



UNIVERSIDAD DE ORIENTE  
NÚCLEO DE SUCRE  
ESCUELA DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE CEPAS DE *Enterococcus* RESISTENTES A  
ANTIBIÓTICOS GLICOPÉPTIDOS EN PACIENTES HOSPITALIZADOS EN EL  
HOSPITAL “SANTOS ANÍBAL DOMINICCI”, CARÚPANO, ESTADO SUCRE

(Modalidad: Investigación)

YAMILET JOSEFINA BOADA RONDÓN

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2008

DETERMINACIÓN DE CEPAS DE *Enterococcus* RESISTENTES A  
ANTIBIÓTICOS GLICOPÉPTIDOS EN PACIENTES HOSPITALIZADOS EN EL  
HOSPITAL “SANTOS ANÍBAL DOMINICCI”, CARÚPANO, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:

---

Dra. Lorena Abadía Patiño

Asesora

---

---

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
LISTA DE TABLAS .....	v
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN .....	1
METODOLOGÍA .....	7
Población.....	7
Obtención de muestras .....	7
Procesamiento de las muestras.....	7
Aislamiento y purificación.....	8
Prueba de susceptibilidad por difusión en agar.....	8
Caracterización molecular de los genotipos de resistencia a los glicopéptidos .....	10
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN .....	18
CONCLUSIONES .....	33
RECOMENDACIONES .....	34
BIBLIOGRAFÍA .....	35
ANEXO.....	50

## **DEDICATORIA**

A

Mis padres Zenaida de Boada y José Boada, ejemplos de dedicación y honestidad.

Mis hermanos, Jenny, Jean y Oscar ejemplos de perseverancia y logro.

Mis sobrinos, Neylin y Sebastián que esto les sirva de ejemplo en su vida que apenas comienza.

Mis primos Enrique y José Ángel Núñez, gracias por su tiempo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Todo el esfuerzo realizado hasta ahora, no pudo ser posible sin la ayuda de Dios quien guía cada paso que doy en la vida. Pero también, a muchas personas a las que quiero agradecer:

A La Dra. Lorena Abadía Patiño, por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su tutoría. Gracias por su enseñanza y apoyo.

Las licenciadas Yamilis, Ana Claudia y al Dr. Jesús Russián del Laboratorio de Bacteriología del HSAD por su ayuda y especialmente a la Licenciada Yalile para quien no tengo palabras de agradecimiento por la ayuda y apoyo incondicional.

La Dra. Ángela Rodríguez por permitirme trabajar en la UCI del HSAD.

Al Dr. Juan Fernández por permitirme trabajar en la sala de hemodiálisis del HSAD.

La Dra. Elia Sánchez Infectóloga del HSAD por su colaboración.

La Profa. Bethsy Cedeño quien está a cargo del Laboratorio de Microbiología de Ciencias UDO Sucre.

Al Laboratorio de Genética Molecular del IIBCA a cargo del Dr. Marcos de Donato y el Laboratorio de Bacteriología del Postgrado de Biología Aplicada de la Universidad de Oriente.

Al Laboratorio de Bacteriología de la escuela de Bioanálisis de la UDO Sucre a cargo de la Profa. Elsa Salazar.

Los técnicos Milagros y Jenny, por su colaboración.

Mis compañeras de laboratorio Sarai, Sophy, Gloria, Annie y mis amigas Matilde Torrens, Jennelis Cedeño, Milagros Pérez, gracias por la ayuda.

A la Profa Isabel Mimbela, gracias por su ayuda.

Al Consejo de Investigación del Núcleo de Sucre y a la Dirección de Planificación de la Universidad de Oriente, por el financiamiento de este proyecto, así como a la Profa. Tahís Pico de Oliveros, por la ayuda económica prestada.

Todas aquellas personas que de alguna u otra forma colaboraron en la realización de esta investigación... Gracias

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características de los pacientes en la unidad de hemodiálisis y UCI (febrero – julio 2007).....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 2. Susceptibilidad de agentes antimicrobianos de 26 <i>Enterococcus</i> aislados en la unidad de Diálisis y UCI del HSAD. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.5</b>
Tabla 3. Fenotipos, genotipos y CMI de cepas de <i>Enterococcus</i> aislados en la unidad de Diálisis y UCI del HSAD .....	<b>¡Error! Marcador no definido.6</b>



## RESUMEN

Los pacientes estudiados durante el período de febrero–julio 2007, provinieron de los servicios de hemodiálisis y Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del hospital “Santos Aníbal Dominici” (HSAD) de Carúpano, Venezuela. La detección de pacientes portadores de *Enterococcus* se hizo por pesquisa en placas de agar bilis esculina azida (BEA) con y sin vancomicina (6 µg/ml). A las colonias características de *Enterococcus* se les realizó la coloración de Gram. Se detectó un total de veintinueve aislamientos positivos, caracterizándose por ser positivos a la hidrólisis de la esculina (colonias negras). Se analizaron veinticinco cepas de *Enterococcus* mediante pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos: vancomicina, teicoplanina, estreptomina, gentamicina, ampicilina, ampicilina-sulbactam y ciprofloxacina por el método de difusión en agar (método de Kirby–Bauer), siete cepas presentaron resistencia intermedia a vancomicina (halo de inhibición 15–16mm). Se verificó la resistencia a vancomicina mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a diferentes concentraciones de vancomicina (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, y 128 µg/ml). Todas las cepas en prueba mostraron resistencia. La detección de los diferentes genes de las ligasas de resistencia (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*) se llevó a cabo por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiple, resultando positiva en veinticuatro aislados para el gen *vanC*. Es necesario mantener un sistema de vigilancia mediante cultivos para identificar pacientes colonizados sobre todo en las áreas críticas, higiene de manos, descontaminación de ambientes y equipos, así como utilizar racionalmente los antibióticos en especial, la vancomicina.

## INTRODUCCIÓN

Los antibióticos y agentes quimioterapéuticos, son compuestos químicos capaces de inhibir el crecimiento e incluso de destruir determinadas especies microbianas, de forma específica, a bajas concentraciones y sin toxicidad (o muy baja), para el organismo humano (Myrvik y Weiser, 1991). Los antibióticos sólo son útiles si las bacterias no se vuelven resistentes a sus efectos (Montague, 1999).

Para que un antimicrobiano ejerza su acción, es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre la bacteria y alcance intracelularmente la concentración necesaria. Una vez dentro del microorganismo, la actividad del antibiótico puede ser: bacteriostática (tetraciclinas, aminoglucósidos, cloranfenicol y macrólidos), inhibiendo la multiplicación de formas reversibles, o bactericida ( $\beta$ -lactámicos, polipéptidos y fosfomicina), creando un efecto letal. En general, cada familia de antibiótico tiene un mecanismo de acción diferente (Myrvik y Weiser, 1991).

Luego del descubrimiento de la penicilina y de otras drogas antibacterianas se creyó finalmente, que se habían logrado desarrollar herramientas para vencer de modo definitivo a las bacterias causantes de enfermedades infecciosas. Esto fue una ilusión, ya que casi simultáneamente con su uso se constató la aparición de cepas microbianas resistentes a ellos, lo que constituye una grave amenaza para la salud humana. Para enfrentarla es necesario conocer cuáles son sus causas y qué mecanismos están involucrados en su generación (Chartone, 1999).

Debido a la gran variedad de antibióticos, las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos, no representaban un problema médico durante los años 80. Sin embargo, la evolución bacteriana con respecto a la resistencia ha sido

considerablemente acelerada por la presión selectiva hospitalaria, exhortado por la sobre-prescripción de antibióticos y el uso en grandes cantidades, como promotores de crecimiento en el desarrollo de animales de granjas. Desde entonces, las bacterias tienen la remarcable habilidad de desarrollar resistencia a los antibióticos (Charpentier y Courvalin, 1999).

Se ha descrito que las infecciones nosocomiales por bacterias Gram positivas han sido las más frecuentes y que especialmente *Enterococcus* ha experimentado un notable incremento (Pechére, 1993; Tomaz, 1994). *Enterococcus* es uno de los principales patógenos nosocomiales, (aunque forma parte de la flora intestinal de los individuos sanos y no se le atribuye una elevada virulencia), en el ámbito hospitalario constituye una de las causas más importantes de endocarditis, bacteriemia, infección urinaria e infección de heridas. Las especies aisladas con más frecuencia son de 80–90% *Enterococcus faecalis* (Schleifer *et al.*, 1984; Woodford *et al.*, 1995a) y 5–10% *Enterococcus faecium* (Lewis y Zervos 1990; Ruoff *et al.*, 1990; Gordon *et al.*, 1992; Moellering, 1992; Patterson *et al.*, 1995). En este contexto, la resistencia a glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) plantea un serio problema para el tratamiento de la infección enterocócica, especialmente en UCI debido a la escasez de alternativas terapéuticas (Macía *et al.*, 2005).

La vancomicina, antibiótico bactericida de espectro reducido, es la droga de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a todos los  $\beta$ -lactámicos (oxacilina y meticilina). Los mecanismos de acción de la vancomicina (inhibición de la síntesis y el ensamblado de la segunda etapa del péptidoglicano de la pared celular y alteración de la permeabilidad de la membrana citoplasmática), contribuyen a la baja frecuencia de desarrollo de resistencia (Miele *et al.*, 1995; De la Parte-Pérez *et al.*, 2003).

Durante la década de los 90 surgieron 2 problemas adicionales: debido al uso masivo de cefalosporinas, intrahospitalariamente, se seleccionaron cepas de *Enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*) que pasaron a constituir una etiología importante de las infecciones nosocomiales, ya que, con el uso masivo de vancomicina, requerida para tratar infecciones nosocomiales por *S. aureus* multirresistentes, surgieron cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV). *Enterococcus* es la segunda causa de infecciones nosocomiales en Estados Unidos y la tasa de resistencia a vancomicina está en 30% o más (Marobar y Campos, 1999).

Numerosos brotes han mostrado que los organismos son transferidos de paciente a paciente por la manipulación de trabajadores de la salud o por objetos contaminados. El problema entre los profesionales del cuidado de la salud ha sido microorganismos como ERV, los cuales son fácilmente transmitidos entre el personal y que podrían compartir genes de resistencia con otros géneros (Kirkpatrick *et al.*, 1999; Corso *et al.*, 2005).

Entre los factores que favorecen la selección y la diseminación de genes que confieren resistencia, cabe mencionar el uso indiscriminado de antibióticos y el aumento en la población de pacientes cuyo sistema inmune se encuentra deprimido (enfermos con SIDA, pacientes que han recibido transplantes de órganos y pacientes bajo quimioterapia). Estas condiciones favorecen la aparición de infecciones llamadas oportunistas, que deben ser tratadas mediante el suministro prolongado de antibióticos y en dosis altas; por último, el uso de antibióticos como factores de crecimiento suministrados en alimentación de animales y el desarrollo de los medios de transporte permiten la rápida diseminación de cepas resistentes (Montague, 1999).

La resistencia bacteriana es un tema de importancia en salud pública. Su extensión a nivel mundial, el desarrollo de resistencia a nuevos agentes antimicrobianos, así como su presencia en patógenos relacionados con enfermedades

agudas prevalentes, como son la enfermedad diarreica, las infecciones respiratorias e intrahospitalarias, le dan el carácter de problema prioritario (Palacios, 2002; Maciá *et al.*, 2005).

Después de la aparición de *Enterococcus* resistentes a los antibióticos betalactámicos y a altas concentraciones de aminoglucósidos en los años 80, la vancomicina representó el último antibiótico disponible para infecciones debido a *E. faecium* (Grayson *et al.*, 1991). El primer caso de ERV descrito en 1986 (Leclercq *et al.*, 1988), fue publicado en Europa en 1988. En el mismo año, los investigadores franceses describieron que el mecanismo genético para la resistencia a vancomicina está situado en un plásmido (Leclercq *et al.*, 1988). Cinco años más tarde, identificaron un pequeño elemento genético móvil, el cual se conoce como transposón, denominado Tn1546, como la base genética para el alto nivel de resistencia a vancomicina (Arthur *et al.*, 1993).

*Enterococcus* susceptibles a vancomicina sintetizan precursores de la pared celular que terminan en D-Ala-D-Ala que tienen alta afinidad por vancomicina. Una vez allí, estos precursores no pueden participar en la síntesis de la pared celular. En presencia de un inductor como vancomicina, ERV genera precursores con terminales diferentes, por ejemplo D-Ala-D-Lac y D-Ala-D-Ser que tiene baja afinidad para vancomicina y puede seguir siendo utilizado en la síntesis de la pared celular (Murray, 2000). En *Enterococcus* se han identificado siete mecanismos de resistencia a vancomicina denominados VanA a VanE, VanG y VanL (McKessar *et al.*, 2000; Murray, 2000; Boyd *et al.*, 2007). El operón *vanA* es el mecanismo más común, debido al alto nivel de resistencia a glicopéptidos (Arthur *et al.*, 1996). El operón *vanB* caracterizado por resistencia a vancomicina y susceptibilidad a teicoplanina es menos frecuente que *vanA* (Quintiliani *et al.*, 1993); aunque esta resistencia podría desarrollarse rápidamente intra-tratamiento. Contrariamente a los mecanismos de resistencia localizados en transposones, el operón *vanC* es cromosómico, no

transferible a otras bacterias y se presenta en *Enterococcus* menos virulentos que *E. faecium* y *E. faecalis*, tales como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens*. Los operones *vanD*, *vanE* y *vanG* se ha encontrado sólo esporádicamente (Périchon, 1997; Fines, 1999; McKessar *et al.*, 2000).

La aparición de ERV en hospitales de Estados Unidos se demuestra claramente por los datos de vigilancia sobre susceptibilidad a antibióticos en patógenos nosocomiales, recogidos por el centro para el control y prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention, 1999). Casi todos los aislamientos enterocócicos de sangre eran susceptibles a vancomicina en 1989, pero la proporción de cepas resistentes ha aumentado a 12,8% y 25,9% en 1995 y 2000, respectivamente (National nosocomial infections surveillance, 2000). En Estados Unidos, ERV parecía propagarse del noreste al cercano oeste y posteriormente, a la costa del oeste. Inicialmente, brotes del hospital que afectaron a pocos pacientes fueron comunicados y éstos se podían controlar con medidas de control de infección (Handwerger *et al.*, 1993; Boyce *et al.*, 1994). Sin embargo, los pacientes se colonizaron cada vez más con ERV y hacia 1995 fueron descritas situaciones endémicas (Morris *et al.*, 1995; Slaughter *et al.*, 1996). La colonización era más frecuente en pacientes críticamente enfermos e inmunocomprometidos, tratados en salas donde el uso antibiótico era mayor y la transmisión fue identificada como ruta importante de la propagación bacteriana, sugiriendo lapsos prolongados en la práctica del control de infecciones (Morris *et al.*, 1995; Bonten *et al.*, 1996). En los últimos años se ha demostrado que la epidemiología de ERV en los hospitales es influenciada por diversas variables que interactúan (Bonten *et al.*, 2001).

Aunque *Enterococcus* es habitante de la flora intestinal normal del ser humano, la colonización con ERV en pacientes hospitalizados no está restringida al intestino. En estos pacientes, ERV ha sido recuperado de la región de la ingle, piel intacta del antebrazo, orofaringe y aspirados gástricos y endotraqueales (Bonten *et*

*al.*, 1996; Beezhold *et al.*, 1997). La colonización persistente y contaminación directa del ambiente (tales como cama y sábanas), ocurren con frecuencia (Bonten *et al.*, 1996). ERV parece combinar características de otros patógenos nosocomiales, como por ejemplo, bacterias entéricas Gram negativas en la colonización intestinal constante, *Staphylococcus aureus* en la colonización de la piel y *Clostridium difficile* en la contaminación del ambiente. Los reservorios extensos de ERV, especialmente superficies ambientales y sitios de la piel de pacientes que son tocados comúnmente sin guantes por los trabajadores de la salud, podría haber contribuido a la rápida propagación de ERV en hospitales (Bonten *et al.*, 2001).

Este es el primer estudio multicéntrico realizado en Venezuela, enfocado hacia la detección de pacientes colonizados por *Enterococcus* resistente a glicopéptidos en la región nor-oriental.

El peligro de tener pacientes portadores de ERV en servicios de alto riesgo, como UCI y hemodiálisis, es que pueden ser autoinfectados por su flora comensal. En Venezuela, sólo se han reportado seis casos de infección por ERV, en Caracas, Maracaibo y Valencia. Desde la aparición del primer caso en un servicio hospitalario, es importante establecer un sistema de vigilancia, para evitar su diseminación en todo el hospital y que se perpetúe en el servicio. Es por ello que hay que detectar la presencia temprana de ERV procedentes de pacientes portadores del HSAD, en Carúpano, estado Sucre para evitar que se infecten y fallezcan.

# METODOLOGÍA

## **Población**

Se tomaron muestras de heces e hisopados rectales durante un periodo de seis meses (febrero-julio de 2007), en pacientes hospitalizados en la UCI del Hospital Santos Aníbal Dominicci (HSAD), en Carúpano, estado Sucre, y diálisis. Los criterios de inclusión fueron: pacientes diabéticos, cancerosos, con insuficiencia renal y transplantados, que estaban recibiendo tratamientos antibióticos con cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y/o glicopéptidos, independientemente de edad y condición social. Se tomaron tres muestras de heces e hisopados rectales, una cada semana, desde el ingreso en el servicio de la UCI y Hemodiálisis. Cada paciente, o un familiar en caso de no poder tomar la decisión el mismo paciente, firmó el consentimiento previa información (anexo 1).

## **Obtención de muestras**

Los Hisopados rectales fueron tomados con hisopos estériles colocados en tubos de rosca con el medio Stuar, fueron transportados al Laboratorio de Bacteriología del HSAD. Por cada paciente se llenó un formulario (anexo 2).

## **Procesamiento de las muestras**

Las muestras obtenidas fueron sembradas en agar Bilis Esculina Azida (BEA), en presencia y ausencia de 6 µg/ml de vancomicina e incubadas de 24 a 72 horas a 37°C. En este trabajo se utilizaron placas de agar bilis esculina azida con y sin 6 µg/ml de vancomicina, preparados en el laboratorio, no fueron placas comerciales. A

las colonias características de *Enterococcus* (colonias negras), se les realizó la coloración de Gram (McFaddin, 1990).

### **Aislamiento y purificación**

A partir de las placas que resultaron positivas en agar BEA las colonias se recuperaron en caldo infusión–cerebro–corazón (BHI) (Difco), se incubaron a 37°C por 24 horas para enriquecer las colonias; luego se sembraron en placas de agar base, las cuales se incubaron a 37°C por 24 horas para obtener un cultivo puro. Las cepas ERV fueron almacenadas a -80°C en caldo BHI–20% glicerol.

### **Prueba de susceptibilidad por difusión en agar**

#### Preparación del inóculo

Se tomó una sola colonia con la aguja para colocarla en 5 ml de BHI en baño de María con agitación, a 37°C por un lapso de 4 horas. El inóculo fue comparado mediante la turbidez con el tubo patrón (0.5 McFarland) para obtener una concentración bacteriana conocida ( $1,5 \times 10^8$  microorganismos viables/ml).

#### Método de Kirby-Bauer

El perfil de susceptibilidad bacteriana se determinó para los siguientes antibióticos: vancomicina (VAN), teicoplanina (TEC), estreptomina (STR), gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), ampicilina-sulbactam (AMS) y ciprofloxacina (CIP) (Difco), fue obtenido mediante la realización de antibiogramas, los cuales se llevaron a cabo por el método de difusión en disco utilizando agar Müeller- Hinton o método del disco de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Los discos de antibióticos se colocaron según normas establecidas en el Manual del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); las placas se incubaron en incubadora a 35°C/24 horas. Se realizó la lectura de los halos de inhibición midiendo, en milímetros, el diámetro alrededor del disco lo más exactamente posible, por la cara

inferior de la placa de Petri; los resultados fueron reportados como susceptibles, intermedias o resistentes a cada antibiótico, de acuerdo con los criterios de interpretación establecidos. Se utilizó la cepa de control de calidad *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los patrones de sensibilidad se determinaron mediante el método de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Los discos de antibióticos utilizados fueron: oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), teicoplanina (30 µg), vancomicina (30 µg) y novobiocina (5 µg), los cuales se colocaron siguiendo las normas establecidas por el M2-A9 del Instituto de Estándares Clínicos de Laboratorio (CLSI). Las placas se incubaron a 35°C por 24 horas en aerofilia. Los halos inhibitorios fueron medidos en milímetros y, seguidamente, la lectura de los antibiogramas fue interpretada bajo los criterios del M2-A9. La cepa control fue *S. aureus* ATCC 25923, recomendada por el M2-A9, la cual es una cepa sensible a los antibióticos estudiados (CLSI, 2007).

**Obtención del ADN total de *Enterococcus*** (Wizard Genomic DNA purification kit, Promega, Madison, Wis.)

A partir de los aislados identificados por coloración de Gram como *Enterococcus* se hizo un cultivo de las cepas de trabajo a 37°C, en baño de María con agitación, para luego centrifugar 1,5 ml de cultivo por 2 minutos (13 000 a 16 000 g) descartándose el sobrenadante y resuspendiendo las células bacterianas en EDTA 50 mM. Añadiendo lisosima 5 mg/ml incubándose 1 hora a 37°C, procediendo seguidamente a centrifugar 2 minutos (13 000 a 16 000 g) removiendo el sobrenadante. La solución de lisis fue añadida pipeteando suavemente, incubando a 80°C por 5 minutos enfriándose a temperatura ambiente. Luego, se agregó RNasa a 4 mg/ml en los tubos mezclando por inversión 5 veces, incubando a 37°C por 1 hora, procediendo seguidamente a centrifugar 2 minutos (13 000 a 16 000 g) removiendo el sobrenadante. Posteriormente, fueron agitados en un vórtex con solución precipitante e incubados en hielo 5 minutos y centrifugando por 3 minutos (13 000 a 16 000 g), el

sobrenadante fue transferido a un tubo estéril con isopropanol mezclando suavemente, después centrifugados por 3 minutos (13 000 a 16 000 g) descartando el sobrenadante y agregando en cada tubo etanol al 70% mezclando y nuevamente ser centrifugados 2 minutos (13 000 a 16 000 g) para eliminar el etanol dejando secar al aire libre 20 minutos. Finalmente, se realizó rehidratación del ADN en solución de rehidratación por 1 hora a 65°C almacenando el ADN de 2 a 8°C hasta su uso (Wizard Genomic) (Difco).

### **Caracterización molecular de los genotipos de resistencia a los glicopéptidos**

Se inició aplicando tres minutos de desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineamiento a 54°C, 1 minuto de extensión a 72°C. La amplificación fue completada con una extensión final de 7 minutos a 72°C en un termociclador marca (Applied Biosystem). Los fragmentos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 2% en 0,5X Tris–Borato–EDTA, por 2 horas a 150 v. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio para visualizar por iluminación ultravioleta. Las cepas de *E. faecium* VanA 77903, *E. faecalis* VanB 77904 y *E. gallinarum* VanC 77905 fueron incluidas como controles (Depardieu *et al.*, 2004).

Oligonucleótidos necesarios para este estudio:

Secuencia de los oligonucleótidos	Fenotipo	Tamaño de la banda (pb)
EA1 (+) GGGAAAACGACAATTGC	VanA	732
EA2 (-) GTACAATGCGGCCGTT		
EB3 (+) ACGGAATGGGAAGCCGA	VanB	647
EB4 (-) TGCACCCGATTTCGTT		

EC5 (+) ATGGATTGGTAYTKGTAT	VanC	
EC8 (-) TAGCGGGAGTGMCYMGTA		815/827
ED1 (+) TGTGGGATGCGATATTCAA	VanD	
ED2 (-) TGCAGCCAAGTATCCGGTAA		500
EE1 (+) TGTGGTATCGGAGCTGCAG	VanE	
EE2 (-) ATAGTTTAGCTGGTAAC		430
EG1 (+) CGGCATCCGCTGTTTTTGA	VanG	
EG2 (-) GAACGATAGACCAATGCCTT		941
DD1-3 (+) CACCTGAAGAAACAGGC	Ddl <i>E. faecalis</i>	
DD3-2 (-) ATGGCTACTTCAATTTACAG		475
FAC1-1 (+) GAGTAAATCACTGAACGA	Ddl <i>E. faecium</i>	
FAC2-1 (-) CGCTGATGGTATCGATTCAT		1,091

### **Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias**

A partir de las cepas que amplificaron la ligasa de resistencia, se les determinó CMI por el método de dilución en agar Müeller-Hinton (MH). Cultivos bacterianos líquidos incluyendo el control negativo *S. aureus* ATCC 25923 y control positivo *E. faecalis* 77904 VanB, fueron preparados al igual que el inóculo 0.5 McFarland para luego realizar diluciones 1:10 (900 µl de solución fisiológica más 100 µl del cultivo 0.5 McFarland) .Colocando 2 ml de VAN en cada placa de Petri y vertiendo 18 ml del medio mezclando bien. Las placas de agar que contenían las diferentes

concentraciones de antibiótico VAN (0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, y 128 µg/ml), fueron inoculadas con 2 µl del cultivo de la cepa a estudiar con  $10^{-7}$  UFC por depósito e incubados por 24 horas a 35°C, comenzando por la placa de menor concentración (CLSI, 2007)

## RESULTADOS

De un total de 41 pacientes muestreados durante los meses de febrero a julio de 2007 en el HSAD, 13 (31,7%) pacientes correspondían a la UCI y 28 (68,29%) pacientes a hemodiálisis. Todos los pacientes de hemodiálisis dieron muestras de heces frescas, por ser pacientes ambulatorios y no aceptar ser hisopados en el servicio; en cambio, las muestras de los pacientes de UCI fueron hisopados rectales (a los cuales fueron tomados tres muestras, otros casos dos muestras y algunos una sola). Todos los pacientes de hemodiálisis dieron su consentimiento informado y en algunos casos fueron los familiares de pacientes de UCI quienes autorizaron la toma de la muestra. De 41 pacientes, veintitrés eran femeninos y dieciocho masculinos; los pacientes estaban distribuidos en dos grupos: infantes de 11 meses a 2 años y adultos de 19 a 75 años ingresados por diferentes patologías. Todos recibieron tratamiento con antibióticos: aminoglucósidos, glicopéptidos, betalactámicos, tetraciclinas, fenicoles, lincomisinas, fluoroquinolonas o trimetropim-sulfametoxazol (tabla 1).

A las colonias presuntivas características de *Enterococcus* se les realizó la coloración de Gram, caracterizándose por ser cocos Gram positivos, colonias pequeñas y una tendencia a agruparse en forma de pares o cadenas cortas, se identificaron en las placas por resultar positivos a la hidrólisis de la esulina. Se observó crecimiento tanto en ausencia como en presencia de vancomicina. Sólo se tomaron en cuenta las colonias negras en presencia de vancomicina (6 µg/ml).

En el HSAD de Carúpano se aislaron 25 cepas de *Enterococcus* resultando: 7 cepas (17,00%) con susceptibilidad intermedia a VAN y 3 cepas (7,00%) con desarrollo de colonias intrahalos en el disco de STR; todas las cepas fueron sensibles a TEC, GEN, AMP y CIP, estos resultados están presentados por paciente en la tabla 2.

Tabla 1. Características de los pacientes de la Unidad de hemodiálisis y UCI (febrero – julio, 2007).

Ptes	Servicio	Sexo	Edad	Fdos	Tratamiento Previo	Crecimiento BEA + VAN	Diagnóstico
1	Hemo	M	50	-	O	+	IRC*
2	Hemo	F	21	-	O	+	IRC*
3	Hemo	M	50	-	O	+	IRC*
4	Hemo	M	66	-	O	+	IRC*
5	Hemo	M	58	-	O	+	IRC*
6	Hemo	F	46	-	O	+	IRC*
7	Hemo	F	57	-	O	+	IRC*
8	Hemo	M	71	X	O	+	IRC*
9	Hemo	M	38	-	O	+	IRC*
10	Hemo	M	49	-	O	+	IRC*
11	Hemo	M	76	-	O	+	IRC*
12	UCI	M	1	-	P,E	+	PTG
13	Hemo	F	38	-	O	-	IRC*
14	Hemo	F	36	-	O	-	IRC*
15	Hemo	F	42	-	O	-	IRC*
16	Hemo	F	51	-	O	-	IRC*
17	UCI	F	2	-	A,O,B,C,N	-	Neumonía
18	UCI	F	74	X	A,P	-	HA**
19	Hemo	F	53	-	O	+	IRC*
20	Hemo	M	75	-	O	+	IRC*
21	Hemo	F	52	-	O	+	IRC*
22	Hemo	F	55	X	O	-	IRC*
23	Hemo	F	68	-	O	-	IRC*
24	Hemo	F	24	X	O	+	IRC*
25	Hemo	F	56	-	O	+	IRC*
26	Hemo	M	46	-	O	+	IRC*
27	Hemo	F	24	-	O	+	IRC*
28	Hemo	F	24	-	O	+	IRC*
29	Hemo	M	67	-	O	+	IRC*
30	Hemo	M	53	-	O	+	
31	UCI	M	58	-	A,M,Ñ,O,E,K,F	-	Tétano III
32	UCI	F	1	-	A,O,D	+	PTG
33	UCI	M	11 meses	-	A,N	+	Intoxicación
34	UCI	M	72	-	P	+	HA**
35	UCI	F	32	-	H	+	HA**, PE
36	UCI	M	36	-	A,Q,R,S,F,G	+	Infección abd
37	UCI	F	24	-	A,T	-	SHV
38	UCI	F	20	X	A,H,I,C	-	Aborto, sepsis
39	UCI	M	23	-	A,C,S,L,F,J,C,K	+	PTG
40	Hemo	F	38	-	O	+	IRC*
41	UCI	F	19	-	A,P,L	-	CAD

Ptes: Pacientes, Fdos: Fallecidos, Hemo: Hemodiálisis, \* Insuficiencia renal crónica, \*\* Hipertensión arterial, PE: Preeclampsia, Infección abd: Infección intraabdominal, SHV: Shock hipovolémico, CAD:

Cetoacidosis diabética, (A) AK: Amikacina, (B) MEM: Meropenem, (C): Piperacilina, (D) CAZ: Ceftazidima, (E) FOR: Fortun, (F) Tigeciclina, (G): Sulfametoxazol, (H) CEP: Cefalotina, (I) DA: Clindamicina, (J) FLU: Fluconazol, (K) NET: Netromicina, (L) MET: Metronidazol, (M) CL: Cloranfenicol, (N) CTX: Cefotaxima, (Ñ) PEN: Penicilina, (O) VAN: Vancomicina, (P): Sultamicilina, (Q) GEN: Gentamicina, (R) IMI: Imipenem, (S) CIP: Ciprofloxacina, (T): Ampicilina-Sulbactam.

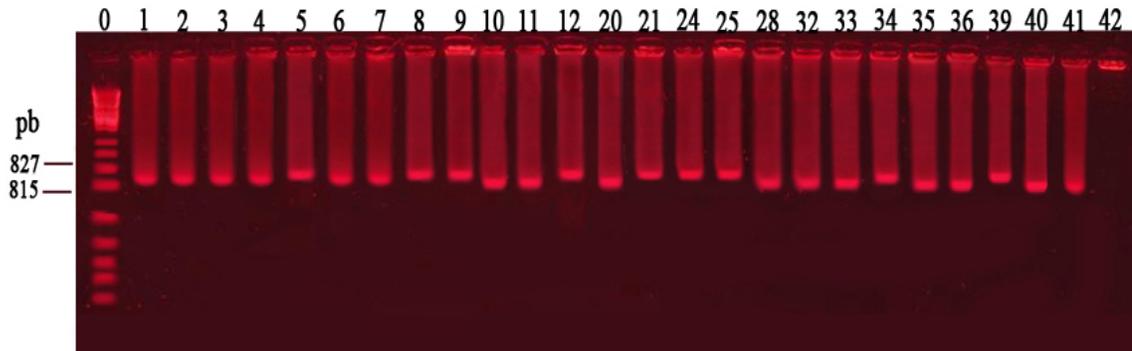
Tabla 2. Antibiotipos más frecuentes de agentes antimicrobianos de 25 *Enterococcus* aislados en la unidad de diálisis y UCI del HSAD.

Nº de cepas	Antimicrobianos						
	VAN	TEC	STR	GEN	AMP	AMS	CIP
14	S	S	S	S	S	S	S
07	I	S	S	S	S	S	S
03	S	S	R	S	S	S	S
01	S	S	I	S	S	S	S

R: Resistente, S: Sensible, I: Intermedio

La PCR se realizó tres veces para confirmar los amplificadores obtenidos. De las 25 cepas, 9 fueron positivas para el gen *vanC* en las tres PCR; de éstas, 4 fueron *vanC1* y 5 fueron *vanC2*. 6 cepas amplificaron dos veces *vanC1* y tres dos veces *vanC2*. 6 cepas amplificaron una sola vez como *vanC1* (figura 2). Una cepa no amplificó con ningún par de oligonucleótido (datos no mostrados). Con los oligonucleótidos EC5 (+) y EC8 (-) se amplificaron dos bandas, una banda de 815pb correspondiente a *vanC1* y una banda de 827 pb correspondiente a *vanC2*.

Figura 2. Perfil electroforético de la PCR múltiple de los ERV aislados.



Línea 0: marcador de peso molecular mostrado en pares de base ( $\lambda$  digerido por PstI), Líneas 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 20, 28, 32, 33, 35, 36, 40: pacientes con *E. gallinarum*., Líneas 5, 8, 9, 12, 21, 24, 25, 34, 39: pacientes con *E. casseliflavus*, Línea 41: control positivo *vanC*, Línea 42: control negativo.

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los 25 aislamientos de las cepas de *Enterococcus* se midió en agar MH. Todos los aislamientos mostraron susceptibilidad; 5 cepas mostraron una CMI de 8  $\mu\text{g/ml}$ , 19 tenían CMI de 16  $\mu\text{g/ml}$ .

Tabla 3. Fenotipos, genotipos y CMI de cepas de *Enterococcus* aislados en la unidad de diálisis y UCI del HSAD (Tabla 3).

Cepa	VAN	TEC	Genotipo ( <i>vanC</i> )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )
01	S	S	<i>vanC1</i>	08
02	S	S	<i>vanC1</i>	16
03	I	S	<i>vanC1</i>	16
04	S	S	<i>vanC1</i>	16
05	S	S	<i>vanC2</i>	08
06	S	S	<i>vanC1</i>	16
07	S	S	<i>vanC1</i>	16
08	S	S	<i>vanC2</i>	08
09	S	S	<i>vanC2</i>	16
10	S	S	<i>vanC1</i>	16

---

11	S	S	<i>vanC1</i>	16
12		S	<i>vanC2</i>	16
20	S	S	<i>vanC1</i>	08
21	S	S	<i>vanC2</i>	16
24	I	S	<i>vanC2</i>	16
25	S	S	<i>vanC2</i>	16
28	S	S	<i>vanC1</i>	16
32	I	S	<i>vanC1</i>	16
33	I	S	<i>vanC1</i>	16
34	S	S	<i>vanC2</i>	16
35	I	S	<i>vanC1</i>	16
36	I	S	<i>vanC1</i>	16
39	I	S	<i>vanC2</i>	16
40	S	S	<i>vanC1</i>	08

---

## DISCUSIÓN

Este trabajo forma parte del primer proyecto multicéntrico de despistaje de portadores de ERV desarrollado en Venezuela, el cual involucra los principales hospitales del Oriente del país: “Luís Razetti”, Barcelona, estado Anzoátegui, “Ruiz y Páez”, Ciudad Bolívar, estado Bolívar, “Manuel Núñez Tovar”, Maturín, estado Monagas, “Luís Ortega”, Porlamar, estado Nueva Esparta, Servicio Autónomo del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, en Cumaná y “Santos Aníbal Dominicci”, Carúpano, ambos del estado Sucre. Este primer estudio de portadores de ERV sugirió una presunta colonización en veintinueve pacientes (tabla 1), quienes estaban recibiendo tratamiento profiláctico con vancomicina, excepto dos que habían ingresado a UCI.

En el HSAD, estos cultivos de pesquisa fueron realizados a partir de muestras de heces e hisopados rectales de 41 pacientes cuyo sistema inmune se encontraba comprometido o deprimido; debido a diferentes patologías, estaban expuestos a presión selectiva por glicopéptidos y otros antibióticos, representando alto riesgo para la colonización y subsecuente infección por ERV

Durante un período de seis meses, 110 muestras de heces e hisopados rectales fueron evaluadas. Veintinueve cepas ERV fueron recuperadas de esas 110 muestras notándose un color negro (posible ERV +) luego del periodo de incubación en las placas con 6 µg/ml de vancomicina; la coloración es una característica fenotípica de *Enterococcus* (Facklam y Collins, 1989), por la capacidad de hidrolizar la esculina y el hecho de que creciera en vancomicina indicaba cierto grado de resistencia, por esa razón las cepas almacenadas fueron posteriormente estudiadas. De un total de 29 aislamientos positivos, tres estaban contaminados con *Proteus* siendo imposible

recuperar *Enterococcus*, quedando un total de 26. La cepa del paciente 19 fue descartada para este estudio, después que resultara posible ERV+ al crecer en placa BEA + 6 µg/ml de vancomicina, pero luego de la coloración de Gram, se observaron levaduras, las cuales son resistentes a glicopéptidos, por esta razón no se tomó en cuenta, ya que no se trataba de un enterococo, quedando veinticinco cepas en total para analizar.

Muchos son los esfuerzos de los laboratorios por presentar el método correcto para la detección efectiva de los pacientes portadores de ERV. En 2004, Novicki *et al.*, demostraron que el enriquecimiento en caldo es superior a la detección directa en placas para ERV, sólo que no existen medios líquidos comerciales disponibles con vancomicina (Drews *et al.*, 2006). En un principio, se planteó esta metodología, pasar los hisopados en 1 ml de solución salina fisiológica al 0,85% para recuperar los posibles ERV + y sembrar 100 µl en la placa agar BEA sin y con 6 µg/ml de VAN, pero dado los inconvenientes como espacio físico en el HSAD y Universidad de Oriente, así como falta de material y financiamiento fue imposible realizarlo de esta forma.

Actualmente en los laboratorios se emplean placas de agar selectivo conteniendo 6 µg/ml de vancomicina para detectar la presencia de ERV; comercialmente, se han producido agares diferenciales selectivos que contienen vancomicina a concentraciones de 6–8 µg/ml para *Enterococcus*. El uso de vancomicina a estas concentraciones es citado en el trabajo de Swenson *et al.* (1994), y posibilita la detección confiable de enterococos VanA, VanB y VanC.

Trabajos posteriores son necesarios con otras metodologías que permitan evaluar completamente la eficacia de este método y comparación con otros medios que contengan VAN para detectar alto nivel de resistencia VanA y VanB. Novicki *et al.* (2004) señalan que placas con concentraciones de VAN de 15 a 16 µg/ml, señalan

Novicki *et al.* (2004) pudieran eliminar algunos de los falsos positivos causados por *Enterococcus* móviles, los cuales son intrínsecamente resistentes a bajo nivel a vancomicina debido a que contienen *vanC* (VAN CMI  $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ ), por lo que detecta la mayoría de las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* VanA y VanB de importancia clínica.

Durante el estudio, fallecieron 4 pacientes por causas ajenas al portaje de ERV; de los 4, sólo uno había resultado posible portador de ERV, este paciente masculino pertenecía al servicio de hemodiálisis, de 71 años de edad, con IRC, diabético (tabla 1), cuyo sistema inmune se encontraba deprimido, además con fallas cardíacas, recibía tratamiento profiláctico con vancomicina. Caso similar reportó Reid (2001), en un estudio en el cual encontró que cuatro pacientes de 20, murieron dentro de los seis días de haber sido admitidos al hospital, 3 tenían bacteriemia por *E. gallinarum* y uno por *E. casseliflavus*, 4 pacientes murieron de uno a tres meses después del episodio de la bacteriemia; es difícil decir si la cepa de *E. gallinarum* aislada en ese paciente, tuvo alguna implicación en su muerte. Debido a que estos pacientes presentan enfermedades subyacentes graves, es difícil atribuir su mortalidad directamente a la infección por enterococos móviles como el caso del paciente anteriormente mencionado.

Existen varios factores de riesgo para infectarse debido a una colonización por ERV (Centers for Disease Control and Prevention, 1995; Woodford, 1995a). En este estudio, se observaron: i) una duración prolongada del tratamiento con VAN en todos los pacientes de hemodiálisis (68,29%), ii) estancia hospitalaria de larga data (pacientes de hemodiálisis tenían fecha de ingreso al hospital desde enero de 2004 a mayo de 2007, recibiendo VAN desde el inicio), iii) administración de cefalosporinas de tercera generación para tratar infecciones por bacterias Gram negativas, iv) así como estar sometidos a hemodiálisis. v) Los pacientes de hemodiálisis presentan riesgo aumentado a sufrir infecciones ya que tienen acceso inmediato al sistema

circulatorio debido a la presencia del catéter (puerta de entrada), pudiendo conducir a una septicemia o endocarditis. Vi) La estancia en UCI es otro factor de riesgo, en donde todos los pacientes (31,7 %) tuvieron un promedio de 4–30 días de hospitalización. A sí mismo, (Tuazon *et al.*, 1975; Kirmani *et al.*, 1978) indican que los pacientes en hemodiálisis tienen un índice mayor de colonización por ERV que la población general. Edlund *et al.* (1997), reportaron un aumento significativo en la emergencia de cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* en pacientes sanos cuando se les administraba vancomicina oral.

Son muchos los factores que desempeñan un papel importante para adquirir ERV. Al respecto, Mandell *et al.* (1997), indican que el estado de portador es clínicamente importante en el caso de pacientes sometidos a cirugía o con trastornos cutáneos exudativos, los cuales experimentan un mayor número de infecciones que los no portadores, y éstas, habitualmente, son producidas por la misma cepa que coloniza al paciente. Tales son los casos de los pacientes 36, 37 y 38 quienes ingresaron a UCI con infección intraabdominal postoperatoria, cesárea y aborto, respectivamente, recibiendo varios antibióticos durante su hospitalización, presentando además heridas, lo que quiere decir que estos pacientes tienen un mayor número de infecciones. Estos casos presentaron todos los factores de riesgo para desarrollar infección por ERV.

Autores como Ayse *et al.* (2003), señalan que la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es una consecuencia directa de su utilización; son los medicamentos más frecuentemente usados, tanto en la comunidad como en el hospital, en este último, una tercera parte de los pacientes hospitalizados recibe tratamiento antibiótico, siendo el consumo total de antimicrobianos de aproximadamente diez veces mayor en UCI que en el resto de las áreas hospitalarias. El paciente 39 (tabla 1), fue un caso masculino de 23 años, que ingresó al hospital en junio 2007 con politraumatismos generalizados, fue trasladado a UCI, recibiendo varios esquemas de

antibióticos por 30 días y trasladado a Caracas luego de 9 días en el hospital y 30 días en UCI en el HSAD. Este es otro caso que presenta todos los factores de riesgo para desarrollar infección por ERV.

Además, Favaro (2002), plantea que en UCI, se ha registrado un incremento progresivo del consumo de medicamentos por pacientes, con el aumento de días de hospitalización en dicho servicio. Se han publicado trabajos donde se demuestran errores en la dosificación de los antimicrobianos, uso inapropiado de ellos o uso innecesario dentro del hospital (Singh *et al.*, 2000; Ayse *et al.*, 2003).

Los laboratorios de microbiología deben estar preparados para detectar este tipo de cepas lo más rápidamente posible, con el fin de establecer medidas de aislamiento, control de antibióticos y detección de nuevos pacientes infectados. Corso *et al.* (2005), sugiere que la detección aumentada del organismo con reconocimiento de su diseminación persona a persona, es esencial para instaurar medidas de control de infección hospitalaria. Este es el primer paso en la reevaluación sistemática de los beneficios y riesgos de las políticas para profilaxis con antibióticos y el entendimiento del significado clínico de estos organismos.

Hasta el momento no es necesario aplicar dichas medidas en HSAD, ya que no se aislaron ERV con altos niveles de resistencia. No obstante, en esta investigación, tanto en el servicio de hemodiálisis como en UCI, medidas de control imprescindibles como son el uso de bata y guantes, junto al lavado de manos entre pacientes y personal sanitario no fueron observadas, ni, el control sobre la desinfección de equipos e instrumental médico, los cuales deben ser estrictos.

Klotz ( 2000), menciona que si solamente se retomaran los conceptos emitidos en 1847, cuando Semmelweis demostró con hechos irrefutables la importancia fundamental de las manos en la morbilidad de los pacientes hospitalizados así como el lavado de las mismas, la implementación de los conceptos de

asepsia–antisepsia y de aislamiento emitidos por Lister y Pasteur, el problema de UCI (transmisión de infección y bacterias resistentes) no tendría la magnitud que tiene actualmente en la mayoría de los centros de salud a nivel mundial, ya que en UCI un sólo paciente puede, en pocas horas, influir en la ecología local si no se toman estas medidas. La alta prevalencia de infección en pacientes de UCI está asociada, no solamente, al alto consumo de antimicrobianos (Roder *et al.*, 1993), sino también, a las características medioambientales propias, que contribuyen con una ecología favorable a la persistencia de diferentes microorganismos.

El tratamiento de infecciones causadas por *Enterococcus* es difícil, debido a la resistencia intrínseca a una amplia gama de antimicrobianos. *Enterococcus faecium* es intrínsecamente resistente a bajos niveles a penicilinas debido a la expresión de una proteína de unión a penicilina (PBP) de baja afinidad a betalactámicos. *Enterococcus*, en general, es intrínsecamente resistente a aminoglucósidos, porque el transporte activo es poco eficaz (Murray, 1990; Moellering, 1991). *E. faecalis* tiene resistencia natural a estreptograminas A (pristinamicina II o dalfopristina) y a lincosamidas: lincomicina y clindamicina (Fines *et al.*, 2000). Esta resistencia puede deberse a la presencia de una bomba de eflujo en esta especie (Singh *et al.*, 2002). *Enterococcus* tiene resistencia natural al ácido nalidíxico debido a la baja afinidad de su ADN girasa por las quinolonas de primera generación. Así como también, es generalmente resistente al cloranfenicol, tetraciclinas y rifampicina (Kaye, 1982). Algunas cepas pueden presentar altos niveles de resistencia a  $\beta$ -lactámicos por modificación de los niveles de expresión y/o afinidad de las PBP o por producción de una  $\beta$ -lactamasa (Murray *et al.*, 1992), a aminoglucósidos: debido a la adquisición de enzimas modificadoras (Leclercq *et al.*, 1992a), así como a niveles variables de resistencia a glicopéptidos (Courvalin, 2005).

Se emplearon 25 cepas para las pruebas fenotípicas y genotípicas. La tabla 2 muestra la susceptibilidad de los antimicrobianos de las cepas de *Enterococcus*

aisladas en hemodiálisis y UCI del HSAD, los resultados fueron 7 cepas (3, 24, 32, 33, 35, 36, 39) con susceptibilidad intermedia a VAN, mientras que, 15 fueron fenotípicamente susceptibles a VAN y a todos los antibióticos probados (TEC, AMP, GEN, STR, CIP), interpretadas de acuerdo al manual M2–A9 del CLSI (tabla 1).

La resistencia intrínseca del género *Enterococcus* a la mayoría de los antibióticos y la adquisición de resistencia a otros antibióticos activos en bacterias Gram positivas responsables de infecciones severas, produjeron la aparición de cepas refractarias a una gran parte de antibióticos disponibles para su tratamiento. Una porción muy importante del genoma de *E. faecalis* está constituida de elementos móviles y/o ADN exógeno adquirido (Paulsen, 2003). Esta facilidad de incorporar elementos genéticos móviles es, probablemente, responsable de la adquisición rápida de resistencia a antibióticos, pero también de su diseminación. De hecho, *Enterococcus* constituye un reservorio para la diseminación de genes de resistencia tanto para bacterias Gram positivas como Gram

Las cepas 7, 9 y 34 con susceptibilidad disminuída a VAN, no presentaron sinergia con el aminoglucósido STR, ya que se observó presencia de colonias intrahalo alrededor de dicho disco, sin embargo, presentaron sinergia con TEC y el aminoglucósido GEN, el cual puede ser usado como tratamiento para evolución satisfactoria de estos pacientes; el resto de las cepas igualmente con susceptibilidad disminuída a VAN, presentaron sinergia entre TEC y ambos antibióticos aminoglucósidos.

El tratamiento de infecciones causadas por *Enterococcus* aislados de sitios estériles en infecciones graves, es una terapia combinada de inhibidores de pared (VAN, TEC y AMP), con aminoglucósidos (GEN o STR), por su efecto sinérgico bactericida (Herman *et al.*, 1991); aunque enterococos presenta resistencia de bajo nivel a aminoglucósidos, no suprime la sinergia con los betalactámicos ni con

glicopéptidos.

Por lo tanto, es imprescindible detectar el alto nivel de resistencia a aminoglucósidos a nivel de laboratorio para la indicación de una terapia sinérgica en pacientes graves con aislamientos de *Enterococcus* de sitios estériles. Para ello, se deben emplear discos de GEN o STR de alta carga. En la cepa 8 se observó halo de inhibición de 7 mm alrededor del disco de STR, cepas con esta zona de resistencia deben ser verificadas por CMI para descartar una posible resistencia de alto nivel y realizar una curva de muerte con diferentes concentraciones del antibiótico para descartar resistencia.

La primera cepa de *Enterococcus* con alto nivel de resistencia (ANR) a aminoglucósidos fue aislada en Francia en 1979 y desde entonces, se han venido identificando en los cinco continentes (Eliopoulos, 1996). India, es un país que tiene un problema grave con el alto nivel de resistencia a aminoglucósidos (ANRA). En un hospital de Nueva Deli, India, se aislaron 51 enterococos de septicemias pediátricas. 68% presentaron ANR a GEN y 43% ANR a STR. Todas las cepas con ANR a STR lo eran también para GEN. No obstante, el 95% de las cepas era sensible a VAN (Randhawa, 2004).

Otro estudio, realizado en Nagpur, India, tuvo una prevalencia de 7,8% de cepas ANR a GEN y 24% con ANR a STR (Agarwal, 1999). En un estudio realizado en Nueva Deli, 66% de los aislamientos de enterococos de bacteriemias en niños fueron ANR a GEN y 42% a STR, siendo *E. faecalis*, la principal especie involucrada (Kapoor, 2004). La razón de alta prevalencia de ANR a STR en este estudio no está clara, en comparación con la ausencia de ANR a GEN, pudiera estar asociado a un uso mayor de STR en el HSAD. En un hospital de tercer nivel en México, D.F, se aislaron 14,4% *E. faecalis* ANR a GEN y 33,7% de ANR a STR (Arellano, 2005).

Discos de AMP y AMS permiten identificar la especie; *E. faecium* es resistente a AMP y a AMS, mientras que *E. faecalis* es sensible a ambos. El disco de AMS nunca se debe reportar, sólo sirve para la diferenciación entre *E. faecium* y *E. faecalis*. No se detectó la presencia de *E. faecium* en ningún antibiograma, correlacionándose con las amplificaciones por PCR cuando no se obtuvieran amplificados con los oligonucleótidos para las ligasas específicas de especies (Depardieu *et al.*, 2004).

Actinomicetos, microorganismos productores de glicopéptidos, así como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* tienen resistencia intrínseca de alto nivel a vancomicina (Billot-Klein, 1994; Marshal, 1998), mientras que *Erysipelothrix* y *Mycobacterium* son intrínsecamente resistentes a bajo nivel. Existen especies de enterococos, como *E. gallinarum*, *E. flavescens* y *E. casseliflavus* que son naturalmente resistentes a vancomicina (Dutka-Malen *et al.*, 1990; Vincent *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1994). La resistencia adquirida a glicopéptidos apareció treinta años después del inicio de su utilización en terapia humana. Las primeras cepas resistentes descritas fueron aisladas en 1986 en Francia (Leclercq, 1988) y en 1988 en Gran Bretaña (Uttley, 1988). Estas cepas poseían alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina. Desde entonces, numerosas cepas de ERV aisladas en clínica fueron descritas (Uttley *et al.*, 1989; Handwerger *et al.*, 1993; Quintiliani *et al.*, 1993; Handwerger *et al.*, 1995; Woodford *et al.*, 1995b). Esta resistencia no es debida a un gen único, sino que necesita la expresión de un conjunto de genes físicamente unidos bajo una regulación precisa. En enterococos, la resistencia a glicopéptidos es fenotípica y genotípicamente heterogénea. Siete tipos de resistencia han sido descritos: seis resistencias adquiridas, VanA, VanB, VanD, VanE, VanG y VanL y una resistencia intrínseca, VanC. Estos diferentes tipos de resistencia se distinguen por su soporte genético, así como, por los mecanismos de regulación de la expresión de los genes.

La figura 2 muestra los resultados de la PCR para 24 cepas *vanC*, lo cual se correlacionó con los resultados de las CMI. El análisis de la PCR produjo un producto de 815-pb para *vanC1* y 827-pb para *vanC2*, confirmando el fenotipo VanC. 15 cepas con genotipo *vanC-1* y 9 cepas con genotipo *vanC-2*, (Dutka-Malen *et al.*, 1992; Dutka Malen *et al.*, 1994; Navarro *et al.*, 1994; Toye *et al.*, 1997; Reid *et al.*, 2001), señalan que los genes *vanC*, los cuales confieren bajo nivel de resistencia a VAN son nativos en enterococos móviles como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* que transportan genes *vanC1*, *vanC2* y *vanC3*, respectivamente . Autores como Leclercq (1992b) y Navarro (1994), afirman que las especies móviles presentan resistencia intrínseca, bien sea constitutiva o inducible, de bajo nivel únicamente a vancomicina (CMI 2–32 mg/l), como lo aquí observado.

La resistencia VanC, cromosómica y no transferible por conjugación, resulta de la producción de precursores pentapeptídicos del péptidoglicano terminados en D-Ser (Reynolds *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1997). La sustitución de D-Ala terminal por D-Ser no afecta el número de uniones de hidrógeno entre vancomicina y el precursor D-Ser del péptidoglicano (Billot-Klein *et al.*, 1994). Sin embargo, estos precursores presentan una afinidad siete veces más débil por los glicopéptidos que los terminados en D-Ala (Billot-Klein *et al.*, 1994). Arias *et al.* (2000a), señalan que esta disminución de afinidad moderada está asociada a bajo nivel de resistencia a vancomicina. La organización de los genes del operón *vanC* es diferente a la observada en los operones *vanA*, *vanB* y *vanD* (Arthur y Courvalin, 1993; Casadewal *et al.*, 1999; Depardieu *et al.*, 2003).

Tres genes, *vanC*, *vanXYC* y *vanT* son estrictamente necesarios para la expresión de la resistencia (Arias *et al.*, 2000a). El gen *vanC* codifica para la ligasa VanC, la cual cataliza la formación del dipéptido D-Ala-D-Ser (Dutka-Malen *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 1994). En *E. gallinarum*, la inactivación del gen *vanC* produce la pérdida de la resistencia y la producción de precursores del péptidoglicano que

terminan en el dipéptido D-Ala-D-Ala (Dutka-Malen *et al.*, 1992; Reynolds *et al.*, 1994). El gen *vanXYC* codifica una enzima que posee dos funciones D,D-dipeptidasa y D,D-carboxipeptidasa (Reynolds *et al.*, 1999). Esta proteína hidroliza el dipéptido D-Ala-D-Ala formado por la ligasa cromosómica del hospedero y elimina el D-Ala C-terminal de los precursores pentapeptídicos del péptidoglicano. El gen *vanT* dirige la síntesis de la proteína VanT que tiene actividad serina racemasa membranaria permitiendo la transformación de L-Ser en D-Ser (Arias *et al.*, 1999) y una actividad alanina racemasa citoplásmica (Arias *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2000b). En presencia de D-Ser en el medio, las proteínas VanC y VanXYC son suficientes para conferir resistencia a vancomicina. La introducción de los genes *vanC*, *vanXYC* y *vanT*, bajo control del promotor *P2*, en la cepa JH2-2 sensible a glicopéptidos confiere resistencia vancomicina aún en ausencia de D-Ser en el medio (Arias *et al.*, 2000a). VanT cataliza entonces la síntesis de D-Ser *in vivo* (Arias *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2000b). Un sistema regulador a dos componentes VanRC-VanSC está presente (Arias *et al.*, 2000a), el cual es responsable de la expresión inducida o constitutiva.

Una sola cepa no presentó amplificado con los oligonucleótidos utilizados en la PCR múltiple (Depardieu *et al.*, 2004). La cepa 26, debe ser probada por PCR con los oligonucleótido degenerados V1 y V2 (Dutka-Malen *et al.*, 1992) para comprobar si existe un amplificado de una ligasa desconocida hasta el momento.

Existen pocos reportes dirigidos al significado clínico y epidemiológico de enterococos VanC; la poca prevalencia reportada para esas especies pudiera ser debido a su real baja frecuencia como patógenos (Toye *et al.*, 1997; van Horn *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2001). Sin embargo, hay algunos aislamientos clínicos esporádicos altamente resistentes a VAN de cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* transportando genes *vanA* y *vanB* (Toye *et al.*, 1997; van Horn *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2001).

Corso *et al.* (2005), en Argentina reportaron 15 aislamientos de *E. gallinarum* resistentes a vancomicina; medidas de control de infección fueron reforzadas, como aislamiento de pacientes infectados, aumento del lavado de manos y de aparatos médicos, así como todos los nuevos pacientes que ingresaban a UCI fueron seleccionados para cultivos de pesquisa; todos los casos estaban libres de ERV. Estos resultados sugieren una baja probabilidad de adquirir ERV si se aplican eficazmente dichas medidas. Observaciones ponen en evidencia la importancia del medio ambiente en la dinámica de la resistencia. Por otra parte, y debido a la frecuencia tanto de infecciones como de la resistencia producida por *Enterococcus* en el medio ambiente, se impone el uso en estos pacientes, de medidas farmacológicas especiales, para asegurar el éxito de la terapia antimicrobiana, tanto para curar la infección como para prevenir la aparición de cepas resistentes.

Aislamientos de cepas de *E. gallinarum*, han sido obtenidos de diferentes fuentes como cultivos sanguíneos, tracto digestivo, tracto urogenital e hisopados perianales (Toye *et al.*, 1997; van Horn *et al.*, 1998; Schouten *et al.*, 2000; Biavasco *et al.*, 2001). Pero, (Reid *et al.*, 2001; Dargere *et al.*, 2002), indican que solamente en pocos casos esta especie ha sido asociada con enfermedades infecciosas como endocarditis y bacteriemia. Sin embargo, *Enterococcus* móviles son capaces de capturar elementos genéticos responsables del alto nivel de resistencia a glicopéptidos y transferirlos a *E. faecium*, por lo tanto, se debe estar alerta ante esta situación, ya que *Enterococcus* vive habitualmente en el intestino no causando enfermedad en personas sanas. No obstante, en pacientes inmunocomprometidos, puede dejar de actuar como comensal para convertirse en patógeno, causando infección urinaria, contaminando heridas e invadiendo la sangre.

La endocarditis enterocócica es una enfermedad aguda en personas mayores, cuya fuente de infección es el sistema genitourinario o gastrointestinal. Una revisión de la literatura revela que enterococos móviles constituyen menos del 5% de las

bacteriemias enterocócicas (Thal, 1995; Coque, 1996). Contrariamente a lo reportado en muestras clínicas, todos los pacientes de este estudio presentaban enterococos móviles.

Aunque han sido raramente asociados con enfermedad, han estado implicados en una amplia variedad de infecciones humanas invasivas, especialmente, en pacientes inmunocomprometidos o crónicamente enfermos y algunas veces involucrados en infecciones nosocomiales (Facklam *et al.*, 1989; Ruoff, 1990; Gordon, 1992; MacNamara, 1995; Toye, 1997; Reid, 2001). La mayoría de estos pacientes han presentado falla renal, cáncer, pacientes transplantados o con deficiencia de la antitrombina 3, diabetes mellitus entre otras (Kaplan, 1988; Pompei, 1991; Vincent, 1992; van Goethen, 1994; Patterson, 1995; Toye, 1997; Karlonsky, 1999; Ratanasuwan, 1999; Kurup, 2001; Reid, 2001).

Malone (1986), señala que la bacteriemia enterocócica está asociada a una alta tasa de mortalidad; la tasa de fatalidad va de 12 a 68% y la muerte debido a sepsis enterocócica, ocurre de 4 a 50% (Huycke, 1996). Martone (1998) y Jochimsen (1999), indican que en Estados Unidos de 1989 hasta 1997, el porcentaje de infecciones causadas por ERV aumentó de 0.4 a 23,2% en UCI y de 0,3 a 15,4% en pacientes de otros servicios.

Ruoff (1990) encontró en muestras nosocomiales 1% de estos aislamientos tanto cepas de *E. gallinarum* como *E. casseliflavus*. Otros estudios han encontrado estas especies móviles en pacientes hospitalizados y no hospitalizados con tasas de 5,7 a 12,1% (Toye, 1997; van Horn, 1998). Reid (2001), reportó 20 casos de bacteriemia por cepas de *E. gallinarum* o *E. casseliflavus* entre 1992 y 1998.

Bacteriemias debido a cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* están alrededor del 3% (Toye, 1997; Ratanasuwan, 1999). La bacteriemia primaria ocurrió

en 7 de los 20 casos, 6 de los cuales fueron nosocomiales en pacientes bajo quimioterapia; esto pudo ser el resultado de una fuente intestinal por selección antimicrobiana (Patterson, 1995). Se ha demostrado que *Enterococcus* transloca del tracto intestinal a los nódulos linfáticos en animales de experimentación (Wells, 1990).

El primer *E. gallinarum* M2686 con alta resistencia a glicopéptidos, fue reportado por Togneri *et al.* (2003), aislado de un hombre de 64 años hospitalizado en el hospital general de Agudos Evita en Buenos Aires, Argentina. Este aislamiento fue genótipicamente caracterizado como *vanA* y *vanC* por PCR. Después de este reporte, pesquisas con hisopados rectales fueron inmediatamente realizados en UCI de esa institución.

En Estados Unidos, Biedenbach *et al.* (2004) reportan que la resistencia a vancomicina en enterococos es ya una situación endémica en muchos hospitales alcanzando 17,7% de cepas resistentes en 2002. Sin embargo, Goossens *et al.* (2003), señalan que en Europa la prevalencia de *E. faecalis* resistente a glicopéptidos en el ámbito nosocomial es menor, situándose por debajo del 3% en términos generales y en torno al 0,8% en España según estudios recientes (Macía *et al.*, 2005). No obstante, en España hay constancia hasta la fecha de dos brotes: el primero, descrito por Peset *et al.* (2000), implicó un total de 16 pacientes entre 1994 y 1995 y el segundo, recientemente publicado por Velazco *et al.* (2004), afectó a seis pacientes en un hospital de Galicia. Estos datos, advierten del grave problema que se acerca si estas situaciones no se controlan debidamente.

En Venezuela, ya existen varios reportes de algunos casos por infección, entre los cuales se puede citar a Montilla *et al.* (2007), Pineda *et al.* (2007), Ruíz *et al.* (2007) y Silva *et al.* (2007), quienes aislaron, de focos infecciosos, cepas de *E. faecium* con alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina. Mientras que,

Vásquez *et al.* (2007), señalan un caso de endocarditis por *E. faecalis*. Esto podría ser debido a la administración de antibióticos, duración prolongada de tratamiento con vancomicina, presencia de comorbilidades y hospitalización en servicios de alto riesgo.

La identificación a nivel de especie es vital en *Enterococcus*, ya que los enterococos móviles con bajo nivel de resistencia caen siempre en el rango de susceptibilidad definido por el CLSI. Las CMI de esas cepas van de 2–32 mg/l, conduciendo a fracasos terapéuticos si se tratan con VAN, el antibiótico de elección en el medio hospitalario para el tratamiento de infecciones nosocomiales por cocos Gram positivos (Courvalin, 2005). La identificación exacta de enterococos alerta a los médicos de que la vancomicina no es efectiva, aunque el reporte de susceptibilidad indique lo contrario. Además, es importante para una terapia adecuada y una instauración de medidas de control de infecciones.

En general, recomendaciones actuales para el control de infección hospitalaria según Novicki *et al.* (2004), incluyen cultivos de pesquisa de estas muestras para ERV. Pero los métodos óptimos para esos cultivos no están claros. Técnicas de amplificación de ADN para la identificación de ERV en muestras de heces están ganando aceptación, sin embargo, hay una continua necesidad para lograr un mejor método de cultivo para la detección de ERV, ya que los laboratorios clínicos públicos venezolanos, no cuentan con técnicas moleculares para detectar la presencia de estas cepas. El Laboratorio de Resistencia Bacteriana del IIBCAUDO, está buscando una metodología para el aislamiento efectivo de *Enterococcus* con alto nivel de resistencia a los glicopéptidos.

## CONCLUSIONES

En el estado Sucre hasta este momento no existen reportes de *Enterococcus* resistentes a glicopéptidos, no obstante es necesario hacer la pesquisa de portadores de ERV en los servicios de Hemodiálisis y UCI.

El fracaso terapéutico sinérgico entre un inhibidor de pared y el aminoglucósido STR pudiese aumentar sin la implementación de pruebas de rutina en cepas aisladas de sitios estériles para detectar la falta de efectividad.

Hasta el momento no es necesario aplicar medidas de control drásticas en HSAD, ya que no se aislaron ERV con altos niveles de resistencia.

## RECOMENDACIONES

Disponer de personal exclusivo para atender a los pacientes infectados por ERV y emplear uniformes desechables así como materiales de único uso o en su defecto autoclavables.

Realizar estudios continuos de colonización intestinal por *Enterococcus* en pacientes ingresados en UCI así como aquellos que reciben tratamiento profiláctico, los cuales son útiles para evaluar la situación epidemiológica en la que se encuentra el hospital.

Entrenar a los bioanalistas de los laboratorios de Microbiología para detectar este tipo de cepas lo más rápidamente posible, con el fin de establecer las medidas de aislamiento, y control de políticas antibióticas.

Formar y preparar al personal médico sanitario en el uso racional de los antibióticos en especial vancomicina, para evitar que este importante problema se convierta en una alarma real.

Promover la investigación en el campo de resistencia bacteriana a nivel molecular, de gran utilidad para la detección de ERV.

Crear un escenario de concientización y prevención de resistencia bacteriana incidiendo en la correcta utilización antibiótica.

Implementar la pesquisa en medios líquidos con altas concentraciones de vancomicina para aumentar la posibilidad de aislar ERV con alto nivel de resistencia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, V.; Jain, Y. y Pathak, A. 1999. Concomitant high level resistance to penicillin and aminoglycosides in Enterococci at Nagpur, Central India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 17: 85–87.
- Anonymous. 2000. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992- April 2000, issued June 2000. *American Journal of Infection Control*, 28: 429–448.
- Arellano, J.; Garzón, Y.; Giono, S.; Mateos, O.; y Pichardo, E. 2005. High-level aminoglycoside resistance *Enterococcus* spp in a tertiary care hospital in México. *Revista Electrónica de Biomedicina*, 01: 40–45.
- Arias, C; Martin-Martinez, M.; Blundell, T.; Courvalin, P. y Reynolds, P. 1999. Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Molecular Microbiology*, 31: 1653–1664.
- Arias, C; Courvalin, P. y Reynolds, P. 2000a. *vanC* cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44: 1660–1666.
- Arias, C; Weisner, J; Blackburn, J. y Reynolds, P. 2000b. Serine and alanine racemase activities of VanT: a protein necessary for vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Molecular Microbiology*, 146: 1727–1734.
- Arthur, M. y Courvalin, P. 1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37: 1563-1571.
- Arthur, M.; Molinas, C.; Depardieu, F. y Courvalin, P. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of Bacteriology*, 175: 117–127.

- Arthur, M.; Reynolds, P. y Courvalin, P. 1996. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiology*, 4: 401–407.
- Ayse, E.; Coplan, A.; Badur, H.; Cevik, M.; Samore, M. y Ergonul, O. 2003. Evaluation of antibiotic use in a hospital with an antibiotic restriction policy. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21: 308–312.
- Bauer, A.; Kirby, M.; Scherris, J. y Turk, M. 1966. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493–496.
- Beezhold, D.; Slaughter, S. y Hayden, M. 1997. Skin colonization with Vancomycin resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 24: 704–706.
- Biavasco, F.; Paladini, C.; Foglia, G.; Manso, E. y Varaldo, P. 2001. Recovery from a single blood culture of *Enterococcus gallinarum* isolates carrying both *vanCI* and *vanA* cluster genes and differing in glycopeptide. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20: 309–14.
- Biedenbach, DJ.; Moet, EJ.; y Jones, RN. 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparison among bloodstream infection isolates from the sentry antimicrobial surveillance program, 1997-2002. *Diagnostic of Microbiology, Infectious Diseases*, 50: 59–69.
- Billot-Klein, D.; Gutmann, L.; Sablé, S.; Guittet, E. y van Heijenoort, J. 1994. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *Journal Bacteriology*, 176: 2398–2405.
- Bonten, M.; Hayden, M. y Nathan, C. 1996. Epidemiology of colonization of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet Infectious Diseases*, 348: 1615–619.

- Bonten, M.; Willems, R. y Weinstein, R. 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infectious Diseases*, 01: 314–25.
- Boyce, J.; Opal, S. y Chow, J. 1994. Outbreak of multidrug resistant *Enterococcus faecium* with transferable *vanB* class vancomycin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1148–153.
- Boyd, D.; Fawcett, D.; Gillani, N.; Willey, B. y Mulvey, R. 2007. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* N06-0364 Isolated in Canadá Harbors a novel D-Alanine-D-Serine Operon, VanL. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47th IAC. Abstract C1–1463.
- Casadewall, B. y Courvalin, P 1999. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *Journal Bacteriology*. 181: 3644–3648.
- Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Recommendations for preventing the spread of Vancomycin resistance: recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Morbidity Mortality Weekly Report*, 44: 1–13.
- Centers for disease control and prevention. 1999. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued june 1999. *American Journal of Infection Control*, 27: 520–32.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility. CLSI document M100-S15. Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility. CLSI document M100-S17. Wayne, Pennsylvania.
- Charpentier, E. y Courvalin, P. 1999. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9): 2103–2108.
- Chartone, S. 1999. “Las Bacterias resistentes, una guerra casi perdida”. “Ciencia hoy”. <<http://wwwciencia-hoy.retina.ar/hoy50/bacterias.htm>> (18/02/2005).

- Coque, T.; Tomayko, J.; Ricke, S.; Okhyusen, P. y Murray, B. 1996. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 2605–2609.
- Corso, A.; Faccione, D.; Gagetti, P.; Togneri, A.; Lopardo, H.; Melano, R.; Rodríguez, V.; Rodríguez, M. y Galas, M. 2005. First report of VanA *Enterococcus gallinarum* dissemination within an intensive care unit in Argentina. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25: 51–56.
- Courvalin, P. 2005. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 294: 479–486.
- Dargere, S.; Vergnaud, M. y Verdon, R. 2002. *Enterococcus gallinarum* endocarditis occurring on native heart valves. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2305–10.
- De la Parte-Pérez, M.; Brito, A.; Hurtado, P.; Landaeta, J.; Guzman, A. y Carmona, O. 2003. Cambios en la resistencia de *Staphylococcus aureus* a los antimicrobianos en centros clínicos del Área Metropolitana de Caracas, Venezuela. Período 1995-2000. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23: 190–195.
- Depardieu, F.; Reynolds, P. y Courvalin, P. 2003. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 7–18.
- Depardieu, F.; Périchon, B. y Courvalin, P. 2004. Detection of the van alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (12): 5857–5860.
- Drews, S.; Johnson, G.; Gharabaghi, F.; Roscoe, M.; Matlow, A.; Tellier, R. y Richardson, S. 2006. A 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(04): 1578–1580.
- Dutka-Malen, S.; Leclercq, R.; Coutant, V.; Duval, J. y Courvalin, P. 1990. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance

- determinants in gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 34: 1875–1879.
- Dutka-Malen, S.; Molinas, M. y Courvalin, P. 1992. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene*, 112: 53–58.
- Dutka-Malen, S.; Blaimont, B.; Wauters, G. y Courvalin, P. 1994. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 1675–07.
- Dutka-Malen, S.; Evers, S. y Courvalin, P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 24–07.
- Edlund C.; Barkholt, L.; Olsson-Liljequist, B. y Nord, C. 1997. Effect of vancomycin on intestinal flora of patients who previously required antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 25: 729–732.
- Eliopoulos, G. y Moellering, R. 1996. Antimicrobial combinations. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Lorian V, editor. Maryland: William and Wilkins. Págs. 330–396.
- Facklam, R. y Collins, M. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 731–734.
- Favaro, P. 2002. Aspects pharmaco-economiques du traitement de brulures. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 60(4): 260–267.
- Fines, M. y Leclercq, R. 2000. Entérocoques et autres antibiotiques. En: *Précis de Bactériologie Clinique*. Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., et Bollet, C. (Eds). Editions ESKA, Paris, Francia. Págs.630–637.

- Fines, M.; Périchon, B.; Reynolds, P.; Sahm, D. y Courvalin, P. 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptides resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43: 2161–2164.
- Gordon, S.; Swenson, J.; Hill, B.; Pigott, N.; Facklam, R.; Cooksey, R.; Thornsberry, C.; Jarvis, W. y Tenover, F. 1992. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 2373–2378.
- Goossens, H.; Habes, D.; Rossi, R.; Lammens, C.; Privitera, C. y Courvalin, C. 2003. European survey of Vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(S3): 05–12.
- Grayson, M.; Eliopoulos, G. y Wennersten, C. 1991. Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22- year review at one institution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 2180–2184.
- Handwerger, S.; Raucher, B.; Altarac, D.; Monka, J.; Marchione, S.; Singh, K.; Murray, B.; Wolff, J. y Walters, B. 1993. Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Clinical Infectious Diseases*, 16: 750–755.
- Handwerger, S.; Skoble, J.; Discotto, L y Pucci, M. 1995. Heterogeneity of the *vana* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39: 362–368.
- Herman, D. y Gerding, D. 1991. Screening and treatment of infection caused by resistant Enterococi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 215–219.
- Huycke, MM.; Joyce, W. y Wack, MF. 1996. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Infectious Diseases*, 173: 743–746.

- Jochimsen, E.; Fish, L. y Manning, K. 1999. Control of vancomycin resistant enterococci at a community hospital: efficacy of patient and staff cohorting. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 20: 106–109.
- Kaplan, A.; Gilligan, P. y Facklam, R. 1988. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 1216–1218.
- Kapoor, L.; Randhawa, V. y Monorama, D. 2004. Antimicrobial resistance of enterococcal blood isolates at a paediatric care hospital in India. *Japan Journal of Infectious Diseases*, 58: 101-103.
- Karlowsky, J.; Zhanel, G Canadian VRE Surveillance Group, y Hoban, D. 1999. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) colonization of high-risk patients in tertiary care Canadian hospitals. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, 35: 1–7.
- Kaye, D. 1982. Enterococci. Biologic and epidemiologic characteristics and in vitro susceptibility. *Archive Internal Medicine*, 142: 2006–2009.
- Kirkpatrick, B.; Harrington, S.; Smith, D.; Marcellus, D.; Miller, C.; Dick, J.; Karanfil, L. y Perl, T. 1999. An outbreak of vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* in a bone marrow transplant unit. *Clinical Infectious Diseases*, 29: 1268–1273.
- Kirmani.; N, Tuazon, C. y Murray, H. 1978. *Staphylococcus aureus* carriage rate of patients receiving long-term, hemodiálisis. *Annals of Internal Medicine*, 138: 1657.
- Klots, F. 2000. Semmelweis et le CLIN. *Concours Medical*, 122: 06.
- Kurup, A.; Tee, W.; Loo, L. y Lin, R. 2001. Infection of central nervous system by motile *Enterococcus*: first case report. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 820–822.
- Leclercq, R.; Derlot, E.; Duval, J. y Courvalin, P. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New England Journal of Medicine*, 319: 157–161.

- Leclercq, R; Dutka-Malen, S; Brisson-Noël, A; Molinas, E; Derlot, M; Duval, A. y Courvalin, P. 1992a. Resistance of enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clinical Infectious Diseases*, 15: 495–501
- Leclercq, S; Dutka-Malen, S; Duval, J. y Courvalin, P. 1992b. Vancomycin resistance determinant *vanC* is specific of *Enterococcus gallinarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36: 2005–2008.
- Lewis, C. y Zervos, M. 1990. Clinical manifestations of enterococcal infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 09: 111–117.
- Maciá, M.; Juan, C.; Oliver, A.; Hidalgo, O. y Pérez, J. 2005. Caracterización molecular de un brote por *Enterococcus faecalis* resistente a los glicopéptidos en una unidad de cuidados intensivos. *Servicios de Microbiología y Medicina Preventiva*, 23(08): 460–463.
- Malone, DA.; Wagner, RA.; Myers JP. y Watanakunakorn, C. 1986. Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospitals. *American Journal of Medicine*, 81: 601–606.
- Mandell, G.; Bennett, J. y Dolin, R. 1997. *Enfermedades infecciosas principios y prácticas*. Cuarta Edición. New York: Churchill Livingstone.
- Marshall, C. y Wright, D. 1998. DdlN from vancomycin-producing *Amycolatopsis orientalis* C329.2 is a VanA homologue with D-alanyl-D-lactate ligase activity. *Journal Bacteriology*, 180: 5792–5795.
- Marobar, J. y Campos, M. 1999. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. *Revista Médica de Chile*, 128 (06): 1–6.
- Martone, WJ. 1988. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States?. *Infection Control Hospital Epidemiology*, 19: 539–551.
- McFaddin, J. 1990. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

- McKessar, S.; Berry, A.; Bell, J.; Turnidge, J. y Paton, J. 2000. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 3224–228.
- McNamara, E.; King, E. y Smyth, E. 1995. A survey of antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococcus* spp. from Irish hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35:185–189.
- Miele, A.; Bandera, M. y Goldstein, B. 1995. Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in Enterococci and to study gene organization in *VanA* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(08): 1772–1778.
- Moellering, R. 1991. The *Enterococcus*: a classic example of the impact of antimicrobial resistance on therapeutic options. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28: 1–12.
- Moellering, R. 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 14: 1173–1176.
- Montague, P. 1999. “Drogas en el agua”. “El paper”. <<http://www.healthing.com/paper/paper25.html>> (18/02/2005).
- Montilla, N.; León, Y.; Payares, D.; Paraqueimo, M.; Machado, Y.; Ojeda, X.; Marcano, D. y Vacampenhau. 2007. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina con genotipo *vanA* en el hospital Dr. Domingo Luciani, Caracas Venezuela. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 54.
- Morris, J.; Shay, D. y Hebden, J. 1995. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a University Medical Center. *Annals of Internal Medicine*, 123: 250–59.
- Murray, B. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Revista*, 03: 46–65.
- Murray, B.; Lopardo, H.; Rubeglio, E.; Frosolono, M. y Singh, K. 1992. Intrahospital spread of a single gentamicin-resistant, beta-lactamase-producing strain of

- Enterococcus faecalis* in Argentina. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36: 230–232.
- Murray, B. 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New England Journal of Medicine*, 342: 710–721.
- Myrvik, Q. y Weiser, R. 1991. *Bacteriología y Micología Médica*. Segunda edición. Nueva Editorial Interamericana-McGraw-Hill. México.
- Navarro, F. y Courvalin, P. 1994. Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38: 1788–1793.
- Novicki, T.; Shapiro, J.; Ulness, B.; Sebeste, A.; Bauste-Joonston, L.; Swanson, Kristine.; Swanzy, S.; Leisenring, W. y Limaye, A. 2004. Convenient selective differential broth for isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus* from fecal material. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(04): 1637–1640.
- Palacios, R. 2002. *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Ministerio de Salud del Perú. Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas, N° 30. Lima.
- Park, I.; Lin, C. y Walsh, C. 1997. Bacterial resistance to vancomycin: Overproduction, purification, and characterization of VanC2 from *Enterococcus casseliflavus* as a D-Ala-D-Ser ligase. *Biochemistry*, 94: 10040–10044.
- Patterson, J.; Sweeney, A.; Simms, M.; Carley, N.; Mangi, R.; Sabetta, J. y Lyons, R. 1995. An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine*, 74: 191–200.
- Paulsen, I.; Banerjee, L. y Fraser, C. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, 299: 2071–2074.
- Pechère, J. 1993. La microbiologie des infections nosocomiales. *Bulletin de la Académie Nationale de Médecine*, 177: 705–718.

- Périchon, B., Reynolds, P. y Courvalin. 1997. VanD-type glycopeptides resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 2016–2018.
- Peset, V.; Tallon, P.; Sola, C.; Sánchez, C.; Sarrion, A. y Pérez-Belles, C. 2000. Epidemiological, microbiological, clinical, and pronostig factors of bacteriemia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19: 742–749.
- Pineda, M.; Perozo-Meno, A.; Lleras, A.; Bonilla, X.; Méndez, A.; González, M. y Villalobos, H. 2007. *Primer reporte de Enterococcus resistente a vancomicina en el estado Zulia*. Servicio autónomo hospital universitario de Maracaibo. XV Jornadas Nacionales de Infectología “Homenaje al postgrado de Infectología pediátrica. Hospital JM de los Ríos”. Abstract BA-16.
- Pompei, R.; Lampi, G.; Berlutti, F. y Thaller, M. 1991. Characterization of yellow-pigmented enterococci from severe human infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 2884–2886.
- Quintiliani, R., Evers, S. y Courvalin, P. 1993. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *Journal of Infectious Diseases*, 167: 1220–1223.
- Randhawa, V.; Kapoor, L.; Singh, V. y Mehta, G. 2004. Aminoglycoside resistance in enterococci isolated from pediatric septicemia in a tertiary care hospital in north India. *Indian Journal of Medical Research*, 119(Suppl):77–79.
- Ratanasuwan, W.; Iwen, P.; Hinrichs, S y Rupp, M. 1999. Bacteremia due to motile *Enterococcus* species: clinical features and outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 28: 1175–1177.
- Reid, KC.; Cockerill, III FR. y Patel, R. 2001. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteriemia: a report of 20 cases. *Clinical Infectious Diseases*, 32: 1540–06.

- Reynolds, P.; Snaith, H.; Maguire, A.; Dutka-Malen, S. y Courvalin, P. 1994. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Journal Biochemistry*, 301: 5–8.
- Reynolds, P.; Arias, C. y Courvalin, P. 1999. Gene *vanXYC* encodes D,D-dipeptidase (VanX) and D,D-carboxypeptidase (VanY) activities in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Molecular Microbiology*, 34: 341-349.
- Roder, B.; Nielsen, S. y Magnussen, P. 1993. Antibiotic usage in an intensive care unit at a danish university hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 32: 633–642.
- Ruíz, N.; Vasquez, Y.; Gayoso, E.; Moy, F.; Guzmán, M.; Hernández, M. y Spadola, E. 2007. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, reporte del primer caso en el hospital militar “Dr. Carlos Arvelo” y revisión de la literatura. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 54.
- Ruoff, K.; de la Maza, L.; Murtagh, M.; Spargo, J. y Ferraro, M. 1990. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 435-437.
- Schooneveldt, J.M.; Marriot, R.K. y Nimmo, G.R. 2000. Detection of a *vanB* determinant in *Enterococcus gallinarum* in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 3902.
- Schouten, M.A.; Hoogkamp-Korstanje, J.A.A.; Meis, J.F.G. y Voss, A. 2000. The European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19: 816–822.
- Schleifer, K. y Kilpper-Bälz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal Systematic. Journal Bacteriology*, 34: 31–34.

- Silva, M.; Pitteloud.; Villarroel, E.; Figueredo, A.; Payares, D.; Sánchez, D.; Martín, A.; Carvajal, A.; López, L.; Villarroel, E.; Khalil, R.; Núñez, M.; González, E.; Pacheco, C. y Sojo, G. 2007. Aislamiento de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina: Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes. Hospital Universitario de Caracas. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 73.
- Singh, N. y Yu, V. 2000. Rational empiric antibiotic prescription in the UCI. *Chest*, 117: 1496–1499.
- Singh, K.; Weinstock, G. y Murray, B. 2002. An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 1845–1850.
- Slaughter, S.; Hayden, M. y Nathan, C. 1996. A comparison of the effect of universal use of gloves and gowns with that of glove use alone on acquisition of vancomycin-resistant enterococci in a medical intensive care unit. *Annals of Internal Medicine*, 125: 448–456.
- Swenson, J.; Clark, N.; Ferraro, M.; Sahm, D.; Doern, G.; Pfaller, M.; Reller, L.; Weinstein, M.; Zabransky, R. y Tenover, F. 1994. Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1700–1704.
- Thal, L.; Chow, J.; Mahayni, R.; Bonilla, H.; Perri, M.; Donabedian, S.; Silverman, J.; Taber, S. y Zervos, M. 1995. Characterization of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39: 2112–2115.
- Togneri, A.; Lopardo, H. y Corso, A. 2003. Bacteriemia por *Enterococcus gallinarum* com alto nivel de resistencia a glicopéptidos: primer caso documentado em Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 35: 96–109.

- Tomaz, A. 1994. Multiple-Antibiotics resistant pathogenic bacteria a report on the rockerfeller university workshop. *New England Journal of Medicine*, 330: 1179 – 1184.
- Toye, B.; Shymanski, J.; Bobrowska, M.; Woods, W. y Ramotar, K. 1997. Clinical and epidemiologic significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possesing the *vanC* genotype). *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 1637–1640.
- Tuazon, C.; Pérez, A. y Kishoba, T. 1975. *Staphylococcus aureus* among insulin-injecting diabetic patients. *Annals Increased Carriage Rate*, 231.
- Uttley, A.; Collins, C.; Naidoo, J. y George, R. 1988. Vancomycin resistant enterococci. *Lancet Infectious Diseases*, i: 57–58.
- Uttley, A.; George, R.; Naidoo, J.; Woodford, N.; Johnson, A.; Collins, C.; Morrison, D.; Gilfillan, A.; Fitch, L. y Heptonstall, J. 1989. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiology Infectious*, 103: 173–181.
- van Goethem, G.; Louwagie, B.; Simoens, M.; Vandeven, J.; Verhaegen, J y Boogaerts, M. 1994. *Enterococcus casseliflavus* septicemia in a patient with acute myeloid leukaemia. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13: 519–520.
- van Horn, KG. y Rodney, KM. 1998. Colonization and microbiology of the motile enterococci in a patient population. *Diagnostic of Microbiology Infectious Diseases*, 31: 525–530.
- Vásquez, Y.; Guzmán, M.; Ruíz, N.; Gayoso, E.; Moy, F.; Hernández, M.; Spadola, E. y Córdova, J. 2007. Endocarditis por *Enterococcus faecalis* en paciente trasplantado renal en el hospital militar “Dr. Carlos Arvelo” a propósito de un caso. *Boletín Venezolano de Infectología*, 18(2): 73.
- Velazco, D.; Pérez, S.; Dominguez, MA. y Bou, G. 2004. Description of a nosocomial outbreak of infection caused by a *vanA*-containing strain of

- Enterococcus faecalis* in la Coruña, Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 05: 892–893.
- Vincent, S.; Knight, R.; Green, M.; Sahm, D y Shlaes, D. 1991. Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 2335–2337.
- Vincent, S.; Minkler, P.; Binczewski, B .; Etter, L. y Shlaes, D. 1992. Vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36: 1392–1399.
- Wells, CL.; Jechovek, RP. y Erlandsen, SL. 1990. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *Journal of Infectious Diseases*, 162: 82–90.
- Woodford, N; Johnson, A; Morrison, D. y Speller, D. 1995a. Current Perspectives on Glycopeptide Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4): 585–615.
- Woodford, N.; Jones, B.; Baccus, Z.; Ludlam, H. y Brown, D. 1995b. Linkage of vancomycin and high-level gentamicin resistance genes on the same plasmid in a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35: 179–184.

## ANEXO

### CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

Bajo la coordinación de la Dra. Lorena Abadía Patiño, Investigador-docente del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas (IIBCA), de la Universidad de Oriente, se está realizando el proyecto intitulado: “Determinación de cepas de *Enterococcus* resistentes a antibióticos glicopéptidos en pacientes hospitalizados en el hospital “Santos Aníbal Dominicci”. Carúpano, estado Sucre”. El objetivo general de este trabajo es determinar la presencia de cepas de *Enterococcus* resistentes a los glicopéptidos en pacientes hospitalizados en dicho hospital.

La toma de la muestra consiste en hisopados rectales, lo cual no le va a causar dolor, siendo la frecuencia del hisopado rectal uno semanal, hasta cuando se detecte la presencia de la bacteria buscada. Los hisopados rectales serán única y exclusivamente para determinar la presencia de cepas de *Enterococcus* resistentes a los glicopéptidos.

Luego de haber leído, comprendido y aclaradas mis dudas con respecto a este formato de consentimiento, Yo, C.I. N° autorizo al Br. C.I. , para recolectar las muestras y toda la información que sea necesaria para la realización de este estudio y doy fe de haber recibido previamente la información acerca de la investigación y de los beneficios que generará a las partes interesadas. Mi participación en dicho estudio no implica riesgos ni inconvenientes para mi salud. Bajo ningún aspecto se me ha ofrecido ni pretendo recibir ningún beneficio de tipo económico producto de los hallazgos que puedan producirse en el referido proyecto de investigación. Me reservo el derecho de revocar mi autorización

y donación en cualquier momento sin que ello conlleve a ningún tipo de consecuencia negativa para mi persona.

Firmas

---

Paciente

---

Br.

---

Dra. Lorena Abadía Patiño



# **Hoja de Metadatos**



## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

### Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencia	Biología
	Biotecnología

### Resumen (abstract):

Los pacientes estudiados durante el período de febrero–julio 2007, provinieron de los servicios de hemodiálisis y Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del hospital “Santos Aníbal Dominicci” (HSAD) de Carúpano, Venezuela. La detección de pacientes portadores de *Enterococcus* se hizo por pesquisa en placas de agar bilis esculina azida (BEA) con y sin vancomicina (6 µg/ml). A las colonias características de *Enterococcus* se les realizó la coloración de Gram. Se detectó un total de veintinueve aislamientos positivos, caracterizándose por ser positivos a la hidrólisis de la esculina (colonias negras). Se analizaron veinticinco cepas de *Enterococcus* mediante pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos: vancomicina, teicoplanina, estreptomicina, gentamicina, ampicilina, ampicilina-sulbactam y ciprofloxacina por el método de difusión en agar (método de Kirby–Bauer), siete cepas presentaron resistencia intermedia a vancomicina. Se verificó la resistencia a vancomicina mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a diferentes concentraciones de vancomicina (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, y 128 µg/ml). Todas las cepas en prueba mostraron resistencia. La detección de los diferentes genes de las ligasas de resistencia (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*) se llevó a cabo por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) múltiple, resultando positiva en veinticuatro aislados para el gen *vanC*. Es necesario mantener un sistema de vigilancia mediante cultivos para identificar pacientes colonizados sobre todo en las áreas críticas, higiene de manos, descontaminación de ambientes y equipos, así como utilizar racionalmente los antibióticos en especial, la vancomicina.

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

### Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail
Abadía P., Lorena	ROL CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>

	CVLAC	10.952465
	e-mail	abalar@movistar.net
	e-mail	
Villalobos, Luz Betina	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.162.987
	e-mail	lbvillalobos@yahoo.com
	e-mail	
Albarado, Luzmila	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	9.278.774
	e-mail	Luzalv@hotmail.com
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2008	10	27

Lenguaje: Spa

## Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS-yamilet.doc	Aplicattion/Word

**Alcance:**

**Espacial :** Universal (Opcional)  
**Temporal:** 2013 (Opcional)

**Título o Grado asociado con el trabajo:**

**Licenciatura Biología**

---

**Nivel Asociado con el Trabajo:** Licenciatura

**Área de Estudio:**

**BIOLOGÍA**

---

**Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:**

**Universidad de Oriente Núcleo de Sucre**

---

---

---

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso –  
5/5

Derechos:

---

---

---

---

---

---

---

---

---

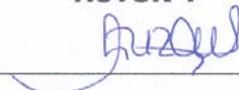
---

  
AUTOR 1

\_\_\_\_\_  
AUTOR 2

\_\_\_\_\_  
AUTOR 3

  
TUTOR

AUTOR 4  
  
JURADO 1

  
JURADO 2

**POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:**

