinarias, contaminación de heridas postquirúrgicas, etc) por contacto directo con pacientes infectados, a través de

las manos de trabajadores o mediante equipos de atención al paciente o superficies ambientales contaminados (Flores-Mireles y col., 2015).

3.4.1. Factores de virulencia relacionados e ITU.

Los enterococos codifican varios factores de adhesión incluida la adhesina de colágeno Ace, la proteína de superficie enterocócica (Esp), el antígeno polisacárido enterocócico (Epa) y los pili asociados a endocarditis y biopelícula (Ebp). El Ebp contribuye a la infección asociada a cateterización generando la persistencia de la infección y diseminación a los riñones (Bush & Vazquez-Pertejo, 2023). La respuesta inflamatoria en la inserción del catéter genera liberación de fibrinógeno el cual se acumula en la vejiga y se deposita en el catéter implantado, posteriormente la adhesina Ebp pilis la cual contiene un sitio de unión a fibrinógeno N-terminal interviene en la colonización del catéter y la formación de biopelículas, estos factores contribuyen a la colonización de *E. faecium* en el tracto urinario, sin embargo para este estudio no serán analizados, dada la naturaleza del estudio y los objetivos si es de gran importancia la resistencia que presenta a diversos antibióticos de manera natural y la resistencia a la vancomicina (Flores-Mireles y col., 2015).

3.4.2. Resistencia a Antibióticos del Género.

Previo a entender la resistencia es necesario comprender la composición y como se realiza la síntesis de la pared celular en bacteria Gram positivas, esta se compone de peptidoglucano (también conocido como mureína), ácido lipoteicóico, ácido teicóico, polisacárido capsular. El principal componente es el peptidoglucano el cual es una malla polimérica formada de N-acetylglucosamina

(GlcNAc) y ácido N-acetylmurámico (MurNAc) entrecruzada por puentes peptídicos simples; este proceso consta de tres etapas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009): etapa citoplásmica, etapa de transporte a través de la membrana citoplásmica, y la etapa de organización final de la estructura del peptidoglucano: en el citoplasma la L-alanina (L-Ala) terminal es convertida en D-alanina (D-Ala) por la racemasa, la D-Ala ligasa une dos moléculas de D-Ala dipeptidasa y subsecuentemente es añadido a uracil difosfato-N-acetilmuramiltripeptido para formar UDP-MurNAc-L-Ala-D-iGlu-L-Lis-D-Ala-D-Ala el llamado nucleótido de Park, este se une al transportador lípido undecaprenil-pirofosato para generar el lípido I y UDP-GlcNAc es añadido para crear el lípido II (GlcNAc-MurNAc-I-Ala-I-iGlu-I-Lys-d-Ala-D-Ala), donde culmina la etapa de transporte. Ambos péptidos son translocados y reorganizados mediante la formación de puentes peptídicos en el sitio de Unión de Proteínas resto terminal D-Ala-D-Ala (etapa de reorganización).

Durante la etapa citoplásmica se sintetizan los precursores del peptidoglucano, La resistencia a múltiples fármacos común entre los enterococos, son naturalmente resistente a la trimetoprima, la clindamicina, las cefalosporinas, las penicilinas y clotrimazol (Cercenado, 2011, Kristich y col., 2014).

E. faecium puede adquirir resistencia a muchas familias de antibióticos: glucopéptidos, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, oxazolidinonas, lipopéptidos, estreptograminas y glicilciclina (Hollenbeck & Rice, 2012).

3.4.2.1. Beta-lactámicos

Los enterococos presentan una elevada resistencia a cefalosporinas y penicilinas semisintéticas como la oxacilina, meticilina y nafcilina; moderadamente resistentes a penicilinas de amplio espectro como oticarcilina y carbenicilina. Algunos beta-lactámicos como la penicilina, imipenem y la ampicilina presentan actividad contra enterococos, con concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) entre 1 a 8 µg/ml (CLSI 2018) y algunas con CIM > 64 µg/ml, esta resistencia está mediada por el cambio de sitios de unión de las proteínas de unión a penicilinas (PBP por sus siglas en inglés: penicillin-binding protein) específicamente la PBP5 (Cercenado, 2011, Kristich y col., 2014, Hollenbeck & Rice, 2012).

3.4.2.2. Aminoglucósidos

Todos los enterococos tienen una baja resistencia a los aminoglucósidos (CIM de 8-25 µg/ml), probablemente reflejando como transporte de este antibiótico a través de la pared celular.

La resistencia a los aminoglucósidos es definida por el crecimiento a concentraciones de 2000 µg/ml y 500 µg/ml de estreptomicina y gentamicina respectivamente en agar infusión cerebro-corazón, o 1000 µg/ml de estreptomicina cuando se usa caldo infusión cerebro-corazón. La resistencia se debe a la presencia de una enzima modificadora, la AAC(6') Ie-APH(2''), que confiere la resistencia de alto nivel a gentamicina (y al sinergismo con otros aminoglucósidos excepto estreptomicina). La resistencia a estreptomicina es mediada por mutaciones en la subunidad ribosomal 30S y a la presencia de una 6-6'adeniltransferasa de estreptomicina. La enzima 3'fosfotransferasa inactiva a

la kanamicina y la amikacina. La producción de estas enzimas modificadoras de los aminoglucósidos está mediada por plásmidos (Cercenado, 2011).

3.4.2.3. Fluoroquinolonas

La resistencia adquirida por enterococos a quinolonas está mediada por expresión de regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR, por sus siglas en inglés: quinolone – resistance - determining regions) como *gyrA*/*gyrB* y *parC*/*parE*, que actúan por la inhibición de topoisomerasa IV. Su inhibición conduce a una muerte celular ya que ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN (Oyamada y col., 2006).

3.4.2.4. Peptídicos

Glucopéptidos y lipoglucopéptidos

Tradicionalmente la vancomicina había sido efectiva contra enterococos resistentes a múltiples antibióticos. Hace 2 décadas se reportó el primer ERV en Reino Unido y desde entonces las proporciones de infecciones por este agente ha incrementado de 0.5 % en 1989 a un 30% en la actualidad. La resistencia a la vancomicina va generalmente acompañada de resistencia a otros glucopéptidos incluyendo la teicoplanina y daptomicina.

La vancomicina y otros glucopéptidos inhiben la biosíntesis de la pared celular en la etapa de organización estructural del peptidoglucano por unión con las terminales D-Alanil-D-alanina (D-ala-D-ala) del precursor del peptidoglicano en la pared externa de la membrana citoplasmática. Esta interacción bloquea la formación de un peptidoglucano maduro, principalmente impidiendo el acceso de la transpeptidasa a su sustrato, que evita la formación de los puentes peptídicos a su sustrato y con esto impide la formación de los puentes peptídicos cruzados

entre las cadenas de polisacáridos que proporcionan a la pared celular su estabilidad.

Esta resistencia adquirida presenta diferentes genotipos y sus características resumidos en la tabla 3 (Rincón y col., 2014).

Fenotipos Van

Los enterococos resistentes han adquirido un conjunto de genes de resistencia cuyos productos genéticos trabajan en conjunto para modificar el sitio terminación D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac durante la síntesis de peptidoglucano terminados en D-Ala-D-Lac o D-Ala-D-Ser (Rincón y col., 2014).

Fenotipo *vanA*

Las cepas con fenotipo *vanA* se caracterizan por presentar resistencia inducible de alto nivel tanto a la vancomicina (CIM >64 mcg/ml) como a la teicoplanina (CIM >16 mcg/ml). La resistencia tipo *vanA* es transferible. El gen de resistencia *vanA* se encuentra localizado en el transposón Tn1546, de 10.8 Kb, generalmente localizado en un plásmido, aunque en algunos casos se ha transferido al cromosoma. En este transposón están codificadas las siete proteínas que intervienen en la resistencia a los glucopéptidos:

- a) VanR y VanS, implicadas en la regulación del gen de resistencia,
- b) VanA, VanH y VanX, responsables directas de la resistencia a glucopéptidos;
- c) VanY y VanZ, proteínas accesorias (Cercenado, 2011, Kristich y col., 2014, Hollenbeck & Rice, 2012, CLSI 2018).

Tabla 3 Tipos de resistencia adquirida a glucopéptidos en el género *Enterococcus* sp.

	Resistencia adquirida								Resistencia Intrínseca
	alto nivel		variable	Moderado					bajo nivel
Fenotipo (ligasa)	Van A	Van M	Van B	Van D	Van E	Van G	Van L	Van N	Van C1/C2/C3
CMI (mg/L)									
Vancomicina	16-1000	>256	4-32 (1000)	64-128	8-32	16	8	12-16	8-16
Teicoplanina	4-512	1-96	0.5-1	4-64	0.5	0.5	<4	0.5	<4
Transferibilidad	+	+	+	-	-	+	-	+	-
Principales especies de enterococos	Efm, Efc, Edu, Ehi, Egl, Ecs, Emd		Efm, Efc, Edu, Egl	Efm, Efc, Erf	Efc	Efc	Efc	Efm	Egl, Ecs, Efv (Efm, Efc)
Expresión	Inducible	Inducible	Inducible	Constitutiva	Inducible	Inducible	Inducible	Constitutiva	Constitutiva/in ducible
Localización genética	PI/Cr	PI/Cr	Cr/PI	Cr/PI	Cr	Cr	Cr?	PI	Cr
Precusores PG	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser

Abreviaturas: CMI, concentración mínima inhibitoria; Efm, *E. faecium*; Efc, *E. faecalis*; Edu, *E. durans*; Ehi, *E. hiriae*; Egl, *E. gallinarum*; Ecs, *E. casseliflavus*; Erf, *E. raffinosus*; Eav, *E. avium*; Emd, *E. mundtii*; Efv, *E. flavescens*;

PI, plasmídica; Cr, cromosómica; PG, peptidoglicano.

Obtenido de: Cercenado E. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiológicas en España, *Enfer Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(supl.5):59-6

Fenotipo VanB

Las cepas portadoras del gen *vanB* se caracterizan por niveles variables de resistencia a la vancomicina (CIM entre 4 y 100 g/ml) y sensibilidad a la teicoplanina (Facklam & Collins, 1989).

La resistencia VanB se transfiere en algunas cepas por conjugación y se asocia a la movilización de material genético de elevado peso molecular de cromosoma a cromosoma. El análisis de la secuencia de aminoácidos de VanB ha permitido demostrar la elevada homología (65-75%) existente con la ligasa VanA, la deshidrogenasa VanH y la dispeptidasa VanX. Probablemente, las diferencias observadas en la expresión fenotípica y en las sustancias inductoras de la resistencia entre las cepas con fenotipo y en las sustancias inductoras de la resistencia entre las cepas con fenotipo VanA y VanB sean debidas a variaciones en el sistema regulador, cuya homología es menor (<40%).

La resistencia a los glucopéptidos en *Enterococcus sp* ocasiona la pérdida de una importante alternativa terapéutica en un género que presenta resistencia intrínseca a muchos antibióticos y que muestra una gran capacidad para adquirir nuevas resistencias. Además, no debe descartarse la posibilidad de transferencia *in vivo*, lo que plantearía graves dificultades terapéuticas, sobre todo en las infecciones causadas por *S. aureus* resistentes a meticilina (Facklam & Collins, 1989).

Se ha comprobado de manera experimental que los genes *vanA* y *vanB* se pueden transferir del enterococo a otras bacterias. *S. aureus* ha hecho resistencia a la vancomicina (SAVR) a través de la transferencia intergénica del transposón Tn1546 que acarrea los genes *van* en las cepas *vanA* de un co-

aislamiento de *E. faecalis*, creando así un *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina ((Cercenado, 2011, Kristich y col., 2014, Hollenbeck & Rice, 2012, CLSI 2018, Rincón y col., 2014).

Para su diagnóstico en el laboratorio se realiza un cultivo in vitro para obtener una cepa pura en Agar Sangre de Carnero al 5 % (Koneman, M.D. 2003); una vez obtenida la cepa purificada puede diferenciarse mediante el método convencional de Facklam y Collins (1988) o Ruoff (1990) o métodos automatizados (VITEK®, BD Phoenix™, MALDI-Biotyper®) o métodos moleculares (HybridSpot12™, BIOFIRE®, FILMARRAY®) (Procop y col., 2017, Murray, 2009, Ruoff y col., 1990, Da Glória S Carvalho et al., 2006).

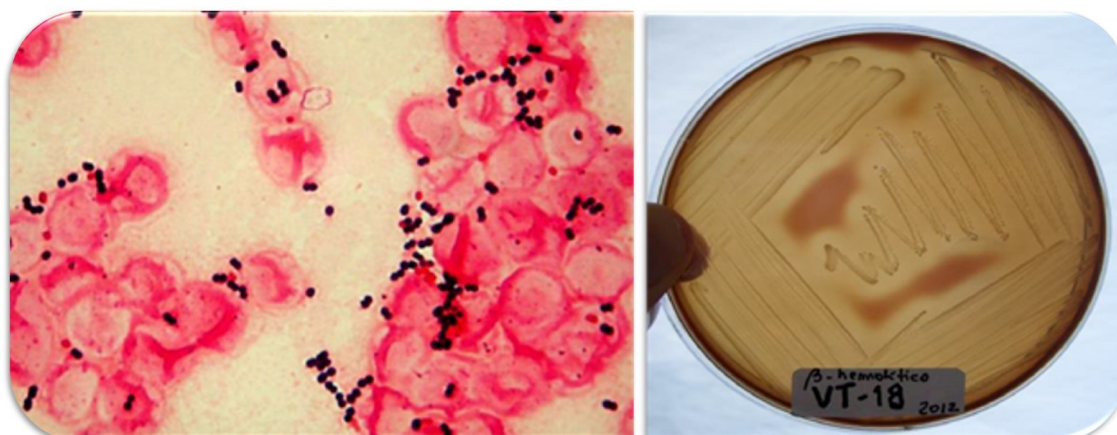


Figura 4. SEQ Figura * ARABIC 4

A: Coloración de Gram. Se observa la morfología y la agrupación de *E. faecium*.

B: Placa con Agar Sangre Carnero (5 %) sembrada con técnica por agotamiento en cuatro cuadrantes donde se observan colonias de *E. faecium* productoras de β -hemólisis.

Tomado de: <http://microbe-canvas.com//index.php>. ERASMUS MC.

3.5. Caracterización fenotípica convencionales.

La caracterización fenotípica de *Enterococcus* a nivel de género es simple y se realiza por test bacteriológicos convencionales siguiendo, con algunas modificaciones, la metodología del esquema propuesto por Facklam (2002, Carvalho & Teixeira (2003), entre otros (Da Glória S Carvalho et al., 2006). La temperatura óptima de crecimiento es 35 °C, aunque pueden crecer dentro de

un rango comprendido entre 10 y 45 °C. La literatura demuestra que muchas cepas pueden sobrevivir a 60 °C por 30 min o crecer en presencia de 6,5 % de NaCl y pH 9,6. En placas de agar sangre se observan colonias cremosas de 1 mm a 2 mm de tamaño que pueden producir hemólisis.

La prueba de la catalasa resulta negativa para este género, aunque está descrito que algunas cepas pueden poseer una “pseudocatalasa”. La prueba de hidrólisis es positiva para L-pirrolidonil β -naftil-amida (PYR). La producción de gas, el crecimiento en agar con bilis esculina al 40 %, la actividad de leucina arilamidasa, la presencia de hemólisis en agar base Columbia con 5 % de sangre de carnero y la producción de acetoina, son otras pruebas bioquímicas que están dentro del esquema de su identificación.

Otras pruebas que se realizan son: hidrólisis de leucina-amino-peptidasa, la observación de producción de pigmento, la utilización de piruvato, el estudio de tolerancia al telurito 0,04 %, hidrólisis de arginina y la formación de ácido en caldo con metil- α -D-glucopiranosido. Para la caracterización de especies de enterococos implican investigar la fermentación de hidratos de carbono, como: glucosa, melibiosa, adonitol, D-rafinosa, lactosa, melezitosa, ramnosa, manitol, sorbitol, L-arabinosa, L-sorbosa, rafinosa, trehalosa, D-xilosa, ribosa, sacarosa y D-arabitol.

La Figura 5 describe el esquema de identificación convencional del género *Enterococo*, señalando con rojo la ruta para el fenotipo de *E. faecium*.

E. faecalis y *E. faecium* son las especies más aisladas de muestras clínicas humanas, pertenecen al Grupo II, que se compone de especies que forman ácido en caldo manitol, hidrolizan la arginina, pero no forman ácido en caldo sorbosa.

Debido a la resistencia que presentan ciertas especies de enterococos frente a VAN y al impacto que produce el hallazgo de cepas Enterococos Vancomicina Resistentes (EVR) en instituciones de salud, la prueba de screening para la rápida detección de resistencia a este antibiótico, completa el diagnóstico fenotípico (Facklam RR. Collins 1989, Koneman y col. 2003, Carvalho MDGS 2006).

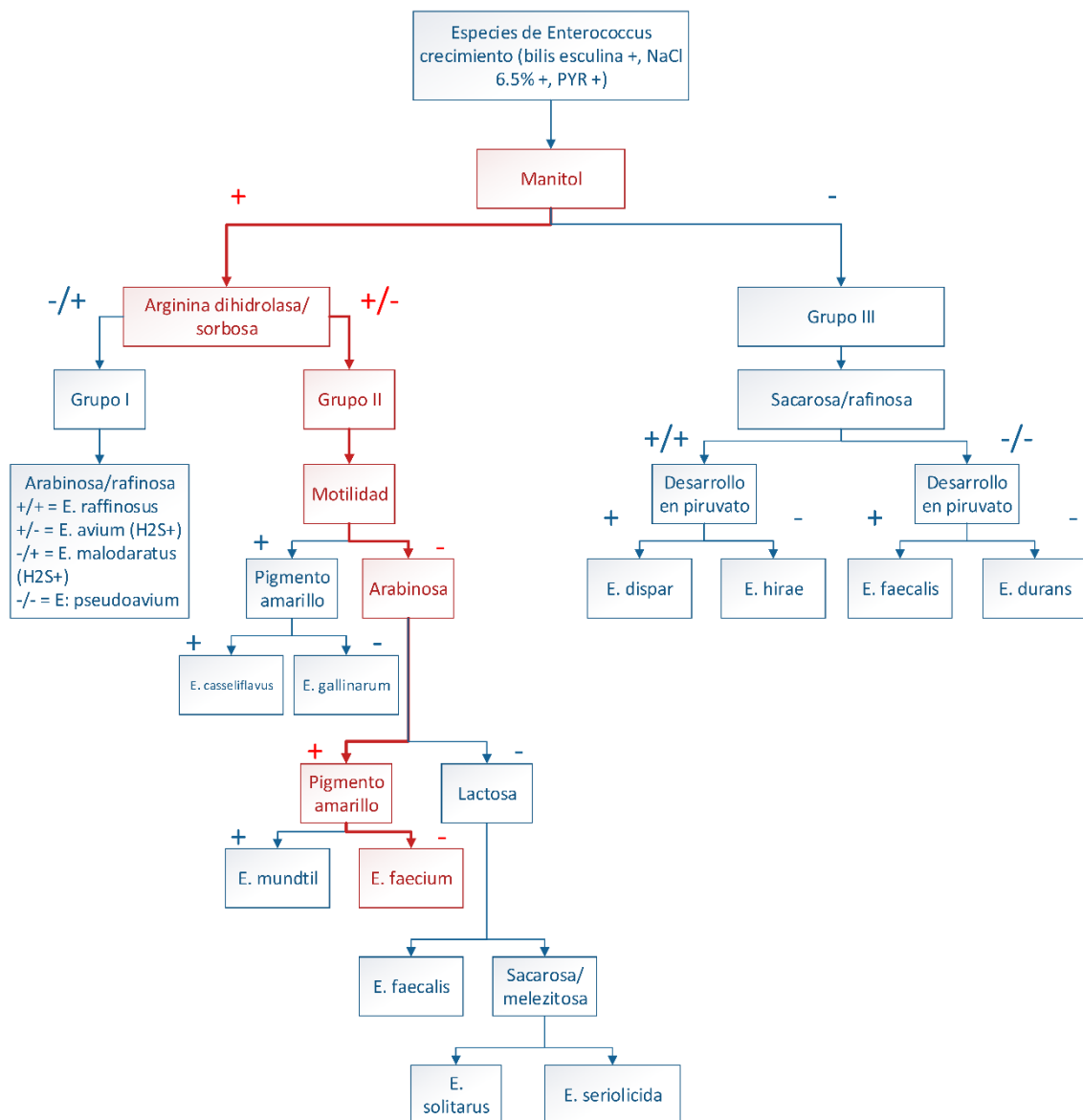


Figura 5 Esquema básico de identificación fenotípica para el género *Enterococcus* spp. Adaptado de: Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schrenckenberger P, Woods G. (2008) Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 6ta ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

3.6. Caracterización fenotípica mediante equipos automatizados.

Los métodos automatizados identifican a los microorganismos por métodos bioquímicos patentados, que radican en la variación de colores en pocillos contenidos en tarjetas comerciales por medio de los productos del metabolismo de la bacteria, caracterizadas por un valor numérico conocido como Bionúmero; este número de identificación le permite asignar al equipo un género y especie contenido en su base de datos con un porcentaje de detección que debe ser mayor a un 80% para considerarse como una correcta identificación.

Diversas investigaciones han demostrado que existen dificultades en la identificación de *E. faecium*, principalmente con kits comerciales como el sistema API 20 S system (Biomérieux), al momento de discriminar especies diferentes a *E. faecalis* y a *E. faecium*, mostraron escasa eficiencia del sistema VITEK 2 en la detección de otras especies del género, dicha metodología diagnóstica es fiable para *E. faecalis* y *E. faecium*.

Dado que los métodos bioquímicos y automatizados no logran diferenciar en ciertas ocasiones *E. faecium* de ciertas especies de enterococos (Cheng S. y col. 1996), puede presentar porcentajes de similitud mayor al 90%, entre diferentes especies del género, al momento de su identificación (Fang H. y col 2012) se ha considerado como un método poco eficiente para la identificación de la especie, es por ello que, los métodos moleculares son una mejor elección al momento de esa identificación por caracterización genotípica (Bosshard, P. y col. 2004).

Replicación del ADN

Para comprender el proceso de identificación genotípica es necesario comprender los sistemas naturales de replicación del ADN.

El ADN es una molécula de dos cadenas enrollada sobre sí misma, formando una doble hélice que fue propuesta por James Dewey Watson y Francis Harry Compton Crick en 1953. Cada cadena está formada por secuencias de desoxirribonucleótidos: Adenina (A), Citocina (C), Guanina (G) y Timina (T).

Las dos cadenas se complementan entre sí, siendo así que la A se une a T por doble enlace de puente de hidrogeno, una C se une a una G por triple enlace de puente de hidrógeno estabilizando las dos cadenas dando paso a estructura secundaria del ADN o doble hélice. Cada cadena tiene un extremo 5' y 3' la cadena complementaria es antiparalela por tal motivo tendrá un sentido 3' – 5'.

Durante la replicación del ADN se separan las dos hélices como paso inicial, mediante la enzima helicasa que rompe los puentes de hidrógeno para dar paso a la horquilla de replicación, cada cadena de la horquilla es una hebra molde a partir de la cual se pueden obtener dos cadenas de ADN idénticos a partir de uno y mediante proteínas estabilizadoras se mantiene la separación de la horquilla.

La enzima primasa inicia el proceso de replicación formando una pequeña cadena de ARN llamada primer o cebador, esta pequeña cadena funge como iniciador de la construcción de la hebra complementaria; en el cebador se une la ADN polimerasa 3, incorporando desoxirribonucleótidos en el sentido 5'-3'. En la cadena complementaria la enzima primasa genera varios cebadores para que la enzima polimerasa 1 realice la síntesis de pequeños fragmentos de ADN en sentido 5'-3' denominados fragmentos de Okazaki.

A continuación, la enzima exonucleasa elimina todos los cebadores y la ADN polimerasa 1 culmina la síntesis de ADN en estos espacios. Por última la enzima ADN ligasa une todos los fragmentos de ADN en ambas cadenas y la topoisomerasa elonga de nuevo la cadena dando paso a la hélice (Burgers P., Kunkel T. 2017)

3.7. Caracterización genotípica.

Los sistemas fenotípicos de identificación suelen presentar problemas inherentes a la bacteria, “no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayo repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros” (Cercenado E. y col. 2011), *Enterococcus sp* es uno de géneros más heterogéneos fenotípicamente hablando, los métodos moleculares reducen dicha problemática y pueden utilizarse como complementarios e incluso de referencia.

En todo proceso aplicado a la Biología Molecular se requiere como materia prima ADN o ARN y su extracción es crucial, pues, se requieren muestras de ADN completamente puro para obtener resultados confiables; debe considerarse el tipo de ácido nucleico que se va a extraer: ADN de cadena sencilla (ADNss), ADN de cadena doble (ADNds), ARN total, ARN mensajero (ARNm) o ARN ribosomal (ARNr); el organismo del cual proviene el ácido nucleico: células eucariotas (animales o plantas), células procariotas o virus; fuente de la muestra donde será extraído el material genético: cultivo celular, tejido, sangre, líquido biológico, etc; por último es necesario considerar la técnica a la cual se destinará el producto de la extracción, dicha extracción se caracteriza por la

homogeneización del tejido, la lisis de la célula y la inactivación de las enzimas nucleares (Montes y col., 2013).

La homogeneización mecánica o química consiste en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético mediante métodos mecánicos (nitrógeno líquido, trituración, lisis hipotónica), tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles), por digestión enzimática (proteína K).

Durante el proceso de lisis celular se busca que las interacciones moleculares que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifiquen o eliminen permitiendo la liberación de los ácidos nucleicos. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular; en este paso es imprescindible el uso de inhibidores de enzimas que degradan el ADN (DNAsas). Las soluciones elaboradas para lisis son formuladas con agentes quelantes como EDTA, que forma complejos con el Mg^{2+} e impide la función de las DNAsas.

Posteriormente la purificación del ADN se realiza mediante extracción/purificación, ultrafiltración, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad, ya sean métodos tradicionales o comerciales;

La purificación se puede realizarse por métodos tradicionales o por métodos comerciales; el protocolo tradicional inicia con la separación de proteínas y lípidos mediante solvente orgánicos (fenol, cloroformo, alcohol isoamílico) y ciclos de centrifugación, el ADN es hidrofílico debido a los grupos fosfatos en el exterior de las cadenas, permitiendo su separación en medios acuosos, mientras que las proteínas y lípidos quedan disueltos en la fase orgánica; el siguiente paso

es la precipitación del ADN, adicionando etanol en la fase acuosa y soluciones con altas concentraciones de iones sodio y amonio que se unen a los grupos fosfato permitiendo que el ADN se pliegue sobre sí mismo reduciendo su solubilidad: se separa el etanol por decantación y evaporación; es necesario re-suspender el ADN en una solución amortiguadora de pH 7 (Tris-HCl a 10mM y EDTA a 0.1 Ma) para evitar la hidrólisis ácida (Ayats Ardite, 2017).

Actualmente existen kits comerciales que cuentan con protocolos de extracción, el rendimiento del proceso depende del tipo y cantidad de material inicial (ADN), dichos métodos cuentan con una matriz o membrana de sílice y se emplea una columna cromatográfica aprovechando la afinidad de los grupos fosfato, lípidos y proteínas que son eluidas con una solución de lavado (Torres-Rosales F. 2021).

3.7.1. Caracterización genotípica mediante la técnica de PCR

La técnica consiste en la amplificación de una región específica de ADN utilizando cebadores, a través del uso de productos necesarios para la síntesis de nuevas cadenas de ADN. Los cebadores son fragmentos cortos de ADN con una secuencia definida complementaria al ADN objetivo que se va a detectar y amplificar (Garibyan & Avashia, 2013).

La muestra pura de ADN se agrega a una mezcla con los cebadores, desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa), solución amortiguadora, un cofactor el cual generalmente el magnesio y agua en un termociclador, el cual realiza ciclos de cambio de temperatura para llevar a cabo tres fases:

Fase de desnaturalización: Se caracteriza por mantener una temperatura de 94 a 96 °C durante 20 a 30 segundos produciendo la ruptura de puentes de hidrógeno que mantienen unidas ambas hebras de ADN, el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper su triple enlace.

Fase de hibridación: se lleva a cabo la alineación de los cebadores al extremo 3' del templado separado en la desnaturalización, en esta etapa es crucial la temperatura de hibridación o Temperatura de Melting (T_m) oscilando entre 50 y 60 °C.

Fase de extensión: durante esta etapa inicia su función catalítica la Taq polimerasa uniéndose al complejo templado-cebador, en este surge la elongación de los amplicones a los 72°C (temperatura a la cual la enzima es funcional).

Como se mencionó el resultado de este proceso se conoce como amplicones, para poder saber si se llevó a cabo correctamente la PCR y, por tanto, la formación de amplicones es necesario realizar una electroforesis en geles de agarosa del 1 al 2 %.

Una electroforesis es un método de separación de moléculas de elevado peso molecular como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funge como un filtro, y que, mediante un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica, las separa. Esta separación se hace en un tampón que puede ser Tris, acetato y EDTA o Tris, borato y EDTA (TAE o TBE). En la molécula del ADN el grupo fosfato proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo.

Cuando los amplicones son corridos en el gel, requieren cargarse con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón (De Dios L y col., 2013).

Tal como lo menciona Tamay de Dios L y cols (2013) esta técnica al final requiere la visualización de los amplicones mediante una fotografía digital al gel de agarosa expuesto a la luz UV (Figura 6) (De Dios L y col., 2013).

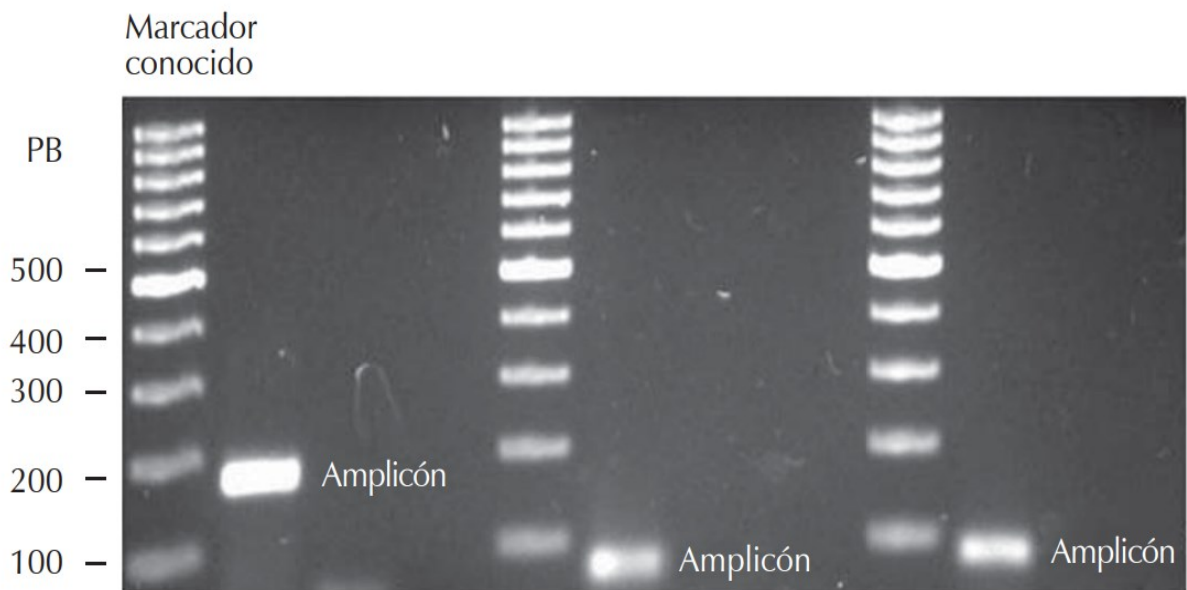


Figura 6 Gel de agarosa. Los productos de la PCR o amplicones están representados mediante bandas de un tamaño específico y se comparan con un marcador de peso molecular conocido para determinar la especificidad de la reacción. PB = número de pares de bases / Imagen obtenida de Dios T. y col. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (OCR) y de la PCR en tiempo real, invest en disc. (2013);2(2): 70-78

3.7.1.1. Determinación genotípica de género bacteriano mediante PCR del gen 16S

Todos los seres vivos requieren la maquinaria para la síntesis de proteínas indispensables para la vida, por tanto, todos poseen ribosomas y genes de ARN ribosomal (ARNr).

Este ARN ribosomal en las bacterias, se encuentra organizado en un operón a partir de dos promotores P1 y P2, posterior al operón se encuentran los genes que codifican los ARNr 23S (rrl), 16S (rrs) y 5S (rrf) separados por regiones intergénicas (IG) y adicionalmente algunos genes para ARN de transferencia (ARNt). El gen 16S se encuentra compuesto por aproximadamente 1 500 nucleótidos, debido a su función bioquímica, el gen del ARNr no codifica una proteína, por lo que no se amortiguan cambios en el 3er nucleótido de un codón por redundancia en el código genético, además que se consideran genes altamente conservados (Del Rosario Rodicio & Del Carmen Mendoza, 2004), así, el cambio de un solo nucleótido puede tener repercusiones importantes en la estructura y función del ARNr.

Ante la necesidad de establecer mecanismos genotípicos que instituyan la diferenciación entre géneros y especies, Carl Woese propuso el análisis del gen 16S al darse cuenta que este es ubicuo e indispensable para la vida.

El gen 16S contiene información suficiente para realizar el análisis y determinación del género de una bacteria, debido a los fragmentos altamente conservados en su secuencia, consecuencia de su ubicuidad; aunque también posee variaciones Inter especie muy sutiles que permiten diferenciarlas.

Los ribosomas bacterianos presentan un coeficiente de sedimentación 70S constituidos por proteínas ribosómicas y ARNr específicos, puede dividirse en dos subunidades (50S y 30S); la subunidad 50S o subunidad grande está compuesta por 34 proteínas (de la L1-L34: L, large) y los ARNr 5S y 23S; la subunidad 30S o subunidad pequeña contiene 21 proteínas (de la S1–S21: S small) y el ARNr 16S.

La secuenciación del gen ARNr 16S permite la discriminación de *Enterococcus* a nivel de especie (Bosshard y col., 2004); sin embargo, al momento de la diferenciación Inter especies estrechamente relacionadas puede ser menos preciso, como el grupo de *E. faecium* (Devriese y col., 1993, Quintela-Baluja y col., 2013), debido a estas similitudes en las secuencias se emplean herramientas que permiten explorar bases de datos que presentan los genomas dispuestos en un árbol filogenético o en una lista tabular que puede ser filtrada por el agregado o la remoción de columnas específicas de genomas o metadatos otorgando el porcentaje de identidad. El buscador permite examinar la presencia de genes específicos. Uno de los buscadores disponibles es la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local para nucleótidos (BLASTn, por sus siglas en inglés) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés).

3.7.2. Tipificación genotípica mediante la técnica ERIC-PCR.

La ERIC-PCR (secuencias consenso repetitivas intergénicas de enterobacterias, por sus siglas en inglés) pertenece a técnicas de PCR aplicadas a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas, dichas técnicas pertenecen a métodos de tipificación los cuales se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basado en características fisiológicas o bioquímicas) y

genotípicos (basado en el estudio del ADN) tal como describe Fernández-Cuenca (2004). “Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos.” Debido a que la expresión de los caracteres fenotípicos son el resultado de la expresión del genotipo influido por el medio ambiente, siendo el primero susceptible a modificarse cuando las condiciones de desarrollo son distintas.

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos se fundamentan en el mismo principio de la PCR, que tienen como objetivo comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos (son amplificados genes o secuencias de ADN polimórficas), de tal manera que se puede reconocer la relación entre los aislamientos de microorganismos vinculados epidemiológicamente, dentro de estas técnicas se encuentran: Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés: Random amplified polymorphic DNA) o PCR con iniciadores arbitrarios (AP-PCR), Amplificación de secuencias repetitivas, (secuencias palindrómica extragénicas secuencias rep) y secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC), Amplificación y secuenciación de genes denominados housekeeping.

Al igual que en la detección de género y especie, existe variabilidad en la tipificación, un claro ejemplo de esta situación la describe Olawale y col (2011) “los patrones fenotípicos de resistencia antimicrobiana similares que varios aislamientos provienen de una misma cepa, sin embargo, esto no es concluyente”, por tanto, es indispensable caracterizar genotípicamente las

diversas cepas y mediante el análisis determinar la relación clonal existente entre aislamientos bacterianos.

Mediante la amplificación de secuencia polimórficas, empleando cebadores específicos, las técnicas ERIC y REP PCR pueden diferenciar serotipos estrechamente relacionados de la misma especie y grupos de cepas no relacionadas clonalmente, basados en secuencias palindrómicas repetitivas imperfectas, que se encuentran en diversas ubicaciones a lo largo de los genomas bacterianos (Wilson & Sharp, 2006).

4. Antecedentes

La propagación de infecciones nosocomiales, específicamente los enterococos, ocurren con mayor frecuencia en unidades de cuidados intensivos (UCI). Se pueden propagar por contacto de persona a persona o por dispositivos médicos contaminados (Olawale y col., 2011). Epidemiológicamente, al ser un problema a nivel mundial, se han realizado investigaciones antecedentes que resaltan la importancia y justificación de este estudio. Al respecto, la Unión Europea (EU/EEA 2021) ha presentado una prevalencia de 6.8% con incremento de 21% al año 2021 (ECDC, 2021), en Asia 8.10% (Shrestha y col., 2021), India 7.0% (Bhatt y col., 2015), Egipto 6.3% (Said & Abdelmegeed, 2019), en estudios aislados Brasil 6% (Zanella y col., 2003), en todos los casos se empleó la técnica de PCR punto final como prueba confirmatoria; en México no se cuenta con datos de prevalencia de EFVR de acuerdo a la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2015) reporta prevalencia del 1.1% en infecciones de tracto urinario para *E. faecium* sin datos de resistencia a Vancomicina.

Tomando en cuenta la prevalencia, existen características demográficas y poblacionales que son necesarias considerar, adicionalmente los factores de riesgo que incrementan la probabilidad de infección por EVR incluyen el uso de catéteres, el sexo femenino (Saengsuwan y col., 2021), grupos de edad mayores de 65 años tal como lo describe Mathis y col 2019 y el uso de antibióticos dirigidos a la síntesis de peptidoglucano de acuerdo al estudio de Padmavathy y col (2015). Este último factor de riesgo pondera la emergencia de cepas nosocomiales de ERV que predispone la emergencia de dichas cepas.

5. Justificación

Durante el año 2019 en un Hospital de tercer nivel al Sur de La Ciudad de México se presentan múltiples casos de infecciones en Tracto Urinario con presencia de resistencia a vancomicina en pacientes hospitalizados; el abordaje de estos promueve la detección (“la detección constituye la caracterización inequívoca de especie, sus modificaciones como mutaciones, deleciones y translocaciones, así como diferentes genotipos dentro de una misma especie y genes de resistencia” (Diz Mellado, 2020) al tratamiento farmacológico de una probable cepa circulante de *E. faecium*, la cual requiere de estudios epidemiológicos y técnicas moleculares para determinar su naturaleza y gravedad, así como brindar la posibilidad de adoptar medidas de prevención y control que permitan evitar su diseminación.

A partir de la creación de la lista de prioridad de bacterias por su resistencia a múltiples fármacos en 2016 por parte de la OMS (Díaz y col., 2021), resulta imperante fortalecer un sistema adecuado de farmacovigilancia en el uso de antibióticos para tratamientos empíricos, dada la importancia que la OMS plantea de vigilar las cepas ESKAPE, grupo al que pertenece *E. faecium*, con la finalidad de evitar la inducción de la resistencia a la vancomicina por el uso de antibióticos dirigidos a la síntesis de peptidoglucano; por ello se requieren técnicas rápidas con alta capacidad de sensibilidad y especificidad, para que el médico tome decisiones en corto tiempo, previo al uso de tratamientos empíricos, éstas técnicas incluyen los métodos moleculares para la identificación de cepas y genes de resistencia *vanA* y *vanB*.

6. Planteamiento del problema.

En un Hospital de Especialidades al Sur de la Ciudad de México se reportaron 147 casos de pacientes hospitalizados, infectados con *E. faecium* durante 2019, a partir de muestras de orina con sospecha de Infección en Vías urinarias, de las cuales 7 presentaron resistencia a la vancomicina.

En los últimos años la emergencia de cepas nosocomiales y no nosocomiales de *E. faecium* resistentes a vancomicina se ha incrementado a nivel mundial. El uso indiscriminado de antibióticos, en especial vancomicina, aunado a otros factores de riesgo predispone la emergencia de esta infección aumentando las infecciones en vías urinarias; desconocer los patrones de resistencia antibiótica produce cepas nosocomiales multirresistentes, resistencia extendida o pan-resistentes (Pearson y col., 2019) que pueden desencadenar una crisis en la atención hospitalaria, por lo que la caracterización genotípica y fenotípica de estos casos es necesario para evitar tratamientos que conlleven a prolongar la estancia del paciente, disminuir la acción de antibióticos, aumentar los costos y generar un riesgo de contagio.

7. Hipótesis.

Existe diseminación de *E. faecium* vancomicina resistente en pacientes con hospitalización prolongada, tratados con esquemas empíricos de antibióticos y que presentan factores de riesgo para infecciones de Vías Urinarias complicadas.

8. Objetivos.

8.1. Objetivo General

Caracterizar y fenotipificar cepas de *E. faecium* aisladas de muestras clínicas urinarias, provenientes de pacientes hospitalizados en un Hospital de Especialidades al sur de la Ciudad de México.

8.2. Objetivos Específicos

- Determinar el patrón de categorización clínica antimicrobiana según grupos fenotípicos del sistema ORENUC para infección de vías urinarias complicada
- Caracterizar a *E. faecium* por métodos convencionales y automatizados
- Determinar la resistencia a vancomicina por método automatizado.
- Detectar las cepas aisladas de *E. faecium*.
- Definir el genotipo de resistencia a Vancomicina de las cepas en estudio.
- Determinar la relación clonal entre las cepas de *E. faecium* vancomicina resistentes.

9. Materiales y métodos.

9.1. Tipo de estudio.

El diseño de investigación de esta tesis de licenciatura fue observacional, descriptivo, retrospectivo y de corte transversal para el cumplimiento de los objetivos.

9.2. Población de estudio.

Se consideraron 147 pacientes con confirmación de infección bacteriana en vías urinarias por *E. faecium* en un Hospital de Especialidades en el sur de la Ciudad de México durante el periodo comprendido del 01 de enero al 31 de diciembre de 2019.

De los cuales consideraron para su análisis 7 cepas, de acuerdo a los criterios de inclusión.

Las cepas de *E. faecium*, fueron recuperadas y aisladas de manera retrospectiva, a partir de una colección de 25 cepas de *E. faecium* conservadas en congelación a -20°C en solución de glicerina al 10% (NCCLS 1996) provenientes de los 147 pacientes.

Las muestras de orina recibidas en el laboratorio de Microbiología fueron obtenidas por chorro medio en frasco estéril.

9.3. Criterios de inclusión.

Pacientes mayores a 18 años.

Pacientes hospitalizados con infección complicada en Tracto Urinario.

Pacientes con urocultivo positivo a *Enterococcus faecium* cuyo perfil de antibiograma resulta resistente a la vancomicina.

Pacientes con comorbilidades preexistentes como diabetes, hipertensión e insuficiencia renal como factor de riesgo de acuerdo a clasificación ORENUC

Clínica: Pacientes con Sintomatología Relacionada a Infección de Vías Urinarias Complicada.

9.4. Criterios de exclusión.

Pacientes pediátricos.

Pacientes provenientes de servicios de consulta externa.

Pacientes que no cuentan con factores de riesgo de acuerdo con ORENUC

Pacientes con Infección en Tracto Urinario No Complicada.

Pacientes con urocultivo positivo a *Enterococcus faecium* cuyo perfil de antibiograma resulta sensible a la vancomicina.

9.5. Criterios de eliminación.

Muestras con criterios de inclusión contaminadas o que presentan más de una bacteria en el cultivo.

9.6. Material Biológico

-Muestra de orina en frasco estéril.

-*Enterococcus faecium* derivado de ATCC 700221 KWIK-STIK™

-Colonias aisladas en placas de agar sangre de carnero al 5% BD® (ASC 5%)

9.7. Reactivos

-Placa de agar sangre de carnero al 5% BD® (ASC 5%)

-Placas de agar bilis esculina Britania®

-Prueba α -pirrolidonil β -naftilamida Britania® (PYR-A-ENT)

-Solución de peróxido de hidrógeno 20%

-Kit colorante Gram Hycel®

-Tarjetas de identificación VITEK® 2 GP Identificación de Gram-positivos

-Tarjetas VITEK® 2 AST Tarjetas para análisis de susceptibilidad antimicrobiana

-Solución salina estéril 9%

-Discos para comprobar la susceptibilidad a Vancomicina Bio-Rad®

- Kit Qiagen® Genomic DNA.

- Isopropanol (grado Biología Molecular).

- BD® Caldo Soya Trypticaseína

-Kit de extracción de ADN Stratec®

-Isopropanol.

- Bromuro de etidio.
- TBE 10X Invitrogen.
- Marcador Quick-Load® 100 pb DNA.
- Agarosa Sigma.
- Agua inyectable Pisa.
- Cebadores.

9.8. Instrumentos y equipos

- Asa Bacteriológica Nicromo Calibrada 10mc
- Incubadora.
- Tubos de Ensayo 6.8 x 5.4
- VITEK® DENSICHEK®
- VITEK® 2 Compact Sistema de identificación microbiana automatizado.
- Pipetor
- Vórtex
- Termoblock
- Columna DNeasy®

9.9. Metodología

Obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas de pacientes hospitalizados durante el año 2019, cuya clínica indicó infección de tracto urinario positivo a *E. faecium*; de estos 8 cultivos presentaron resistencia a la vancomicina.

Se realizó un análisis de la historia clínica de los pacientes para determinar las enfermedades motivos de ingreso y factores de riesgo que los pacientes presentan.

Las muestras recibidas en el laboratorio de Microbiología corresponden a orina recolectadas en frascos estériles mediante chorro medio. Dichas muestras fueron sembradas en medio de cultivo en ASC 5% y posteriormente se conservaron en congelación a -20°C en solución de glicerina al 10% (NCCLS 1996), para su resiembra se sometieron a descongelación manteniéndose por 8 horas en refrigeración y 1 hora a temperatura ambiente, se tomó una muestra con asa estéril de 10 µL y se realizó la siembra por agotamiento en 4 cuadrantes en agar ASC 5% y Agar Bilis esculina. Posteriormente se llevó a incubación a 37°C ± 0.5 durante 24 horas. Adicionalmente se sembró cepa control de *E. faecium* BM 4147 (ATCC 700221).

Una vez terminado el tiempo de incubación, se revisó el tipo de hemólisis, se seleccionaron 3 colonias de cada cultivo y se realizó la prueba de catalasa. Se realizó tinción de Gram. A continuación, se realiza la prueba PYR como detalla el proveedor (Britania).

Se transfirieron 3 mL de solución salina estéril a 2 tubos mediante pipetor por cada muestra, mediante un aplicador se tomó una colonia aislada y se disolvió

en el tubo con solución estéril colocándolos en el casete para lectura del sistema Vitek. La densidad de cada suspensión bacteriana se ajustó con el densitómetro DensiChek entre 0.45 y 0.5 de la escala de Mc Farland, para lograr un inóculo final de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL, se colocó una tarjeta de identificación VITEK® 2 GP Identificación de Gram-positivos en el primer tubo y una Tarjeta VITEK® 2 AST Tarjetas para análisis de susceptibilidad en el segundo tubo, el casete se colocó en el quipo Vitek para su llenado.

A la par se realizó la siembra en masivo para confirmación de resistencia a Vancomicina por método estandarizado Kriby-Bauer o prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión (CLSI) en agar Müller-Hinton (Difco®), tres mono discos con vancomicina fueron colocados con un aplicador de discos (BIO RAD). Todas las placas fueron incubadas a 35 °C, durante 18 h y posteriormente se realizó la medición de los diámetros de los halos de inhibición utilizando una lupa graduada.

Las siguientes técnicas se desarrollaron en el Laboratorio de Análisis Clínico del Hospital Juárez de México bajo la supervisión y tutela del M. en C. Juan Carlos Bravata, director del área de biología molecular del Laboratorio.

9.9.1. Extracción de DNA de las cepas del *E. faecium*.

Para la extracción de DNA total, se utilizó el Kit Qiagen® Genomic DNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Del cultivo en placa es transferida una asada a un tubo con caldo soya Trypticaseína, posteriormente se incuba con agitación constante durante 24 hrs, se adicionó en un tubo Eppendorf 200µL de cada suspensión de aislamiento bacteriano y 200µL de la solución de lisis con agitación con vórtex durante 1 min

y colocado en un termoblock a 65°C durante 20min hasta que no hubiera turbidez.

Se adicionaron 200µL de isopropanol en frío (5°C) para la precipitación del material genético, y transfirió a una columna de separación (RTA Spin Filters) en un tubo Eppendorf para centrifugarse a 11000 G durante 2 minutos y precalentado a 65°C.

El eluido fue conservado a -22°C para su posterior estudio.

9.9.2. Amplificación para identificación de *E. faecium* por PCR de la región 16s rRNA.

Para la mezcla de reacción se consideró un volumen final de 50 µL de los cuales 5 µL de solución Buffer, 5 µL del oligo 27F, 5 µL del oligo 1492R, 5 µL de solución de dNTP's, 2.5 µL de solución de MgCl₂, 0.4 µL de Taq (2U), 22.1 µL de H₂O milliQ y 5 µL del DNA.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

94 °C/10 min Desnaturalización inicial y activación de la Taq polimerasa.

94 °C/30 s Desnaturalización del DNA.	}	30 ciclos
57 °C/45 s Alineamiento de los cebadores.		
72 °C/90 s Elongación.		

72 °C/10 min Elongación final/consumo de reactivos.

Hold ∝ 4 °C Enfriamiento/paro de la Taq. Polimerasa.

Las secuencias de los cebadores diseñados para este propósito se muestran en el Tabla 4.

Tabla 4. Cebadores usados para la amplificación del gen 16S ARNr

CEBADORES	BLANCO MOLECULAR	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (PB)	T _M (°C)
27-F	16S ARNr	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1492	57
1492-R		GGTACCTTGTTACGACTT		

Análisis del producto de PCR 16s ARNr por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con una fuente de poder de 80 volts por 1 h y el gel se observó en un foto documentador de imágenes.

9.9.3. Purificación del amplicón 16s rRNA (GFX™ PCR DNA and gel band purification kit).

Al producto de PCR se le adicionó 500 µL de regulador de captura. Se agitó suavemente por 5 min, la mezcla se colocó en una columna GFX y se centrifugó por 30 s a 13000 rpm (a temperatura ambiente).

Se adicionó 500 µL de regulador de lavado a la columna y se centrifugó por 30 segundos a 13000 rpm (temperatura ambiente).

La columna colocada en un tubo Eppendorf se adicionaron 50 µL de regulador de elución. Se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto.

Los productos de PCR ya purificados fueron secuenciados.

9.9.4. Secuenciación del gen ribosomal 16s rRNA.

Los productos de PCR purificados fueron llevados al Laboratorio de secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la salud del instituto de Biología de la UNAM, en donde se empleó un secuenciador 3730xL DNA Analyzer, el cual operó empleando primers; 27F y 1492R. Posteriormente se hizo uso del software 4Peaks Versión 1.7.2 para descryptar secuencias nucleotídicas. Finalmente se procedió a comparar las secuencias descryptadas con la base de datos del Genbank usando el algoritmo heurístico BLASTn, mismo que fue consultado con estrictos parámetros de filtro (más del 98% de homología de nucleótidos y al menos 80% de cobertura de consulta).

9.9.5. Amplificación para identificación de los genes *vanA* y *vanB*.

Se realizó la amplificación de los genes *vanA* y *vanB* del material genético proveniente de los aislamientos. La mezcla de reacción fue llevada a un volumen final de 50 µL y contenía: 5 µL de la solución Buffer, 5 µL del oligo 27F, 5 µL del oligo 1492R, 5 µL de la solución de dNTP's, 2.5 µL de la solución de MgCl₂, 0.4 µL de *Taq* (2U), 22.1 µL de H₂O milliQ y 5 µL del DNA.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

94 °C/10 min Desnaturalización inicial y activación de la *Taq* polimerasa.

94 °C/30 s Desnaturalización del DNA.

52 y 54 °C/45 s Alineamiento de los cebadores.

30 ciclos

72 °C/90 s Elongación.

72 °C/10 min Elongación final/consumo de reactivos.

Hold ∝ 4 °C Enfriamiento/paro de la *Taq*. Polimerasa.

Las secuencias de los cebadores diseñados para este propósito se muestran en el Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores usados para la amplificación de los genes *vanA* y *vanB*.

CEBADORES	BLANCO MOLECULAR	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (PB)	T _M (°C)
<i>VANA</i> -F	<i>vanA</i>	CAT GAC GTA TCG GTA AAA TC	732	52
<i>VANA</i> -R		ACC GGG CAG RGT ATT GAC		
<i>VANB</i> -F	<i>vanB</i>	CAT GAT GTG TCG GTA AAA TC	885	54
<i>VANB</i> -R		ACC GGG CAG RGT ATT GAC		

9.9.6. Tipificación molecular de cepas de *Enterococcus faecium* por ERIC-PCR

Para la amplificación de regiones intergénicas en *E. faecium* mediante PCR se preparó la siguiente mezcla a un volumen final de 25 µL. La mezcla contenía: 0.2 µL de Taq polimerasa (1 U), 5 µL del mix de cebadores indicados en la tabla 6, 2.5 µL de la solución de dNTP's, 1.25 µL de la solución de MgCl₂, 2.5 µL del Buffer 10X, 11.55 µL de H₂O milliQ y 2 µL del DNA de *E. faecium*.

El termociclador fue configurado en las siguientes condiciones para amplificación del DNA:

95 °C/5 min Desnaturalización inicial y activación de la Taq polimerasa.

90 °C/30 s Desnaturalización del DNA.

50 °C/30 s Alineamiento de cebadores

52 °C/10 min Elongación.

72 °C/8 min Elongación final/consumo de reactivos.

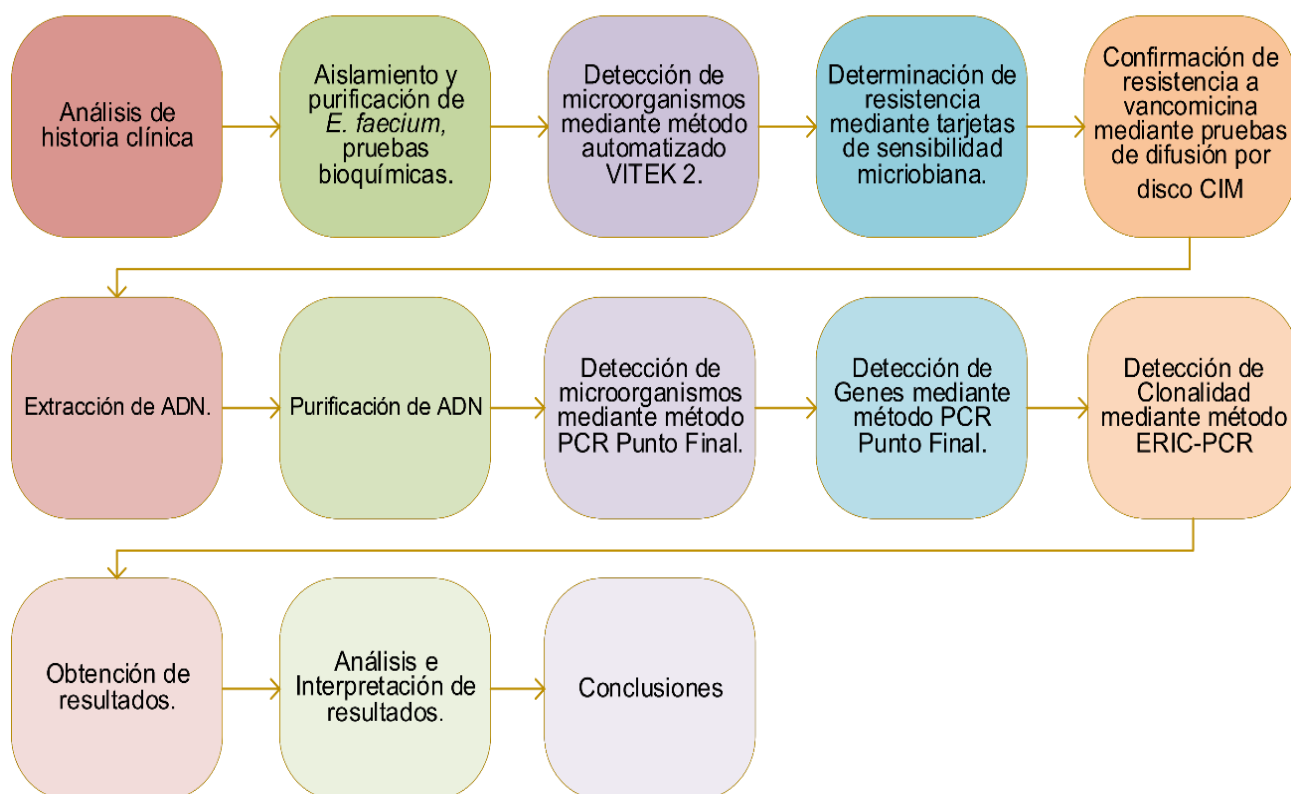
Hold ∞ 4 °C Enfriamiento/paro de la Taq. polimerasa.

Tabla 6. Cebadores usados para la amplificación de regiones intergénicas mediante ERIC-PCR en *E. faecium*

CEBADORES	BLANCO MOLECULAR	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (PB)	T _M (°C)
ERIC1R	Consensos	ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA	Variable	50 °C
ERIC2	intergénicas	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC		

Análisis de los productos de PCR de las regiones intergénicas (ERIC-PCR) por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % a una fuente de poder de 80 volts por 1 h, el gel se observó en un foto documentador de imágenes.

10. Diagrama de Flujo de la metodología empleada.



11. Variables.

Presencia fenotípica de resistencia a Vancomicina

Presencia de Gen *vanA*

Presencia de Gen *vanB*

Presencia de factores de riesgo ORENUC

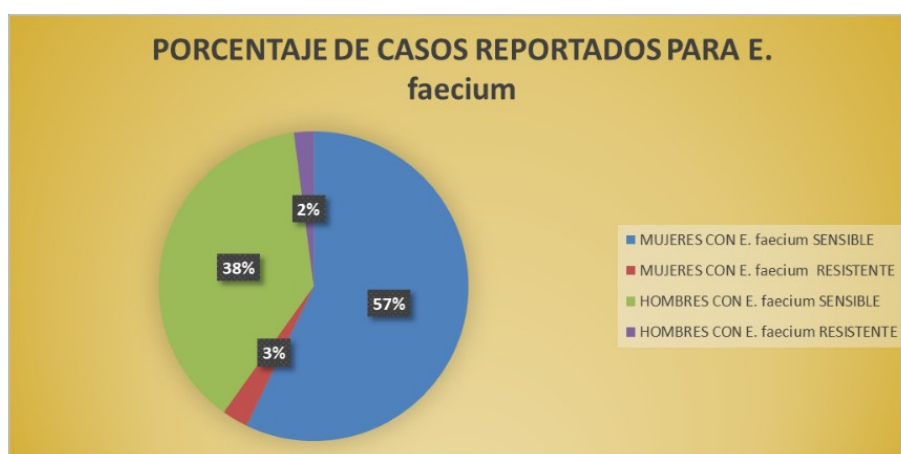
12. Análisis estadísticos.

Se emplearon cálculos porcentuales de los datos obtenidos en la revisión de expedientes con la finalidad de comparar con datos mundiales, para género y factores de riesgo asociados.

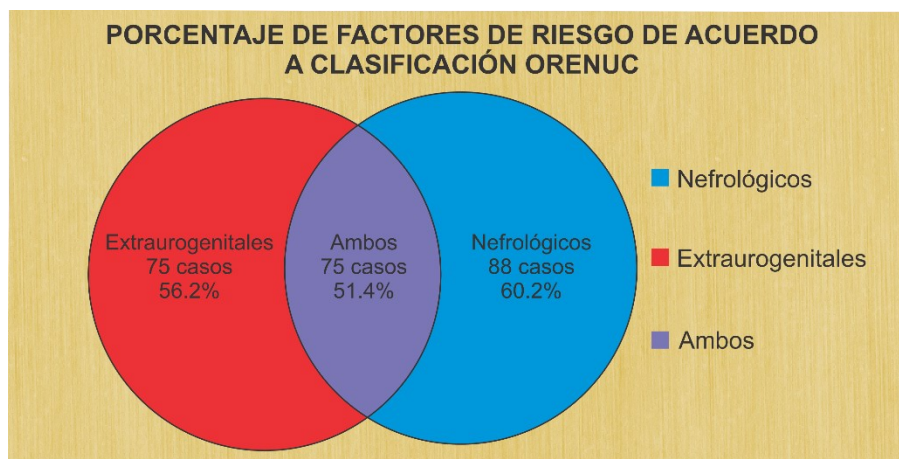
13. Resultados y discusión de resultados

13.1. Consulta de Expedientes y factores de riesgo ORENUC.

Durante el año 2019 en un hospital al sur de la Ciudad de México en las áreas de hospitalización, unidad de cuidados intensivos, medicina interna, pacientes de consulta externa se presentaron 147 casos de infección en vías urinarias en pacientes cuyo agente causal fue *E. faecium*, de los cuales 88 fueron mujeres (60%) y 59 hombres (40%) ver Gráfica 1; 7 casos presentaron resistencia a vancomicina (4.8%): 4 mujeres (2.7%) y 3 hombres (2%); de acuerdo a la clasificación de ORENUC 88 pacientes presentaron factores de riesgo Nefrológicos (N= 60.2%), 82 Extraurogenitales (E= 56.2%) y 75 ambos (EN= 51.4%), ver Gráfica 2; se realizó la verificación de la clínica al ingreso de los expedientes de los pacientes presentados en la Tabla 6.



Gráfica 1. Porcentaje de casos reportados como positivo para *E. faecium* en vías urinarias durante el año 2019, en consulta interna, externa, y hospitalizados.



Gráfica 2. Porcentaje de pacientes que presentan factores de riesgo asociados a Infecciones de Tracto Urinario Complicado.

En México los estudios nosocomiales de *E. faecium* se encuentran limitados a infecciones totales (Bautista y col., 2013), sin diferenciar casos particulares de infección en diferentes sistemas, en comparativa con el presente estudio donde se analizan casos particulares de infección en tracto urinario, al respecto, los datos obtenidos en el presente estudio son congruentes (4.8%) con las prevalencias de EVR analizadas a nivel internacional: India 7.0% (Bhatt y col., 2015), Egipto 6.3% (Said & Abdelmegeed, 2019), España 10.2% (Cantón & Ruiz-Garbajosa, 2013) y 17.2% (ECDC, 2021) en países europeos.

Tabla 6 Clasificación de la presentación clínica de pacientes en estudio, con respecto al fenotipo ORENUC.

No.	Fecha de ingreso	Servicio	Sexo	Edad	Diagnósticos	Fenotipo ORENUC
1	17/03/2019	MI	M	41	URGENCIAS: Enfermedad Renal Crónica en diálisis, Hipertensión Arterial Sistémica, dolor en pecho y espalda, dificultad respiratoria, inflamación de pierna MI: Sepsis, ERC, Neumonía	N
2	02/05/2019	UCIA	M	60	URGENCIAS: Diabetes Mellitus, Hipertensión Arterial Sistémica, Herida en abdomen por objeto punzocortante. UCIA: Pb Tromboembolia Profunda. CG: Trombosis Venosa Profunda, Insuficiencia Renal Crónica agudizada, Acidosis metabólica.	E
3	27/02/2019	MI	F	69	URGENCIAS: DM descompensada, choque séptico. UCIA: DM tipo 2, sepsis, Cetoacidosis diabética MI: Enfermedad Renal Crónica, EPOC, Neumotórax, Neumonía, post extubación, IVU, Neumonía asociada a la ventilación, NAC	E,N
4	18/07/2019	MI	F	29	TOCO: G:3 A:2 E:38.3 SDG por FUM, pródromos. UCIA: Preeclampsia. GO: ERC, pb Edema pulmonar. MI: Obesidad	N
5	02/07/2019	MI	M	78	URGENCIAS: Hematuria macroscópica. MI: ERC, Tumoración renal izquierda, sobrepeso.	E, N
6	18/12/2019	MI	F	34	URGENCIAS: DM, ERC en DPI, Anemia, pb Sx urémico, HAS. MI: ERC KDIGO 5 en DPI, IVU, Neumonía, Neumotórax incidental derecho, HAS, DM T2. NEFRO: ERC KDIGO 5 en DPI, Peritonitis	E, N
7	25/12/2019	MI	F	64	URGENCIAS: DM, Hipertensión, pb COVID. HOSPITALIZACION: Hernia diafragmática izquierda pb complicada, Abdomen a tensión, PO laparotomía exploratoria, lavado de cavidad, esplenectomía, toracotomía, Obesidad grado 3, anemia grave, pb fistula Ester corácea	E

Servicios: MI Medicina Interna; UCIA Unidad de Cuidados Intensivos Adulto; CG Cirugía General; TOCO Tococirugía, GO Gineco Obstetricia.

Sexo: F femenino, M masculino.

Enfermedades: ERC Enfermedad Renal Crónica; HAS Hipertensión Arterial Sistémica; DM Diabetes Mellitus; TVP Trombosis Venosa Profunda; IRC Insuficiencia Renal Crónica agudizada, EPOC Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; ERC en DPI Enfermedad Renal Crónica en Diálisis Peritoneal Intermitente.

En México no se encuentran datos estadísticos referentes a Infecciones del Tracto Urinario relacionado con factores de riesgo ORENUC en infecciones complicadas del Tracto Urinario y susceptibilidad antimicrobiana, sin embargo, a nivel internacional podemos encontrar:

Peterson y col (2007) a través del estudio "Identification and pretherapy susceptibility of pathogens in patients with complicated urinary tract infection or acute pyelonephritis enrolled in a clinical study", durante noviembre 2004 a abril 2006, en Estados Unidos, presenta de 650 pacientes (64.1% mujeres y 35.9 hombres), fueron diagnosticados con infección de tracto urinario complicada.

Conforme a los resultados de un estudio en Japón cuyos datos se basaron en las características fenotípicas de la urosepsis presentado por Oshida, Hirashima, Tanaka & Fujimoto (2014) se analizaron 57 pacientes con infección de vías urinarias de estos, 32% de los pacientes se asociaron a DM y 23% ureterolitiasis.

Durante el año 2010 García-Viejo y col presentaron un estudio descriptivo y retrospectivo donde describen "La infección del tracto urinario en los servicios de medicina interna", en España observándose que de un total de 992 pacientes (61.8% mujeres) de 57 hospitales con edad promedio de 75.3 años, de estos 78.3% presentaron factores de riesgo principalmente DM (33.6%) y cateterización vesical (24.1%)

En Nicaragua (Pacheco & Ernesto, 2017) mediante un estudio "Susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos causantes de infección de vías urinarias complicada según sistema fenotípico ORENUC en Hospital Carlos Roberto Huembes, enero a diciembre 2016", refiere que 66% fueron mujeres y 44%

hombres, 63.3% de los casos presentan fenotipos Nefrológicos, 52.3% Extraurogenitales y 57.8% ambos.

Los resultados obtenidos en la presente tesis concuerdan con estudios a nivel internacional; del total de pacientes 60% fueron mujeres y 40% hombres, es factible proponer asociaciones al respecto de la incidencia de ITU por género, sin embargo, como se mencionó de manera previa, en México no hay datos públicos actuales, que permitan realizar conclusiones al respecto.

13.2. Caracterización convencional y por equipo automatizado de las cepas

El propósito de la investigación del presente estudio para sustentar el grado de licenciatura como Químico Farmacéutico Biólogo es caracterizar cepas de *E. faecium* tanto fenotípica como genotípicamente y determinar su resistencia a vancomicina.

La caracterización fenotípica se llevó a cabo mediante pruebas específicas iniciando por la ruta clásica con el aislamiento de la bacteria en medio ASC 5% con crecimiento característico colonias blancas opacas de 0.5 a 1 mm, hemólisis beta, aislamiento en agar bilis esculina presentando ennegrecimiento del medio, Tinción Gram Positiva, PYR positivo y catalasa positiva siendo congruente con lo establecido en la literatura (Koneman 2003); continuando con los métodos automatizados Vitek 2 y Phoenix 100. Mediante los cuales se obtuvo la identificación de todas las cepas como *E. faecium*, con un 90% de confianza en ambas técnicas, en concordancia con lo reportado por Blanco M. y col (2010).

13.3. Determinación de resistencia a Vancomicina.

Una vez obtenidas las colonias e inoculadas en el equipo Vitek 2 y Phoenix BD se presenta detección de 7 cepas de *E. faecium*, con patrones de resistencia antibiótica a Vancomicina como lo muestra la Tabla 8.

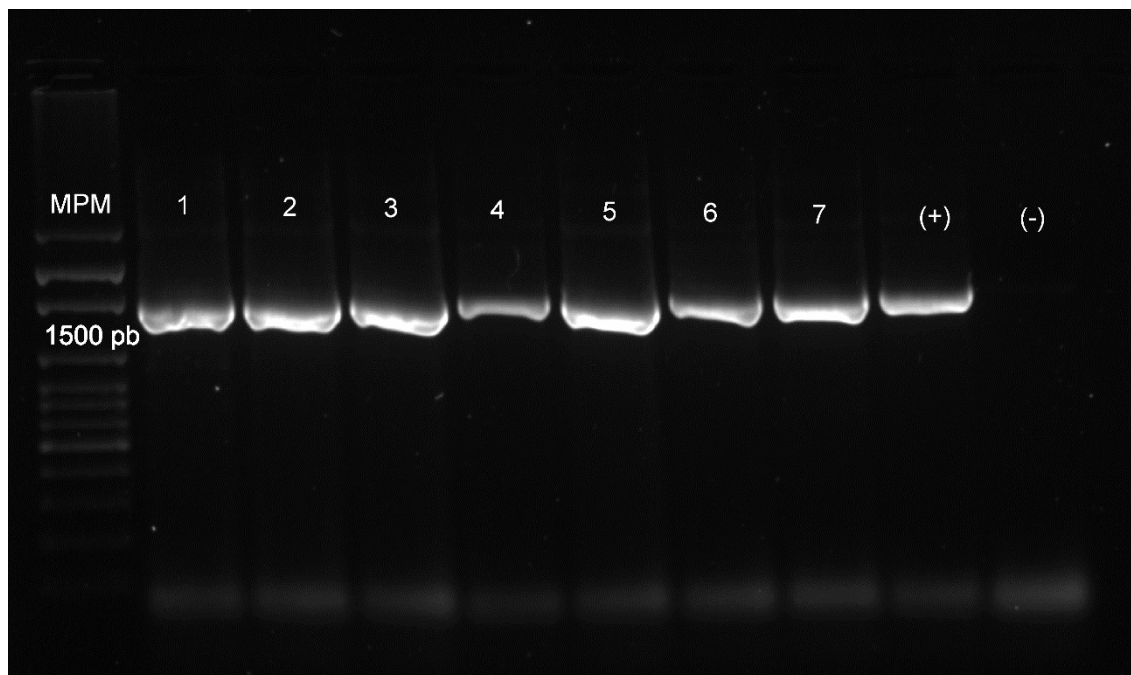
Mediante el método automatizado presentaron las 8 muestras una Concentración Mínima Inhibitoria <32 µg/mL en contraste con los reportes presentados por Clinical and Laboratory Standards Institute en su reporte de Desempeño de estándares para pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos 2018, en esta misma guía presenta la confirmación mediante el

método Kirby-Bauer, de acuerdo a las categorías de interpretación para considerarla resistente, el halo de inhibición debe presentar un diámetro mayor a 16mm, en la medición de los halos de inhibición se observaron diámetros de 20.5mm en promedio de las 7 cepas.

Tabla 8 Detección de resistencia a Vancomicina por método automatizado

Muestra	Microorganismo identificado	Antibióticos Vitek 2 Compact	Antibióticos PHOENIX 100
1	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R
2	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R
3	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R
4	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R
5	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R
6	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R
7	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R

13.4. Amplificación para identificación de *E. faecium* por PCR de la región 16S rRNA

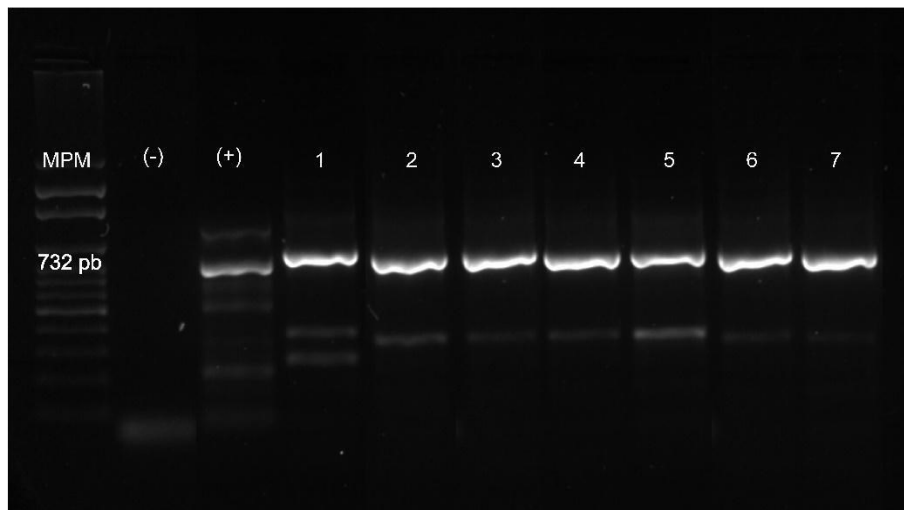


Fotografía 3: Electroforesis en gel de agarosa, producto de amplificación por PCR del gen 16S en orden secuencial de izquierda a derecha se encuentran: MPM marcador de peso molecular, las 7 muestras de *Enterococcus faecium* que muestra el amplicón de 1500 pb, control positivo y control negativo.

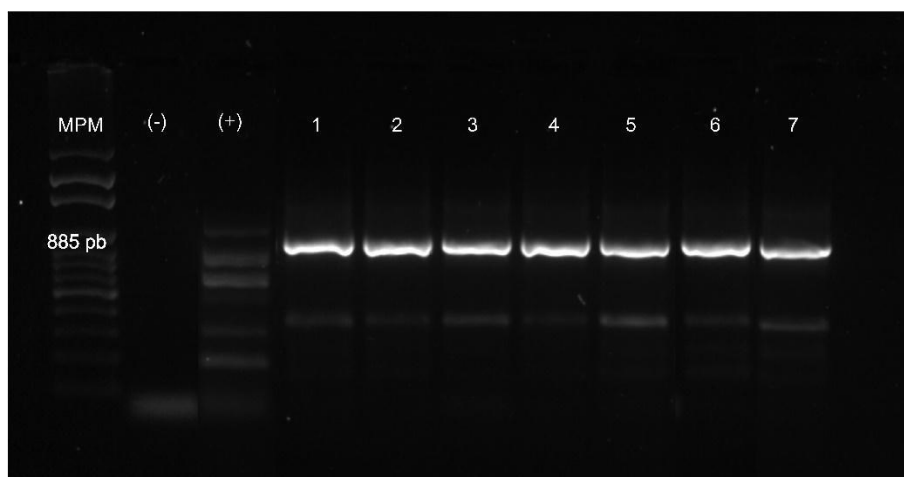
Una vez obtenido el corrimiento electroforético en gel de agarosa se confirma la presencia de las bandas de 1500 pb de todos los aislados bacterianos con los cebadores universales 27F y 1492R, una vez obtenido el amplicón, partiendo del conjunto taxonómico alineado, refinado y mapeado, se extrajo la secuencia consenso (modo estricto, límite mínimo 50%) para la búsqueda de grupos externos usando NCBI BLAST con el programa BLASTn, bajo algoritmo Mega BLAST (Ying Chen y col 2015) contra la base 16S Ribosomal RNA Sequences (16S RefSeq). Las secuencias se recuperaron bajo criterio de porcentaje de identidad <95%. Las secuencias obtenidas de la búsqueda fueron añadidas y alineadas con los parámetros de alineamiento usados previamente con una homología del 98% con *E. faecium*. Con la intención y necesidad que requiere la

identificación correcta del género y especie tal como lo describe Marin y colaboradores (2003), se requiere realizar un estudio de biología molecular dada la poca sensibilidad de los métodos automatizados para discernir entre las especies del género *Enterococcus sp.*

13.5. Detección de genes de vancomicina *vanA* y *vanB* por PCR de punto final.



Fotografía 4: Análisis electroforético en gel de agarosa representativo de los productos de PCR del gen *vanA*, en orden secuencial se observan: marcador de pesos moleculares (MPM), control negativo, control positivo y las 7 muestras de *E. faecium*, que muestra el amplicón de 732 pb.

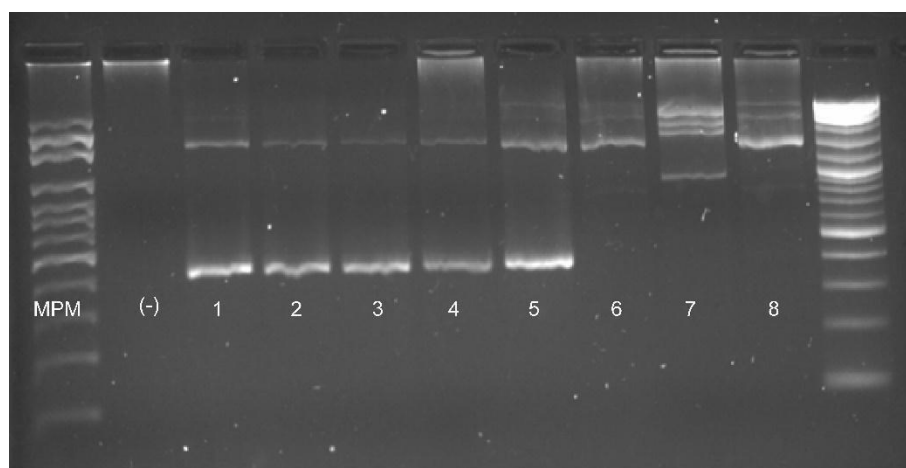


Fotografía 5: Análisis electroforético en gel de agarosa representativo de los productos de PCR del gen *vanB*, en orden secuencial se observan: marcador de pesos moleculares (MPM), control negativo, control positivo y las 7 muestras de *E. faecium*, que muestra el amplicón de 885 pb.

En los últimos años, los cambios en la resistencia bacteriana han propiciado la necesidad imperante de llevar a cabo una vigilancia epidemiológica continua con el fin de mejorar los esquemas terapéuticos (R. Contreras y col 2013, Bhatt M. Y col 2014, Kesavaran y col 2015 Corredor y col 2019, Guevara D. y col 2021). Es crucial que cada centro hospitalario adquiera un conocimiento profundo del resistoma intrahospitalario para coordinar estrategias que puedan mitigar eficazmente las infecciones nosocomiales

El uso de estos esquemas terapéuticos de manera empírica contribuye a la inducción de genes Van, la caracterización de las cepas previo a su administración previene el uso de dicho esquema. (R. Contreras y col 2013, Bhatt M. Y col 2014, Kesavaran y col 2015, Corredor y col 2019, Guevara D. y col 2021). Por ello es necesario la caracterización epidemiológica previo a la administración de esquemas empírico, en las 7 cepas presentó nivel alto de resistencia a gentamicina, que induce la activación del operón *vanA* y *vanB* (Corredor NC y col 2019).

13.6. Tipificación molecular de cepas de *E. faecium* por ERIC-PCR



Fotografía 6: Análisis electroforético en gel de agarosa representativo de los productos de la técnica ERIC-PCR.

En el corrimiento del gel muestra dos perfiles clonales de aislamiento. El primero constituido por 5 muestras (1, 2, 3, 4 y 5), el segundo compuesto por dos aislamientos (muestras 6 y 8).

En orden secuencial se encuentra: marcador de pesos moleculares (MPM), control negativo, 8 muestras de análisis: muestras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 de *E. faecium*. La muestra 7 corresponde a una cepa de *E. faecalis* ATCC, como control de referencia.

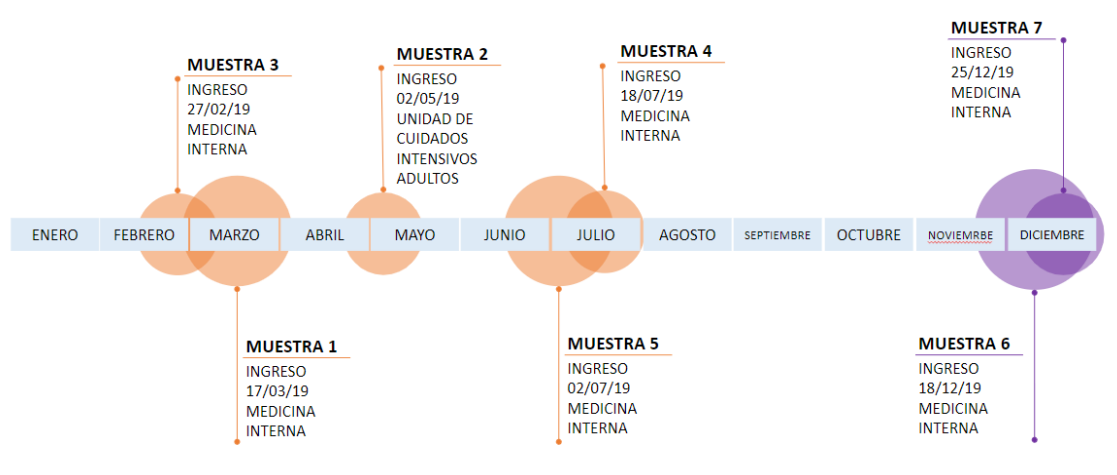


Figura 7. Línea del tiempo que describe los brotes de infecciones analizados. Se observan dos brotes, el primero abarca los meses febrero, marzo, mayo y julio; el segundo el mes de diciembre.

Existen dos patrones diferenciados lo que implica que hay al menos dos clones diferentes de la bacteria, localizados en el área de Medicina Interna, este resultado sugiere la implementación de un seguimiento cronológico y estudio de propagación transicional (Corredor NC 2016), para determinar los patrones de contaminación.

14. Conclusiones.

Se logró caracterizar y fenotipificar las cepas de *E. faecium* aisladas de muestras clínicas urinarias provenientes de pacientes hospitalizados en un Hospital de Especialidades al sur de la Ciudad de México.

Se logró determinar el patrón de categorización clínica de acuerdo a los criterios ORENUC.

Se logró caracterizar a *E. faecium* por métodos convencionales y automatizados.

Se logró la determinación del patrón genotípico (Genes *vanA* y *vanB*) y fenotípico de resistencia a vancomicina (resistencia <32 µg/mL) para infección de vías urinarias complicada.

Se logró determinar la relación clonal entre las cepas de *E. faecium* vancomicina resistentes mediante la técnica ERIC-PCR, encontrando dos perfiles clonales.

Se confirmó que existe diseminación de *E. faecium* vancomicina resistente en pacientes asociados a factores de riesgo, con hospitalización prolongada, tratados con esquemas empíricos de antibióticos y que presentan factores de riesgo para infecciones de Vías Urinarias complicadas.

15. Referencias

- 1 Ayats Ardite, J. (2017). Resistencia a la vancomicina en el género *Enterococcus*. Servicio de Microbiología. C. S. U. de Bellvitge. Hospitalet de Llobregat, 545-556.
- 2 Bautista, E. R., Moreno, G. C., Barbosa, P. A., & De Colsa Ranero, A. (2013). Perfil fenotípico de resistencia de enterococos en el Instituto Nacional de Pediatría, en la Ciudad de México. *Rev Enfer Infec Pediatr.*; 17(106):369-372.
- 3 Bhatt, P., Sahni, A., Praharaj, A., Grover, N., Kumar, M., Chaudhari, C., & Khajuria, A. (2015). Detection of glycopeptide resistance genes in enterococci by multiplex PCR. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.03.005>
- 4 Bosshard, P. P., Abels, S., Altwegg, M., Böttinger, E. C., & Zbinden, R. (2004). Comparison of Conventional and Molecular Methods for Identification of Aerobic Catalase-Negative Gram-Positive Cocci in the Clinical Laboratory. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42(5), 2065-2073. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.5.2065-2073.2004>
- 5 Bosshard, P. P., Abels, S., Altwegg, M., Böttinger, E. C., & Zbinden, R. (2004). Comparison of Conventional and Molecular Methods for Identification of Aerobic Catalase-Negative Gram-Positive Cocci in the Clinical Laboratory. *Journal Of Clinical Microbiology*, 42(5), 2065-2073. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.5.2065-2073.2004>
- 6 Burgers, P. M., & Kunkel, T. A. (2017). Eukaryotic DNA replication fork. *Annual Review Of Biochemistry*, 86(1), 417-438. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044709>

- 7 Bush, L. M., & Vazquez-Pertejo, M. T. (2023, 10 mayo). Infecciones por enterococos. Manual MSD Versión Para Profesionales.
<https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-enterococos>
- 8 Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- 9 Cantón, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2013). Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.*). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(8), 543-551. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.08.001>
- 10 CDC (2019) *Antibiotic Resistance Threats in the United State*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019.
- 11 Cercenado E. (2016) *Epidemiología de la infección por grampositivos resistentes* Rev Esp Quimioter, 29 (supl.1):6-9.
- 12 Cercenado, E. (2011). Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 59-65. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(11\)70045-3](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(11)70045-3)
- 13 Chen, Y., Ye, W., Zhang, Y., & Xu, Y. (2015). High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucleic Acids Research*, 43(16), 7762-7768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv784>

- 14 Cheng, S., McCleskey, F. K., Gress, M. J., Petroziello, J. M., Liu, R., Namdari, H., Beninga, K., Salmen, A., & DelVecchio, V. G. (1997). A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *Journal Of Clinical Microbiology*, 35(5), 1248-1250. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.5.1248-1250.1997>
- 15 CLSI (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 16 Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia (2014), *Infección recurrente de vías urinarias guía práctica clínica*.
- 17 Corredor, N. C., López, C., Aguilera, P. A., Prieto, L. M., Rodríguez-Leguizamón, G., Leal, A. L., Ovalle-Guerro, M. V., Pardo-Oviedo, J. M., Chica, C. E., & Patarroyo, M. A. (2019). An epidemiological and molecular study regarding the spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a teaching hospital in Bogotá, Colombia 2016. *BMC Infectious Diseases*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3877-7>
- 18 Da Glória S Carvalho, M., Shewmaker, P. L., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Sampson, A. J., Joyce, K., Barrett, T. J., Teixeira, L. M., & Facklam, R. R. (2006). *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 56(7), 1505-1508. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64103-0>

- 19 De Dios L, T., C, I., & C, V. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70-78.
<https://biblat.unam.mx/es/revista/investigacion-en-discapacidad/articulo/fundamentos-de-la-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-pcr-y-de-la-pcr-en-tiempo-real>
- 20 Del Rosario Rodicio, M., & Del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(4), 238-245.
- 21 Devriese, L. A., Pot, B., & Collins, M. D. (1993). Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal Of Applied Bacteriology*, 75(5), 399-408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02794.x>
- 22 Díaz, J. A. G., Maldonado, M. R., Padilla, D. E. V., Díaz, R. M., & Palomares, I. R. M. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 41(3), 111-117. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2021/ei213e.pdf>
- 23 Dirección General de Epidemiología (2016), *Informe Anual 2015*, México, Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica.
- 24 Diz Mellado, O. D. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *N Punto*, III(30), 88-100.
<https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>

- 25 European Union. European Centre for Disease Prevention and Control [ECDC] 2021; c2021: Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018 periodo cubierto 1 de enero de 2018 a 31 de diciembre de 2018, [citado 2020 enero 26]; Disponible en:
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>.
- 26 Facklam, R. R., & Collins, M. D. (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal Of Clinical Microbiology*, 27(4), 731-734.
<https://doi.org/10.1128/jcm.27.4.731-734.1989>
- 27 Fang, H., Ohlsson, A., Ullberg, M., & Özenci, V. (2012). Evaluation of species-specific PCR, Bruker MS, VITEK MS and the VITEK 2 system for the identification of clinical *Enterococcus* isolates. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(11), 3073-3077.
<https://doi.org/10.1007/s10096-012-1667-x>
- 28 Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269-284.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- 29 Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes. *Infectious Disease Clinics Of North America*, 28(1), 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003>
- 30 García, J. L. A., Flores, A. M. E., Barbosa, P. A., & Cortina, J. H. M. (2018). Susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* y *faecium* en un hospital de tercer nivel. *Revista Latinoamericana de*

Infectología Pediátrica, 31(2), 56-61.

<https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2018/lip182d.pdf>

- 31 Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. Journal Of Investigative Dermatology, 133(3), 1-4.
<https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- 32 Girón-González J., Pérez-Cano R., (2003) *Tratamiento de las infecciones por enterococo*, Rev Clin Esp. 203(10):482-5.
- 33 Gorrie, C., Higgs, C., Carter, G., Stinear, T. P., & Howden, B. (2019). Genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Microbial Genomics, 5(7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000283>
- 34 Hilt, E. E., McKinley, K., Pearce, M. M., Rosenfeld, A. B., Zilliox, M. J., Mueller, E. R., Brubaker, L., Gai, X., Wolfe, A. J., & Schreckenberger, P. C. (2014). Urine Is Not Sterile: Use of Enhanced Urine Culture Techniques To Detect Resident Bacterial Flora in the Adult Female Bladder. Journal Of Clinical Microbiology, 52(3), 871-876.
<https://doi.org/10.1128/jcm.02876-13>
- 35 Hollenbeck, B. L., & Rice, L. B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. Virulence, 3(5), 421-569.
<https://doi.org/10.4161/viru.21282>
- 36 Instituto Mexicano del Seguro Social (2009) Guía de Práctica Clínica Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Infección de Vías Urinarias no Complicada en Menores de 18 años en el Primero y Segundo Nivel de Atención, México.

- 37 Instituto Mexicano del Seguro Social (2009), Diagnóstico y Tratamiento de la Infección Aguda, no Complicada del Tracto Urinario de la Mujer México, CUMAE, División de Excelencia Clínica.
- 38 Johansen, T. E. B., Botto, H., Cek, M., Grabe, M., Tenke, P., Wagenlehner, F. M., & Naber, K. G. (2011). Critical review of current definitions of urinary tract infections and proposal of an EAU/ESIU classification system. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 38, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.09.009>
- 39 Karstens, L., Asquith, M., Davin, S., Stauffer, P., Fair, D., Gregory, W. T., Rosenbaum, J. T., McWeeney, S. K., & Nardos, R. (2016). Does the Urinary Microbiome Play a Role in Urgency Urinary Incontinence and Its Severity? *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00078>
- 40 Kristich, C. J., Rice, L. B., & Arias, C. A. (2014). *Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance*. Boston: Massachusetts Eye And Ear Infirmary. <http://europepmc.org/abstract/MED/24649502>
- 41 Lewis, D. A., Brown, R., Williams, J., White, P., Jacobson, S. K., Marchesi, J. R., & Drake, M. J. (2013). The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00041>
- 42 Magistro, G., & Stief, C. G. (2019). The Urinary Tract Microbiome: The Answer to All Our Open Questions? *European Urology Focus*, 5(1), 36-38. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2018.06.011>

- 43 Marín, J. P., Campos, M., Herrera, M. L., Moya, T., Herrera, J. F., Obando, C., & Vargas, A. (s. f.). Sistema Vitek vs E-Test: comparación de la susceptibilidad en cepas de *Enterococcus* spp.
- 44 Martínez, J. A., & Mensa, J. (2005). Infección urinaria asociada a catéteres urinarios en la comunidad. *Enferm Infecc Microbial Clin*, 23, 57-66. <https://doi.org/10.1157/13091449>
- 45 Montes, A. M. S., Sandoval-Rodríguez, A. S., & Borunda, J. A. (2013). *Biología Molecular. Fundamentos Y Aplicaciones En Las Ciencias De La Salud*. En McGraw-Hill Education.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=830133>
- 46 Murray, P. R. (2009). *Microbiología Médica + Student Consult*, 6a ed. Elsevier España.
- 47 Neugent, M. L., Hulyalkar, N. V., Nguyen, V. H., Zimmern, P. E., & De Nisco, N. J. (2020). Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. *mBio*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00218-20>
- 48 Olawale, K. O., Fadiora, S. O., & Taiwo, S. S. (2011). Prevalence of hospital acquired enterococci infections in two primary-care hospitals in Osogbo, Southwestern Nigeria. *African Journal Of Infectious Diseases*, 5(2). <https://doi.org/10.4314/ajid.v5i2.66513>
- 49 Organización Panamericana de la Salud (2002), *Módulos de Principios de Epidemiología para el Control de Enfermedades*. Washington 2da ed. D.C.: OPS, ©, 46 p.

- 50 Oshida, Y., Hirashima, O., Tanaka, T., & Fujimoto, T. (2014). The Characteristics of Urinary Tract Infection with Urosepsis. *Kansenshogaku Zasshi*, 88(5), 678-684.
<https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi.88.678>
- 51 Oyamada, Y., Ito, H., Fujimoto, K., Asada, R., Niga, T., Okamoto, R., Inoue, M., & Yamagishi, J. (2006). Combination of known and unknown mechanisms confers high-level resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecium*. *Journal Of Medical Microbiology*, 55(6), 729-736.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46303-0>
- 52 Pacheco, J., & Ernesto, E. (2017). Susceptibilidad antimicrobiana de microorganismos causantes de infección de vías urinarias complicada según sistema fenotípico ORENUC en Hospital Carlos Roberto Huembes, enero a diciembre 2016. <https://repositorio.unan.edu.ni/8516/>
- 53 Padmavathy, K., Praveen, S., Madhavan, R., Krithika, N., & Kiruthiga, A. (2015). Clinico-Microbiological Investigation of Catheter Associated Urinary Tract Infection by *Enterococcus faecalis* : vanA Genotype. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*.
<https://doi.org/10.7860/jcdr/2015/13856.6378>
- 54 Pearson, M. A. J., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Valderrama, C. D., Marcano, N. S., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1-8.
<https://doi.org/10.26633/rpsp.2019.65>

- 55 Pérez-Cano, H., & Robles-Contreras, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev Med MD*, 4.5(3), 186-191.
- 56 Peterson, J., Kaul, S., Khashab, M., Fisher, A., & Kahn, J. B. (2007). Identification and Pretherapy Susceptibility of Pathogens in Patients with Complicated Urinary Tract Infection or Acute Pyelonephritis Enrolled in a Clinical Study in the United States from November 2004 Through April 2006. *Clinical Therapeutics*, 29(10), 2215-2221.
<https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2007.10.008>
- 57 Piezzi, V., Gasser, M., Atkinson, A., Kronenberg, A., Vuichard-Gysin, D., Harbarth, S., Marschall, J., & Buetti, N. (2009). Increasing proportion of vancomycin resistance among enterococcal bacteraemias in Switzerland: a 6-year nation-wide surveillance, 2013 to 2018. *Eurosurveillance*, 25(35). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.35.1900575>
- 58 Porat, A., Bhutta, B. S., & Kesler, S. (2023, 17 agosto). Urosepsis. StatPearls - NCBI Bookshelf.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482344/>
- 59 Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2017). Koneman. Diagnóstico microbiológico: Texto Y Atlas.
- 60 Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Fernández-No, I. C., Morandi, S., Alnakip, M. E., Caamaño-Antelo, S., Barros-Velázquez, J., & Calo-Mata, P. (2013). Characterization of different food-isolated *Enterococcus*

- strains by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 34(15), 2240-2250. <https://doi.org/10.1002/elps.201200699>
- 61 Raza, T., Ullah, S. R., Mehmood, K., & Andleeb, S. (2018). Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. *PubMed*, 68(5), 768-772.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29885179>
 - 62 Reina-Bautista, E., Camacho-Moreno, G., Arzate-Barbosa, P., & De Colsa-Ranero, A. (2013). Perfil fenotípico de resistencia de enterococos en el Instituto Nacional de Pediatría, en la Ciudad de México. *Rev Enfer Infec Pediatr*, 27(106), 369-372.
 - 63 Rincón, S., Panesso, D., Díaz, L., Carvajal, L. P., Reyes, J., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). [Resistance to «last resort» antibiotics in Gram-positive cocci: The post-vancomycin era]. *PubMed*, 34 Suppl 1, 191-208.
<https://doi.org/10.1590/s0120-41572014000500022>
 - 64 Ruoff, K. L., De la Maza, L., Murtagh, M. J., Spargo, J. D., & Ferraro, M. J. (1990). Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *Journal Of Clinical Microbiology*, 28(3), 435-437.
<https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.435-437.1990>
 - 65 Saengsuwan, P., Singkhamanan, K., Madla, S., Ingviya, N., & Romyasamit, C. (2021). Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates in a tertiary care hospital in southern Thailand: a retrospective study. *PeerJ*, 9, e11478.
<https://doi.org/10.7717/peerj.11478>

- 66 Said, H. S., & Abdelmegeed, E. S. (2019). <p>Emergence of multidrug resistance and extensive drug resistance among enterococcal clinical isolates in Egypt</p> Infection And Drug Resistance, Volume 12, 1113-1125. <https://doi.org/10.2147/idr.s189341>
- 67 Shrestha, S., Kharel, S., Homagain, S., Aryal, R., & Mishra, S. K. (2021). Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Asia—A systematic review and meta-analysis. Journal Of Clinical Pharmacy And Therapeutics, 46(5), 1226-1237. <https://doi.org/10.1111/jcpt.13383>
- 68 Torres-Rosales F. (2021). *Técnicas y herramientas moleculares empleadas para la obtención de material genético*. (informe 20210903) Universidad Autónoma Metropolitana
<https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/26292/1/cbs1973836.pdf>
- 69 Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2010). Principios de anatomía y fisiología. Bogota DC, Colombia: Panamericana Editorial Ltda;.
- 70 Viejo, M. G., & Asensio, A. N. (2010). La infección del tracto urinario en los servicios de medicina interna. Revista Clínica Española, 210(11), 537-544. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2009.12.015>
- 71 Viejo, M. G., & Asensio, A. N. (2010b). La infección del tracto urinario en los servicios de medicina interna. Revista Clínica Española, 210(11), 537-544. <https://doi.org/10.1016/j.rce.2009.12.015>
- 72 Weinstein, M. P., & Clinical. (2019). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. En Clinical and Laboratory Standards Institute eBooks. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BB27798825>

- 73 Wilson, L. A., & Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology And Evolution*, 23(6), 1156-1168. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj125>
- 74 Zanella, R. C., Brandileone, M. C. C., Bokermann, S., Almeida, S. C., Valdetaro, F., Vítório, F., De Fátima A Moreira, M., Villins, M., Salomão, R., & Pignatari, A. C. C. (2003). Phenotypic and Genotypic Characterization of VanA *Enterococcus* Isolated During the First Nosocomial Outbreak in Brazil. *Microbial Drug Resistance*, 9(3), 283-291. <https://doi.org/10.1089/107662903322286490>