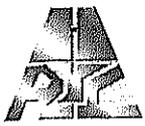


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS GLICOPEPTIDICOS
EN EL GENERO *Enterococcus*

TESIS DOCTORAL PRESENTADA PARA OPTAR
AL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA POR
D. JUAN ANTONIO REGUERA MARQUEZ

DIRECTOR: DR. JOSE CLAUDIO PEREZ DIAZ



HOSPITAL RAMON Y CAJAL
AREA SANITARIA 4
28034 MADRID



Dr. JOSE CLAUDIO PEREZ DIAZ, Médico Adjunto del Servicio de
Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid (Instituto Nacional de la Salud).

CERTIFICA: Que D. Juan Antonio Reguera Márquez, licenciado en
Farmacia ha realizado bajo mi dirección el trabajo que presenta para optar al grado
de Doctor en Farmacia, con el título:

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS GLICOPEPTIDOS EN EL
GENERO *Enterococcus*

Lo que hago constar en Madrid, a cinco de mayo de mil novecientos
noventa y cinco.

Jóse Claudio Pérez Díaz

Doctor en Medicina

A Soledad
A mis padres

AGRADECIMIENTOS

AI Dr. D. JOSÉ CLAUDIO PÉREZ DÍAZ, por aceptar ser director de esta Tesis, por su estímulo y ayuda constantes.

AI Dr. D. FERNANDO BAQUERO MOCHALES, por la cálida acogida con que me recibió en su servicio, por las múltiples enseñanzas, y por la colaboración en la confección y corrección de la presente memoria.

A todos los compañeros del laboratorio de Genética los Doctores JUAN M. AGUIAR, ROBERTO ALONSO, JESÚS BLAZQUEZ, MARY LUZ CAMPILLO, ESTHER CULEBRAS, MARINA GONZÁLEZ, JOSÉ LUIS MARTÍNEZ, JOAQUÍN MARTÍNEZ, CARMEN PATRÓN, MARÍA SÁNCHEZ, y PAQUI VICENTE, por su amistad, sus buenos consejos y su inestimable ayuda en la elaboración de este trabajo.

A los Doctores MANUEL MARTÍNEZ y RAFAEL CANTÓN, por facilitarme datos de sensibilidad, y como al resto de los compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal por su ayuda y amistad.

A los Doctores JOSEFINA LIÑARES, FRANCISCO PARRAS, y JAVIER GARAU por proporcionarnos cepas de enterococos resistentes a vancomicina.

AI Doctor RAFAEL ROTGER por aceptar ser ponente de esta Tesis.

A los compañeros del Servicio de Análisis Clínicos del Ambulatorio "José Marv" de Madrid por su estímulo.

A la Unidad de Investigación del Hospital Ciudad de Baza por facilitarme el uso del material de ofimática.

A mi esposa SOLEDAD que sin su apoyo y comprensión nunca habría realizado este trabajo.

ABREVIATURAS

ARN	ácido ribonucleico
ADN	ácido desoxirribonucleico
BSA	albúmina bovina sérica
BHI	caldo de infusión de cerebro y corazón
BICP	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato
CMI	concentración mínima inhibitoria
EDTA	ácido etilen diamino tetracético
DDT	ditiotreitól
DO	densidad óptica
FIC	concentración fraccionada inhibitoria
Fus	ácido fusídico
Kb	kilobase o kilo par de bases
NAc-MUR	ácido N-acetil-murámico
NBT	cloruro de p-nitro azul tetrazolio
N.D.	no determinado
PBP	proteínas fijadoras de penicilina
PYR	pirrolidonil- β -naftilamina
RAN	resistencia de alto nivel
Rif	rifampicina
rARN	ácido ribonucleico ribosomal
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
Str	estreptomicina
TEMED	N,N,N',N', tetrametil-etilen-diamina
Tet	tetraciclina
Tris	tris-hidroximetil aminometano
Van	vancomicina
UFC	unidades formadoras de colonia

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 GÉNERO <i>Enterococcus</i>	2
1.1.1 TAXONOMIA Y CLASIFICACION DEL GÉNERO <i>Enterococcus</i> .	2
1.1.2 IDENTIFICACION	4
1.1.3 TIPIFICACION INTRAESPECIFICA	8
1.1.4 INTERCAMBIO GENETICO	9
1.1.5 SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS	11
1.1.6 IMPORTANCIA CLINICA DE <i>Enterococcus</i>	17
1.2 ANTIBIOTICOS GLICOPEPTIDICOS	21
1.2.1 ESTRUCTURA MOLECULAR Y RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD	21
1.2.3 MECANISMO DE ACCION	24
1.2.4 DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD	26
1.2.5 ESPECTRO ANTIBACTERIANO	28
1.2.6 FARMACOCINETICA	30
1.2.8 EFECTOS SECUNDARIOS	31
1.2.9 INDICACIONES	31
1.3 RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS GLICOPEPTIDICOS	34
1.3.1 RESISTENCIA INTRINSECA	35
1.3.2 RESISTENCIA ADQUIRIDA EN NO ENTEROCOCOS	35
1.3.3 FENOTIPOS DE RESISTENCIA EN EL GÉNERO <i>Enterococcus</i>	37
1.3.4 RESISTENCIA DE FENOTIPO VanA	38
1.3.5 RESISTENCIA DE FENOTIPO VanB	49
1.3.6 RESISTENCIA DE FENOTIPO VanC	52
1.3.7 RESISTENCIAS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	53
 2. MATERIAL Y METODOS	 54
2.1 ESTIRPES BACTERIANAS	55
2.2.1 IDENTIFICACION	56

2.2.2 PRODUCCION DE HEMOLISIS Y BACTERIOCINAS	56
2.3 SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS	57
2.3.1 ANTIMICROBIANOS	57
2.3.2 CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS	57
2.3.3 ISOBOLOGRAMA	58
2.4 CURVAS DE CRECIMIENTO	58
2.5 ANALISIS DE PROTEINAS	59
2.5.1 PREPARACION DE EXTRACTOS PROTEINAS TOTALES	59
2.5.2 EXTRACCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA	59
2.5.3 ANALISIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	60
2.5.4 TRANSFERENCIA DE LAS PROTEINAS A LA MEMBRANA IMMOBILON PVDF	61
2.5.5 PREPARACION DE ANTISUERO ANTI PROTEINAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA	61
2.5.6 DETECCION DE PROTEINAS CON ANTISUERO ANTI-39KDa	62
2.5.7 ANALISIS DE PBP	63
2.6 TRANSFERENCIA DE LA RESISTENCIA	63
2.6.1 ENSAYOS DE CONJUGACION	63
2.6.2 RESPUESTA A FEROMONAS	64
2.7 OBTENCION DE ADN	64
2.7.1. LISIS PARA ADN TOTAL	64
2.7.2 MINILISIS ALCALINA	64
2.7.3 OBTENCION ADN PLASMIDICO A GRAN ESCALA	65
2.8 ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA DEL ADN, E HIBRIDACION	66
2.9 MANIPULACION ENZIMATICA DEL ADN	67
2.9.1 DIGESTION DEL ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION	67
2.9.3 MARCAJE DE OLIGONUCLEOTIDO EN EL EXTREMO 3'	67
2.10 PRODUCCION DE OLIGONUCLEOTIDO	67

3. RESULTADOS	69
3.1 IDENTIFICACION DE CEPAS RESISTENTES A VANCOMICINA	70
3.2 SENSIBILIDAD DE LOS ENTEROCOCOS AISLADOS EN EL HOSPITAL RAMON Y CAJAL EN EL PERIODO 1988-1993.....	71
3.2.1 ANTIBIOTICOS INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE LA PARED CELULAR: β -LACTAMICOS, GLICOPEPTIDOS, Y FOSFOMICINA	71
3.2.2 ANTIBIOTICOS INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE PROTEINAS: AMINOGLICOSIDOS, TETRACICLINA, CLORANFENICOL, Y MACROLIDOS	76
3.2.3 INHIBIDORES DE LA SINTESIS DEL ACIDO FOLICO	79
3.2.4 ANTIMICROBIANOS QUE INTERACCIONAN CON LOS ACIDOS NUCLEICOS: QUINOLONAS, RIFAMPICINA Y NITROFURANTOINA	79
3.3 SENSIBILIDAD DE LOS ENTEROCOCOS RESISTENTES A VANCOMICINA A LOS ANTIMICROBIANOS	82
3.3.1 SENSIBILIDAD A β -LACTAMICOS, GLICOPEPTIDOS Y LIPOGLICOPEPTIDOS	82
3.3.2 ACTIVIDAD DE 10 ANTIBIOTICOS DE DIFERENTES GRUPOS	84
3.3.3 ASOCIACION D-CICLOSERINA Y VANCOMICINA	85
3.4 INDUCIBILIDAD DE LA RESISTENCIA A GLICOPEPTIDOS	86
3.5 ANALISIS DE PROTEINAS	88
3.5.1 ANALISIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE EXTRACTOS CRUDOS	88
3.5.2 PRODUCCION DE ANTISUERO ANTI-39KDa	94
3.5.3 ANALISIS DE LAS CEPAS CON EL ANTISUERO ANTI-39KDa	94
3.5.4 INDUCIBILIDAD DE LA PROTEINA VanA POR ANTIBIOTICOS	97
3.5.5 ANALISIS DE PBP	98

3.6 TRANSFERENCIA POR CONJUGACION DE GENES DE RESISTENCIA	100
3.7 RESPUESTA A FEROMONAS	103
3.8 ANALISIS DEL ADN PLASMIDICO	105
3.9.1 HIBRIDACION CON ADN TOTAL	110
3.9.2 HIBRIDACION CON PLASMIDOS	110
4. DISCUSION	111
5. CONCLUSIONES	126
6. BIBIOGRAFIA	129

1. INTRODUCCION

Los antibióticos glicopeptídicos han sido utilizados durante más de treinta años sin que hayan surgido resistencias significativas; esta situación cambió en 1986, tras la aparición de cepas de *Enterococcus* resistentes a la vancomicina. Anteriormente, habían sido descritas cepas naturalmente resistentes, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, y *Leuconostoc*, bacterias con escasa relevancia clínica. No obstante, los antibióticos glicopeptídicos siguen siendo una alternativa eficaz en el tratamiento de infecciones producidas por enterococos. Hoy se conocen, al menos, cinco fenotipos de resistencia en el género *Enterococcus*. Teniendo en cuenta el incremento de la resistencia a β -lactámicos y que, en algunos casos, la resistencia a vancomicina es transferible, podemos afirmar que la resistencia a glicopéptidos puede ocasionar un problema grave en el tratamiento de infecciones enterocócicas.

1.1 Género *Enterococcus*

1.1.1 TAXONOMIA Y CLASIFICACION DEL Género *Enterococcus*

El termino "entérocoque" fue utilizado por primera vez en 1899 por Thiercelin, para describir un nuevo diplococo gram positivo de origen intestinal; en el mismo año, MacCallun y Hasting publicaron un caso de endocarditis producida por *Micrococcus zymogenes* (hoy, sinónimo de *Enterococcus faecalis*); posteriormente, en 1906, la denominación de *Streptococcus faecalis* sería utilizada por Andrews y Horder para describir un caso de endocarditis producida por un coco gram positivo (159), manteniéndose ésta última, hasta la década de los 80 que cambió a *E. faecalis*.

En 1937 Sherman clasificó los estreptococos en cuatro grupos: piogénicos, *viridans*, lácticos y enterococos. El grupo enterococo esta compuesto por microorganismos que crecen a 10 y 45 °C, en NaCl al 6,5%, sobreviven a 60 °C durante 30 minutos, y son capaces de hidrolizar la esculina. Estas características siguen hoy vigentes para la diferenciación de este grupo de cocos gram positivos. En el esquema serológico de Lancefield, propuesto a comienzos de la década de los 30, el

grupo D se correlacionó con los enterococos de la clasificación de Sherman, aunque no todos los estreptococos grupo D son enterococos. La separación en dos géneros diferentes de los estreptococos grupo D no enterococo y enterococos, no tuvo lugar hasta comienzos de los 80 (159).

Kalima propuso en 1970 que *S. faecalis* y *Streptococcus faecium* fuesen transferidos a un nuevo género, el género *Enterococcus* (131); esto no ocurre hasta 1985, año en que aparece en la Lista de nombres bacterianos aprobados del International Journal of Systematic Bacteriology (157). Tras la publicación en 1984 del trabajo de Schleifer y Kilper-Bälz, en el que se propone la nueva denominación de *Streptococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, para *S. faecalis* y *S. faecium*, como consecuencia de los resultados obtenidos de hibridaciones ADN-ADN y ADN-rARN entre estas especies pertenecientes a estreptococos grupo D enterococos, y no enterococos y *Streptococcus* (210). Posteriormente, también se cambian las denominaciones de *Streptococcus avium*, *Streptococcus casseliflavus*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus gallinarum*, y *Streptococcus malodoratus* (47).

En la novena edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, dentro de la sección 12 (cocos gram positivos), se describen en el apartado Streptococcus, incluidas en el género *Streptococcus*, las especies *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. avium*, y *S. gallinarum* (158). El género *Enterococcus* está constituido, hoy, por doce especies, las cuatro descritas en el Bergey's como *Streptococcus* enterococos, y las siguientes: *Enterococcus durans*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus malodoratus* (47), *Enterococcus hirae* (71), *Enterococcus mundtii* (54), *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus solitarius*, y *Enterococcus pseudoavium* (67).

1.1.2 IDENTIFICACION

Los microorganismos del género *Enterococcus* son células ovoídes, individuales o agrupadas en parejas o cadenas cortas, gram positivas; no forman endosporas, y pueden ser móviles. Son anaerobios facultativos, pueden crecer a 10 y 45 °C, en NaCl al 6,5% , a pH 9,6, y en medios con 40% de bilis. Hidrolizan la pirrolidonil-β-naftilamida, y la esculina a 6,7 dehidrocumarina. Quimioorganotrofos, presentan metabolismo fermentativo, siendo el producto final mayoritario de la fermentación de la glucosa el ácido láctico. No poseen citocromos (test de la bencidina y catalasa negativos) excepto en presencia del grupo hemo que algunas cepas pueden sintetizar pseudocatalasa (113, 158, 210).

Reaccionan con el antisuero D de Lancefield, aunque algunos *E. avium* son reconocidas por el antisuero Q (158, 210). El determinante antigénico, grupo específico, que responde al antisuero D de Lancefield es un ácido glicerol-teicoico asociado con la membrana citoplásmica (158).

El contenido guanina-citosina (G + C) está comprendido entre el 37 y 45 %. La estructura del peptidoglicano es de tipo A (Lys-D-Asp), excepto *E. faecalis* que es de tipo B (Lys-Ala_{2,3}) (210). Son inmóviles, excepto *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* y algunas cepas de *E. faecalis* (158, 184).

Géneros relacionados con *Enterococcus* son *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, y *Leuconostoc* (113). Al clasificar una cepa como *Enterococcus* debe ser diferenciada de estos géneros; especialmente, si se trata de una cepa resistente a vancomicina, ya que entre el 90 y 100% de las cepas de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, y *Leuconostoc* son resistentes a la misma (68). En la Tabla 1.1 figuran las pruebas para la distinción de *Enterococcus* del resto de cocos, y cocobacilos gram positivos.

La hidrólisis del PYR y la aglutinación con antisuero grupo D de Lancefield son dos pruebas imprescindibles para la correcta identificación de cepas del género *Enterococcus* resistentes a vancomicina. Los enterococos hidrolizan el PYR mientras que las cepas de los géneros *Streptococcus* (excepto *Streptococcus pyogenes*), *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* (excepto *Lactococcus garviae*) y *Lactobacillus*,

Tabla 1.1. Pruebas para la diferenciación de *Enterococcus* de otros géneros de bacterias gram positivas (68).

PRUEBA	Enteroc	Strept	Lactoc	Aeroco	Gemella	Pedioc	Leuco	Lactob
GAS DE GLU	-	-	-	-	-	-	+	-/+
RES. VAN	-	-	-	-	-	+	+	+
GRUPO D	+	-	-	-	-	+	-/+	-/+
BILIS/ESC	+	-	+/-	+/-	-	+	+	+/-
PYR	+	-	+/-	+	+/-	-	-	-
NaCl 6,5%	+	-	+/-	+	-	-/+	+/-	-/+
LEU-AMI-PEP	+	+	+	-	+	+	-	+/-

Enteroc, *Enterococcus*; Strep, *Streptococcus*; Lactoc, *Lactococcus*; Aeroco, *Aerococcus*; Pedioc, *Pediococcus*; Leuco, *Leuconostoc*; Lactob, *Lactobacillus*. Las pruebas propuestas son gas de glucosa, resistencia a vancomicina, aglutinación grupo D, bilis/esculina, hidrólisis de PYR, crecimiento con NaCl al 6,5%, y Leucin-aminopeptidasa. Signos (-) < 25%, (-/+) 25-50%, (+/-) 51-75%, (+) > 75%.

son incapaces de hidrolizarlo. La aglutinación con antisuero grupo D ayuda a distinguir los enterococos de *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*, y *Lactobacillus* (68).

La identificación a nivel de especies de los enterococos puede realizarse siguiendo el esquema propuesto por Facklam y Collins (67), clasificándolos en tres grupos, según los resultados obtenidos de la fermentación del manitol, sorbitol, sorbosa, e hidrólisis de la arginina. El grupo I compuesto por *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, y *E. pseudoavium* se diferencian por la fermentación de la arabinosa y rafinosa. El grupo II lo constituyen las especies *E. faecalis*, *E. solitarius*, *E. gallinarum*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, y *E. mundtii* distinguiéndose por la fermentación de la arabinosa, sorbitol, y lactosa, por la movilidad y producción de pigmento (67). Las cepas de *E. faecalis* lactosa negativas pueden ser erróneamente clasificadas, siguiendo el

esquema de Facklam y Collins, como *E. solitarius*. Para distinguirlas es preciso realizar pruebas complementarias; como la reducción del telurito y la fermentación de la ribosa (200). *E. durans*, *E. hirae* y *E. faecalis* (variantes asacarolíticas) pertenecen al grupo III diferenciándose por la fermentación de la sacarosa y rafinosa, y la utilización del piruvato (67).

En la Tabla 1.2 se recogen las pruebas diferenciales propuestas en la quinta edición del Manual of Clinical Microbiology para la identificación de las especies de enterococo (69).

Tabla 1.2. Pruebas para la identificación a nivel de especie de *Enterococcus* (69).

ESPECIE	MAN	SORB	SOR	ARG	ARA	RAF	TEL	MOV	PIG	SAC	PYU
GRUPO I											
<i>E. avium</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
GRUPO II											
<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
<i>E. solitarius</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>E. faecium</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>E. mundtii</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
<i>E. gallinarum</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
GRUPO III											
<i>E. durans</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	-	+	-	+/-	-	-	-	+/-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+/-

Signos (-) < 10% positivo, (+/-) 60-90% positivo, (+) > 90% positivo. MAN, manitol; SORB, sorbitol; SOR, sorbosa; ARG, arginina; ARA, arabinosa; RAF, rafinosa; TEL, telurito 0,04%; MOV, movilidad; PIG pigmentación; SAC, sacarosa; PYU, piruvato.

E. faecalis es la especie aislada con más frecuencia de muestras clínicas y del tracto gastrointestinal humano (93, 199, 200). En agar sangre de caballo puede presentar hemólisis α y β , ésta última asociada a la presencia de un plásmido (124).

También, asociada a plásmidos se ha comunicado la producción de bacteriocinas (124) y antibióticos peptídicos (80, 150).

E. faecium es la segunda especie en frecuencia de aislamientos en muestras clínicas (93, 200). Durante algunos años ha sido un "cajón de sastre" donde situar a muchos enterococos atípicos que, hoy, forman parte de algunas de las nuevas especies del género *Enterococcus* (199).

E. durans es difícil de diferenciar fenotípicamente de *E. faecium* y *E. hirae*. No obstante presentan escaso grado de homología de ADN lo que justifica la separación en especies diferentes (47, 136). Se aísla en raras ocasiones de muestras humanas (200), y con mayor frecuencia de pollos (54).

E. casseliflavus, anteriormente denominado *S. faecium var casseliflavus*, produce pigmento amarillo y es móvil. Se aisló inicialmente de plantas (200), pero recientemente ha sido implicado en infecciones nosocomiales en áreas quirúrgicas (184).

E. avium reacciona con el antisuero grupo D de Lancefield y, en muchos casos, también con el Q. Junto con *E. malodoratus* son los únicos enterococos productores de SH₂ (47).

E. gallinarum son móviles y producen β-hemólisis en agar sangre de caballo (200). Presentan resistencia intrínseca de bajo nivel a vancomicina (144).

El resto de las especies, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. solitarius*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, y *E. hirae* son aisladas, excepcionalmente, en muestras de origen clínico (199, 200).

1.1.3 TIPIFICACION INTRAESPECIFICA

La tipificación intraespecífica de los enterococos se realiza mediante los siguientes métodos: fagotipia, bacteriocinotipia (enterococinotipia), examen del contenido plasmídico, análisis del patrón de restricción del ADN total, y ribotipia. La tipificación intraespecífica es imprescindible para justificar un brote epidémico puesto que, los caracteres fenotípicos y el patrón de sensibilidad a los antibióticos, son insuficientes para distinguir unas cepas de otras (159).

La utilización conjunta de las técnicas de fagotipia y enterococinotipia, han permitido la tipificación del 87% de cepas en 187 tipos. Individualmente la fagotipia permitió reconocer 25 tipos, el 79 % de las cepas tipadas, aunque el 61% pertenecía a un solo tipo, y la enterococinotipia, también, reconoció el 79% de las cepas en 85 tipos, la mitad de las cepas perteneció al mismo tipo (159).

El análisis del contenido plasmídico ha sido utilizado, a veces, para demostrar brotes epidémicos (159), pero su utilización rutinaria es poco práctica ya que las lisis rápidas no ofrecen una cantidad suficiente de ADN para el estudio electroforético (163).

El análisis del patrón de restricción del ADN total, mediante electroforesis de campo pulsado, ha demostrado la diseminación de una cepa productora de β -lactamasa en 6 hospitales de 5 estados de U.S.A. (163). La misma técnica, resuelta con un sistema de electroforesis convencional, se evaluó positivamente para estudios epidemiológicos (101). También ha sido aplicado al estudio de 17 cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina, implicadas en un brote de un hospital pediátrico, encontrando que no estaban relacionadas (22); otros estudios epidemiológicos con este método sí han hallado relación entre las cepas (25).

La ribotipia discriminó con menor eficacia que el análisis del patrón del ADN total (22, 101), considerándose recomendable para la discriminación a nivel de especie (101). No obstante ha sido utilizado en algunos estudios epidemiológicos con cepas resistentes a vancomicina (17, 130).

1.1.4 INTERCAMBIO GENETICO

Los enterococos intercambian genes de resistencia entre miembros de su mismo género y con cepas de otros géneros, incluyendo bacterias gram positivas (208, 244) y gram negativas (55, 235). Se ha demostrado la adquisición de genes de resistencia "in vivo" mediante plásmidos y transposones, conjugativos o no (40, 43), e "in vitro", además, por transformación (73, 259). El mecanismo que proporciona mayor eficacia en la transmisión genética es la conjugación de plásmidos que responden a feromonas, con frecuencias de conjugación en caldo que puede llegar a ser de 10^{-1} (43). La frecuencia de conjugación para los transposones conjugativos es del orden de 10^{-5} (44), y aún mucho menores para plásmidos que no responden a feromonas y transposones no conjugativos.

Las feromonas son péptidos hidrofóbicos de 7 u 8 aminoácidos que inducen la producción de un conjunto de proteínas en la cepa donante implicadas en la

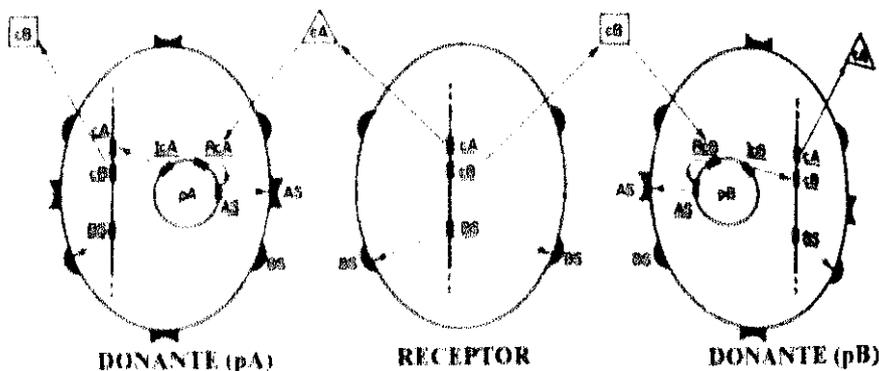


Figura 1.1 Esquema de la síntesis y respuesta a feromonas propuesto por D.B. Clewell (43).

agregación con la cepa receptora, produciéndose acúmulos visibles macroscópicamente. El plásmido codifica el conjunto de proteínas inducidas por las feromonas (265), algunas son de superficie (62, 233), y una de ellas es agregante (82). Esta última constituye una sustancia que, al microscopio electrónico, aparece como material microfibrilar. La sustancia agregante se sitúa en la pared celular de la cepa donante, y se une con el producto enlazante (probablemente ácido lipoteicoico) de la superficie de la receptora (62), precisándose para la unión iones fosfato y cationes divalentes, facilitando la transferencia del plásmido que responde a feromona y de otros si los hubiera (45). Como consecuencia de esta agregación se facilita el proceso de conjugación de plásmidos, observándose frecuencias de conjugación en caldo de 3 a 6 órdenes de magnitud mayores en células inducidas frente a no inducidas (45). Los agregados se producen alrededor de 40 minutos después de entrar en contacto el donante con la feromona (265).

Las cepas sin plásmidos excretan múltiples feromonas codificadas por genes cromosómicos; cuando adquieren un plásmido que responde a feromonas se inhibe específicamente la producción de esa feromona (42). Al mismo tiempo, se sintetiza un péptido inhibidor competitivo de la feromona a la que responde, probablemente para evitar la autoagregación por niveles bajos de feromona endógena o de feromonas relacionadas (123). Han sido descritas once feromonas diferentes, el análisis de homología de ADN de la región que codifica la proteína agregante revela que todas ellas, salvo la que responde a cAM373, poseen una alta homología, lo que sugiere un origen común (83). cAM373 es sintetizada por cepas de enterococos, la mayoría de los *Staphylococcus aureus* y aproximadamente el 15% de *Streptococcus sanguis*, pero no por los estafilococos coagulasa negativos (41).

1.1.5 SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS

El patrón de sensibilidad de los enterococos esta en continua evolución, relacionándose con el consumo de antibióticos en una institución o una zona geográfica determinada (92, 207).

La actividad de los antibióticos β -lactámicos frente a enterococos es variable, siendo ampicilina el producto más activo, seguido de imipenem, penicilina, piperacilina, meropenem, ticarcilina y carbenicilina, ordenados de mayor a menor actividad (85, 90, 93). En realidad, la ampicilina es ligeramente más activa que penicilina, aunque existe la idea de que es mucho más activa, probablemente debido al uso de discos de 10 μ g y 2 U (1,2 μ g) respectivamente, lo que proporciona halos mayores con ampicilina (96). Las cefalosporinas no tienen actividad "in vivo", aunque se han descrito cefalosporinas con buena actividad "in vitro" no siendo eficaces en la clínica (5, 87).

Los enterococos son tolerantes a todos los antibióticos β -lactámicos, resultando ineficaces para obtener un efecto bactericida a concentraciones terapéuticas (236). La consecución del efecto bactericida precisa asociar un aminoglicósido (117). *E. faecium* es más resistente a los β -lactámicos que *E. faecalis* y el resto de los enterococos (85, 90).

El 90% de los *E. faecalis* son inhibidos por 4 μ g/ml de penicilina, 2 μ g/ml de ampicilina, y 2-8 μ g/ml de imipenem (28, 90, 93). Habitualmente, la tasa de resistencia para la penicilina y ampicilina (CMI > 16) es próxima al 0%. Existen cepas productoras de β -lactamasas, que presentan una CMI de 1 a 4, y >64 μ /ml con inóculos de 10^5 y 10^7 UFC/ml respectivamente, no evidenciándose la resistencia con inóculo normal, siendo aconsejable la determinación de β -lactamasa con nitrocefina para detectar cepas resistentes (90). En un estudio multicéntrico estadounidense se ha detectado un 1,6% de cepas productoras de β -lactamasa (90), en trabajos europeos no

han sido halladas (85, 93, 241, 262). Las cepas productoras de β -lactamasa son sensibles al imipenem, amoxicilina / clavulánico y ampicilina / sulbactam (90, 149).

La producción de β -lactamasa está asociada a la presencia de plásmidos conjugativos que, también, codifican resistencia de alto nivel a gentamicina (160) y que, en al menos un caso, responden a feromonas (162). Han sido hallados diferentes plásmidos con β -lactamasa pero todos poseen regiones homólogas, en particular la codificante de la β -lactamasa (180, 221, 246). La localización plasmídica no es única, habiéndose encontrado en el cromosoma de una cepa (194), formando parte de un transposón (196). La β -lactamasa de *E. faecalis* probablemente procede de la de *S. aureus*, como lo demuestran los estudios de hibridación, que ponen de manifiesto una gran homología entre ambas (161, 269). Entre las diferencias habría que destacar que la expresión de la β -lactamasa de *E. faecalis* es constitutiva y el enzima se encuentra ligado a la célula, mientras que la expresión de la de *S. aureus* es inducible y el enzima se libera al medio (161).

La resistencia a β -lactámicos, en cepas europeas, es debida a un incremento en la producción de la PBP 5 de baja afinidad por penicilina (75, 268); también se ha propuesto un incremento de la PBP 4 (268).

E. faecium es cada día más resistente a los antibióticos β -lactámicos; Grayson y cols. comparan las CMI_{50} y CMI_{90} para ampicilina de cepas aisladas en 1968, en las Islas Salomón de individuos que nunca habían recibido antibióticos, con las procedentes de un hospital de Boston en los periodos 1969-1988, y 1989-1990, las CMI_{50} y CMI_{90} para ampicilina de 2 y 2, 8 y 32, y 64 y 128 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (92). En general, la tasa de resistencia a penicilina y ampicilina oscila entre el 21 y 100%, según los autores (28, 90, 92, 262). Varios artículos comunican que la CMI_{90} para ampicilina se encuentra entre 64 y $\geq 64 \mu\text{g/ml}$, y entre 32 y 128 $\mu\text{g/ml}$ para imipenem. Todos los aislados resistentes a ampicilina también lo son a imipenem (28, 90, 93, 135, 207).

El mecanismo de resistencia es, fundamentalmente y como en el caso de *E. faecalis*, la modificación de la afinidad de la PBP 5, siendo mucho menor en las cepas resistentes (4, 75, 92); algunas cepas hipersensibles a penicilina presentan una nueva PBP 5 (92), o bien carecen de ella (76); excepcionalmente, se han descrito otros mecanismos de resistencia (135).

La sensibilidad a β lactámicos de las especies de enterococos distintas de *E. faecalis* y *E. faecium*, ha sido menos estudiada siendo en general sensibles a penicilina y ampicilina (90), aunque se han descrito cepas resistentes de *E. gallinarum* (207) y *E. raffinosus* (90, 207).

Los aislados de *E. faecalis* resistentes a vancomicina son habitualmente sensibles a ampicilina (217, 238), aunque se han descrito dos cepas en U.S.A. productoras de β lactamasa y resistentes a glicopéptidos (149). Sin embargo, cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina son frecuentemente resistentes a ampicilina y penicilina (156, 142, 143, 174, 238).

Los aminoglicósidos son poco activos frente a los enterococos, necesitándose concentraciones de 250 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina o kanamicina, y de 8 a 64 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina o tobramicina para inhibir a *E. faecalis* y mayores para *E. faecium* (159). Los aminoglicósidos asociados a β -lactámicos producen un efecto bactericida a concentraciones mucho menores (25 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina) (117).

La determinación de la resistencia a alto nivel a aminoglicósidos puede llevarse a cabo por los métodos de concentración única en medio sólido, microdilución en caldo, microdilución en caldo comercial y disco/placa; el método más sensible es el de placas con una determinada concentración de antibiótico, incubadas 48 horas. Los sistemas comerciales Pasco y MicroScan tienen una sensibilidad para la detección de la resistencia a 2000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina y gentamicina de 79 y 96%, y 65 y 59% respectivamente, tras 24 horas de incubación, mejorándose al 93 y 98%, y 88 y 89%

respectivamente al incubar durante 48 horas (203). El estudio de sensibilidad, por el método de difusión, se efectúa con discos de estreptomina y gentamicina, con carga de 300 y 120 µg respectivamente, considerándose sensibles con halos mayores ó iguales a 10 mm (204), correlacionándose al 100% con el método de placas con antibiótico (203).

E. faecalis, en un estudio multicéntrico estadounidense, presentó una tasa de resistencia de alto nivel a estreptomina y gentamicina de 26,2 y 23,1% respectivamente (90); en otros estudios europeos, el nivel de resistencia se sitúa entre el 10 y 30% para ambos antibióticos (85, 93, 266, 241, 262).

La resistencia a estreptomina, debida a una alteración ribosomal que no permite la unión con el antibiótico, representa menos del 5% de las cepas aisladas en clínica (268); el mecanismo de resistencia mayoritario es la presencia de enzimas modificantes, en particular una adeniltransferasa (AAD 6), frecuentemente codificada por un plásmido, que también posee la fosfotransferasa (APH 3'), confiriendo resistencia a kanamicina y amikacina (268). La resistencia de alto nivel a gentamicina es consecuencia de la enzima bifuncional fosfo-acetil-transferasa (APH 2''- AAC 6') (49, 152). Otro mecanismo descrito, en una sola cepa, consiste en la alteración específica del sistema de transporte de gentamicina (268). Los genes de las enzimas inactivantes de aminoglicósidos residen habitualmente en plásmidos autotransferibles (49, 152), y en transposones (120). Las cepas productoras de β-lactamasa, frecuentemente, poseen resistencia de alto nivel a estreptomina y gentamicina (149, 160).

E. faecium es resistente al efecto sinérgico entre penicilina o ampicilina con kanamicina, netilmicina, sisomicina o tobramicina, debido a la presencia de una acetiltransferasa (AAC 6'1) de bajo nivel no transferible (85, 268). La tasa de resistencia de alto nivel para estreptomina es aproximadamente 50-60%, la enzima implicada es una adeniltransferasa (90, 241, 262); y para gentamicina se sitúa entre 0 y el 19% (85,

90, 93, 241, 262) debida a la enzima bifuncional (APH 2"-AAC 6') codificada por plásmidos (64).

La resistencia de alto nivel a aminoglicósidos también se ha encontrado en otras especies de enterococos distintas de *E. faecalis* y *E. faecium* (90, 262).

Se han descrito cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* con resistencia de alto nivel a estreptomycin y/o gentamicina asociada a resistencia a glicopéptidos (156, 149, 238), pero esta asociación no puede considerarse como frecuente (142, 143, 213).

Eritromicina inhibe a los enterococos a concentraciones de 0,1 a > 100 µg/ml, siendo la habitualmente de 1,5 µg/ml. Muchas cepas son resistentes debido al gen *ermB* codificado por el transposón Tn917, mediante la metilación del 23S ARN ribosómico (141). La clindamicina es inactiva (226).

Concentraciones de rifampicina, menores o iguales a 8 µg/ml, inhiben a la mayoría de los enterococos, pero la resistencia se desarrolla rápidamente (63). Asociaciones de rifampicina con β-lactámicos y vancomicina no han demostrado, suficientemente, un efecto sinérgico (63). En un modelo de endocarditis experimental producida por *E. faecium* resistente a vancomicina, se comprobó la actividad de rifampicina administrada conjuntamente con ciprofloxacina y/o gentamicina, resultando que las asociaciones que contenían rifampicina fueron más activas que gentamicina y ciprofloxacina al administrarse solas o asociadas (255).

La actividad de tetraciclina es escasa. Su uso frente a enterococos se limita al tratamiento de infecciones urinarias ocasionadas por cepas moderadamente sensibles (225). La tasa de resistencia es del 60-80% según los trabajos (159). Los genes de resistencia implicados son de las clases Tet L, Tet M, y Tet O (18).

Cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol) es activo *"in vitro"* e *"in vivo"* frente a *E. faecalis* (96). No ocurre igual con *E. faecium* que puede ser sensible *"in vitro"*, pero *"in vivo"* probablemente es resistente, debido a su capacidad de asimilar ácido fólico exógeno (96). Existen estudios contradictorios respecto de la actividad bactericida (159). La determinación de la sensibilidad debe hacerse en medios sin timina y/o timidina, ya que éstas pueden ser incorporadas por los enterococos resultando falsas resistencias (50).

Ciprofloxacina inhibe al 90% de *E. faecalis* con concentraciones entre 1-4 $\mu\text{g/ml}$ (90, 260). Concentraciones mayores de 4-8 $\mu\text{g/ml}$ se requieren para inhibir al 90% de *E. faecium* (90, 92). Otras quinolonas con actividad frente a enterococos son ofloxacina (93), pefloxacina y, con menor actividad, norfloxacina (260). Mutaciones *gyrA* son responsables de la resistencia a las fluorquinolonas. Los distintos niveles de resistencia dependen de la capacidad de entrada del antimicrobiano (165). Ha sido demostrada actividad bactericida *"in vitro"* de ciprofloxacina asociada a ampicilina frente algunos *E. faecium* resistentes a vancomicina, ampicilina y gentamicina (139).

En cuanto a los antibióticos glicopeptídicos, se describe su mecanismo de acción y resistencia en los apartados 1.2 y 1.3. La mayoría de los enterococos permanecen sensibles a glicopéptidos. Las tasas de resistencia varían según las publicaciones, siendo inferiores al 1% en la mayor parte de las publicaciones anteriores a 1992 (28, 85, 90, 93), recientemente se han comunicado tasas de resistencia entre 1-11% (241, 253), y excepcionalmente mayores. Así, el 22% de los *E. faecium* aislados de pacientes tratados en su domicilio en Oklahoma fueron resistentes (74). La tasa de resistencia más alta de las recopiladas por nosotros es del 27% de un centro de referencia de antibióticos del Reino Unido. Este último porcentaje quizá no sea del todo representativo debido a que no se reciben todas las cepas aisladas (262).

1.1.6 IMPORTANCIA CLINICA DE *Enterococcus*

Los enterococos son un patógeno nosocomial importante, al menos el 10 % de las infecciones de origen hospitalario son producidas por ellos; forman parte de la flora gastrointestinal humana, también pueden colonizar la orofaringe, vagina, y periné de individuos sanos. La mayoría de las infecciones ocasionadas por enterococos son de origen endógeno; recientemente se ha postulado la adquisición de infecciones por vía exógena, siendo las vías de contagio: persona-persona y fómites; pudiendo ser éstos los mecanismos de transmisión de los enterococos resistentes a los antibióticos (37, 147).

E. faecalis causa entre el 80-90 % de todas las infecciones producidas por enterococos, y *E. faecium* alrededor del 5-15 %. El resto de los enterococos, como *E. durans*, *E. avium*, y *E. raffinosus*, son aislados excepcionalmente (146). Los enterococos causan infecciones, como endocarditis, bacteriemias, sepsis neonatales, celulitis, abscesos, e infecciones urinarias, pélvicas, y de úlceras de decúbito (146). Se ha relacionado el aumento del uso de cefalosporinas con el incremento de las infecciones nosocomiales de etiología enterocócica (254).

Aproximadamente el 5% de las bacteriemias son producidas por enterococos (146, 159); observándose un elevado índice de mortalidad, entre el 30 y 50% (121, 146). El origen de las mismas es, por orden de frecuencia, el tracto urinario, cavidad intraabdominal y heridas (91, 146). La administración previa de antibióticos como cefalosporinas, imipenem, aztreonam, y ciprofloxacina está asociada a bacteriemias enterocócicas nosocomiales (14, 24, 91). La sepsis neonatal y meningitis es excepcional, en ocasiones ha sido descrita en unidades de cuidados intensivos neonatales de forma epidémica (159). Cuando se tiene la certeza de que no hay afectación cardíaca, para su tratamiento es suficiente la monoterapia (ampicilina o vancomicina)(91, 121) si no, es preciso un tratamiento bactericida con asociaciones de antibióticos (generalmente implica un aminoglicósido)(159).

Los enterococos son la tercera causa más común de endocarditis, tras estreptococos y estafilococos. Esta se presenta, habitualmente, en varones ancianos con válvulas normales o no, y suele tener un origen urinario (153). Su tratamiento requiere la asociación de penicilina, ampicilina o vancomicina con un aminoglicósido y, a menudo, recurrir al reemplazamiento de la válvula afectada (195).

El reto terapéutico más importante es la endocarditis producida por cepas con resistencia de alto nivel a aminoglicósidos ya que, cuando ésta aparece, no existen alternativas demostradas para conseguir efectos bactericidas con β -lactámicos o vancomicina. En estos casos, se recurre a la administración de monoterapia, con dosis altas de un β -lactámico o vancomicina, según la sensibilidad a estos fármacos (63, 118). En un brote de bacteriemias por *E. faecium* de tipo VanA con resistencia de alto nivel a estreptomina y gentamicina, y ampicilina, se observó que el tratamiento con ampicilina y aminoglicósidos a altas dosis no fue efectivo (156).

Williamson y cols. observaron en aislados resistentes a vancomicina un incremento en la susceptibilidad a penicilina en presencia de vancomicina (258), estas observaciones fueron confirmadas por Leclercq y cols., comprobaron que la asociación no era bactericida, este efecto lo consiguieron al añadir gentamicina (145). Shales y cols. obtuvo efectos bactericidas en enterococos de fenotipo VanA y VanB con la asociación vancomicina, penicilina, y gentamicina, que fue más bactericida que gentamicina con uno de los dos antibióticos (217). Asimismo, en un modelo de endocarditis experimental producida por un enterococo VanA moderadamente resistente a penicilina (CMI 32 $\mu\text{g/ml}$) se demostró que la terapia de penicilina a altas dosis y gentamicina era la más efectiva junto con la asociación de penicilina a baja dosis, vancomicina, y gentamicina (32). También, resultó útil la asociación de teicoplanina o vancomicina a altas dosis con gentamicina para tratar una endocarditis experimental producida con un *E. faecium* VanB (70). Gutmann y cols. han observado en dos cepas de fenotipo VanA sinergia entre teicoplanina o vancomicina y penicilina, ampicilina o ceftriaxona. La CMI de ceftriaxona en presencia de glicopéptidos disminuyó más de mil

veces. El mecanismo en una ellas estaba asociado con la sustitución de dos PBP de alto peso molecular por la PBP 5 (99). El conjunto de estas publicaciones proponían como alternativa el tratamiento, de las infecciones ocasionadas por enterococos resistentes a vancomicina, la asociación de penicilina-vancomicina-gentamicina. Posteriormente se ha comunicado en varios trabajos que la asociación de vancomicina y penicilina no era sinérgica "in vitro" (95, 34, 78, 107). Las discrepancias se deben, probablemente, a la distinta susceptibilidad a los β -lactámicos de las cepas probadas (34, 78), es preciso estudiar en cada cepa la sensibilidad de las diferentes asociaciones propuestas.

Green y cols. han propuesto un ensayo para determinar la sinergia entre vancomicina y ampicilina. Sobre una placa microtiter se efectúan diluciones seriadas de ampicilina (16-0,25 $\mu\text{g/ml}$) y vancomicina a concentración constante (8 $\mu\text{g/ml}$). Las cepas que obtienen CMI para ampicilina (con vancomicina) $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ se correspondieron con cepas sinérgicas mediante la medida del tiempo de muerte, y con CMI > 16 no observaron sinergia (94).

Otras alternativas propuestas son la asociación ciprofloxacina/ampicilina y ciprofloxacina/novobiocina que pueden ser bactericidas para algunas cepas resistentes a vancomicina, penicilina y gentamicina, pero sensibles a ciprofloxacina (139). En un modelo de endocarditis experimental por enterococos resistentes a vancomicina y ampicilina se compararon ciprofloxacina, rifampicina, y gentamicina solas o combinadas entre si, observándose que las asociaciones más activas eran las contenían rifampicina (255). Este último antibiótico es ineficaz en monoterapia por la aparición de mutantes resistentes (255).

Las infecciones del tracto urinario, producidas por enterococos, están asociadas a manipulaciones genito-urinarias, anomalías estructurales, y hospitalización (146, 159). Su importancia radica en ser la principal puerta de entrada para las bacteriemias enterocócicas. El tratamiento de elección es penicilina, ampicilina, o vancomicina, también pueden ser utilizadas nitrofurantoina, tetraciclina, o eritromicina.

En cuanto a las fluorquinolonas, incluyendo ciprofloxacina, no son recomendables (159), aunque existe la posibilidad de tratamientos eficaces con el nuevo producto sparfloxacina (182).

Las infecciones de piel, tejidos blandos, y de herida quirúrgica son el segundo lugar de origen de bacteriemias enterocócicas. En múltiples ocasiones los aislamientos se producen en el seno de un proceso polimicrobiano. Aunque algunos autores consideran *Enterococcus* como meros colonizadores en esas infecciones, el hecho de que puedan implicarse en bacteriemias secundarias debe ser suficiente para considerarlos patógenos (146, 175).

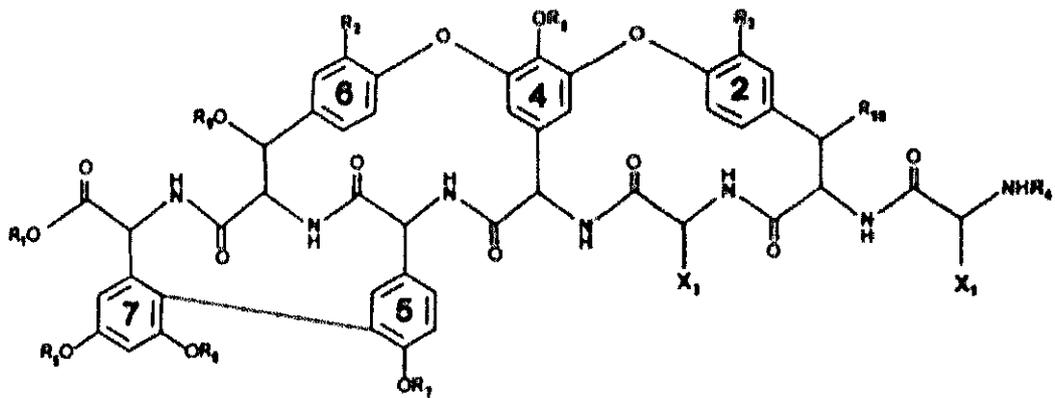
1.2 ANTIBIÓTICOS GLICOPEPTÍDICOS

Los antibióticos glicopeptídicos son producto del metabolismo secundario de gran número de actinomicetos, habiendo sido encontrados en microorganismos de los géneros *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Streptomyces* y *Amycolatopsis* (189). El primer glicopéptido introducido en clínica fue vancomicina, descubierto en 1956, producto del metabolismo de un actinomiceto nocardiforme, *Amycolatopsis orientalis* (anteriormente se denominó *Nocardia orientalis* y *Streptomyces orientalis*), aislado del suelo de Borneo e India por Eli Lilly Company (129). Teicoplanina fue descubierta en la década de los 70, y se obtiene de la fermentación de una cepa de *Actinoplanes teichomyceticus* (97). Otros antibióticos glicopeptídicos no utilizados en clínica son decaplanina, ristocetina (útil en el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand), avoparicina y actaplanina (usados en veterinaria) (15). Antibióticos relacionados con los glicopeptídicos son los lipoglicopéptidos: daptomicina y ramoplanina, habiéndose realizado ensayos clínicos con ambos (31, 222).

1.2.1 ESTRUCTURA MOLECULAR Y RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD

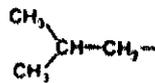
Los antibióticos glicopeptídicos son moléculas complejas de peso molecular de más de 1400 Da. La estructura molecular de vancomicina no se determinó hasta 1978, tras la aplicación de técnicas de degradación parcial, espectrofotometría de masas, resonancia magnética nuclear, y difracción de rayos X (183, 212).

Los glicopéptidos presentan un heptapéptido central, formado por cinco aminoácidos comunes para todos los miembros del grupo, y por dos aminoácidos, los de las posiciones 1 y 3, que son específicos para cada uno de ellos (191). También, se diferencian los antibióticos glicopeptídicos por los sustituyentes de los aminoácidos aromáticos, hallándose radicales cloruro, hidroxilo, metilo, y azúcares y aminoazúcares,

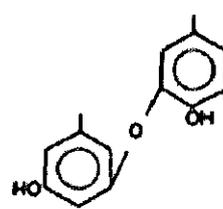
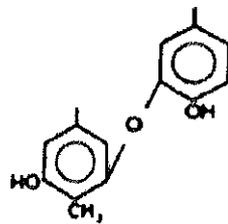


Sustituyente vancomicina ristocetina teicoplanina

X_1



X_2



R_1

H

CH_3

H

R_2

Cl

H

Cl

R_3

Cl

H

Cl

R_4

CH_3

H

H

R_5

H

H

H

R_6

H

D-manosa

D-manosa

R_7

H

H

H

R_8

L-vancosamina-
D-glucosa

A ristoterosa
B ristobiosa

N-acil*-glucosamina

R_9

H

ritosamina

N-acetil-glucosamina

R_{10}

OH

OH

H

* Existen 5 tipos de grupos acilo diferenciando los 5 tipos de teicoplanina

Figura 1.2. Estructura general de los antibióticos glicopeptídicos (15, 97).

algunos de ellos específicos para cada glicopéptido. Todos tienen 7 anillos aromáticos excepto vancomicina que tiene sólo 5 (15).

En la Figura 1.2 se representa la estructura general de los antibióticos glicopeptídicos. Entre las diferencias de vancomicina y teicoplanina destacamos que, los aminoácidos 1 y 3 de vancomicina son respectivamente N-metil-leucina y asparagina, sin embargo, la teicoplanina tiene en ambas posiciones hidroxifenilglicina; y que teicoplanina tiene tres azúcares D-manosa, N-acetil-glucosamina y N-acilglucosamina, el último de ellos, sustituido por una cadena de ácido graso, mientras que vancomicina presenta un solo disacárido (D-glucosa-vancosamina)(97).

La relación estructura actividad ha sido revisada por Nagarajan (164). El aminoácido 1 es crucial para la actividad. El grupo amino se une al extremo carboxi-terminal de UDP-N-acetilmurámico pentapéptido mediante un puente de hidrógeno. Su ausencia conduce a la pérdida de acción antibiótica.

El cambio del grupo hidroxil-bencílico por un hidrógeno del aminoácido 2 reduce a la mitad la actividad de vancomicina. La pérdida del cloruro R_3 disminuye la actividad antibacteriana de vancomicina y teicoplanina, debido a la pérdida de afinidad por el extremo D-alanil-D-alanina (164).

El aminoácido 3 de vancomicina es asparagina; cuando se incrementa la longitud de la cadena disminuye la actividad, el resto de glicopéptidos poseen un radical fenólico (164).

Los aminoazúcares residen sobre el aminoácido 4 y de ellos dependen las características farmacocinéticas de cada antibiótico. Algunos están sustituidos por una cadena de ácidos grasos como por ejemplo en la teicoplanina, lo que le proporciona un aumento en la vida media. La sustitución N-acil o N-alquil de una cadena de 9 a 11 átomos de carbono incrementa la actividad de vancomicina; este incremento se

manifiesta espectacularmente frente a los enterococos resistentes a vancomicina disminuyendo la media geométrica de la CMI desde 263 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta 4-6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (173). El aminoazúcar ha sido considerado responsable de la agregación plaquetaria producida por la ristocetina (191).

La eliminación del cloruro del aminoácido 6 no tiene efecto en la actividad antibacteriana (164).

1.2.3 MECANISMO DE ACCION

El mecanismo de acción de los glicopéptidos es la inhibición de la síntesis de la pared celular. También se publicaron, en la década de los 60, efectos directos sobre la membrana citoplásmica e inhibición de la síntesis de ácido ribonucleico (129, 183). Posteriormente no se han implicado estos efectos en la acción de vancomicina.

El bloqueo de la síntesis de la pared celular está motivado por la inhibición de las reacciones de transglicosilación y transpeptidación, causas de un solo efecto, la unión de vancomicina al extremo terminal D-alanil-D-alanina del N-acetil-murámico-pentapéptido. La inhibición de la transglicosilación no permite la adición de nuevas unidades de N-acetil-murámico-pentapéptido al peptidoglicano naciente, acumulándose en el citoplasma, debido a que éste no se libera del lípido transportador (undecaprenil-P) en la parte externa de la membrana citoplásmica. Como consecuencia de la inhibición de la transpeptidación, se impide la maduración del peptidoglicano, al no producirse el entrecruzamiento entre las cadenas del mismo.

El resultado de la detención de la síntesis de la pared celular es que la célula no puede aumentar su tamaño. Secundariamente se paraliza la síntesis de ADN, ARN, y proteínas, y al continuar actuando las enzimas autolíticas, se produce la lisis bacteriana (191). La bacteriolisis tiene lugar sobre células en fase exponencial. La acción

lítica de vancomicina desaparece en presencia de Mg^{+2} 50 mM (129) y en medios hiperosmóticos, mientras que teicoplanina no se afecta, postulándose que la cadena de ácido graso de teicoplanina favorecería la penetración de la molécula en la membrana citoplásmica, causando la lisis (38).

La unión de vancomicina al extremo D-alanil-D-alanina tiene lugar a través de 5 puentes de hidrógeno (191), extremo comprobado por Sheldrick y cols., al estudiar, mediante análisis de rayos X, el complejo cristalino formado entre CDP-I, producto de degradación de vancomicina, y acetil-D-alanil-D-alanina (212), Figura 1.3. La unión de vancomicina a péptidos terminados en D-alanil-D-alanina sigue una cinética de segundo orden (185), el complejo final y el intermediario se encuentran estabilizados por interacciones hidrofóbicas entre el enlace peptídico y el azúcar de vancomicina (185).

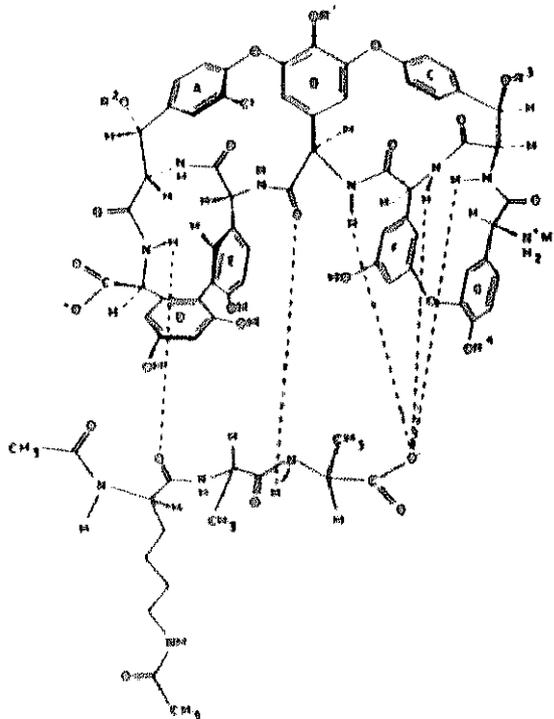


Figura 1.3. Esquema de la unión entre acetil-D-alanil-D-alanina con aglicona de vancomicina (191).

Los antibióticos lipoglicopeptídicos presentan un mecanismo de acción diferente a los glicopéptidos. La daptomicina actúa produciendo grandes alteraciones morfológicas (247), causadas por la inhibición de la síntesis de ácidos teicoicos y lipoteicoicos (23, 31). La ramoplanina inhibe la síntesis de peptidoglicano, probablemente impide la formación de UDP- N-acetil-murámico- pentapéptido-P-P- undecaprenil (222).

1.2.4 DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD

El estudio por difusión en agar de la sensibilidad de vancomicina y teicoplanina se lleva a cabo con discos de 30 μg ; la interpretación del diámetro de los halos es distinta, según se trate, de enterococos u otros gram positivos. Para los no enterococos, los criterios de sensibilidad de vancomicina no han cambiado desde 1987, Tabla 1.3, se considera sensible ≥ 12 mm, intermedio entre 10-11 mm, y resistente ≤ 9 mm (166, 168, 169, 171). El criterio inicial para teicoplanina fue sensible ≥ 14 mm, intermedio 10-13 mm, y resistentes ≤ 9 mm (16, 169). Estos criterios han sido modificados en 1993, el NCCLS considera sensible con halos ≥ 14 mm, intermedio entre 11-13 mm, y resistentes si ≤ 10 mm (171).

Los criterios de sensibilidad de vancomicina para enterococos han sufrido diversas modificaciones desde 1987 hasta la actualidad, Tabla 1.3, debido a la existencia de cepas de *Enterococcus* moderadamente resistentes y resistentes con halos de 16 y 13 mm respectivamente (202, 231). Swenson y cols. propusieron considerar halos de ≥ 15 mm sensibles y ≤ 14 mm resistentes (231). Willey y cols. encontraron aceptables los criterios propuestos por el documento M100-S3 del NCCLS (169), aunque sugieren que se consideren moderadamente sensibles a partir de ≥ 16 en vez de ≥ 17 mm (257). Los últimos criterios propuestos por el NCCLS (171), basados en el trabajo de Swenson y cols. (230), son: resistente ≤ 14 mm, intermedio 15-16 mm, sensible ≥ 17 mm y ,además especifican que la lectura ha de realizarse tras 24 horas

de incubación con especial atención a la aparición de colonias en los bordes de los halos, y la categoría moderadamente sensible desaparece. Willey y cols. propusieron para la detección de estirpes resistentes la inoculación de 10^5 UFC en placas con 8, 10 o 12 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina (257). Este método ha sido estandarizado recientemente por Swenson y cols., consiste en la inoculación de una gota con 10^3 - 10^6 UFC en placas de BHI agar suplementadas con 6 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina, la lectura se realiza a las 18 horas de forma preliminar pero los resultados no son definitivos hasta las 24 (228). No obstante, cuando se considere tratar con vancomicina una cepa de sensibilidad

Tabla 1.3. Diámetros de halo y puntos de corte de la CMI para vancomicina.

Documento NCCLS	DIAMETRO DE HALOS (mm)				CMI ($\mu\text{g/ml}$)			
	R	I	MS	S	R	I	MS	S
M2-A3-S2 1987(168)	≤ 9	10-11		≥ 12	≥ 32		16-8	≤ 4
M2-A4 1990(168)								
para enterococos	≤ 9	10-11		≥ 12	≥ 32		16-8	≤ 4
otros gram +	≤ 9	10-11		≥ 12	≥ 32		16-8	≤ 4
M100-S3 1991(169)								
para enterococos	≤ 14	15-16	≥ 17		≥ 32	16-8	≤ 4	
otros gram +	≤ 9	10-11		≥ 12	≥ 32		16-8	≤ 4
M2-A5 1993(171)								
para enterococos	≤ 14	15-16	≥ 17		≥ 32	16-8		≤ 4
otros gram +	≤ 9	10-11	≥ 12		≥ 32	16-8		≤ 4

R resistente, I intermedio, M S moderadamente sensible, S sensible

intermedia determinada por el método de difusión, se ha recomendado confirmar previamente la susceptibilidad mediante CMI (230). Los criterios de sensibilidad de tetraciclina para enterococos, son en la actualidad, idénticos a los de no enterococos sensible con halos ≥ 14 mm, intermedio entre 11-13 mm, y resistentes si ≤ 10 mm (171), anteriormente se consideró halos ≥ 17 mm moderadamente sensible, 15-16 mm intermedio, y ≤ 14 mm resistente (16, 170).

En métodos de dilución no existen diferencias de criterios entre enterococos y no enterococos, los puntos de corte actuales son para vancomicina ($\leq 4 \mu\text{g/ml}$ sensible, 4-16 $\mu\text{g/ml}$ intermedio, y $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ resistente (171)) y para teicoplanina $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ sensible, 16 intermedio, y ≥ 32 resistente (170)).

Algunos sistemas semiautomáticos y automáticos han sido evaluados para la detección de enterococos resistentes a vancomicina. El sistema Vitek, inicialmente, no resultó eficaz (202, 257), tras una modificación del programa presentó una sensibilidad del 98% (256); el sistema MicroScan Walk/Away presentó una sensibilidad del 93%, mejorándose hasta el 99% al realizar lectura visual (257), y el sistema Pasco fue considerado aceptable por otra publicación (202).

1.2.5 ESPECTRO ANTIBACTERIANO

El espectro antibacteriano de vancomicina y teicoplanina es muy similar, con algunas excepciones. Ambas moléculas son activas frente a cocos y bacilos gram positivos, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Eubacterium*, y *Propionibacterium* (72, 250). Teicoplanina es ligeramente más activa frente a *Streptococcus*, *Enterococcus*, *S. aureus*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, y *Peptococcus* (72, 97). Vancomicina es algo más activa que teicoplanina en *Staphylococcus coagulasa* negativos. La actividad es similar para *Listeria* y *Corynebacterium jeikeium* (97). En la Tabla 1.3 figuran los rangos de CMI para teicoplanina y vancomicina de algunas bacterias gram positivas.

Algunas bacterias gram positivas son resistentes, intrínsecamente, a los antibióticos glicopeptídicos; son las pertenecientes a los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Lactobacillus* (229).

Las bacterias gram negativas son resistentes a los glicopéptidos, con excepciones como *Flavobacterium meningosepticum* (72), *Leptospira pomona* (129), *Borrelia burgdorferi* (53), y algunas cepas de *Neisseria gonorrhoeae* (72).

Tabla 1.4. Rangos de CMI para teicoplanina y vancomicina (97).

Microorganismo	Vancomicina ($\mu\text{g/ml}$)	Teicoplanina ($\mu\text{g/ml}$)
<i>S. aureus</i>	0,03-8	0,03-8
estafilococos coagulasa negativos	0,03-10	0,05-32
<i>E. faecalis</i>	0,12-8	0,03-3,1
<i>Streptococcus spp.</i>	0,2-3,1	0,008-3,1
<i>Clostridium difficile</i>	0,06-3,2	$\leq 0,007$ -3,2
<i>Clostridium perfringens</i>	0,2-6,4	0,02-3,2
<i>Clostridium spp.</i>	0,2-3,1	0,02-1,6
cocos anaerobios	0,02-0,5	0,02-0,25
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,8-1,6	0,4-1,6
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,1-1,6	0,2-1,6
<i>C. jeikeium</i>	0,2-1,6	0,1-3,1

Las CMB de glicopéptidos para las bacterias sensibles son de dos a cuatro veces la CMI, excepto las bacterias del género *Enterococcus* que pueden necesitar hasta 100 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina, concentración entre 10 y 50 veces superior a los niveles séricos alcanzados a dosis terapéuticas. El efecto bactericida frente a *Enterococcus* se consigue con la asociación de vancomicina y un aminoglicósido (estreptomina o gentamicina) (72).

Daptomicina y ramoplanina presentan un espectro de acción similar a los glicopéptidos, aunque ramoplanina es, de cuatro a ocho veces, más activa que vancomicina (128). Ambas, inhiben a los enterococos resistentes a vancomicina (126, 143). Además, ramoplanina es bactericida, sola, para enterococos resistentes a vancomicina y/o ampicilina (126).

1.2.6 FARMACOCINETICA

Los parámetros farmacocinéticos son similares para los glicopéptidos comercializados diferenciándose, especialmente, en la vida media, que para vancomicina es de 6-8 horas, mientras que para teicoplanina es de 40-70 horas. En pacientes anúricos la vida media de vancomicina es de 9 días, siendo preciso ajustar las dosis de ambos fármacos en individuos con la función renal alterada. La unión de vancomicina a proteínas plasmáticas es entre 10-50% (219), y de aproximadamente el 90% en teicoplanina. El volumen de distribución aparente es 0,81/kg para teicoplanina y ligeramente superior para vancomicina (0,92 l/kg) (220).

Los glicopéptidos no son absorbidos por vía oral estando, esta vía, reservada para el tratamiento de la colitis pseudomembranosa. La forma de administración es mediante infusión lenta intravenosa, en solución salina o glucosada al 5%. Teicoplanina, puede ser administrada por vía intramuscular (72).

La concentración en suero, transcurridas 1-2 horas de la administración de 500 mg de vancomicina, es de 6-10 $\mu\text{g/ml}$, y de 4 $\mu\text{g/ml}$ mantenidos durante 24 horas tras la infusión de 400 mg de teicoplanina. En líquidos pericárdico, sinovial y ascítico los niveles son semejantes a los séricos (219). Vancomicina no alcanza el líquido cefalorraquídeo, salvo que las meninges estén alteradas, pudiendo entonces conseguir concentraciones de 1 a 7 $\mu\text{g/ml}$. En pacientes con meningitis, sin respuesta al tratamiento endovenoso de vancomicina, se administran de 3 a 5 mg por vía intratecal (72).

La excreción es, fundamentalmente, por filtración glomerular, apareciendo en orina a las 24 horas el 80-90% de vancomicina, y el 28% y 44% de teicoplanina a las 24 horas y 4 días respectivamente. La hemodiálisis no retira cantidades significativas de vancomicina y la diálisis peritoneal la elimina parcialmente (219, 220).

1.2.8 EFECTOS SECUNDARIOS

La toxicidad de vancomicina ha disminuido, desde que se introdujo en el mercado, gracias a la mayor pureza conseguida. Actualmente, puede producir tromboflebitis y reacciones alérgicas con fiebre, urticaria, exantema y shock anafiláctico. Estos efectos son más infrecuentes si el fármaco se inyecta lentamente (219).

El efecto secundario más frecuente, al iniciar la terapia con vancomicina, es el síndrome del cuello u hombre rojo (248), caracterizado por prurito y eritema de la cara, cuello y parte superior del tórax y, en casos graves, angioedema y colapso cardiovascular, debido en parte a una liberación de histamina (116). Este efecto puede ser prevenido mediante la administración conjunta de un antihistamínico, difenilhidramina (248). Al menos, se ha descrito un caso con teicoplanina (56).

La reacción adversa más grave es la ototóxica, que puede ser irreversible. Es infrecuente cuando los niveles máximos no alcanzan los 50 $\mu\text{g/ml}$, y común si superan los 80 $\mu\text{g/ml}$ (72, 219). El riesgo de nefrotoxicidad se incrementa cuando se administra conjuntamente con aminoglicósidos (72). Teicoplanina es ototóxica y nefrotóxica, aunque en menor grado que vancomicina (220).

1.2.9 INDICACIONES

Las indicaciones de los antibióticos glicopeptídicos son las infecciones graves como septicemia, endocarditis, etc., causadas por *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina, *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a ampicilina (72), en endocarditis causadas por *Streptococcus* grupo *viridans*, *Streptococcus bovis* (19), y *Corynebacterium spp.*, en meningitis causadas por *Streptococcus pneumoniae* con CMI >2 $\mu\text{g/ml}$ a penicilina, en colitis pseudomembranosa estafilocócica y la producida por *C. difficile* administrada por vía oral (la administración endovenosa ha

sido asociada a fallos terapéuticos (178)), en meningitis ocasionadas por *F. meningosepticum*, y en pacientes alérgicos a β-lactámicos con infecciones debidas a *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Enterococcus* (72).

Son administrados con fines profilácticos, solos o en asociación con gentamicina, en pacientes alérgicos a penicilina sometidos a manipulaciones dentales, del tracto respiratorio, y en intervenciones genitourinarias y gastrointestinales (72).

Han sido usados en la prevención de infecciones estafilocócicas en pacientes sometidos a diálisis periódica, y asociados a otros antibióticos en el tratamiento empírico de la fiebre de origen desconocido en pacientes neutropénicos. (98, 132, 237).

Teicoplanina es tan eficaz como vancomicina siendo utilizables de forma indistinta (138, 240). Las primeras evaluaciones de teicoplanina revelaron un alto porcentaje de fallos terapéuticos (81), debidos probablemente a la administración de una dosis baja (200 mg/día); en la actualidad se recomiendan 400 mg/ día (72). Se han descrito fallos de teicoplanina en el tratamiento de sepsis por estafilococos resistentes a la misma, que se han resuelto favorablemente con vancomicina (27). Teicoplanina presenta ventajas sobre vancomicina, menor frecuencia de administración, menor potencial nefrotóxico y ototóxico (72).

Los ensayos clínicos con daptomicina tuvieron que ser suspendidos al producirse fallos en el tratamiento de pacientes con bacteriemia. En estudios posteriores, se ha comprobado que la unión de daptomicina a albúmina (84, 103) y la interacción con el calcio a concentraciones sanguíneas pudieran ser la causa de estos fracasos terapéuticos (103).

Ramoplanina es escasamente tolerada, tras inyección endovenosa o intramuscular, sin embargo la administración tópica y oral fue bien tolerada; al no ser absorbida por el tracto gastrointestinal podría ser usada para la eliminación de enterococos resistentes a los antibióticos de portadores intestinales (126)

1.3 RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS GLICOPEPTIDICOS

Las bacterias gram positivas, de interés clínico, han sido definidas homogéneamente sensibles a vancomicina. Este concepto cambió tras la aparición en 1986 de *Enterococcus* y *Staphylococcus* resistentes a glicopéptidos (142, 235, 211).

Los primeros aislamientos, de *Enterococcus* resistentes a vancomicina, tuvieron lugar en 1986 en Inglaterra y Francia (142, 237). La primera cepa aislada en España fue obtenida en 1987 (108) y las primeras comunicaciones sobre cepas vancomicina-resistentes con resistencia transferible se presentaron por nosotros en 1989 (190). Los aislamientos han sido asociados al tratamiento empírico con vancomicina de pacientes neutropénicos o inmunocomprometidos con sepsis (98, 156, 133, 142, 237), aunque en otras comunicaciones no se ha relacionado al tratamiento con antibióticos glicopeptídicos (179, 216, 213, 238).

Han sido descritos varios brotes de infecciones nosocomiales producidos por enterococos resistentes a vancomicina (22, 25, 156, 133, 147). Se ha postulado que los animales de granja actuarían como reservorio de cepas resistentes, que llegarían al hospital mediante la alimentación (17), aunque parece más probable que el sentido sea el inverso ya que los glicopéptidos no se usan en veterinaria. La búsqueda de portadores fecales de enterococos resistentes a vancomicina reveló que entre el 5 y 15% de los pacientes hospitalizados los poseían según las áreas y el 2% de pacientes no ingresados (130). En un brote por *E. faecium* de fenotipo VanB se comprobó que los factores de riesgo para adquirir la cepa epidémica eran la proximidad a un paciente infectado, recibir cuidados de la misma enfermera y la contaminación de superficies fue mayor cuando los pacientes infectados padecían diarrea (25). En otro brote la cepa se vehiculizó en un termómetro electrónico (147)

En 1981 Cherubin y cols. describen los primeros estafilococos coagulasa negativos resistentes a glicopéptidos (125), posteriormente se han descrito *S. aureus*

(27). En 1994 se produce la aparición, extraordinariamente alarmante, de cepas de *S. aureus* con resistencia a meticilina y vancomicina en un hospital de Caracas (Venezuela) (datos no publicados).

1.3.1 RESISTENCIA INTRINSECA

Las bacterias gram positivas, habitualmente resistentes a los antibióticos glicopeptídicos, pertenecen a los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Erysipelothrix* (68, 125). La resistencia es constitutiva e intrínseca, no conociéndose con exactitud su mecanismo (125), aunque probablemente dependa de la composición refractaria a glicopéptidos del dipéptido terminal implicado en el entrecruzamiento del peptidoglicano (122). Recientemente, dos grupos diferentes han demostrado en *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus casei* que el extremo de los precursores del peptidoglicano es -D-Ala-D-Lac, y que estos precursores no se unen a vancomicina (21, 110). El laboratorio de Microbiología Clínica debe estar preparado para identificar estos microorganismos (apartado 1.1.2) ya que pueden ser confundidos con *Streptococcus* y *Enterococcus* resistentes a vancomicina (68).

1.3.2 RESISTENCIA ADQUIRIDA EN NO ENTEROCOCOS

La resistencia adquirida ha sido hallada en cepas de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus* y *Enterococcus* (125). French y cols. en una carta comunican el aislamiento de cepas resistentes a vancomicina de los géneros *Oerskovia*, *Corynebacterium*, *Lactococcus* y *Arcanobacterium* que insólitamente hibridan con una sonda *vanA* (79).

Las cepas de *Staphylococcus* resistentes a glicopéptidos no suelen presentar resistencia cruzada entre vancomicina y teicoplanina, aunque algunas cepas pueden poseerla. La resistencia a teicoplanina no es infrecuente en estafilococos

coagulasa negativos (*Staphylococcus haemolyticus* y *S. epidermidis*) manteniéndose sensibles a vancomicina (88, 151), incluso algunas de las cepas han respondido al tratamiento con vancomicina (27). "In vitro", la teicoplanina induce mutantes resistentes con mayor frecuencia que vancomicina (251). *S. aureus* resistentes a teicoplanina y vancomicina son excepcionales (125).

El mecanismo de resistencia a glicopéptidos en *Staphylococcus* permanece mal conocido, aunque se sabe que se expresa constitutivamente. Un estudio de microscopía electrónica reveló que *S. epidermidis* resistente a vancomicina presentaba paredes celulares considerablemente más gruesas que los estafilococos sensibles y, en presencia del antibiótico, se producían cambios morfológicos, filamentos, septos anormales, y pared celular doble (205). La actividad antibiótica desaparece cuando se incuban los estafilococos con vancomicina o teicoplanina a concentraciones subinhibitorias. Aunque no se demostró modificación de los antibióticos, estas cepas mostraron capacidad para secuestrar glicopéptidos. La teicoplanina fue secuestrada con mayor eficiencia que vancomicina (206).

Estudios del contenido proteico de cepas resistentes a glicopéptidos pusieron de manifiesto la aparición de grandes cantidades de proteínas de membrana de peso aproximado de 33 o 39 kDa en *S. aureus* y *S. epidermidis* (191). Ha sido posible obtener cepas de *S. aureus* resistentes a vancomicina, mediante pases sucesivos con concentraciones subinhibitorias. En estas cepas resistentes se observa la aparición de una proteína citoplásmica de 39 Kda, engrosamiento de la pared celular, y cambios en la morfología colonial, en la susceptibilidad a bacteriófagos, en la detección del antígeno capsular, y en la susceptibilidad a la lisostafina (52).

También, han sido aisladas cepas de *S. bovis*, *Streptococcus morbillorum*, *Streptococcus cremoris*, y *Aerococcus viridans* resistentes a vancomicina, procedentes de muestras clínicas o ambientales. El mecanismo de resistencia, aún no ha sido estudiado.

1.3.3 FENOTIPOS DE RESISTENCIA EN EL GÉNERO *Enterococcus*

Existen, al menos, cuatro fenotipos de resistencia a glicopéptidos en el género *Enterococcus* (48), definidos por el nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina, la expresión de la resistencia constitutiva o inducible, la capacidad de ser transferida por conjugación, codificación plasmídica o cromosómica, producción o no de proteínas de membrana, y molécula que sustituye a la D-Ala terminal del UDP-NAC-MUR-petapéptido; en la Tabla 1.4 se describen las características de los fenotipos VanA, VanB, VanB2, y VanC.

Tabla 1.4. Fenotipos de resistencia a antibióticos glicopeptídicos en el género *Enterococcus*.

FENOTIPO	CMI VANCO	CMI TEICO	INDUCIBLE	PROTEINA MEMBRANA	CONJU- GACION	PLAS- MIDOS	EXTREMO PENTAPEPTIDO
Van A	> 64	> 16	SI	39 KD	SI	SI	D-lactato
Van B	16-32	< 0,5	SI	39,5 KD	SI	NO	D-lactato
Van B2	> 64	< 0,5	SI	-	SI	NO	D-lactato
Van C	16-32	< 0,5	NO	-	NO	NO	D-serina

Los fenotipos VanA y VanB se hallaron, inicialmente, en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* (48), posteriormente también se han descrito en cepas de las especies *E. durans* (102, 234), *E. avium* (89, 198), mientras que Van C sólo ha sido hallado en *E. gallinarum*, y parece ser exclusivo e intrínseco de esta especie (144). Algunas cepas de *E. casseliflavus* y *E. flavescens* presentan el mismo fenotipo que *E. gallinarum*, aunque no hibridan con el gen *vanC* (144), posteriormente se ha demostrado que están relacionadas (172).

1.3.4 RESISTENCIA DE FENOTIPO VanA

VanA es el fenotipo que presenta mayor relevancia clínica, al estar presente en la mayoría de las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*, resistentes a vancomicina. Al ser codificado por un transposón, que habitualmente está integrado en plásmidos, puede diseminarse entre la población de *Enterococcus* sensibles. También puede diseminarse entre cepas con resistencia de bajo nivel, como ha ocurrido en cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* aislados de las heces de un paciente tratado con vancomicina por vía oral (58), y en un aislado clínico de *E. avium* con resistencia constitutiva de bajo nivel a vancomicina y teicoplanina que también poseía un plásmido de alto peso molecular con el determinante *vanA* (198). La mayoría de las cepas son de origen humano pero también han sido aislados *E. faecium* procedentes animales de granja en el Reino Unido (17), y *E. faecium* y *E. durans* de aguas residuales en Alemania (134), Reino Unido (17), y España (234).

La resistencia es inducible, y de alto nivel para vancomicina y teicoplanina (48). Recientemente han sido aisladas 18 cepas con resistencia de alto nivel a vancomicina y sensibles a teicoplanina que hibridaban con una sonda *vanA* (262).

La agrupación de genes *vanA* está constituida por tres genes estructurales, dos genes reguladores, y dos genes innecesarios para la expresión de la resistencia *vanY* y *vanZ*. Los genes estructurales son *vanA*, *vanH* y *vanX*. El producto de *vanA* es una proteína de membrana de aproximadamente 39 KD del tipo de las D-Ala-D-Ala ligasas, *vanH* codifica para una proteína de 35 KD relacionada con α -cetoácido reductasas y *vanX* codifica para una proteína de 202 aminoácidos con función dipeptidasa (192). Los genes reguladores son *vanR* y *vanS* relacionados con los genes reguladores de la subclase OmpR.

Arthur y cols. encontraron en los extremos del conjunto de genes *vanA*, del plásmido p1816, unas secuencias imperfectas, invertidas, y repetidas, proponiendo

que los genes de resistencia a vancomicina están incluidos en un transposón, el Tn1546. Se determinó la secuencia de la zona comprendida entre el gen *vanR* y la secuencia de bases invertidas y repetidas, detectándose la secuencia de dos zonas ORF. ORF1 tiene una homología del 56 y 42%, con las transposasas de Tn4430 de *Bacillus thuringiensis*, y de Tn917 de *E. faecalis*, respectivamente. ORF2 tiene una secuencia que está relacionada con las resolvasas, Res del plásmido pIP404, y la del Tn917. Del análisis, de las secuencias de ORF1, ORF2, y las terminales IR, concluyeron que Tn1546 es un transposón, de 10.851 pb, estructuralmente relacionado con la familia del Tn3, mientras que las proteínas ORF1 y ORF2 guardan mayor homología con proteínas de gram positivos (12).

El transposón es replicativo y conduce a la formación de cointegrados, produciendo una duplicación de 5 pb en la diana, estas características son típicas de los transposones de la familia Tn3.

Mediante amplificación de ADN se pudo comprobar, que el Tn1546 o elementos relacionados se encontraban en otros plásmidos con resistencia a vancomicina, distintos del pI816, procedentes de diversos lugares del mundo (12). Recientemente, Handwerger y cols. han comprobado la heterogeneidad de la agrupación de genes *vanA* en cinco cepas. Han observado diferencias en la organización por adquisición de ADN o por reordenación de algún gen. Tres de ellas albergaban, entre *vanS* y *vanH*, un fragmento de ADN de 1,4 Kb relacionado con las secuencias de inserción IS1165 y IS1181 de *L. mesenteroides* y *S. aureus*, respectivamente. Las dos restantes tenían una nueva disposición la región ORF1 (111)

Los plásmidos que albergan el grupo de genes *vanA* tienen un tamaño entre 34 y 50 Kb (142, 238), y son algunos de ellos transferibles a cepas de *Enterococcus* por conjugación. Las frecuencias de conjugación son del orden de 10^{-8} a 10^{-2} (transconjugantes / donantes)(108, 143). La alta frecuencia de conjugación (10^{-2}) de algunos plásmidos se explica por responder a feromonas (108). Los plásmidos con

resistencia a vancomicina pueden albergar o no, otros genes de resistencia, habiéndose asociado con resistencia a eritromicina, tetraciclina, kanamicina, y/o estreptomina (61, 108, 238). En algunas cepas del fenotipo VanA no se han detectado plásmidos, aunque sí transferían la resistencia por conjugación (216, 218, 238).

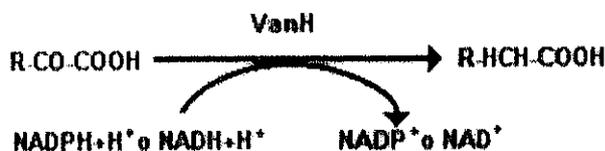
La expresión de la resistencia es heteróloga, observándose diferentes grados de resistencia según la especie. Así, es alto en *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, intermedio en *S. pyogenes* y *S. sanguis*, y bajo en *Streptococcus lactis* (143). La resistencia puede transferirse por conjugación a otras especies entre las que se incluyen: *L. monocytogenes*, *S. pyogenes*, *S. lactis*, y *S. sanguis* (143). La agrupación de genes *vanA* ha sido transferida por transformación a *S. sanguis*, y *B. thuringiensis*, expresándose la resistencia en grado alto y medio, respectivamente. También, plásmidos con resistencia VanA han sido introducidos por transformación en *Bacillus subtilis*, *S. aureus* y *Escherichia coli* sensible a vancomicina, no expresándose la resistencia (26, 48). Posteriormente Noble y cols. han comunicado la transferencia y expresión de la resistencia a vancomicina, mediante conjugación en ausencia de ADN plasmídico desde un *E. faecalis* a un *S. aureus*, pero ésta no pudo transferirse de estafilococo a estafilococo (177). Las causas de la expresión heteróloga de la resistencia son desconocidas, teniendo en cuenta que, muchos promotores de *Enterococcus* funcionan en *Bacillus* y *E. coli*, y que la proteína VanA se expresa en minicélulas de *E. coli*. De este modo, no parece que la expresión heteróloga dependa sólo de una falta de transcripción de los genes, sino de factores relacionados con el transporte y/u orientación en la membrana de alguna de las proteínas implicadas en la resistencia (26).

El primer gen estudiado fue *vanA*, clonado a partir del plásmido pIP816 de 34 Kb aislado de un *E. faecium* (26). El producto de *vanA* es una proteína de 39-40 KD (59), localizada en la membrana citoplásmica (174, 216). Esta proteína es inducible (143, 213), y la cantidad sintetizada está relacionada con la concentración de glicopéptido en el medio (174). Vancomicina, teicoplanina y otros glicopéptidos son

inductores en diferente grado no conociéndose la causa de la distinta capacidad inductora (216).

La secuencia de aminoácidos, obtenida a partir del gen *vanA*, tiene una homología del 36% con la secuencia de aminoácidos de la enzima D-Ala-D-Ala ligasa de *Salmonella* y del 28% con D-Ala-D-Ala ligasa de *E. coli*. La enzima D-Ala-D-Ala-ligasa produce un dipéptido D-Ala-D-Ala, que será añadido a UDP-tripéptido formándose el UDP-pentapéptido (51). La proteína VanA funciona como una D-Ala-D-Ala-ligasa, como se demostró en un ensayo de transcomplementación, realizado con una cepa de *E. coli* portador de una mutación termosensible (59). Tras la purificación se calcularon las constantes cinéticas de VanA en su acción como D-Ala-D-Ala-ligasa, lo que demostró una especificidad de sustrato diferente a las D-Ala-D-Ala-ligasas de gram negativos. VanA une con más eficacia una D-Ala con D-Met o D-Phe, que con otra D-Ala (29). Los datos previos a la secuenciación del gen *vanH* sugirieron que el extremo final del peptidoglicano naciente sería -D-Ala-D-Phe o -D-Ala-D-Met, resultando un pentapéptido con escasa o nula afinidad por vancomicina (29).

vanH codifica para una proteína de 322 aa, descubierta en un fragmento de 5,5 Kb necesario para la expresión de la resistencia a glicopéptidos al encontrar una zona ORF posterior al gen *vanA*. Su secuencia guarda una homología del 19-30% con tres deshidrogenasas 2-hidroxicarboxílicas o α -cetoácido reductasas (13). Las deshidrogenasas llevan a cabo la reacción:



vanH puede utilizar como donante de protones NADP ó NAD aunque tiene preferencia por el NADP. Posee mayor afinidad por sustratos en los que el radical R es una cadena alifática corta, CH₃- (piruvato) ó CH₃-CH₂- (2-cetobutirato), que por sustratos con cadena larga, al contrario que las otras deshidrogenasas homólogas. La

reducción del piruvato a D-lactato, sin formación de L-lactato pone de manifiesto la estereoespecificidad del enzima (9).

Tras conocer la funcionalidad de VanH, se postuló que el extremo del peptidoglicano naciente sería un α -hidroxi-ácido, en vez de los aminoácidos D-Met o D-Phe, propuestos en principio. Bugg y cols. comprobaron que VanA era capaz de unir D-Ala con los α -hidroxiácidos: 2-hidroxibutirato, 2-hidroxivalerato, fenil-lactato y lactato (30).

Con objeto de aclarar, que molécula sería la que se une a D-Ala, y el sentido de la reacción catalizada por *vanH*; Arthur y cols. consiguieron un mutante incapaz de sintetizar VanH, tras la inserción del gen de resistencia a kanamicina *aphA-1* en *vanH*, el mutante resultó sensible a vancomicina. La resistencia a vancomicina fue restaurada al añadir al medio de cultivo DL-2-hidroxibutirato o DL-lactato, y no se recuperó cuando se añadía 2-ceto-butirato o 2-D-aminobutirato. Con ello quedaba demostrado que un α -hidroxiácido sería el producto final de la acción de VanH, descartándose que el α -hidroxiácido fuera sustrato de una transaminasa para la producción de un nuevo aminoácido.

De los dos α -hidroxiácidos propuestos, D-lactato y D-hidroxibutirato, el D-lactato restablece la resistencia a concentraciones 5 que veces menores que el D-hidroxibutirato, y dado que el piruvato es producto de la vía homofermentativa de las hexosas, D-lactato debe ser él que se une a la D-Ala (9). La capacidad de unión de la vancomicina a péptidos cuyo extremo terminal es D-Ala- α -hidroxiácido es prácticamente nula (30). En la Figura 1.4 se representa las vías activas en enterococos sensibles y resistentes a glicopéptidos en la síntesis de la pared celular.

El análisis de los precursores citoplasmáticos del peptidoglicano, mediante HPLC, reveló que en células inducidas hay una disminución considerable de D-Ala-D-Ala, un incremento de UDP-NAC-Mur-tripéptido, y aparece una nueva sustancia que está

unida a UDP-NAc-Murámico (20). Este precursor fue aislado e identificado por espectrometría de masas como UDP-NAc-Mur-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-lactato (109,

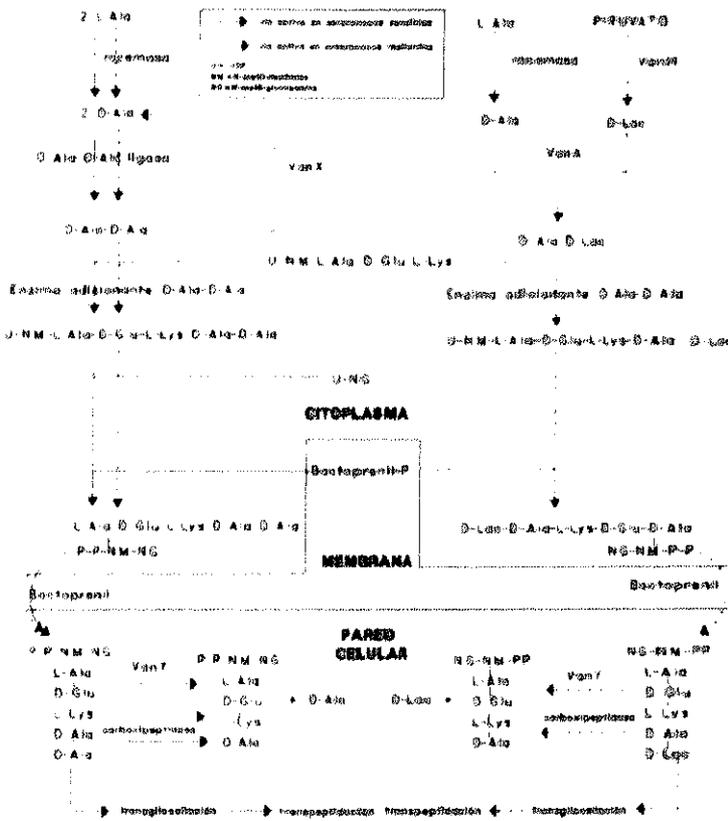


Figura 1.4. Representación esquemática de la síntesis del peptidoglicano en enterococos sensibles y resistentes a glicopéptidos.

154). El precursor UDP-NAC-Mur-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-lactato se une a las PBPs mediante acilación y con salida del D-lactato para tener lugar las reacciones de transpeptidación o carboxipeptidación, la unión de depsipéptidos a las PBP fue comprobada por Ramussen y Strominger al aislar carboxipeptidasas sensibles a penicilina (7).

"In vitro". Bugg y cols. demostraron que el complejo -D-Ala-D- α -hidroxiácido era ligado al UDP-NAC-MUR-tripéptido con el enzima adiciónador de D-Ala-D-Ala de *E. coli*, formando UDP-NAC-MUR-tetrapéptido- α -hidroxiácido. También

extractos crudos de *E. faecium* fueron capaces de formar NAc-MUR-pentapéptido a partir de NAc-MUR-tripéptido y D-Ala-D-Phe o D-Ala-D-Met. No parece necesario un enzima específico para unir el producto D-Ala-D- α -hidroxiácido a UDP-MUR-NAc-tripéptido (30).

El gen *vanX* es imprescindible para la expresión de la resistencia. Es una proteína de 202 aa que no presenta homología con otras proteínas. Su función dipeptidasa se ha esclarecido recientemente (192), inicialmente se postuló que debía actuar en un paso posterior a la formación del NAc-MUR-tetrapéptido-D-lactato (10). Reynolds y cols. han demostrado que Van X hidroliza el dipéptido D-Ala-D-Ala, pero no es capaz de hidrolizar los precursores del peptidoglicano: UDP-NAc-MUR-pentadepsipéptido, UDP-NAc-MUR-pentapéptido y D-Ala-D-lactato. Con la hidrólisis del dipéptido D-Ala-D-Ala sintetizado por la D-alanil-D-alanil ligasa cromosómica se impide la formación de UDP-NAc-MUR-pentapéptido que es susceptible de la unión con vancomicina (192).

El sistema se encuentra regulado a nivel transcripcional por los genes *vanS* y *vanR*. VanS es una proteína de 43 Kd relacionada con proteínas histidin-quinasa, en particular su dominio citoplásmico. VanR es una proteína de 27 Kd relacionada con las proteínas reguladoras de la subclase OmpR (10); estas proteínas se activan mediante fosforilación por parte de las proteínas histidin-quinasa, e inducen la transcripción de genes cuyos promotores son reconocidos por la RNA polimerasa (227).

El sistema regulador *vanS-vanR* en presencia de vancomicina promueve una activación de la transcripción de los genes *vanH*, *vanA* y *vanX*, los cuales se

encuentran en ese orden en la agrupación de genes *vanA*. *vanH* y *vanA* comparten 5 pares de bases y *vanX* dista 8 pares de bases de *vanA*, lo que sugiere que los tres genes se cotranscriben tras la activación de un promotor situado entre *vanH* y *vanS*, encontrado por Arthur y cols. (10). Recientemente ha sido demostrada la unión selectiva de la proteína *vanR* fosforilada al fragmento de ADN que contiene el promotor, y su función como activador transcripcional de los genes (119, 249).

vanR es imprescindible para la transcripción de los genes estructurales (10, 105). La inactivación de *vanS* mantiene la resistencia a vancomicina, aunque reduce la expresión del gen *caf* cuando este se encuentra clonado tras el gen *vanX*, sugiriendo que *VanR* puede ser activado por otras proteínas histidin-protein-quinasa, además de la fosforilación específica de *VanS* (10). Wright y cols. construyeron una proteína de fusión a partir de *VanS* y la proteína fijadora de maltosa comprobando, con proteínas purificadas, la autofosforilación de la proteína de fusión, y la transferencia del grupo fosfato al aspártico de *VanR* por *VanS* (263).

El inhibidor de la reacción de transglicosilación moenomicina induce la producción de una proteína de 39 kDa (*VanA*) (106). La señal que reconoce *VanS* podría estar relacionada con la inhibición de la transglicosilación; ya sea ésta u otra señal producida por vancomicina al unirse a su diana, activa a *VanS* induciendo la transcripción de la agrupación de genes *vanA*. Un sistema inducible de regulación tiene como ventaja que, en ausencia de vancomicina, las células crecen a velocidad normal y presentan una susceptibilidad normal a β -lactámicos mientras que, cuando tienen el complejo *VanA* activado, crecen a menor velocidad y son más susceptibles a β -lactámicos (10). Sin embargo ha sido publicado el aislamiento de tres *E. faecium*, en un

mismo centro hospitalario, que expresaban la resistencia de forma constitutiva y en los cuales no se observó sinergia entre vancomicina y β -lactámicos (95).

Para evitar la producción de NAc-Mur-pentapéptido sensible a la acción de vancomicina se postuló que el sistema reprimiría la expresión D-Ala-D-Ala-ligasa cromosómica de *E. faecium* (30), posteriormente se ha demostrado que se evita la síntesis del pentapéptido mediante la hidrólisis de la D-Ala-D-Ala (192).

Se detectó una actividad DD-carboxipeptidasa en las cepas inducidas (2, 59), que no era necesaria para la expresión de la resistencia. Recientemente Wright y cols. han demostrado que la proteína VanY tiene, específicamente, actividad DD-carboxipeptidasa y DD-carboxiesterasa, siendo capaz de liberar D-Ala o D-lactato del UDP-NAc-Mur-L-Ala-D-Glu-mDAP-D-ALA/-D-Ala ó D-lactato; pero no muestra actividad transpeptidasa. El producto del gen *vanY* es la proteína VanY, de 34,8 Kda, se encuentra asociada a membrana y regulada por el sistema *vanR-vanS* (264). La secuencia de *vanY* no está relacionada con las carboxipeptidasas conocidas; se diferencian, además, por no inhibirse con β -lactámicos, ni actuar como PBP, y tampoco posee actividad β -lactamasa, descartándose así, que el aumento de la sensibilidad a los β -lactámicos sea consecuencia de su expresión (9, 11, 264). El grado de resistencia a vancomicina ha sido correlacionado con la cantidad de actividad carboxipeptidasa, que contribuiría eliminando restos D-Ala que hubiesen entrado a formar parte de los precursores del peptidoglicano (100). Arthur y cols. han demostrado que VanY disminuye la concentración de UDP-NAc-Mur-tripéptido -D-Ala-D-Ala mediante la hidrólisis del resto D-Ala terminal, justificando la moderada participación de VanY en la

resistencia de alto nivel por la elevada eficacia de VanX hidrolizando el dipéptido D-Ala-D-Ala (8).

Zarlenga y cols. han publicado que la adición al medio de cultivo de aminoácidos a concentraciones elevadas (0,2 M) conduce a una disminución de la CMI a vancomicina de los *Enterococcus* de los fenotipos Van A y Van B, sugiriendo que esta disminución es producto de un mecanismo específico, extremo que no ha sido demostrado (267).

El gen *vanZ* no es necesario para la expresión de la resistencia, su secuencia no está relacionada con otras conocidas, desconociéndose la función que pueda desempeñar (12).

En cuanto al origen de los genes *vanA* se conoce que el gen *vanA* no hibrida con el ADN de *Amycolatopsis orientalis* y *Actinoplanes teichomyceticus* productores de vancomicina y teicoplanina respectivamente, ni con bacterias que tienen resistencia intrínseca a glicopéptidos (61), y por lo tanto no se dispone de datos para establecer una hipótesis. La relación G+C de los nueve genes codificados por el Tn1546 es variada, así es del 41-45% para los genes implicados en la resistencia (*vanS*, *vanR*, *vanH*, *vanA*, y *vanX*); es similar a la relación del ADN de *E. faecalis* y *E. faecium* (38-39%) en los genes ORF1 (37%) y ORF2 (34%); por último *vanY* y *vanZ* tienen una relación del 34% y 29%, respectivamente, sugiriéndose que cada grupo genes tenga un origen diferente (12).

1.3.5 RESISTENCIA DE FENOTIPO VanB

Los *Enterococcus* del fenotipo Van B son moderadamente resistentes a vancomicina (CMI 16-32), y sensibles a teicoplanina (CMI ≤ 0.5) (258). No obstante la CMI de teicoplanina de cepas preinducidas con vancomicina se incrementa a 16 $\mu\text{g/ml}$ (3). El distinto grado de susceptibilidad frente a 20 glicopéptidos (incluidos vancomicina y teicoplanina) no se pudo correlacionar con el peso molecular, carga, y/o hidrofobicidad (214). "In vitro" se obtienen con facilidad mutantes con CMI $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ para vancomicina (3, 258). Quintiliani y cols. han publicado la existencia de cepas de *Enterococcus* de fenotipo VanB con CMI comprendidas entre 4 y 1024 $\mu\text{g/ml}$ para vancomicina, sensibles a teicoplanina, e hibridan con un fragmento de 620 pb del gen *vanB* (187). Las cepas con mayor grado de resistencia a vancomicina es posible pertenezcan al genotipo VanB2, o bien sean un grupo heterogéneo de genes *vanB* con diversas mutaciones puntuales, lo que originaría la diversidad en el nivel de resistencia a vancomicina. La diferenciación entre fenotipos VanA y VanB es cada vez más compleja, tanto por la aparición de cepas VanB con CMI de vancomicina $\geq 64 \mu\text{g/ml}$, como por el aislamiento de cepas resistentes a teicoplanina (115).

La resistencia es inducible por vancomicina, apareciendo una proteína de membrana de 39,5 KD, que ha sido asociada con pérdida de la capacidad autolítica, anomalías en la división celular, incremento en la susceptibilidad a penicilina de las células inducidas (215), y coinducción de una actividad DD-carboxipeptidasa residente en otra proteína (100).

Fraimow y cols. han comunicado el aislamiento de la primera bacteria que necesita antibióticos para crecer, un *E. faecalis* de genotipo VanB que requiere vancomicina para su crecimiento (77). Recientemente, se ha publicado el aislamiento de un mutante de una cepa de *E. avium* con resistencia VanA que también es dependiente de glicopéptidos (198).

La proteína VanB no está relacionada inmunológicamente con VanA (3). Inicialmente se propuso la unión de la proteína de 39,5 KD al pentapéptido terminal del peptidoglicano naciente, y posterior modificación enzimática (2). Esta hipótesis no ha sido demostrada suficientemente, y será necesaria la reinterpretación de los ensayos que llevaron a esas conclusiones, ya que el gen *vanB* ha sido secuenciado, la secuencia de aminoácidos tiene una identidad del 77% con *vanA*, y también guarda cierta homología con *vanC* y *ddl*, habiéndose propuesto que sea como *vanA* una D-Ala-D-lactato ligasa (66, 65).

El análisis de los precursores del peptidoglicano, mediante HPLC, revela una disminución del dipéptido D-Ala-D-Ala y un incremento de UDP-NAc-Mur-tripéptido en células inducidas frente a las no inducidas, así como la aparición de dos nuevos picos de naturaleza desconocida, el primero de ellos tiene el mismo tiempo de elución que el pico único originado en células inducidas de fenotipo VanA (20), presumiblemente UDP-NAc-Mur-tetrapéptido-D-lactato, que posteriormente fue confirmado por otros autores (21, 109, 154), sugiriendo que dos proteínas diferentes podrían originar un mismo producto. VanB ha sido purificada, las constantes cinéticas obtenidas han puesto de manifiesto que une D-Ala a d-hidroxiácidos aunque la eficacia catalítica es de 5 a 35 veces menor que VanA. Así el bajo nivel de resistencia proporcionado por *vanB* será

debido a la presencia del precursor normal y el terminado en D-lactato resistente a la acción de vancomicina (155).

La sinergia observada entre vancomicina y penicilina en cepas de fenotipo VanB resistentes a penicilina puede ser consecuencia de que en células expuestas a vancomicina la PBP 1 hace las funciones de la PBP 5 (responsable de la resistencia a β -lactámicos), debido a que la PBP 5 no sería capaz de utilizar el precursor modificado pero sí la PBP 1 (1).

El gen o genes implicados en la resistencia han sido transferidos por conjugación (25, 187), aunque inicialmente no se consiguió transferirlos (258). El análisis de los transconjugantes obtenidos ha puesto de manifiesto que la transferencia del determinante *vanB* está asociado con el movimiento de grandes fragmentos de ADN, entre 90 y 150 kb, de cromosoma a cromosoma (188). No se ha asociado a la presencia de plásmidos (7, 187, 258). El gen *vanA* no hibrida con ADN de cepas de fenotipo Van B (61).

El fenotipo VanB2 se caracteriza por presentar resistencia de alto nivel a vancomicina ($\geq 64 \mu\text{g/ml}$) y permanecer sensibles a teicoplanina ($\leq 0,5 \mu\text{g/ml}$). La resistencia es transferible por conjugación, y su presencia no está asociada a plásmidos. El gen *vanB2* es similar al gen *vanB* diferenciándose tan solo en un 3,6% de su secuencia de ADN. La secuencia de aminoácidos guarda una homología del 77% con VanA y del 36% con VanC (86), el mecanismo de resistencia será semejante al de los fenotipos VanA y VanB.

1.3.6 RESISTENCIA DE FENOTIPO VanC

El fenotipo VanC presenta moderada resistencia a vancomicina, y sensibilidad a teicoplanina y otros glicopéptidos. La expresión de la resistencia es constitutiva (243). El gen *vanC-1* hibrida con el ADN de todos los *E. gallinarum* probados, no hibrida con el gen *vanA*, ni con ADN de bacterias con resistencia intrínseca a vancomicina, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Lactobacillus* (144). La secuencia obtenida por Dutka-Malen y cols. (60) tiene una homología del 29 y 38% con los genes *vanA* y *ddl* de *E. coli*, respectivamente, lo que sugiere que actúe como una D-Ala-D-Alanil ligasa con afinidad de sustrato modificada, de forma semejante a VanA. Cuando se inactiva *vanC-1* mediante inserción la cepa se convierte en susceptible (60), consecuencia probable de la acción de una D-Ala-D-Ala ligasa normal (193). En un ensayo de transcomplementación no se restableció la resistencia al clonar el gen *vanA*, y por tanto los productos de VanA y VanC deben ser diferentes. Reynolds y cols. han comunicado que *vanC-1* lleva a cabo la síntesis de D-Ala-D-Ser (193). Billot-Klein y cols. han analizado mediante HPLC la composición de los precursores del peptidoglicano y han hallado dos precursores el normal, UDP-NAc-Mur-tripéptido-D-Ala-D-Ala, y UDP-NAc-Mur-tripéptido-D-Ala-D-Ser que podría tener disminuida la afinidad por glicopéptidos (21). Postulando que la resistencia de *E. gallinarum* a vancomicina es de bajo nivel debido a la presencia de ambos precursores (21), Vincent y cols. propusieron inicialmente que, la resistencia a vancomicina, es debida a la acción carboxipeptidasa de la PBP 6, basándose en que encuentran en la membrana de *E. gallinarum* una actividad carboxipeptidasa y en que la resistencia a vancomicina fue inhibida por β -lactámicos a concentraciones que saturaban la PBP 6 (243). Estos datos son difíciles de compaginar con los resultados de la secuencia de *vanC-1* y de la composición de los

precursores del peptidoglicano. La actividad carboxipeptidasa actuara eliminando el resto D-Ala terminal del precursor normal del peptidoglicano sensible a vancomicina (193).

La mayoría de las cepas de *E. casseliflavus* y *Enterococcus flavescens* poseen resistencia a vancomicina de fenotipo VanC. Navarro y Courvalin han demostrado que en ambas especies existen genes relacionados con *vanC-1*, los han denominado *vanC-2* y *vanC-3* respectivamente. Postulando que el mecanismo de resistencia sea similar al de *E. gallinarum* (172).

1.3.7 RESISTENCIAS DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

La resistencia de bacterias gram negativas, a este grupo de antibióticos, es debida a que, dado el tamaño de la vancomicina, no puede atravesar la membrana externa. Shlaes y cols. han responsabilizado al lipopolisacárido de la exclusión de los glicopéptidos de su diana; tras el aislamiento de mutantes de *E. coli* sensibles a vancomicina, observando únicamente alteraciones del lipopolisacárido (218), posteriormente se corroboró esta hipótesis cuando se describió una cepa con déficit en la biosíntesis de lípido A que era 32 veces más susceptible a vancomicina que la cepa original (245). Otro dato que confirma la implicación del lipopolisacárido en la resistencia es el incremento de la sensibilidad a vancomicina que tiene lugar al adicionar EDTA (129), este actúa quelando iones Mg^{+2} , que neutralizan la repulsión electrostática entre las moléculas de lipopolisacárido, resultando la desestabilización del mismo (176).

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 ESTIRPES BACTERIANAS

Las estirpes bacterianas resistentes a vancomicina se describen en la Tabla 2.1, proceden todas de pacientes diferentes. En la Tabla 2.2 se detallan las estirpes de origen distinto del clínico.

Tabla 2.1 Estirpes bacterianas resistentes a vancomicina procedentes de aislamientos clínicos.

ESPECIE	ESTIRPE	HOSPITAL	MUESTRA	AÑO	REFERENCIA
<i>E. faecium</i>	RYC37509	Ramón y Cajal	Herida	1988	
<i>E. faecalis</i>	RYC44749	Ramón y Cajal	Herida	1988	
<i>E. faecalis</i>	PE282	Príncipes de España	Catéter	1988	
<i>E. faecalis</i>	PE435	Príncipes de España	Orina	1988	
<i>E. faecalis</i>	PE477	Príncipes de España	Absceso	1988	
<i>E. faecalis</i>	PE491	Príncipes de España	-	1988	
<i>E. faecalis</i>	MT77628	Mutua de Tarrasa	Sangre	1988	(179)
<i>E. faecalis</i>	MT77693	Mutua de Tarrasa	Sangre	1989	(179)
<i>E. avium</i>	SON144	Son Dureta	-	1989	

Tabla 2.2 Estirpes bacterianas de origen distinto del clínico.

ESPECIE	CEPA	ORIGEN	DESCRIPCION
<i>E. faecalis</i>	JH2-2	D.B. Clewell (124)	Rif ^r ; Fus ^r ; sin plásmidos
<i>E. faecalis</i>	OG1X(pAM714)	D.B. Clewell (123)	Str ^r ; Erm ^r ; responde a cAD1
<i>E. faecalis</i>	OG1X(pAM351)	D.B. Clewell (265)	Str ^r ; Tet ^r ; responde a cPD1
<i>E. faecalis</i>	FA2-2(pAM373)	D.B. Clewell (41)	Rif ^r ; Fus ^r ; responde a cAM373
<i>E. faecalis</i>	V583	D. Sahn (202)	Van ^r de fenotipo VanB
<i>E. faecalis</i>	JVR-1	este trabajo	transconjugante JH2-2/RYC37509
<i>E. faecalis</i>	JVR-2	este trabajo	transconjugante JH2-2/RYC44749
<i>E. faecalis</i>	JVR-3	este trabajo	transconjugante JH2-2/PE282
<i>E. faecalis</i>	JVR-4	este trabajo	transconjugante JH2-2/PE435
<i>E. faecalis</i>	JVR-5	este trabajo	transconjugante JH2-2/PE477
<i>E. faecalis</i>	JVR-6	este trabajo	transconjugante JH2-2/PE491
<i>E. faecalis</i>	JVR-7	este trabajo	transconjugante JH2-2/MT77628
<i>E. faecalis</i>	JVR-8	este trabajo	transconjugante JH2-2/MT77693
<i>E. faecalis</i>	ATCC29212		
<i>S. aureus</i>	ATCC29213		

Además, se aportan datos de sensibilidad de 3.333 cepas de *Enterococcus* aisladas en el Hospital Ramón y Cajal procedentes de muestras clínicas.

2.2.1 IDENTIFICACION

Las pruebas realizadas para la identificación de las cepas resistentes a vancomicina fueron: tinción de gram, catalasa, aglutinación con antisuero D de Lancefield (Oxoid), bilis/esculina (Difco), crecimiento en NaCl al 6,5%, y la galería API 20 STREP (Biomérieux). La galería API 20 STREP incluye las pruebas: Voges-Proskauer, hidrólisis del hipurato, esculina, y PYR; presencia de α -galactosidasa, β -glucoronidasa, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, leucin arilamidasa, y arginin hidrolasa; fermentación de ribosa, L-arabinosa, manitol, sorbitol, lactosa, trealosa, inulina, rafinosa, almidón y glicógeno.

El resto de las cepas de *Enterococcus* fueron identificadas a nivel de género con las pruebas: catalasa, bilis/esculina (Difco), y crecimiento en NaCl al 6,5%.

2.2.2 PRODUCCION DE HEMOLISIS Y BACTERIOCINAS

La capacidad de hemolizar sangre de caballo y carnero se estudió en agar BHI (Difco) con 5% de sangre. La producción de bacteriocinas se determinó frente a la cepa *E. faecalis* JH2-2 en agar BHI. En ambos ensayos se utilizó la estirpe OG1X(pAM714) como control positivo, ya que es productora de hemolisina y bacteriocina (123).

2.3 SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS

2.3.1 ANTIMICROBIANOS

Para la determinación de la sensibilidad, de las cepas de *Enterococcus* aisladas en el Hospital Ramón y Cajal, se utilizaron los paneles 1S ó 3S del sistema semiautomático Pasco (Difco). Los paneles poseen diluciones seriadas de los antibióticos siguientes (entre paréntesis figura el rango de concentraciones en $\mu\text{g/ml}$): ampicilina (0,12-8), ampicilina/sulbactam (4/2-16/8), cefalotina (16), cefamandol (8-16), cefazolina (2-16), cefoxitina (2-16), cefuroxima (2-16), ciprofloxacina (0,25-2), clindamicina (1-4), cloranfenicol (8-16), cotrimoxazol (2/38-8/152), eritromicina (0,5-4), estreptomina (2000), fosfomicina (16-128), gentamicina (0,5-8), nalidíxico (16), norfloxacina (16), nitrofurantoína (64), oxacilina (0,25-6), penicilina (0,12-8), rifampicina (0,5-2), sulfisoxazol (256), tetraciclina (4-8), tobramicina (0,5-8), vancomicina (1-16).

La sensibilidad a los antimicrobianos de las cepas resistentes a vancomicina se determinó con los paneles 1S del sistema PASCO y microdilución en caldo Mueller-Hinton. Los antibióticos probados por microdilución fueron los siguientes (en paréntesis rango en $\mu\text{g/ml}$): daptomicina (Eli Lilly) (1-256), imipenem (Merck Sharp Dhome) (0,25-32), meropenem (Ici) (1-32), piperacilina (Lederle) (4-64), teicoplanina (Merrell Dow) (4-512), y vancomicina (Eli Lilly) (16-2048).

2.3.2 CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS

Las CMI se determinaron siguiendo las instrucciones del fabricante con el sistema semiautomático PASCO. La interpretación se realizó siguiendo los criterios del NCCLS (169), excepto para fosfomicina, que no figura, consideramos sensible $\leq 32 \mu\text{g/ml}$, y $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ resistente (223).

Para la determinación de la CMI, mediante microdilución en placa microtiter, se utilizó caldo Mueller-Hinton (Difco). Se inocularon los pocillos con una suspensión bacteriana crecida en caldo Mueller-Hinton, con concentración final de 10^8 UFC/ml (167). Tras 18 horas de incubación a 37 °C, se practicó la lectura de la CMI. La sensibilidad de daptomicina se realizó en caldo Mueller-Hinton suplementado con Ca^{+2} 25 mg/l y Mg^{+2} 12,5 mg/l (127). En todos los ensayos se utilizó como control la cepa *E. faecalis* ATCC 29212.

2.3.3 ISOBOLOGRAMA

Se estudió el posible antagonismo entre D-cicloserina y vancomicina, para ello se realizaron isobogramas, mediante microdilución en caldo Mueller-Hinton, de la D-cicloserina asociada a vancomicina. El rango de concentraciones ensayado fue para ambos antibióticos de 8 y 512 $\mu\text{g/ml}$. Se consideró antagónico cuando el índice FIC resultó ≥ 2 (137).

2.4 CURVAS DE CRECIMIENTO

Para conocer la inducibilidad de la resistencia a vancomicina se determinaron las curvas de crecimiento de las cepas con y sin vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$), partiendo de preinóculos crecidos durante la noche en presencia y ausencia del antibiótico. Se realizaron en frascos enlermeyer con un tubo lateral, el cual se introdujo en el espectrofotometro Spectronic 20, para determinar la DO, a 660 nm. Las medidas de la DO se efectuaron cada 30 minutos, durante un intervalo de 11 horas.

2.5 ANALISIS DE PROTEINAS

2.5.1 PREPARACION DE EXTRACTOS PROTEINAS TOTALES

Se partió de un preinóculo crecido durante la noche en BHI, se inoculó en proporción 1/10 en 200 ml de BHI con y sin vancomicina (100 $\mu\text{g/ml}$). Se incubó a 37° C, con agitación hasta una DO de 0,6 a 660 nm.

Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron en tampón fosfato 10mM pH 7, resuspendiéndose en un volumen final de 5 ml de tampón fosfato 10 mM pH 7, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con 10 mg/ml de lisozima (Sigma), a continuación las muestras fueron sonicadas durante 15 minutos, con un sonicador Ultrasonic W-380, manteniéndose en todo momento las muestras a 0° C.

Una vez sonicadas, se retiraron los restos celulares por centrifugación a 4.000 rpm durante 5 minutos. La concentración de proteínas se determinó con BCA Protein Assay de PIERCE, y ajustada a 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.5.2 EXTRACCION DE PROTEINAS DE MEMBRANA

A partir de los extractos de proteínas totales preparados como en el apartado 2.5.1, las proteínas de membrana fueron purificadas por ultracentrifugación a 105.000 xg, durante una hora a 4 °C. El sedimento resultante se resuspendió en tampón fosfato 10mM, pH 7. Se lavó centrifugando de nuevo en las mismas condiciones. Después de resuspender en 1 ml de tampón fosfato 10 mM, pH 7, se determinó la concentración de proteínas, y se repartió en alícuotas que conservaron a -70 °C, hasta su uso.

2.5.3 ANALISIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Se han utilizado las cubetas Mini Protean II y Protean II de Bio Rad para geles verticales de poliacrilamida desnaturizante. Los geles constan de dos partes, un gel superior de concentración de acrilamida constante y un gel inferior separador con concentraciones de acrilamida variables según el tamaño de las proteínas a analizar (140).

El gel inferior se preparó en un volumen total de 10 ml mezclando: 2,5 ml de Tris.HCl 1,5M, pH 8,8, x ml de acrilamida/bisacrilamida 30% (x depende de la concentración final deseada), 0,1 ml de SDS al 10%, y (7,4-x) ml de agua. La solución se desgaseó a vacío y se añadieron 50 μ l de persulfato amónico al 10% y 10 μ l de TEMED.

El gel superior se añadió sobre el gel inferior cuando este polimerizó, se preparó mezclando en un volumen final de 10 ml: 2,5 ml de Tris.HCl 0,5M, pH 6,8, 1,3 ml de acrilamida/ bisacrilamida 30%, 6,1 ml de agua, 0,1 ml de SDS 10%, 50 μ l de persulfato amónico 10%, y 10 μ l de TEMED.

Se añadió tampón de muestras (x2) (para 10 ml se mezclan: 1,25 ml de Tris.HCl 0,5M, pH 6,8, 2 ml de SDS 10%, 2 ml de glicerol 50%, 0,5 ml de β -mercaptoetanol, 0,01 g de azul de bromofenol) a los extractos proteicos, y la electroforesis se llevó a cabo en tampón Tris 25 mM, glicina 0,182 M, SDS 0,1%. El gel se corrió a 40 mA hasta que el frente de colorante llegó al final del gel.

La tinción de proteínas se llevó a cabo sumergiendo los geles de acrilamida durante una hora en una solución conteniendo azul de coomasie al 0.25%, ácido acético 10% y metanol 30%. Posteriormente, el exceso de colorante se eliminó por sucesivos lavados con una mezcla de ácido acético al 10% y etanol al 7,5%. Los geles se secaron al vacío, o bien entre dos papeles de celofán.

El densitómetro EC 910 Transmission Densitometer equipado con un EC 934 Densitometric Software (E-C-Apparatus Corporation, Florida USA), se utilizó para la comparación de las bandas existentes en cepas crecidas con y sin antibiótico en los geles de proteínas.

Los pesos moleculares de las proteínas se calcularon mediante extrapolación a una recta obtenida a partir de las distancias recorridas por el patrón de pesos moleculares SDS-6H de Sigma.

2.5.4 TRANSFERENCIA DE LAS PROTEINAS A LA MEMBRANA IMMOBILON PVDF

La transferencia de las proteínas desde los geles de acrilamida a la membrana Immobilon PVDF (Millipore) se efectuó siguiendo el protocolo proporcionado por Bio Rad con el sistema de cubeta para transferencia de proteínas (Mini Trans-blot electrophoretic Transfer cell Bio Rad). La transferencia se realizó refrigerada, en tampón de transferencia (glicina 0,192 M, Tris 0,025 M, y metanol 15%, disueltos en agua, pH 8,3) a 100 V y 250 mA durante 1 hora.

2.5.5 PREPARACION DE ANTISUERO ANTI PROTEINAS RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA

Se inmunizaron 4 conejos siguiendo el protocolo de Vaitukaitis (239) con una mezcla homogénea, que contenía 0,5 ml de adyuvante completo de Freund (Difco), y 1 ml de extracto de membranas de la cepa JVR-2 crecida con 50 μ g/ml de vancomicina, preparadas como se indica en 2.5.2, con una concentración de 2,1 mg/ml de proteínas. A la sexta semana les fue inoculada una nueva dosis. La producción de anticuerpos se detectó inicialmente mediante difusión en placa. En las semanas 10^a,

12ª, y 14ª se extrajo sangre de la vena marginal de la oreja del conejo. Se mezcló el suero obtenido de las diferentes sangrías, y se congeló en alícuotas de 8 ml a -70 °C.

Con objeto de purificar el antisuero obtenido, este se absorbió con extractos sonicados de un cultivo de 250 ml crecido durante la noche en ausencia de vancomicina de la cepa JVR-2. Se mantuvo el suero en agitación con los extractos durante una hora a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C, este proceso se repitió cuatro veces. El antisuero parcialmente purificado se denominó anti-39KDa, y reconoce, fundamentalmente, una banda de peso molecular de aproximadamente 39 KD presente en las cepas inducidas y ausente en las cepas no inducidas.

2.5.6 DETECCIÓN DE PROTEINAS CON ANTISUERO ANTI-39KDa

La membrana Immobilon PVDF se humedeció con metanol, como agente bloqueante se utilizó leche de vaca descremada en polvo al 8,8 % en TBS (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4), a 37 ° C durante una hora, o a 4 °C durante la noche. El antisuero anti-39KDa se añadió a una concentración final 1:200. Se mantuvo en agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se lavó 4 veces con solución salina y Tween 20 al 0,5%, y una vez con solución salina. El conjugado utilizado, fue anticuerpo antiglobulina de conejo producida en cabra marcada con fosfatasa alcalina (Bio Rad), diluido en leche descremada en polvo al 8,8% a concentración final 1:2.000, se incubó a temperatura ambiente durante una hora con agitación. Se lavó con solución salina/Tween 20 como en el ciclo de lavado anterior. Para revelar se añadió el substrato de la fosfatasa alcalina; para preparar 10,2 ml se toman 10 ml de tampón carbonato (8,4 g NaHCO₃, 0,2 g 6.H₂O.MgCl₂, H₂O c.s.p. 1.000 ml ajustando el pH a 9,8 con NaOH), 100 µl de solución de NBT (30 mg NBT en 0,7 ml de dimetilformamida y 0,3 ml de agua), y 100 µl de solución BICP (15 mg de BICP en 1 ml de dimetilformamida). La reacción se detiene lavando con solución salina.

2.5.7 ANALISIS DE PBP

El análisis de las PBP se realizó con extractos de proteínas de membrana preparadas como se indica en 2.5.2, con concentración final de proteínas 5 mg/ml. Se incubaron alícuotas de 50 μ l con [S^{35}] penicilina (2,2 Ci/mmol) (Dupont, NEN research Products) a una concentración final de 5 μ g/ml, durante 15 minutos a 37°C, la reacción se detuvo por adición de penicilina a concentración final 1 mg/ml (224, 242). Los geles de poliacrilamida con las PBP marcadas fueron fijados durante una hora con ácido acético 10%, metanol 30%, y glicerol 3%, el acético se eliminó con dos lavados sucesivos con metanol 30% y glicerol 3%. Posteriormente el gel se mantuvo una hora en salicilato Na 1M, metanol 30%, y glicerol 3%. Tras el secado se expusieron frente a una película Kodak X. Omat XS5 durante 10 días a -70°C (224, 242).

2.6 TRANSFERENCIA DE LA RESISTENCIA

2.6.1 ENSAYOS DE CONJUGACION

Los ensayos de conjugación en filtro se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Pérez-Díaz y cols (181), las conjugaciones en caldo BHI se efectuaron durante cuatro horas, en ambos casos la relación donante: receptor fue 1:10. La frecuencia de conjugación se expresó como el número UFC de transconjugantes resultantes por UFC de donantes, se calculó practicando diluciones seriadas a 1:10 y plaqueando estas sobre placas con antibióticos. Los antimicrobianos utilizados en la selección de transconjugantes fueron: vancomicina (50 μ g/ml), tetraciclina (10 μ g/ml), eritromicina (10 μ g/ml), y rifampicina (75 μ g/ml).

2.6.2 RESPUESTA A FEROMONAS

Los ensayos para verificar la respuesta a feromonas se efectuaron según el método descrito por Dunny y cols (57). Las cepas de *E. faecalis* resistentes a vancomicina se pusieron en contacto con filtrados de las cepas: JH2-2 (tratados y sin tratar con pronasa (Sigma)), OG1X(pAM714), OG1X(pAM351), y FA2-2 (pAM373), observándose la producción o no de acúmulos, también se añadió sobre los acúmulos EDTA 50 mM para comprobar si se disgregaban (265).

2.7 OBTENCION DE ADN

2.7.1. LISIS PARA ADN TOTAL

La extracción del ADN total se llevó a cabo con el método publicado por Poyart-Salmeron y cols (186). Las células obtenidas por centrifugación de 5 ml de BHI crecidas durante la noche, se resuspendieron en tampón TE (Tris 0,01 M, EDTA 0,001 M, pH 8) con sacarosa al 25% y lisozima (Sigma) (25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), e incubadas durante una hora a 37 °C. Los protoplastos generados se lisaron mediante una extracción con fenol/cloroformo 1:1. El ADN total se recuperó del sobrenadante precipitándolo con etanol, y se resuspendió en 100 μl de tampón TE. El ADN obtenido se desnaturalizó a 100 °C durante 10 minutos, se depositó sobre una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer), y fue fijado con luz ultravioleta en un horno GS Gene Linker (Bio Rad).

2.7.2 MINILISIS ALCALINA

La presencia de ADN plasmídico se analizó a partir de lisados obtenidos por el método de Anderson y McKay para 10 ml de cultivo (6), modificada por Martínez-Bueno y cols (150). Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con TE. Se resuspendieron en 460 μl de sacarosa 6,7%, Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8; y se

adicionaron 115 μ l de una solución de lisozima 10 mg/ml en Tris 25 mM, pH 8, incubándose 30 minutos a 37 °C, la acción de la lisozima se detuvo con 58 μ l de EDTA 0,25 M, Tris 50 mM, pH 8. La lisis se consiguió por agitación suave con 33 μ l de una solución de SDS 20% en Tris 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8. La adición de 35 μ l de NaOH junto con agitación suave durante 10 minutos desnaturalizó buena parte del ADN cromosómico, neutralizándose con 60 μ l de Tris 2M, pH 7, enfriado en hielo. El ADN cromosómico se precipitó con la adición de 86 μ l de NaCl 5M, e incubación durante 4 horas en hielo. Se centrifugó 10 minutos a 12.000 rpm, y el sobrenadante se extrajo con 700 μ l de fenol saturado con Tris 0,1 M, pH 8, y 3% NaCl. El exceso de fenol se extrajo con 700 μ l de cloroformo-isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con un volumen de isopropanol preenfriado a -20 °C, incubándose durante 4 horas a -20 °C, se centrifugó 10 minutos a 12.000 rpm y se lavó con etanol al 70%, una vez seco se resuspendió en 25 μ l de TE.

2.7.3 OBTENCION ADN PLASMIDICO A GRAN ESCALA

La purificación del ADN plasmídico se efectuó a partir de cultivos crecidos durante la noche en 2 l BHI con 50 μ g/ml de vancomicina, con el método descrito por Anderson y McKay (6) y modificado por Martínez-Bueno (150), para la preparación de ADN a gran escala. El técnica es igual al método de minilisis alcalina de estos autores, diferenciándose únicamente en los volúmenes utilizados. Los lisados obtenidos se sometieron a ultracentrifugación en gradiente de CsCl₂ a 105.000 g durante 48 horas, en una centrífuga Kontron. La banda correspondiente al ADN plasmídico visualizada con luz ultravioleta se extrajo con una jeringa. El bromuro de etidio se eliminó mediante extracciones repetidas con isopropanol saturado con CsCl₂, y éste último se retiró con diálisis frente a TE.

2.8 ELECTROFORESIS, TRANSFERENCIA DEL ADN, E HIBRIDACION

El ADN se analizó en geles de agarosa horizontales al 0,6% o al 0,8%, en tampón TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). El ADN se diluyó con la mitad de volumen de tampón de depósito (EDTA 80 mM, azul de bromofenol 0,01 %, glicerol 20%). La electroforesis se efectuó a 60-80 V hasta que el colorante rebasó el final del gel, posteriormente se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (1µg/ml), y se visualizaron con un transiluminador de luz ultravioleta, fotografiándose con una cámara Polaroid (148).

Los tamaños de los fragmentos de ADN linearizado se estimaron utilizando como patrón el ADN del fago lambda digerido con el enzima *HindIII* (148).

El ADN fue transferido desde los geles de agarosa a membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer) usando el método de Southern (148) con ayuda del sistema Vacum Gene (Pharmacia) siguiendo las normas del fabricante; las soluciones fragmentadora (NaCl 0,25M), desnaturalizante (NaCl 1,5M, NaOH 0,5M), neutralizante (NaCl 1,5, Tris 0,5 M, EDTA 0,001 M, pH 7,2) y de transferencia (20 xSSC), estuvieron en contacto con el gel y la membrana durante 4, 3, 3, y 50 minutos respectivamente, en ese orden, con una presión constante de 50 mbares. Una vez seca se fijó el ADN con luz ultravioleta en un horno GS Gene Linker.

Las hibridaciones de las membranas de nylon que contenían ADN se realizaron en condiciones restrictivas a 65 °C en un horno Techne Hybridiser, durante 18 horas, en continua agitación. Se efectuó una prehibridación durante una hora a 55 °C. La solución de hibridación para plásmidos contiene para 25 ml: 7,25 ml 20xSSC, 1,25 ml SDS 10%, 1,25 100xDenhardt's (BSA 2%, ficoll 2%, polivinilpirrolidina 2%, en agua), 50 µl ADN de esperma de salmón 1 mg/ml, y 15,2 ml de agua. La solución de hibridación para oligonucleótidos contiene para 40 ml: 12 ml de 20xSSC, SDS 10%, 4 ml 100xDenhardt's, 2,5 ml de concentración de ADN de esperma de salmón.

La sonda no ligada a la membrana se retiró al lavar con SDS 0,2% en 6xSSC durante 5 minutos a temperatura ambiente y un segundo lavado a 45 °C durante 15 minutos.

2.9 MANIPULACION ENZIMATICA DEL ADN

2.9.1 DIGESTION DEL ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION

Las reacciones se realizaron en volúmenes finales de 10-30 μ l, mezclando una décima parte del volumen final de tampón de reacción concentrado x10, según la enzima alto (NaCl 100mM, MgCl₂ 10 mM, DDT 1 mM, Tris 50 mM, pH 7,5), medio (NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DDT 1 mM, Tris 10 mM, pH 7,5), o bajo (MgCl₂ 10 mM, DDT 1mM, Tris 10 mM, pH 7,5), y entre 1 y 2 unidades de enzima (148). Se utilizaron las endonucleasas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* (Boehringer).

2.9.3 MARCAJE DE OLIGONUCLEOTIDO EN EL EXTREMO 3'

30 picomoles de oligonucleótido se marcaron, en el extremo 3', con la enzima transferasa terminal (Boehringer), y [α -³²P]ddATP (3000 Ci/mmol: Amersham International), la reacción se llevó a cabo durante una hora, a 37 °C, con tampón de marcaje (CoCl₂), y se detuvo en hielo y 10 μ l de EDTA 200 mM pH8.

2.10 PRODUCCION DE OLIGONUCLEOTIDO

A partir de la secuencia del gen *vanA* publicada por Dutka-Malen y cols (59), se eligió un fragmento de 20 nucleótidos, comprendido entre las posiciones 573 y 593 de la secuencia, zona en la que no existe homología con las d-alanil-d-alanil ligasas de *S. typhimurium* y de *E. coli*. El oligonucleótido, 5'-CAGCTGTACTCTGCC-

GGAT-3', fue construido en el sintetizador Gene Assembler Plus de Pharmacia, y posteriormente, purificado siguiendo las instrucciones del fabricante. En cuanto a la especificidad el oligonucleótido no hibridó con cepas sin resistencia a vancomicina, ni con la cepa *E. faecalis* V583 resistente a vancomicina de fenotipo VanB (202).

3. RESULTADOS

3.1 IDENTIFICACION DE CEPAS RESISTENTES A VANCOMICINA

En la Tabla 3.1 figuran los resultados de las pruebas realizadas para la identificación, a nivel de especie, de las cepas resistentes a vancomicina. Todas las cepas se observaron como cocos gram positivos con tinción de gram, aglutinaron con el antisuero D de Lancefield, fueron catalasa negativas, y crecieron en NaCl 6,5%. Ninguna cepa presentó pigmentación en agar BHI.

Tabla 3.1. Pruebas de identificación de las cepas resistentes a vancomicina.

CEPA N°	B/E	VP	HIP	ESC	PYR	αGAL	βGUR	βGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLY	COD. API	IDENTIFICACION
RYC37509	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	7 157 411	<i>E. faecium</i>
RYC44749	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	7 143 711	<i>E. faecalis</i>
PE282	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	7 143 711	<i>E. faecalis</i>
PE435	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	7 143 711	<i>E. faecalis</i>
PE477	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	7 143 711	<i>E. faecalis</i>
PE491	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	7 143 711	<i>E. faecalis</i>
MT77628	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	7 143 711	<i>E. faecalis</i>
MT77693	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	7 143 711	<i>E. faecalis</i>
SON144	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	7 142 510	<i>E. avium</i>

B/E bilis/esculina, VP Voges-Proskauer, HIP hipurato, ESC esculina, αGAL α-galactosidasa, βGUR β-glucuronidasa, βGAL β-galactosidasa, PAL fosfatasa alcalina, LAP leucin arilamidasa, ADH arginin hidrolasa, RIB ribosa, ARA L-arabinosa, MAN manitol, SOR sorbitol, LAC lactosa, TRE trealosa, INU inulina, RAF rafinosa, AMD almidón, GLY glicógeno, COD. API código Api.

Con los resultados obtenidos de las pruebas aglutinación grupo D de Lancefield, bilis/esculina, PYR, leucin-arilamidasa, y crecimiento en NaCl 6,5%, todas las cepas quedan suficientemente diferenciadas de los géneros *Pediococcus*, *Leuconostoc*, y *Lactococcus* que habitualmente son resistentes a vancomicina (68). La identificación, a nivel de especie, de las nueve cepas obtenida con el sistema API 20 STREP; fue la misma, para cada una de ellas, cuando se extrapolaron los resultados al esquema de Facklam y Collins (93).

Con objeto de caracterizar las cepas de enterococos resistentes a vancomicina, se estudió la capacidad hemolítica y la producción de bacteriocinas, marcadores que se han relacionado con la presencia de plásmidos (124). Ninguna cepa hemolizó sangre de caballo, o de carnero, en agar BHI con 5% de sangre, tampoco se encontró ninguna cepa productora de bacteriocina frente a *E. faecalis* JH2-2 y, todas las cepas, fueron susceptibles a la acción de la bacteriocina codificada por el plásmido pAM714.

3.2 SENSIBILIDAD DE LOS ENTEROCOCOS AISLADOS EN EL HOSPITAL RAMON Y CAJAL EN EL PERIODO 1988-1993.

La sensibilidad de las cepas de *Enterococcus* aisladas en el Hospital Ramón y Cajal en el período 1988-1993 fue realizada con el sistema semiautomático PASCO. Se aportan datos de 3.333 aislados de *Enterococcus*, el número de cepas estudiadas fue de 299 en 1988, 240 en 1989, 327 en 1990, 719 en 1991, 950 en 1992, y 798 en 1993. El menor número de aislados del período 1988-1990 es consecuencia de un cambio en la rutina del laboratorio. Durante los tres primeros años se efectuaba únicamente un antibiograma a buena parte de los enterococos, y a partir de 1991 a todas las cepas se les realizó CMI con el sistema PASCO. Para algunos antibióticos no figuran los datos de 1988 debido a que los paneles utilizados, en ese momento, no los contenían.

3.2.1 ANTIBIOTICOS INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE LA PARED CELULAR: β -LACTAMICOS, GLICOPEPTIDOS, Y FOSFOMICINA

La distribución de la sensibilidad a antibióticos β -lactámicos se presenta en la Tabla 3.2, 3.3, y 3.4; en ellas figuran los resultados obtenidos para penicilina G, ampicilina y ampicilina / sulbactam respectivamente. El sistema Pasco proporciona la

sensibilidad de otros antibióticos β -lactámicos, que han sido excluidos por carecer de importancia en el manejo de las infecciones causadas por enterococos, ó por no aportar información de posibles mecanismos de resistencia.

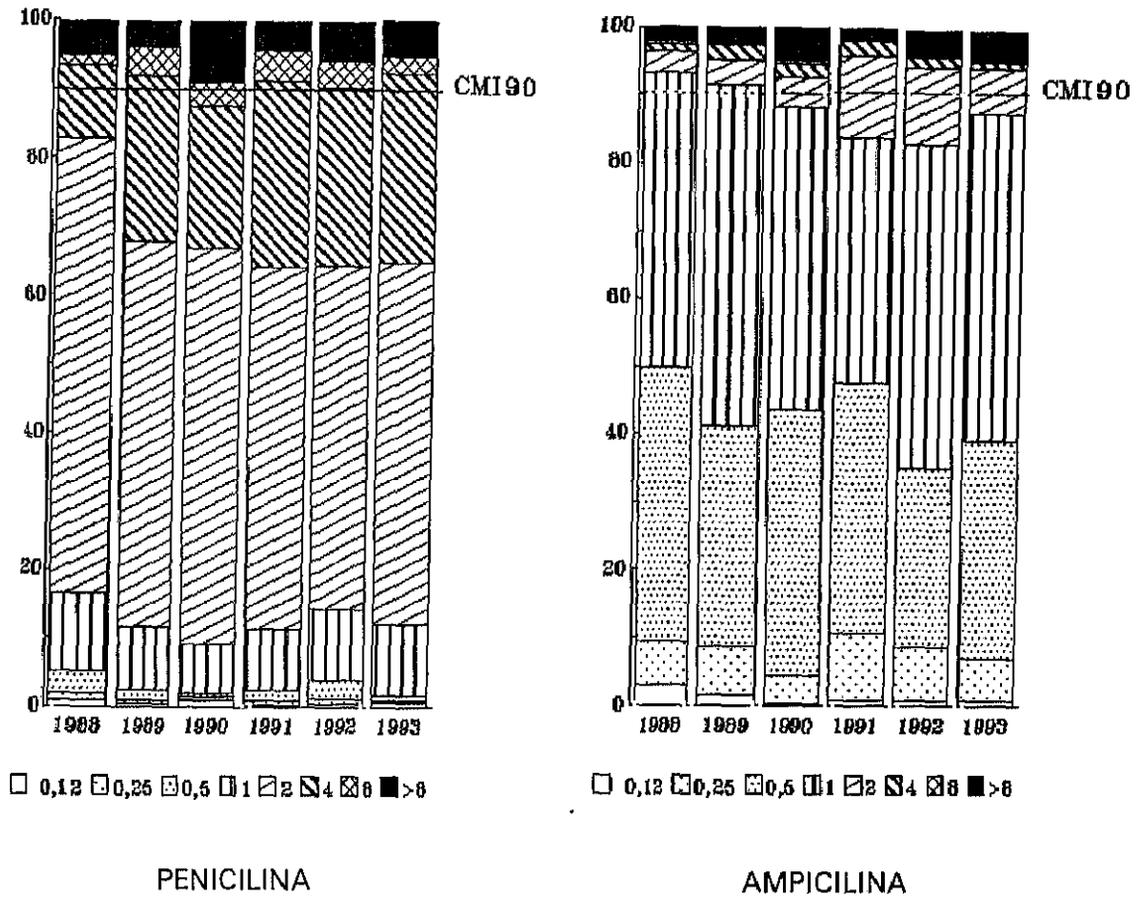
La sensibilidad para ampicilina en el período 1988-1993 se mantiene entre el 98 y 95%; la evolución de las cepas resistentes fue de una ligera tendencia al alza

Tabla 3.2. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a penicilina en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
$\leq 0,12$	1,00	0,41	0,91	0,13	0,42	0,63
0,25	1,00	0,41	0,61	0,83	0,84	0,38
0,5	3,01	1,66	0,30	1,52	2,74	0,75
1	11,37	9,16	7,33	8,90	10,32	10,15
2	66,55	56,25	57,79	52,98	50,11	53,01
4	10,77	24,16	20,79	27,12	25,79	27,44
8	3,14	4,16	3,36	4,45	4,11	2,51
> 8	3,20	3,75	8,86	4,17	5,68	5,14

hasta alcanzar el máximo observado en 1990, disminuyendo bruscamente en 1991 a un mínimo de 1,66%, restaurándose la tendencia alcista en 1992. No obstante, se advierte una suave pérdida de actividad de ampicilina, así las cepas con CMI $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ han disminuido gradualmente desde el 93,57% de 1988 hasta el 83,06% de 1992, truncándose esta tendencia en 1993 que fueron el 87,85%.

En la Figura 3.1, Tabla 3.3, y Tabla 3.7 se observa que penicilina es ligeramente menos activa que ampicilina, presentando el conjunto de las cepas una CMI₉₀ de 4 $\mu\text{g/ml}$ frente a los 2 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. La evolución para penicilina de la sensibilidad es semejante a la descrita para ampicilina, excepto en lo referente a 1991 en el que se produce una disociación entre la tasa de resistencia a ampicilina y penicilina.



PENICILINA

AMPICILINA

Figura 3.1. Diagrama de la distribución de las CMI de los aislados de enterococo frente a penicilina y ampicilina.

Tabla 3.3. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a ampicilina en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
$\leq 0,12$	3,01	1,66	0,30	0,83	0,74	0,88
0,25	6,35	7,08	4,28	9,87	8,00	6,14
0,5	40,46	32,50	39,14	37,13	26,32	32,33
1	43,47	50,41	44,64	36,16	48,00	48,50
2	3,34	3,75	4,58	12,10	11,37	6,77
4	1,00	2,08	1,83	2,08	1,68	0,88
8	0,33	0,00	0,61	0,13	0,20	0,62
> 8	2,00	2,50	4,58	1,66	3,68	3,88

Tabla 3.4. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a ampicilina/sulbactam en el período 1989 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
$\leq 4/2$	ND	97,08	94,66	97,89	95,89	95,11
8/4	ND	0,41	0,70	0,15	1,00	0,87
16/8	ND	0,41	0,84	0,69	0,95	0,50
$> 16/8$	ND	2,08	3,66	1,25	2,11	3,51

La sensibilidad de los enterococos a la asociación ampicilina/ sulbactam evolucionó con un patrón equivalente al de ampicilina (Tabla 3.4). Las cepas resistentes a ampicilina, también lo fueron a la asociación de ampicilina/ sulbactam. Aunque no podemos descartar absolutamente la presencia de cepas con resistencia a β -lactámicos mediada por β -lactamasas, parece improbable su implicación.

La tasa de sensibilidad a fosfomicina (CMI $\leq 32 \mu\text{g/ml}$) (Tabla 3.5) se encontró entre el 81,94% de 1990 y el 93,24% de 1991, siendo en el último año del 85,9%. La CMI₅₀ fue durante todo el período de $32 \mu\text{g/ml}$ y la CMI₉₀ de $64 \mu\text{g/ml}$, excepto en el año 1991 que fue de $32 \mu\text{g/ml}$ (Tabla 3.7).

Tabla 3.5. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a fosfomicina en el período 1989 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 16	ND	37,08	37,91	48,88	31,70	34,64
32	ND	46,66	44,03	44,36	54,64	51,26
64	ND	10,41	13,45	4,86	10,78	9,68
128	ND	3,75	1,52	1,11	0,50	2,00
> 128	ND	2,08	3,05	0,83	2,38	2,42

Tabla 3.6. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a vancomicina en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 1	52,84	60,00	56,88	63,42	68,32	ND
2	44,14	36,66	38,83	34,21	30,21	98,37
4	2,34	2,50	2,14	1,25	1,26	0,63
8	0,00	0,41	0,30	0,55	0,11	0,00
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
> 16	0,66	0,41	1,83	0,55	0,11	1,00

Tabla 3.7. Relación de las CMI₅₀ y CMI₉₀ para los antibióticos que actúan en la pared celular.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
ANTIBIOTICO						
PENICILINA						
CMI ₅₀	2	2	2	2	2	2
CMI ₉₀	4	4	8	4	4	4
RANGO	≤0,12->8	≤0,12->8	≤0,12->8	≤0,12->8	≤0,12->8	≤0,12->8
AMPICILINA						
CMI ₅₀	1	1	1	1	1	1
CMI ₉₀	1	1	2	2	2	2
RANGO	≤0,12->8	≤0,12->8	≤0,12->8	≤0,12->8	≤0,12->8	≤0,12->8
AMPICILINA/ SULBACTAM						
CMI ₅₀	ND	≤4/2	≤4/2	≤4/2	≤4/2	≤4/2
CMI ₉₀	ND	≤4/2	≤4/2	≤4/2	≤4/2	≤4/2
RANGO		≤4/2->16/8	≤4/2->16/8	≤4/2->16/8	≤4/2->16/8	≤4/2->16/8
FOSFOMICINA						
CMI ₅₀	ND	32	32	32	32	32
CMI ₉₀	ND	64	64	32	64	64
RANGO		≤16->128	≤16->128	≤16->128	≤16->128	≤16->128
VANCOMICINA						
CMI ₅₀	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 2
CMI ₉₀	2	2	2	2	2	≤ 2
RANGO	≤1->16	≤1->16	≤1->16	≤1->16	≤1->16	≤2->16

La resistencia a vancomicina, Tabla 3.6, se mantuvo próxima al 1% en cada uno de los períodos estudiados. Únicamente se produjeron de forma estacional aislamientos de cepas resistentes a vancomicina. Los aislamientos con CMI entre 4 y 16 oscilan entre el 0,63 y 2,91% de los años 1993 y 1989. En la Tabla 3.7 figuran las CMI₅₀ y CMI₉₀ siendo de ≤ 1 y $2 \mu\text{g/ml}$ respectivamente durante la totalidad del período, excepto en el año 1993 que la mínima concentración estudiada fue de $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ siendo este el valor de la CMI₅₀ y CMI₉₀.

3.2.2 ANTIBIOTICOS INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE PROTEINAS: AMINOGLICOSIDOS, TETRACICLINA, CLORANFENICOL, Y MACROLIDOS

En la Tabla 3.8 se exponen los datos de sensibilidad para estreptomina 2000 $\mu\text{g/ml}$. La resistencia de alto nivel a estreptomina no sigue una tendencia clara, ya que fue aproximadamente del 30% en 1989, y 1991; del 35% en 1988, y ligeramente superior al 40% en 1990, 1992, y 1993. No disponemos de datos de la sensibilidad a gentamicina 500 $\mu\text{g/ml}$ durante el período 1988-1991, en 1992 y 1993 las cepas resistentes fueron el 32,63 y 31,95% respectivamente.

Tabla 3.8. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a estreptomina en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 2000	64,21	67,08	57,94	61,19	58,84	59,27
> 2000	35,78	32,50	42,50	29,76	41,16	40,73

La susceptibilidad de los enterococos a tetraciclina es baja, encontrándonos una CMI₉₀ para todo el período de $> 8 \mu\text{g/ml}$ (Tabla 3.12). En la Tabla 3.9 no se observan cambios destacables en los distintos períodos estudiados, manteniéndose una tasa de resistencia de aproximadamente el 70%.

Tabla 3.9. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a tetraciclina en período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 4	29,75	38,33	25,05	25,31	23,89	29,57
8	0,33	0,00	0,30	4,45	6,95	3,63
> 8	69,89	61,66	74,61	70,23	69,16	66,79

En la Tabla 3.10, se observa una progresión hacia el incremento de aislados resistentes a cloranfenicol, así en 1988 la tasa de resistencia fue del 26,75% alcanzando el 46,12% en 1993.

Se observa una tendencia hacia la disminución de la sensibilidad a eritromicina (Tabla 3.11), habiéndose incrementado un 10% el número de cepas resistentes entre 1988 y 1993, situándose la tasa de resistencia durante 1993 en el 53,01%. La sensibilidad a clindamicina no se detalla, al resultar más del 90% de las cepas resistentes (Tabla 3.12).

Tabla 3.10. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a cloranfenicol en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 8	72,24	72,50	63,30	54,52	52,32	53,88
16	1,00	0,83	2,44	0,83	1,47	0,00
> 16	26,75	26,66	34,25	44,68	46,21	46,12

Tabla 3.11. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a eritromicina en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
$\leq 0,5$	12,67	17,91	15,89	13,35	10,21	15,05
1	15,05	17,50	14,67	11,96	10,84	ND
2	18,72	13,75	10,09	10,43	10,53	25,19
4	12,04	13,75	6,42	8,48	10,00	6,77
> 4	41,47	37,08	52,90	55,77	58,42	53,01

Tabla 3.12. Relación de las CMI_{50} y CMI_{90} para los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
ANTIBIOTICO						
ESTREPTOMICINA						
CMI_{50}	≤ 2000					
CMI_{90}	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
RANGO	$\leq 2000 \cdot > 2000$					
TETRACICLINA						
CMI_{50}	> 8	> 8	> 8	> 8	> 8	> 8
CMI_{90}	> 8	> 8	> 8	> 8	> 8	> 8
RANGO	$\leq 4 \cdot > 8$					
CLORANFENICOL						
CMI_{50}	≤ 8					
CMI_{90}	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
RANGO	$\leq 8 \cdot > 16$					
ERITROMICINA						
CMI_{50}	4	4	> 4	> 4	> 4	> 4
CMI_{90}	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4
RANGO	$\leq 0,5 \cdot > 4$					

3.2.3 INHIBIDORES DE LA SINTESIS DEL ACIDO FOLICO

El sulfisoxazol sólo es inactivo en el conjunto de cepas ensayadas. La tasa de resistencia a la asociación trimetoprim/sulfametoxazol (Tablas 3.13 y 3.14) durante 1988 y 1989 fue inferior al 6%, en 1990 y 1991 sufrió un fuerte incremento llegando a alcanzar el 19,61%, en 1992 disminuyó hasta el 9,26%, volviendo a los niveles originales (6%) en 1993.

Tabla 3.13. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a cotrimoxazol en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
$\leq 2/38$	93,29	90,83	80,41	79,41	90,32	93,86
4/76	1,00	2,91	1,52	0,27	0,42	0,63
8/152	2,67	0,83	0,91	0,69	0,00	0,00
$> 8/152$	3,01	5,41	17,12	19,61	9,26	5,51

Tabla 3.14. Relación de las CMI₅₀ y CMI₉₀ de la asociación trimetoprim sulfametoxazol.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
COTRIMOXAZOL						
CMI ₅₀	$\leq 2/38$					
CMI ₉₀	$\leq 2/38$	$\leq 2/38$	$> 8/152$	$> 8/152$	$\leq 2/38$	$\leq 2/38$
RANGO	$\leq 2/38 - > 8/152$					

3.2.4 ANTIMICROBIANOS QUE INTERACCIONAN CON LOS ACIDOS NUCLEICOS: QUINOLONAS, RIFAMPICINA Y NITROFURANTOINA

La tasa de resistencia a norfloxacin (≥ 16) se ha multiplicado por 15 en seis años, desde el 2,34% de 1988 hasta el 35,09% de 1993 (Tabla 3.15). La proporción de cepas resistentes a ciprofloxacina (CMI ≤ 2) (Tabla 3.16 y Figura 3.2) ha aumentado desde el 13,13% hasta el 38,97%, entre 1989 y 1993, aunque no se ha

observado variación en los valores de la CMI₅₀ y CMI₉₀, 1 y > 2 respectivamente durante la totalidad del período (Tabla 3.19).

La sensibilidad de los enterococos a rifampicina y nitrofurantoina se ha mantenido prácticamente constante (Tabla 3.17, 3.18, y 3.19), destacando el alto grado de sensibilidad a la nitrofurantoina, alrededor del 98%.

Tabla 3.15. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a norfloxacin en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 16	97,65	90,83	87,46	74,68	68,32	64,91
> 16	2,34	9,16	12,53	21,14	31,68	35,09

Tabla 3.16. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a ciprofloxacina en el período 1989 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 0,25	ND	5,00	4,28	7,09	6,11	ND
0,5	ND	18,75	22,93	25,31	24,63	ND
1	ND	48,75	35,77	32,12	29,58	55,26
2	ND	14,16	17,43	7,23	4,63	5,76
> 2	ND	13,13	19,57	28,23	35,05	38,97

Tabla 3.17. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a rifampicina en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 0,5	20,73	30,83	22,32	38,24	49,58	ND
1	35,45	32,50	28,74	23,92	23,37	67,79
2	22,40	15,41	19,57	14,04	10,32	12,41
> 2	21,40	21,25	29,35	23,78	16,74	19,80

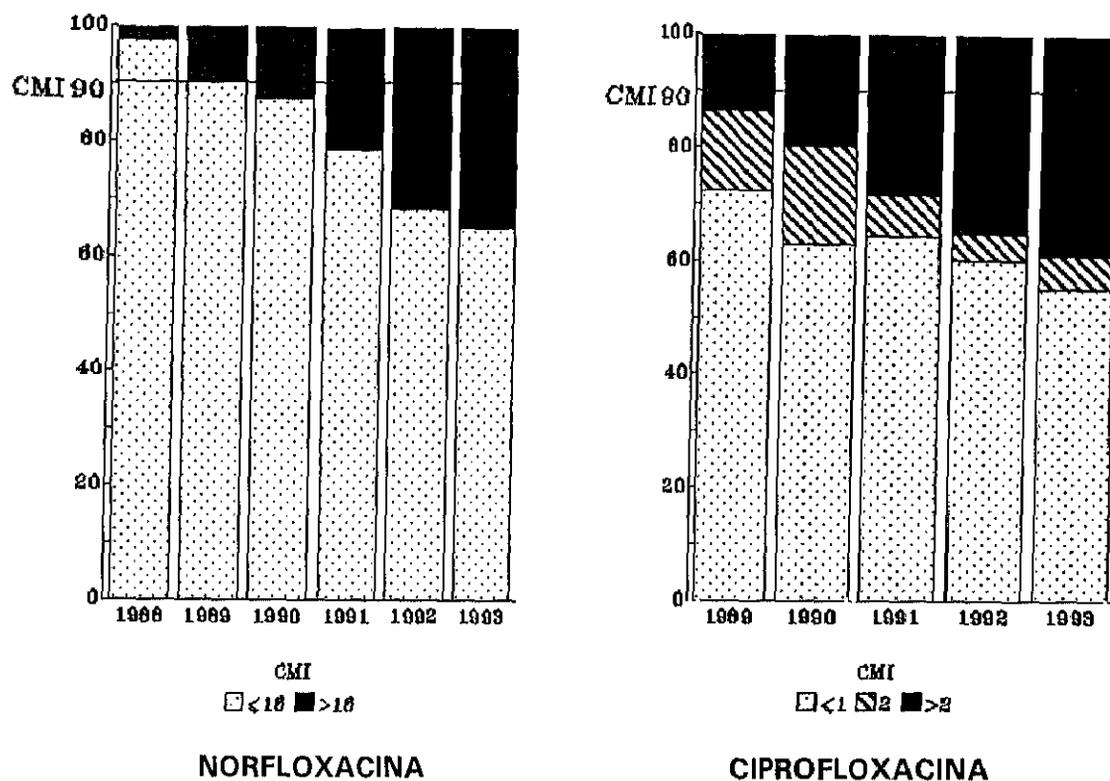


Figura 3.2. Diagrama de la distribución de las CMI de norfloxacin y ciprofloxacin.

Tabla 3.18. Distribución en porcentajes de la CMI ($\mu\text{g/ml}$) a nitrofurantofina en el período 1988 - 1993.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
AISLADOS	299	240	327	719	950	798
CMI						
≤ 64	98,32	99,58	98,16	98,88	99,47	ND
> 64	1,67	0,41	1,84	1,12	0,53	ND

Tabla 3.19. Relación de las CMI₅₀ y CMI₉₀ para los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos.

AÑO	1988	1989	1990	1991	1992	1993
ANTIBIOTICO						
NORFLOXACINA						
CMI ₅₀	≤16	≤16	≤16	≤16	≤16	≤16
CMI ₉₀	≤16	≤16	>16	>16	>16	>16
RANGO	≤16->16	≤16->16	≤16->16	≤16->16	≤16->16	≤16->16
CIPROFLOXACINA						
CMI ₅₀	ND	1	1	1	1	1
CMI ₉₀	ND	>2	>2	>2	>2	>2
RANGO		≤0,25->2	≤0,25->2	≤0,25->2	≤0,25->2	≤0,5->2
RIFAMPICINA						
CMI ₅₀	1	1	1	1	1	1
CMI ₉₀	>2	>2	>2	>2	>2	>2
RANGO	≤0,5->2	≤0,5->2	≤0,5->2	≤0,5->2	≤0,5->2	≤1->2
NITROFU- RANTOINA						
CMI ₅₀	≤64	≤64	≤64	≤64	≤64	ND
CMI ₉₀	≤64	≤64	≤64	≤64	≤64	ND
RANGO	≤64->64	≤64->64	≤64->64	≤64->64	≤64->64	

3.3 SENSIBILIDAD DE LOS ENTEROCOCOS RESISTENTES A VANCOMICINA A LOS ANTIMICROBIANOS

3.3.1 SENSIBILIDAD A β-LACTAMICOS, GLICOPEPTIDOS Y LIPOGLICOPEPTIDOS

Las cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina fueron sensibles a los antibióticos β-lactámicos; el producto más activo fue ampicilina, seguido de imipenem, penicilina, piperacilina, y meropenem (Tabla 3.16). Los aislados de *E. faecalis* presentaron una CMI homogénea para ampicilina (0,5-1 µg/ml); las cepas menos sensibles fueron *E. faecium* RYC37509 y *E. avium* SON144, con CMI para ampicilina de 2 y 4 µg/ml respectivamente.

La resistencia a vancomicina y teicoplanina fue de alto nivel para todas las cepas, vancomicina resultó ser ocho veces menos activa que teicoplanina (Tabla 3.17); la cepa más resistente fue *E. avium* SON144. Todas las cepas resultaron sensibles a daptomicina.

Tabla 3.16. *Enterococcus* resistentes a vancomicina, y *E. faecalis* JH2-2, CMI de antibióticos β -lactámicos ($\mu\text{g/ml}$).

Cepa N°	PEN*	AMP*	AMP* /SUL	PIP	IMI	MER
<i>E. faecalis</i> JH2-2	1	0,5	$\leq 4/2$	≤ 4	0,5	2
<i>E. faecium</i> RYC37509	≥ 8	2	$\leq 4/2$	≤ 4	8	16
<i>E. faecalis</i> RYC44749	2	0,5	$\leq 4/2$	≤ 4	0,5	2
<i>E. faecalis</i> PE282	1	0,5	$\leq 4/2$	≤ 4	0,5	2
<i>E. faecalis</i> PE435	1	0,5	$\leq 4/2$	≤ 4	0,5	2
<i>E. faecalis</i> PE477	1	0,5	$\leq 4/2$	≤ 4	0,5	2
<i>E. faecalis</i> PE491	1	0,5	$\leq 4/2$	≤ 4	0,5	2
<i>E. faecalis</i> MT77628	2	0,5	$\leq 4/2$	≤ 4	1	8
<i>E. faecalis</i> MT77693	2	1	$\leq 4/2$	≤ 4	2	8
<i>E. avium</i> SON144	2	4	$\leq 4/2$	16	1	2

* CMI determinada con sistema PASCO

Williamson y cols. observaron la disminución de la CMI a vancomicina en presencia de NaCl al 7% en un *E. faecium* de fenotipo VanB (258); con objeto de conocer si este efecto tenía lugar con las cepas de nuestro estudio, determinamos la CMI a vancomicina en presencia de NaCl al 7%. Como Williamson y cols. observamos una disminución considerable en las CMI frente a vancomicina.

Tabla 3.17. *Enterococcus* resistentes a vancomicina, y *E. faecalis* JH2-2, CMI de antibióticos glicopeptídicos y lipoglicopeptídicos ($\mu\text{g/ml}$).

Cepa N°	VAN	TEI	DAP	V/NaCl*	T/NaCl*
<i>E. faecalis</i> JH2-2	4	0,5	2	ND	ND
<i>E. faecium</i> RYC37509	512	64	4	64	2
<i>E. faecalis</i> RYC44749	512	64	2	64	1
<i>E. faecalis</i> PE282	512	64	4	128	2
<i>E. faecalis</i> PE435	512	32	4	64	1
<i>E. faecalis</i> PE477	512	32	2	32	0,25
<i>E. faecalis</i> PE491	512	32	2	32	0,5
<i>E. faecalis</i> MT77628	512	128	2	64	1
<i>E. faecalis</i> MT77693	512	64	4	64	1
<i>E. avium</i> SON144	2048	128	2	ND	ND

* CMI de vancomicina y teicoplanina con NaCl 7% en el medio

3.3.2 ACTIVIDAD DE 10 ANTIBIOTICOS DE DIFERENTES GRUPOS

Como se puede observar en la Tabla 3.18, ninguna cepa presentó resistencia a cloranfenicol, norfloxacina, ciprofloxacina, cotrimoxazol, nitrofurantoína, y de alto nivel a estreptomina. La sensibilidad a fosfomicina fue variable. La mayoría de las cepas fueron resistentes a tetraciclina y eritromicina.

Tabla 3.18. *Enterococcus* resistentes a vancomicina, y *E. faecalis* JH2-2, CMI de fosfomicina, tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, estreptomina, rifampicina, norfloxacina, ciprofloxacina, nitrofurantoína, y cotrimoxazol ($\mu\text{g/ml}$).

Cepa N°	FOS	TET	ERM	CM	STR	RIF	NOR	CIP	ND	SXT*
<i>E. faecalis</i> JH2-2	16	1	0,5	≤ 8	≤ 2000	> 4	≤ 16	2	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. faecium</i> RYC37509	32	≥ 8	≥ 4	≤ 8	≤ 2000	$\leq 0,5$	≤ 16	0,5	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. faecalis</i> RYC44749	16	≥ 8	≥ 4	≤ 8	≤ 2000	2	≤ 16	1	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. faecalis</i> PE282	32	$\leq 0,5$	≥ 4	≤ 8	≤ 2000	4	≤ 16	2	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. faecalis</i> PE435	16	≥ 8	≥ 4	≤ 8	≤ 2000	1	≤ 16	1	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. faecalis</i> PE477	16	≥ 8	≥ 4	≤ 8	≤ 2000	1	≤ 16	1	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. faecalis</i> PE491	32	≥ 8	≥ 4	≤ 8	≤ 2000	1	≤ 16	1	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. faecalis</i> MT77628	≥ 128	4	≥ 4	≤ 8	≤ 2000	≥ 2	≤ 16	2	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. faecalis</i> MT77693	128	≥ 8	≥ 4	≤ 8	≤ 2000	2	≤ 16	2	≤ 64	$\leq 0,5$
<i>E. avium</i> SON144	32	$\leq 0,5$	0,5	≤ 8	≤ 2000	$\leq 0,5$	≤ 16	0,5	≤ 64	$\leq 0,5$

CMI realizadas con sistema PASCO

* SXT el valor $\leq 0,5$ se corresponde con la concentración $\leq 0,5/9,5$

3.3.3 ASOCIACION D-CICLOSERINA Y VANCOMICINA

La proteína VanA es una enzima α -hidroxiácido-D-alanil ligasa que actúa en presencia de vancomicina en vez de la D-alanil-D-alanil-ligasa, siendo ésta última enzima inhibida por D-cicloserina, realizamos estudios de sinergia entre vancomicina y D-cicloserina.

A partir de los datos de la Tabla 3.19 se deduce que la asociación de D-cicloserina y vancomicina es antagónica en las cepas *E. faecalis* RYC44749, *E. faecium* RYC37509, y *E. avium* SON144. El índice $FIC_{vancomicina}$ es uno para las tres cepas independientemente de la concentración de D-cicloserina. El índice $FIC_{D-cicloserina}$ es diferente según las cepas probadas y las concentraciones de vancomicina, aunque en todas las ocasiones resultó como mínimo igual a 1, por tanto el índice para la asociación resultó siempre mayor o igual 2 (antagonismo)(137).

La CMI de D-cicloserina se incremento hasta dos y tres veces en las cepas RYC44749 y RYC37509 respectivamente, a medida que se incrementó la concentración de vancomicina, no se observó variación con la cepa *E. avium* SON144. La CMI de vancomicina permaneció constante independientemente de las concentraciones de D-cicloserina en asociación.

Tabla 3.19. Isoblograma de la asociación vancomicina/D-cicloserina.

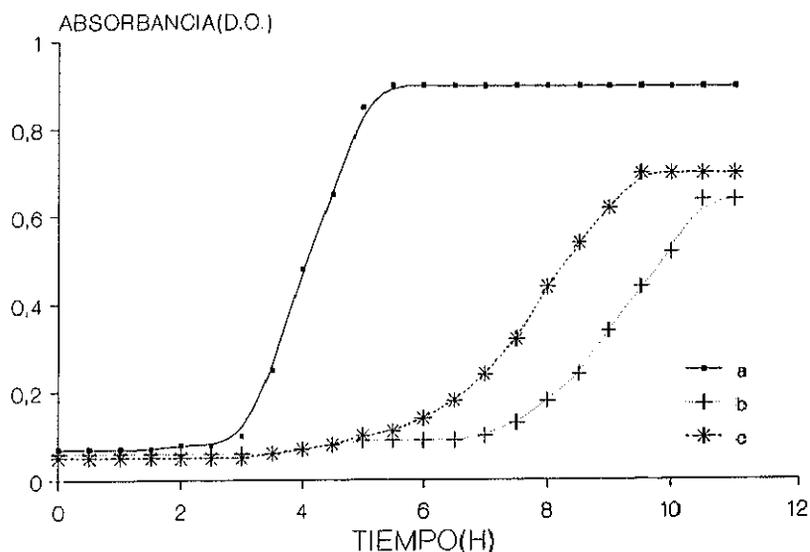
[VAN] $\mu\text{g/ml}$	CMI D-CICLO/ $FIC_{D-cicloserina}$		
	RYC44749	RYC37509	SON144
0	64 / 1	32 / 1	1024 / 1
8	64 / 1	32 / 1	1024 / 1
16	64 / 1	32 / 1	1024 / 1
32	64 / 1	64 / 2	1024 / 1
64	128 / 2	64 / 2	1024 / 1
128	128 / 2	128 / 3	1024 / 1
256	128 / 2	128 / 3	1024 / 1
512			1024 / 1

3.4 INDUCIBILIDAD DE LA RESISTENCIA A GLICOPEPTIDOS

En las figuras 3.3, 3.4, y 3.5 se representan las curvas de crecimiento de las cepas *E. faecalis* RYC44749, *E. faecium* RYC37509, y *E. avium* SON144. Las curvas de crecimiento de las cepas de *E. faecalis* PE282, PE435, PE477, PE491, MT77628, y MT77693; y del transconjugante JVR-2, fueron equivalentes a las obtenidas para las cepas RYC44749 y RYC37509, y por ello no se representan.

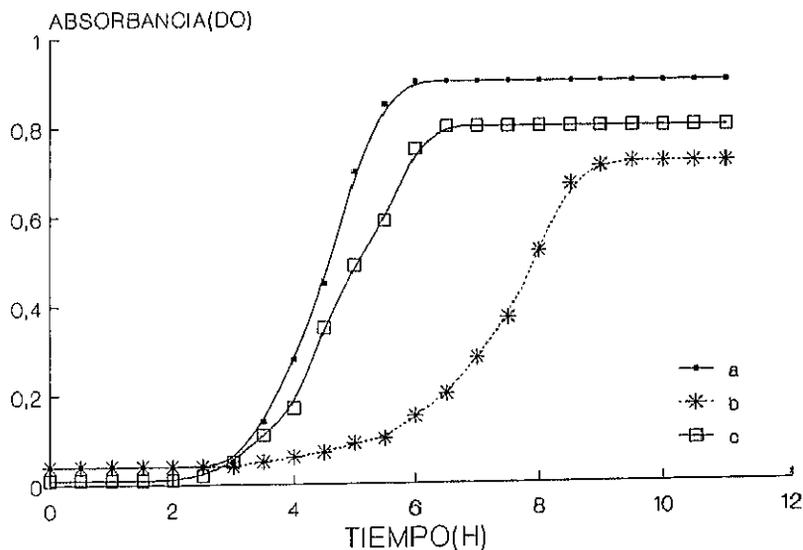
En todas las cepas, excepto el aislado *E. avium* SON144, se observó que el período de latencia fue mayor cuando el preinóculo procedía de un caldo sin antibiótico que cuando éste provenía de un cultivo crecido con vancomicina. La resistencia de las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* a vancomicina debe ser inducible ya que se expresa antes en las células crecidas previamente con el antibiótico. La velocidad de crecimiento de las células en presencia de vancomicina fue algo menor, así como la DO máxima alcanzada. La resistencia fue constitutiva en la cepa *E. avium* SON144 que presentó el mismo tiempo de latencia cuando el preinóculo provenía de caldo con y sin vancomicina.

Figura 3.3. Curva de crecimiento de la cepa *E. faecalis* RYC44749, en presencia y ausencia de vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$), a partir de preinóculos con y sin vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$).



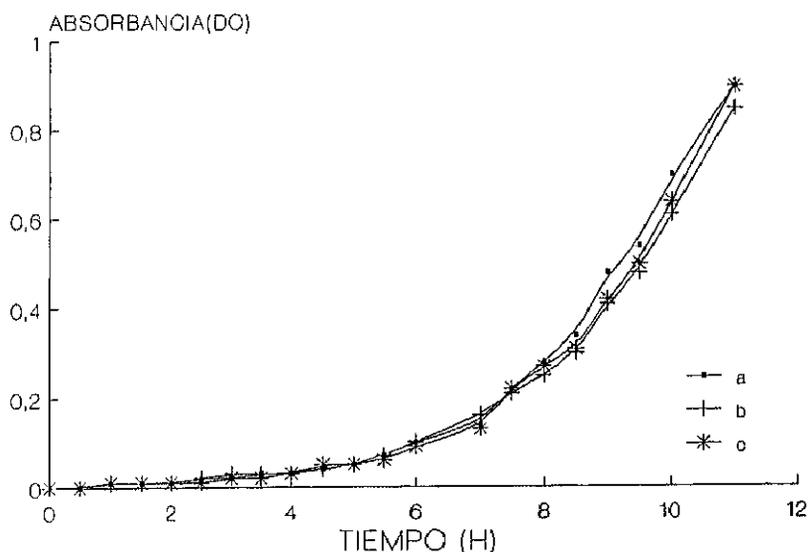
- a- preinóculo con vancomicina; crecimiento en caldo BHI sin vancomicina
- b- preinóculo con vancomicina; crecimiento en caldo BHI con vancomicina
- c- preinóculo sin vancomicina; crecimiento en caldo BHI con vancomicina

Figura 3.4. Curva de crecimiento de la cepa *E. faecium* RYC37509, en presencia y ausencia de vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$), a partir de preinóculos con y sin vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$).



- a- preinóculo con vancomicina; crecimiento en caldo BHI sin vancomicina
- b- preinóculo con vancomicina; crecimiento en caldo BHI con vancomicina
- c- preinóculo sin vancomicina; crecimiento en caldo BHI con vancomicina

Figura 3.5. Curva de crecimiento de la cepa *E. avium* SON144, en presencia y ausencia de vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$), a partir de preinóculos con y sin vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$).



- a- preinóculo con vancomicina; crecimiento en caldo BHI sin vancomicina
- b- preinóculo con vancomicina; crecimiento en caldo BHI con vancomicina
- c- preinóculo sin vancomicina; crecimiento en caldo BHI con vancomicina

3.5 ANALISIS DE PROTEINAS

3.5.1 ANALISIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DE EXTRACTOS CRUDOS

Los extractos crudos de las cepas *E. avium* SON144, *E. faecium* RYC37509, y *E. faecalis* RYC44749, crecidos con y sin vancomicina 50 $\mu\text{g/ml}$, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%; en la Figura 3.9 se puede observar una banda de peso aproximado de 39,8 KD en las cepas RYC37509 y RYC44749 que sólo es apreciable cuando estuvieron crecidas con vancomicina. No se observaron diferencias en el perfil de proteínas totales de la cepa SON144 con y sin vancomicina.

Con objeto de examinar con mayor exactitud el gel de poliacrilamida fue analizado con el densitómetro EC 910 Transmission Densitometer, con ayuda del programa Zeineh Software 1-D Scanner. En la Figura 3.6 se representa *E. avium* SON144 con y sin vancomicina, y el perfil obtenido es equivalente (no igual debido a una fisura producida durante el proceso de secado). En las Figuras 3.7 y 3.8 se representan los perfiles de proteínas de las cepas RYC37509 y RYC44749 crecidos con y sin vancomicina, generados a partir de las DO leídas por el densitómetro, en ambas cepas se distingue la aparición de una nueva banda en presencia de vancomicina.

El peso aproximado de la nueva proteína fue de 39,8 KD, de acuerdo con el cálculo por intrapolación a una recta construída a partir de la distancia recorrida por el patrón de pesos moleculares, las distancias recorridas por cada proteína se midieron con ayuda del densitómetro.

Los extractos crudos de las cepas PE282, PE435, PE477, PE491, MT77628, y MT77693, crecidos con y sin vancomicina, se corrieron en geles de poliacrilamida al 12% en la Figura 3.10 se observa débilmente una nueva banda a la altura de 39 KD.

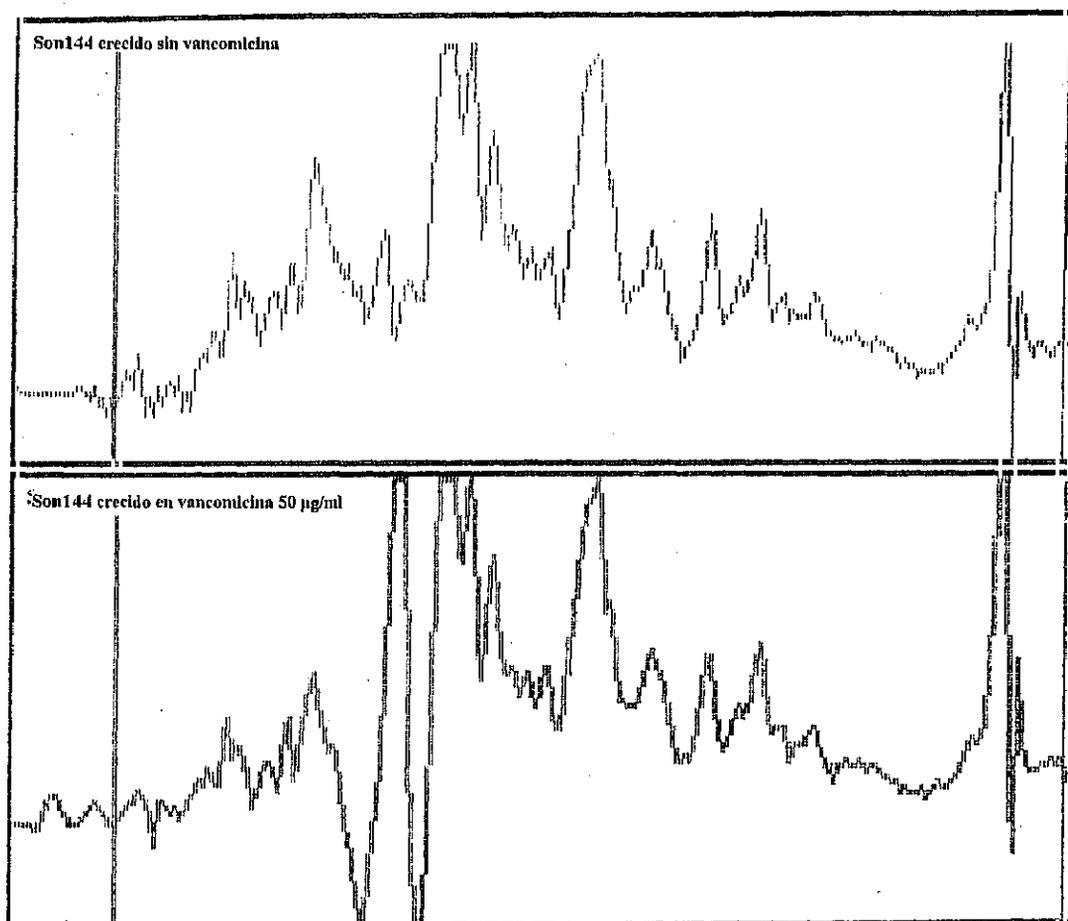


Figura 3.6. Perfil de proteínas leído por el densitómetro de *E. avium* SON144 con y sin vancomicina.

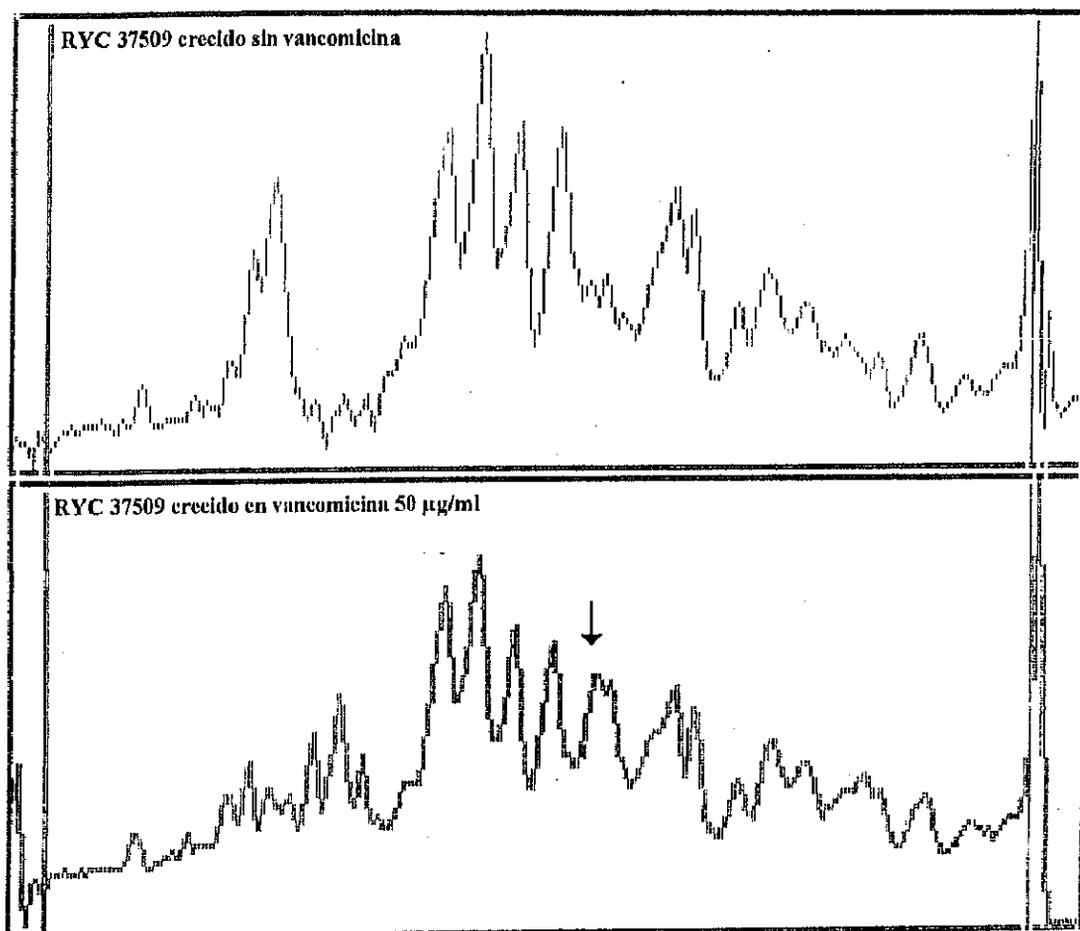


Figura 3.7. Perfil de proteínas leído por el densitómetro de *E. faecium* RYC37509 con y sin vancomicina.

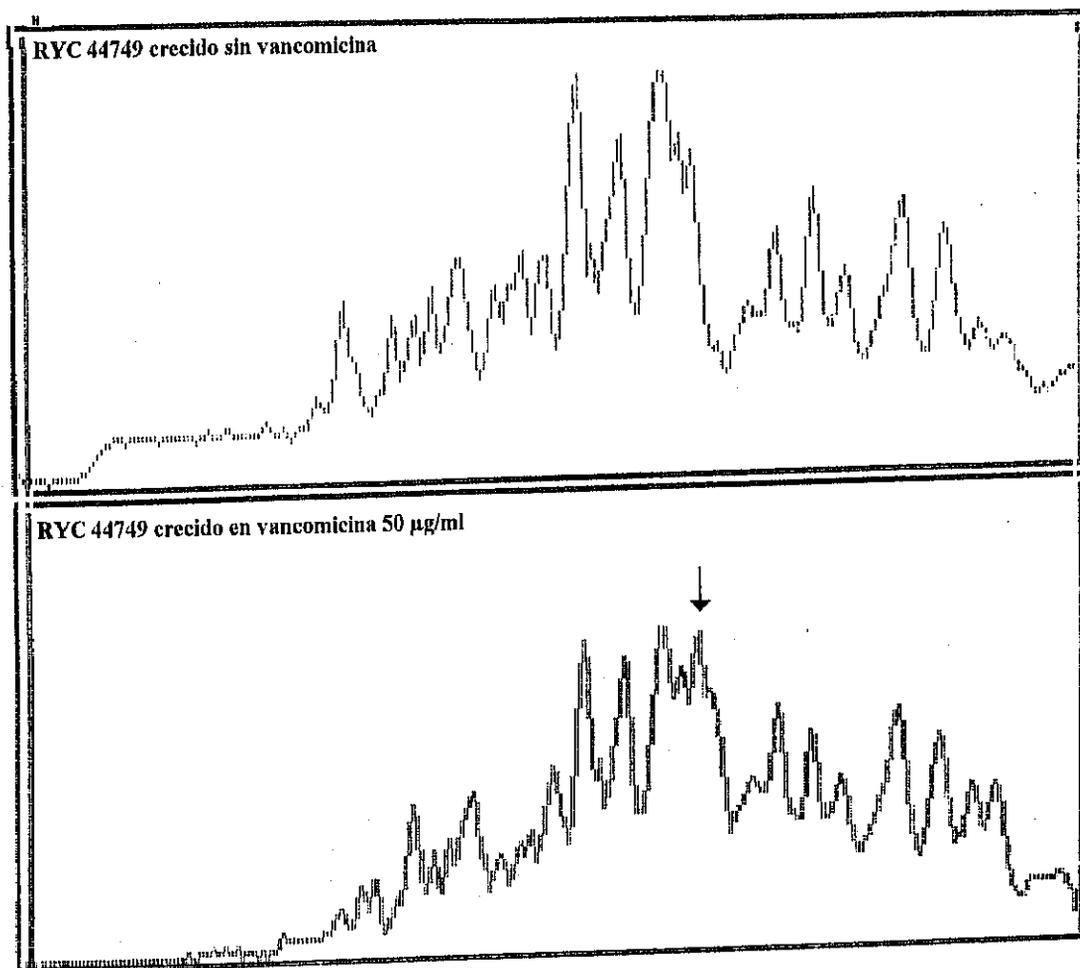


Figura 3.8. Perfil de proteínas leído por el densitómetro de *E. faecalis* RYC44749 con y sin vancomicina.

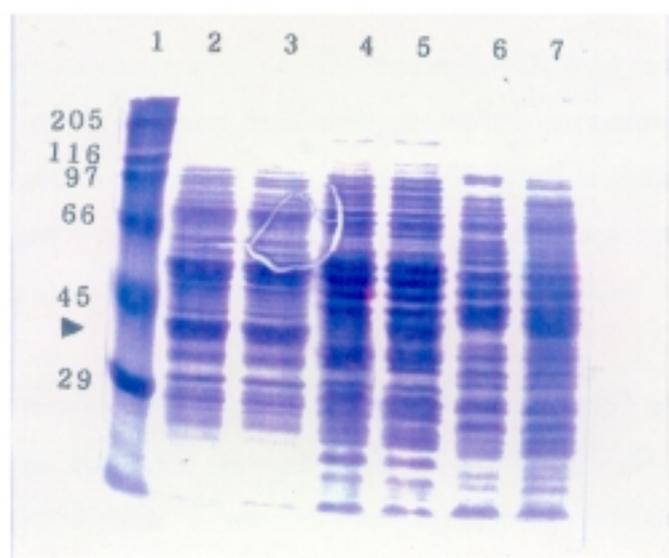
3.5.2 PRODUCCIÓN DE ANTISUERRO ANTI-39KD₂

Figura 3.9. Gel de poliacrilamida al 12% de extractos crudos de las cepas *E. avium* SON144 (carriles 3 y 2), *E. faecalis* RYC44749 (carriles 7 y 6) y *E. faecium* RYC37509 (carriles 5 y 4) crecidas con y sin vancomicina 50 µg/ml. Carril 1 patrón de peso molecular.

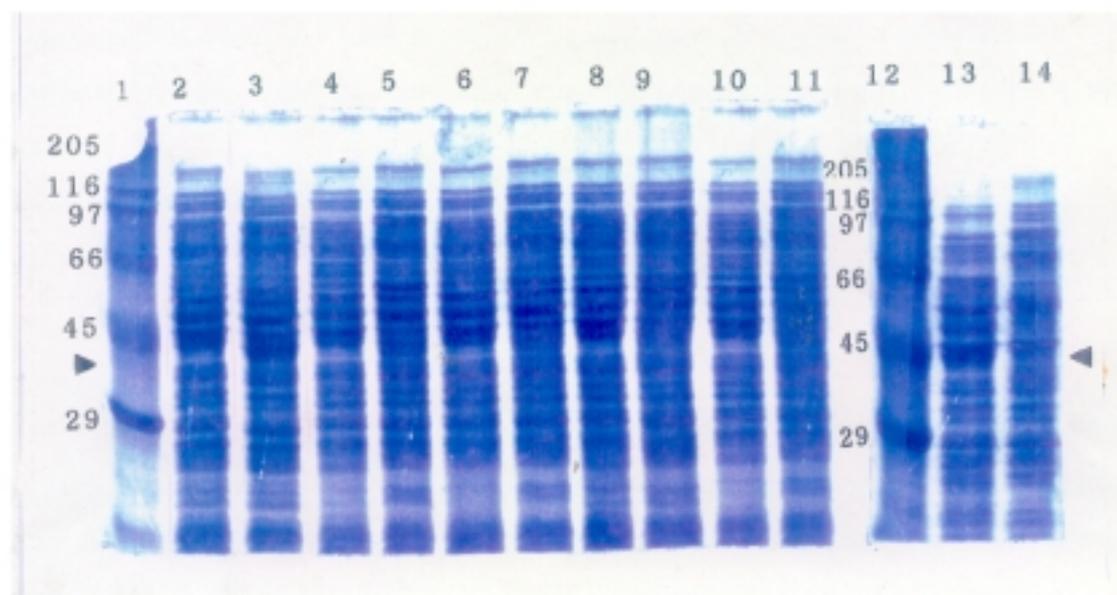


Figura 3.10. Geles de poliacrilamida al 12% de extractos crudos de las distintas cepas crecidas con y sin vancomicina (50 µg/ml). En paréntesis figuran los carriles, PE282 (13 (VAN) y 14), PE435 (2 y 3 (VAN)), PE477 (4 y 5 (VAN)), PE491 (6 y 7 (VAN)), MT77628 (8 y 9 (VAN)), y MT77693 (10 y 11 (VAN)), patrón de peso molecular (1 y 12).

3.5.2 PRODUCCION DE ANTISUERO ANTI-39KDa

Llevamos a cabo la inmunización de conejos de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.5.5, con la finalidad de poseer una herramienta que nos facilitase la observación de la proteína VanA en las cepas resistentes a vancomicina y para comprobar si la cepa de *E. avium* SON144, de fenotipo distinto a los descritos (48), posee alguna proteína inmunológicamente relacionada con VanA.

El antisuero obtenido reconocía inicialmente múltiples proteínas; tras los sucesivos procesos de absorción se consiguió la eliminación de anticuerpos no relacionados con la resistencia a vancomicina. Cuando se enfrentó el antisuero parcialmente purificado a la membrana Immobilon PVDF, con los extractos de la cepa JVR-2 crecida con y sin vancomicina, reconoció especialmente una banda de peso aproximado 39 KD en el carril donde se corrió la cepa crecida con vancomicina y no se reconocieron bandas en ausencia del antibiótico. De acuerdo con la literatura (59, 213) es coherente sugerir que la banda de 39,8 KD que aparece en las cepas en presencia de vancomicina y que no está presente en ausencia de la misma corresponda a la proteína VanA, y por tanto el antisuero obtenido que reconoce esa banda sería anti VanA.

3.5.3 ANALISIS DE LAS CEPAS CON EL ANTISUERO ANTI-39KDa

Como podemos observar en los diferentes "inmunoblot" realizados, Figuras 3.11.A, 3.11.B, y 3.12 las cepas de *E. faecalis* RYC44749, PE282, PE435, PE477, PE491, MT77628, y MT77693 el antisuero anti-39KDa reconoce la banda de 39 KD en todas las cepas cuando están crecidas en presencia de vancomicina. Las cepas crecidas sin vancomicina pueden poseer pequeñas cantidades de la proteína VanA como se observa en los "inmunoblotting" de las cepas PE435, y PE282 (Figura 3.11.B).

El antisuero reconoce dos bandas en la cepa *E. faecium* RYC37509 (Figura 3.9.A), una de aproximadamente 39 KDa, y otra de menor peso (aproximadamente 30 KD) presente independientemente de la presencia de vancomicina. Esta banda no debe estar relacionada con la resistencia ya que la cepa *E. faecalis* JVR-1, transconjugante de *E. faecium* RYC37509, no la presenta. Además, en otro estudio realizado por nosotros, el antisuero anti VanA también reconoce una banda de 30 KDa en *E. faecium* resistentes a vancomicina procedentes de aguas residuales (234).

Los extractos crudos de *E. avium* SON144 no son reconocidos por el antisuero anti-39KDa cuando fueron crecidos con o sin vancomicina (Figura 3.11.A).



Figura 3.9. A Antisuero anti 39KDa (concentración final 1/200) frente cepas de las tres especies estudiadas, crecidas en presencia de vancomicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y sin ella. Carriles: 1- JH2-2, 2- SON144 (VAN), 3- SON144, 4- RYC37509 (VAN), 5- RYC37509, 6-RYC44749 (VAN), 7-RYC44749.

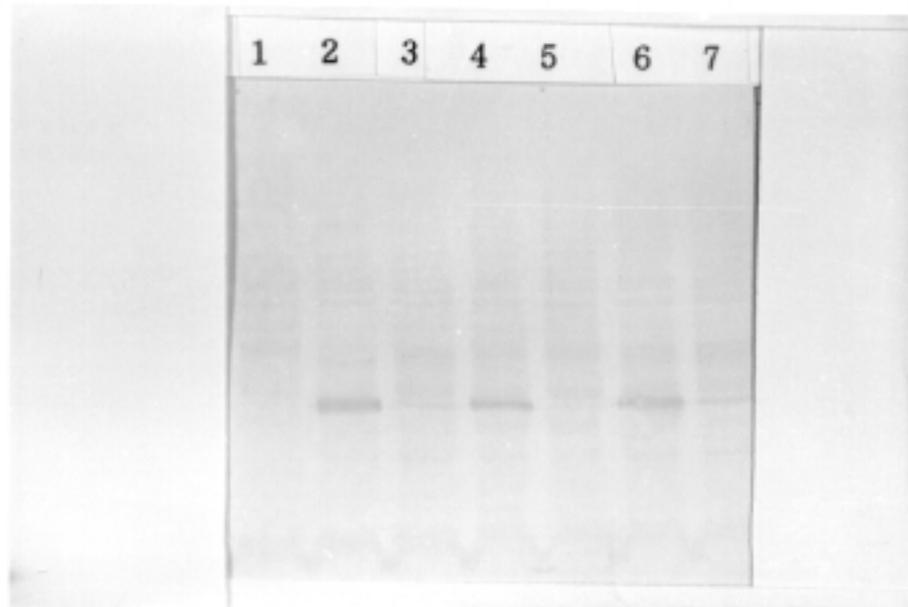


Figura 3.9. B. Antisuero anti 39KDa (concentración final 1/200) frente a las diferentes cepas estudiadas crecidas con y sin vancomicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Carriles 1-JH2-2, 2-PE477 (VAN), 3-PE477, 4-PE435(VAN), 5-PE435, 6-PE282(VAN), 7-PE282.

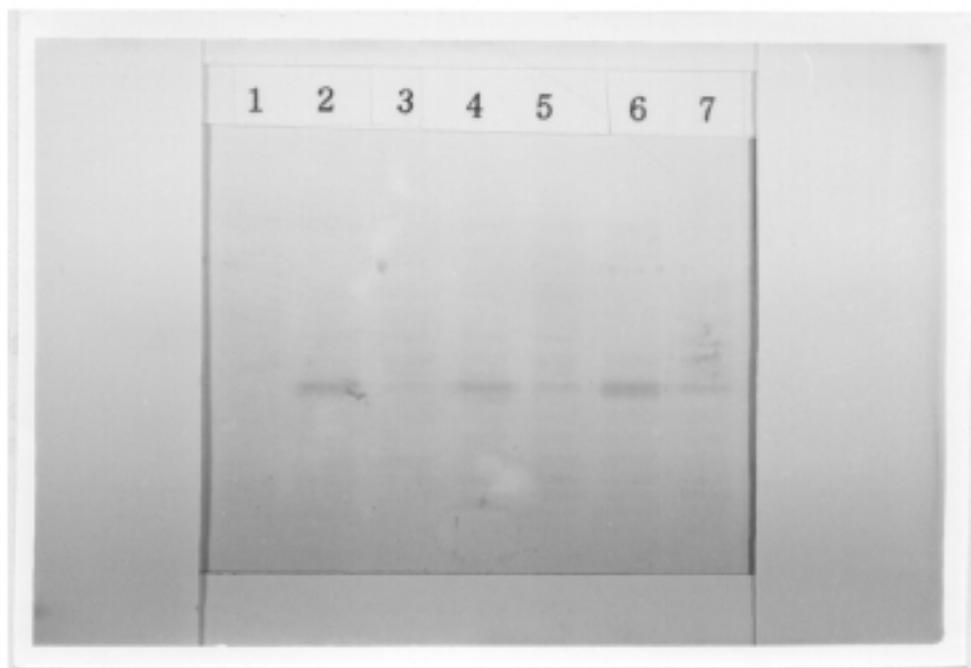


Figura 3.10. Antisuero anti 39KDa (concentración final 1/200) frente a las diferentes cepas estudiadas crecidas con y sin vancomicina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Carriles 1-JH2-2, 2-PE491(VAN), 3-PE491, 4-MT77693(VAN), 5-MT77693, 6-MT77628 (VAN), 7-MT77628.

3.5.4 INDUCIBILIDAD DE LA PROTEINA VanA POR ANTIBIOTICOS

Se estudió la capacidad inductora de antibióticos que actúan a nivel de la síntesis de la pared celular, diferentes de vancomicina. La cepa *E. faecalis* RYC44749 fue crecida en presencia de concentraciones subinhibitorias de ampicilina (0,25 $\mu\text{g/ml}$), fosfomicina (4 $\mu\text{g/ml}$), D-cicloserina (16 $\mu\text{g/ml}$), daptomicina (2 $\mu\text{g/ml}$) y teicoplanina (32 $\mu\text{g/ml}$). En la Figura 3.11 se observa en el "immunoblot" que sólo indujeron la producción de VanA los antibióticos glicopeptídicos vancomicina y teicoplanina, mientras que ampicilina, D-cicloserina, fosfomicina, y daptomicina resultaron no inductores.

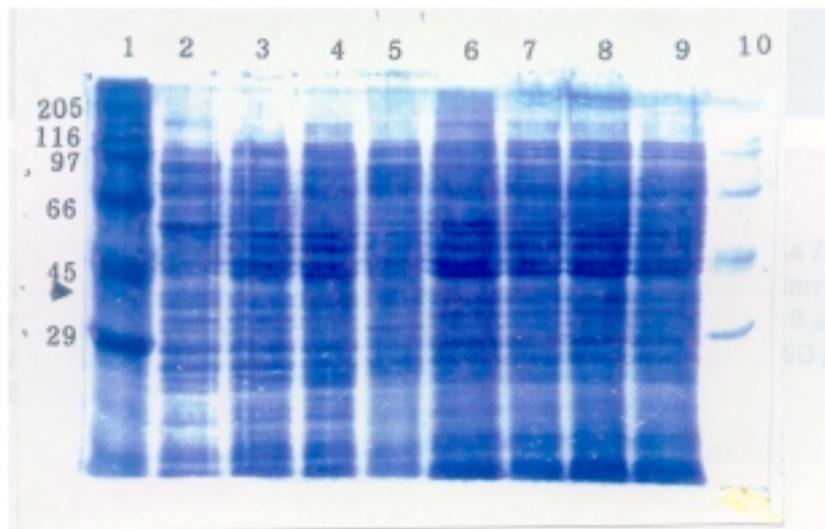


Figura 3.11.A. Gel de poliacrilamida al 12% de extractos proteicos de RYC44749 crecidos previamente con antibióticos Carriles: 1 y 10- patrón de peso molecular, 2- JH2-2 (control negativo), 3- RYC44749 sin antibióticos, 4- con vancomicina 50 $\mu\text{g/ml}$, 5- con teicoplanina 32 $\mu\text{g/ml}$, 6- con daptomicina 2 $\mu\text{g/ml}$, 7- con D-cicloserina 16 $\mu\text{g/ml}$, 8- con fosfomicina 4 $\mu\text{g/ml}$, 9- con ampicilina 0,25 $\mu\text{g/ml}$.

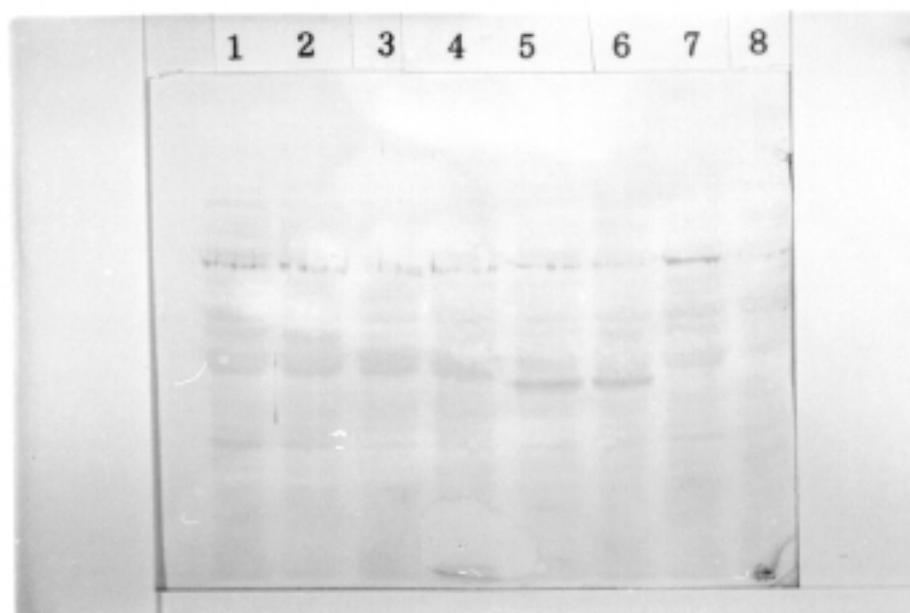


Figura 3.11.B- "Inmunoblot" de extractos proteicos de RYC44749 crecidos previamente con antibióticos revelado con antisuero Anti 39KDa. Carriles: 1- con ampicilina 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 2- con fosfomicina 8 $\mu\text{g/ml}$, 3- con D-cicloserina 16 $\mu\text{g/ml}$, 4- con daptomicina 2 $\mu\text{g/ml}$, 5- con teicoplanina 32 $\mu\text{g/ml}$, 6- con vancomicina 50 $\mu\text{g/ml}$, 7- sin antibióticos, 8- JH2-2 (control negativo).

3.5.5 ANALISIS DE PBP

Los perfiles de PBP de las estirpes *E. faecium* RYC37509 y *E. faecalis* RYC44749 son equivalentes a los de las cepas sensibles a vancomicina. La autorradiografía (Figura 3.12) reveló que la presencia de vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$) no alteró el perfil de PBP de los extractos de proteínas de membrana de ambas cepas.

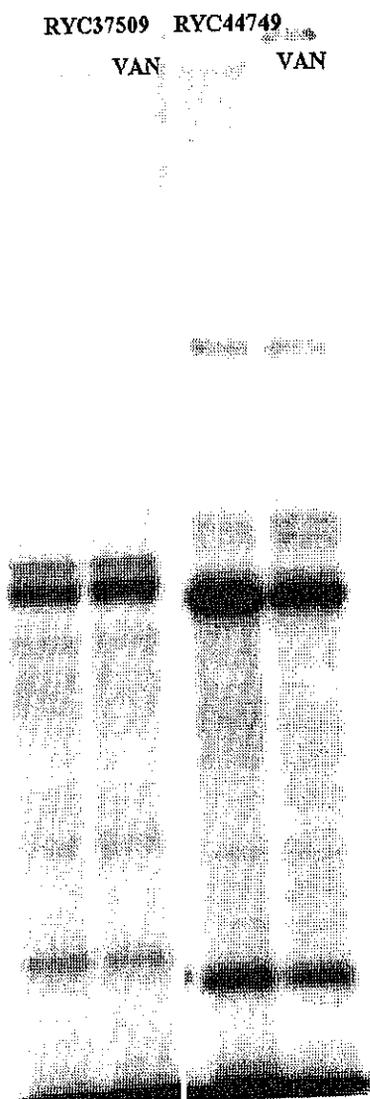


Figura 3.12. Análisis de PBP de las cepas RYC37509 y RYC44749, con y sin vancomicina.

3.6 TRANSFERENCIA POR CONJUGACION DE GENES DE RESISTENCIA

Todos los *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a vancomicina fueron capaces de transferir la resistencia por conjugación usando como receptor *E. faecalis* JH2-2. Determinamos las frecuencias de conjugación en filtro para los antibióticos: vancomicina, eritromicina y tetraciclina, los dos últimos sólo en aquellas cepas que presentaban resistencia, los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 3.20. Debido a que algunos *E. faecalis* presentaron frecuencias de conjugación muy altas, del orden de 10^{-1} , también estudiamos la frecuencia de conjugación de la resistencia a vancomicina en caldo. Los resultados revelaron que cinco de los siete *E. faecalis*

Tabla 3.20. Frecuencias de conjugación entre *E. faecalis* JH2-2 y los diferentes donantes, en filtro y caldo para los antibióticos: vancomicina, eritromicina, y tetraciclina.

CEPA DONANTE	Nº	VANCO FILTRO	VANCO CALDO	ERM FILTRO	TET FILTRO
<i>E. faecium</i>	RYC37509	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$\leq 1 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-7}$	$\leq 5 \cdot 10^{-8}$
<i>E. faecalis</i>	RYC44749	$3 \cdot 10^{-1}$	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-7}$
<i>E. faecalis</i>	PE282	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-6}$	sensible
<i>E. faecalis</i>	PE435	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$7,5 \cdot 10^{-8}$
<i>E. faecalis</i>	PE477	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-8}$
<i>E. faecalis</i>	PE491	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-7}$
<i>E. faecalis</i>	MT77628	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$8 \cdot 10^{-6}$	sensible
<i>E. faecalis</i>	MT77693	$1 \cdot 10^{-1}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^{-7}$
<i>E. avium</i>	SON144	$\leq 1 \cdot 10^{-9}$	ND	sensible	sensible

mantenían en caldo altas frecuencias de conjugación, sugiriéndonos la participación de feromonas. La estirpe RYC37509 fue la que presentó menor frecuencia de conjugación en filtro ($2,5 \cdot 10^{-6}$), y en caldo no obtuvimos transconjugantes.

E. avium SON144 no transfirió la resistencia a vancomicina en filtro ($\leq 10^{-9}$) utilizando como receptores las estirpes JH2-2 y OG1X.

Tabla 3.21. Porcentaje de cotransferencia de resistencia asociada entre tetraciclina-vancomicina, eritromicina-vancomicina, y vancomicina -eritromicina - tetraciclina, actuando como receptor *E. faecalis* JH2-2.

DONANTE	NC TET R	% CO TET-VAN	NC ERM R	% CO ERM-VAN	NC VAN R	% CO VAN-ERM	% CO VAN-TET
RYC37509	S	S	15	33	32	90	S
RYC44749	52	100	58	100	110	100	0
PE282	S	S	200	100	150	100	S
PE435	44	97	50	100	120	100	0
PE477	25	92	115	100	107	100	0
PE491	48	100	112	100	123	100	0
MT77628	S	S	80	100	112	100	S
MT77693	60	96	123	100	97	100	0

NC: numero de clones seleccionados % CO: % de cotransferencia

El 100% de los clones obtenidos en la conjugación entre JH2-2 y los aislados RYC44749, PE282, PE435, PE477, PE491, MT77628, MT77693 seleccionados en vancomicina fueron resistentes a eritromicina, y el 90 % de los obtenidos con la cepa RYC37509. No obtuvimos clones resistentes a tetraciclina en ningún caso (Tabla 3.21).

Las frecuencias de conjugación en filtro obtenidas para eritromicina fueron de un orden de magnitud menor o iguales a las obtenidas con vancomicina para cada aislado. Entre 50 y 200 transconjugantes de los aislados RYC44749, PE282, PE435, PE477, PE491, MT77628, y MT77693 obtenidos de la selección con eritromicina (10 $\mu\text{g/ml}$) se plaquearon sobre vancomicina (50 $\mu\text{g/ml}$) resultando todos resistentes a ésta. Sin embargo, sólo el 33% de los transconjugantes obtenidos con el aislado RYC37509 seleccionando con eritromicina fueron resistentes a vancomicina (Tabla 3.21).

La tetraciclina se transfirió con menor frecuencia que eritromicina o vancomicina. Las frecuencias obtenidas se encuentran entre $1 \cdot 10^{-7}$ y $7,5 \cdot 10^{-8}$, no se detectaron transconjugantes con el aislado RYC37509. La proporción de transconjugantes seleccionados en tetraciclina resistentes a los otros dos

antimicrobianos fue entre el 92 y 100 % según el donante. Los valores obtenidos son semejantes a las frecuencias de conjugación de transposones como el Tn916, resistentes a tetraciclina (44).

Los transconjugantes seleccionados de cada cepa también transfirieron la resistencia a glicopéptidos por conjugación en caldo utilizando la cepa *E. faecalis* OG1X como receptora.

En la Tabla 3.22 figura el fenotipo de resistencia de cada cepa, así como el de uno de los transconjugantes seleccionado sobre vancomicina.

Tabla 3.22. Fenotipos de resistencia de los aislados resistentes a vancomicina y de sus transconjugantes (serie JVR) seleccionados sobre vancomicina.

ESPECIE	CEPA Nº	VAN	TEI	ERM	TET	FOS	RIF	FUS
<i>E. avium</i>	SON144	R	R	S	S	S	S	S
<i>E. faecium</i>	RYC37509	R	R	R	R	S	S	S
<i>E. faecalis</i>	JRV-1	R	R	S	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i>	RYC44749	R	R	R	R	S	S	S
<i>E. faecalis</i>	JRV-2	R	R	R	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i>	PE282	R	R	R	S	R	S	S
<i>E. faecalis</i>	JRV-3	R	R	R	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i>	PE435	R	R	R	R	S	S	S
<i>E. faecalis</i>	JRV-4	R	R	R	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i>	PE477	R	R	R	R	S	S	S
<i>E. faecalis</i>	JRV-5	R	R	R	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i>	PE-491	R	R	R	R	S	S	S
<i>E. faecalis</i>	JRV-6	R	R	R	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i>	MT77628	R	R	R	S	R	S	S
<i>E. faecalis</i>	JRV-7	R	R	R	S	S	R	R
<i>E. faecalis</i>	MT77693	R	R	R	R	S	S	S
<i>E. faecalis</i>	JRV-8	R	R	R	S	S	R	R

Tabla 3.7 RESPUESTA A FEROMONAS capacidad de originar acúmulos de las cepas OG1X(pAM351), OG1X(pAM714) que responden a las feromonas cAD1, cAM373 y cPD1 respectivamente. Las cepas de *E. faecalis* RYC44749, PE435, PE477, PE491, y MT77693 respondieron con formación de acúmulos cuando se enfrentaron a los caldos crecidos con la cepa JH2-2 y posteriormente centrifugados y filtrados. Los acúmulos se mantuvieron después de tratar el filtrado con tripsina 0,1 mg/ml, pero no cuando se incubaron previamente con pronasa 0,1 mg/ml, y se disgregaron al añadir EDTA 50 mM. En la Figura 3.13 podemos ver una foto de este ensayo. De los resultados de estos ensayos se deduce que las cepas responden a feromonas.

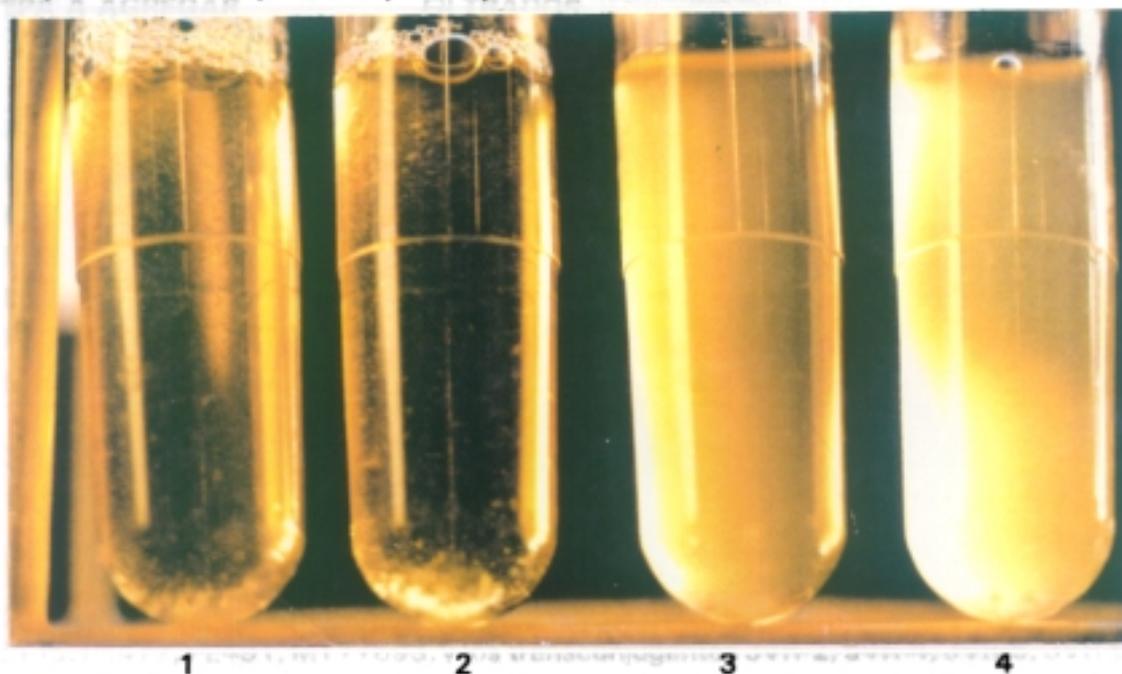


Figura 3.13. Producción de acúmulos de *E. faecalis* RYC44749 en presencia de filtrados de cultivo de *E. faecalis* JH2-2. Tubo 1: sin tratamiento. Tubo 2: filtrado tratado con tripsina. Tubo 3: filtrado tratado con pronasa. Tubo 4: RYC44749 sin filtrado de JH2-2

Para caracterizar la/s feromonas a las que responden los aislados RYC44749, PE282, PE435, PE477, PE491, MT77628, y MT77693, se ensayó la formación de acúmulos con filtrados (diluidos a una concentración final 1/10) de las estirpes OG1X(pAM351), OG1X(pAM714), FA2-2(pAM373) que no producen cPD1, cAD1, y cAM373 respectivamente, JH2-2 (productor de múltiples feromonas) y *S. aureus* ATCC 29213 productor de cAM373. Los resultados obtenidos figuran en la

Tabla 3.23. También estudiamos la capacidad de originar acúmulos en las cepas OG1X(pAM351), OG1X(pAM714), que responden a las feromonas cPD1, cAD1, respectivamente con filtrados de los aislados RYC44749, PE435, PE477, PE491, y MT77693; así como con los de sus transconjugantes JVR-2, JVR-4, JVR-5, JVR-6, y JVR-8 los resultados obtenidos se describen en la Tabla 3.24.

Tabla 3.23. Estudio de la capacidad agregante de los aislados clínicos con filtrados obtenidos de las cepas JH2-2, OG1X(pAM351), OG1X(pAM714), FA373, *S. aureus* ATCC29212.

CEPA A AGREGAR	FILTRADOS					
	JH2-2	OG1X (pAM351)	OG1X (pAM714)	FA373	ATCC 29212	TODD HEWITT
RYC44749	+	+	d	+	-	-
PE282	-	-	-	-	-	-
PE435	+	+	d	-	-	-
PE477	+	+	+	+	-	-
PE491	+	+	d	+	-	-
MT77628	-	-	-	-	-	-
MT77693	+	+	d	+	-	-

d: caldo turbio con ligera formación de acúmulos. Todd Hewitt: crecimiento sin adición de filtrado.

Tabla 3.24. Estudio de la capacidad agregante de las cepas JH2-2, OG1X(pAM351), OG1X(pAM714) con filtrados de los aislados clínicos RYC44749, PE435, PE477, PE491, MT77693, y los transconjugantes JVR-2, JVR-4, JVR-5, JVR-6, y JVR-8

CEPA A AGREGAR	FILTRADOS										
	JH2-2	RYC 44749	JVR-2	PE 435	JVR-4	PE 477	JVR-5	PE 491	JVR-6	MT 77693	JVR-8
OG1X(pAM351)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OG1X(pAM714)	+	d	d	d	d	d	d	d	d	d	+

d: caldo turbio con ligera formación de acúmulos

Los aislados PE282 y MT77628 no responden a las feromonas exploradas al no producirse acúmulos en presencia de filtrados de *E. faecalis* JH2-2, OG1X, FA373 y *S. aureus* ATCC29212 (Tabla 3.23).

Los aislados RYC44749, PE435, PE477, PE491, y MT77693 responden a alguna de las múltiples feromonas producidas por *E. faecalis* JH2-2. También, forman acúmulos con los cultivos filtrados de OG1X(pAM351) y FA373, que no producen las feromonas cPD1 y cAM373, de éstos resultados concluimos que los aislados no responden a cPD1 y cAM373, en el caso de ésta última lo confirmamos por la incapacidad para originar acúmulos con los filtrados de *S. aureus* ATCC29212 (produce únicamente cAM373) (Tabla 3.23). La respuesta a la feromona cAD1 no es concluyente, al producirse con filtrados de OG1X(pAM714) escasos acúmulos con las cepas RYC44749, PE435, PE491, MT77693, de igual forma los filtrados de RYC44749, JVR-2, PE435, JVR-4, PE477, JVR-5, PE491, y MT77693 producen algunos agregados con OG1X(pAM714), mientras que los filtrados de PE477 y JVR-8 producen acúmulos evidentes (Tabla 3.24). Con objeto de cuantificar la respuesta a cAD1 titulamos la formación de agregados de RYC44749 con filtrados de JH2-2, FA373, OG1X(pAM351) y OG1X(pAM714), los resultados fueron 1/32, 1/32, 1/16, y 1/4 respectivamente. Del conjunto de ensayos podemos afirmar que cada uno de los aislados que responden a feromonas lo hacen a feromonas distintas de cPD1, cAM373, y cAD1 aunque podrían estar relacionadas con esta última.

3.8 ANALISIS DEL ADN PLASMIDICO

Todas las cepas estudiadas presentaron una única banda de ADN plasmídico, excepto el aislado *E. avium* SON144, al que no se le observó ninguna banda. Los transconjugantes obtenidos en *E. faecalis* JH2-2, se sometieron a minilisis alcalina y posteriormente se analizaron en gel de agarosa al 0,6%, observándose en todos ellos una sola banda de ADN plasmídico. En la Figura 3.14, se observa la similitud

en el tamaño de los plásmidos de las cepas JVR-2, JVR-4, JVR-5, JVR-6, JVR-7, Y JVR-8, mientras que las cepas JVR-1 y JVR-3 presentan mayores diferencias de tamaño.

Con objeto de analizar los plásmidos de las distintas cepas, se obtuvo el ADN plasmídico de las cepas originales mediante purificación en gradiente de densidad cloruro de cesio / bromuro de etidio. Los plásmidos purificados fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, posteriormente se separaron los fragmentos en gel de agarosa al 0,8% utilizando, como patrón, el ADN del fago lambda digerido con *HindIII*, los tamaños de los fragmentos se dedujeron de más de tres geles de agarosa.

La cepa RYC37509 alberga un plásmido de aproximadamente 35,5 Kb. De la digestión con *EcoRI* resultaron siete fragmentos de 10,4, 10, 4,3, 4,1, 3,6, 1,5, y 1,4 Kb (Figura 3.15 y 3.16). El tratamiento con *HindIII* proporcionó nueve fragmentos de 15, 4,5, 3,5, 3,2, 2,9, 2,5, 2, 1,3, y 1 Kb (Figura 3.17). Este plásmido se denomina pVR-1.

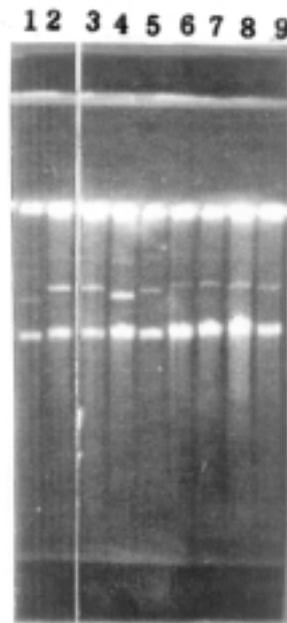


Figura 3.14 Gel de agarosa al 0,6% de los distintos transconjugantes y de la cepa RYC44749, carriles: 1- JVR-1, 2-JVR-2, 3- RYC44749, 4-JVR-4, 5-JVR-5, 6-JVR-6, 7-JVR-7, 8-JVR-8, y 9-JVR-3.

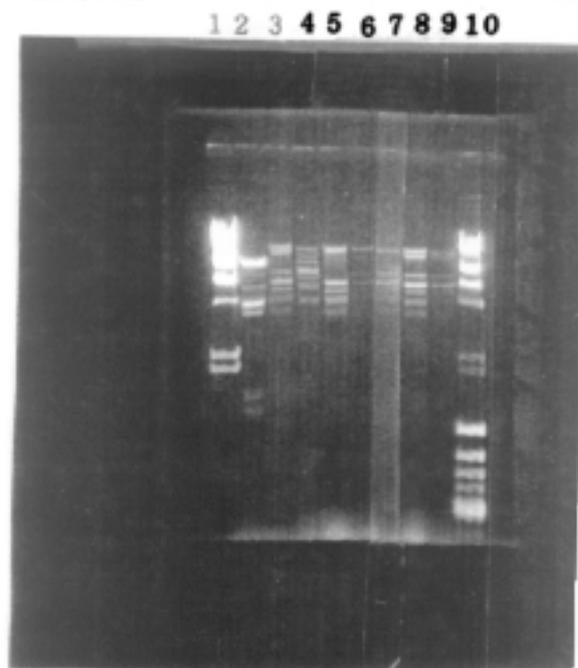


Figura 3.15. Gel de agarosa al 0,8% de las digestiones con *EcoRI* de los plásmidos obtenidos de las siguientes cepas: (en paréntesis los carriles) RYC37509 (2), RYC44749 (3), PE282 (4), PE435 (5), PE477 (6), PE491 (7), MT 77628 (8), MT77693 (9). Carriles 1 y 10- Lambda *HindIII*.

TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS EN Kb

1	2	3	4	5	6	7	8	9
23,1	10,4	17,3	16,0	16,4	17,3	17,3	17,3	17,3
9,4	10,0	13,7	12,0	6,5	8,0	8,0	13,7	13,7
6,5	4,3	8,0	10,5	6,4	6,5	6,5	8,0	8,0
4,3	4,1	6,5	8,4	5,4	6,4	6,4	6,5	6,5
2,3	3,6	6,4	8,0	4,5	5,4	5,4	6,4	6,4
2,0	1,5	5,4	6,7	4,3	4,5	4,5	5,4	5,4
	1,4	4,5	6,2	3,8	4,3	4,3	4,5	4,5
		4,3	5,8	3,6	3,8	3,8	4,3	4,3
		3,8	5,6	1,4	3,6	3,6	3,8	3,8
		3,6	4,5		1,4	1,4	3,6	3,6
		1,4	4,3				1,4	1,4
		3,6						
		3,4						
		2,9						
		2,7						
		2,5						

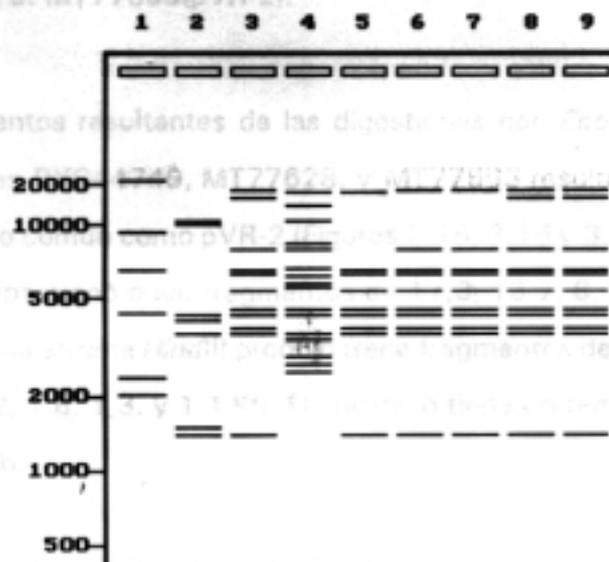


Figura 3.16. Representación de los plásmidos de las aislados clínicos digeridos con la enzima *EcoRI*. Carriles 1: Lambda *HindIII*, 2: RYC37509(pVR-1), 3: RYC44749(pVR-2), 4: PE282(pVR-3), 5: PE435(pVR-4), 6: PE477(pVR-5), 7: PE491(pVR-5), 8: MT77628(pVR-2), 9: MT77693(pVR-2).

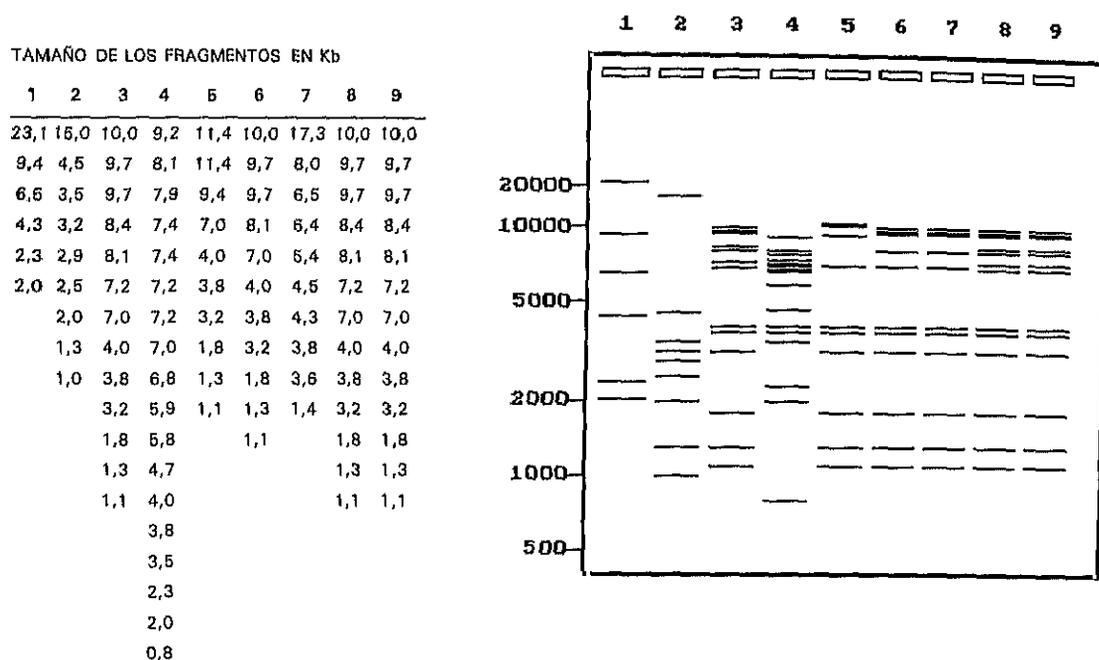


Figura 3.17. Representación de los plásmidos de las aislados clínicos digeridos con la enzima *Hind*III. Carriles 1: Lambda *Hind*III, 2: RYC37509(pVR-1), 3: RYC44749(pVR-2), 4: PE282(pVR-3), 5: PE435(pVR-4), 6: PE477(pVR-5), 7: PE491(pVR-5), 8: MT77628(pVR-2), 9: MT77693(pVR-2).

Los perfiles de fragmentos resultantes de las digestiones con *Eco*RI y *Hind*III de los plásmidos de las cepas RYC44749, MT77628, y MT77693 resultaron idénticos, denominándose el plásmido común como pVR-2 (Figuras 3.15, 3.16 y 3.17). La digestión de pVR-2 con *Eco*RI proporcionó once fragmentos de 17,3, 13,7, 8, 6,5, 6,4, 5,4, 4,5, 4,3, 3,8, 3,6, y 1,4 Kb; la enzima *Hind*III produjo trece fragmentos de 10, 9,7, 9,7, 8,4, 8,1, 7,2, 7, 4, 3,8, 3,2, 1,8, 1,3, y 1,1 Kb. El plásmido tiene un tamaño calculado de aproximadamente 75 Kb.

El plásmido de la cepa PE282 resultó mucho mayor que el resto, presentó un tamaño de aproximadamente 103 Kb, y lo hemos denominado pVR-3. La digestión con *Eco*RI dio lugar a catorce fragmentos de: 16, 12, 10,5, 8,4, 8, 6,7, 6,2, 5,8, 5,6, 4,5, 4,3, 3,6, 3,4, y 2,9 Kb, los fragmentos obtenidos con *Hind*III fueron dieciocho, de

los siguientes tamaños: 9,2, 8,1, 7,9, 7,4, 7,4, 7,2, 7,2, 7, 6,8, 5,9, 5,8, 4,7, 4, 3,8, 3,5, 2,3, 2, y 0,8 Kb (Figuras 3.16 y 3.17) .

La cepa PE435 posee un plásmido, pJVR-4, de aproximadamente 52 Kb. Los nueve fragmentos obtenidos de la digestión con *EcoRI* tienen un tamaño equivalente al plásmido pVR-2, excepto el de 16,4 Kb. Además, se diferencia de pVR-2 por la ausencia de dos fragmentos, uno de 13,7 Kb y otro de 8 Kb. El patrón de restricción obtenido con *HindIII* fue idéntico al de pVR-2 si comparamos los siete fragmentos de menos de siete kilobases. Sin embargo, los fragmentos de mayor tamaño presentaron diferencias notables (Figuras 3.15, 3.16 y 3.17).

Los aislados PE477 y PE491 poseen un plásmido de unas 60 Kb, que presenta idéntico patrón cuando se digirió con *EcoRI* y *HindIII*, y que denominamos pVR-5. De la digestión con *EcoRI* se obtuvieron diez fragmentos que comparten tamaño con los originados de la digestión de pVR-2 con la misma enzima. pVR-5 se diferencia del último en la ausencia de un fragmento de 13,7 Kb. La digestión con *HindIII* también pone de manifiesto la relación de ambos plásmidos: pVR-5 no posee dos fragmentos de 8,4 y 7,2, Kb que están presentes en pVR-2.

La digestión con *EcoRI* de los plásmidos pVR-1, pVR-2, pVR-3, pVR-4, y pVR-5 proporcionó fragmentos de igual tamaño, en todos se observaron dos fragmentos de 4,3 y 3,6 Kb; un fragmento de 1,4 Kb estaba presente en todos excepto pVR-3. Todos los plásmidos excepto pVR-1 poseen fragmentos de 4,5 Kb. La digestión con *HindIII* de los distintos plásmidos no produjo ningún fragmento que compartiese tamaño. Un fragmento de 7 Kb esta presente en todos salvo en pVR-1.

3.9 HIBRIDACION CON OLIGONUCLEOTIDO

3.9.1 HIBRIDACION CON ADN TOTAL

El ADN total de todas las cepas resistentes a vancomicina se hibridó con el oligonucleótido 5'-CAGCTGTACTCTCGCCGGAT-3', correspondiente a las posiciones 573 y 593 de *vanA* (59). La hibridación fue positiva con todas las cepas excepto con la estirpe *E. avium* SON144.

3.9.2 HIBRIDACION CON PLASMIDOS

El ADN plasmídico de las todas cepas digerido con *EcoRI* hibridó con el oligonucleótido marcado con P^{32} en un fragmento de aproximadamente 4,3 Kb. Cuando las cepas se digirieron con *HindIII* el fragmento que hibridó, también fue el mismo para todas las cepas con un tamaño aproximado de 7 Kb, excepto el plásmido pVR-1 que lo hizo con un fragmento de aproximadamente 4,5 Kb (Figura 3.18).

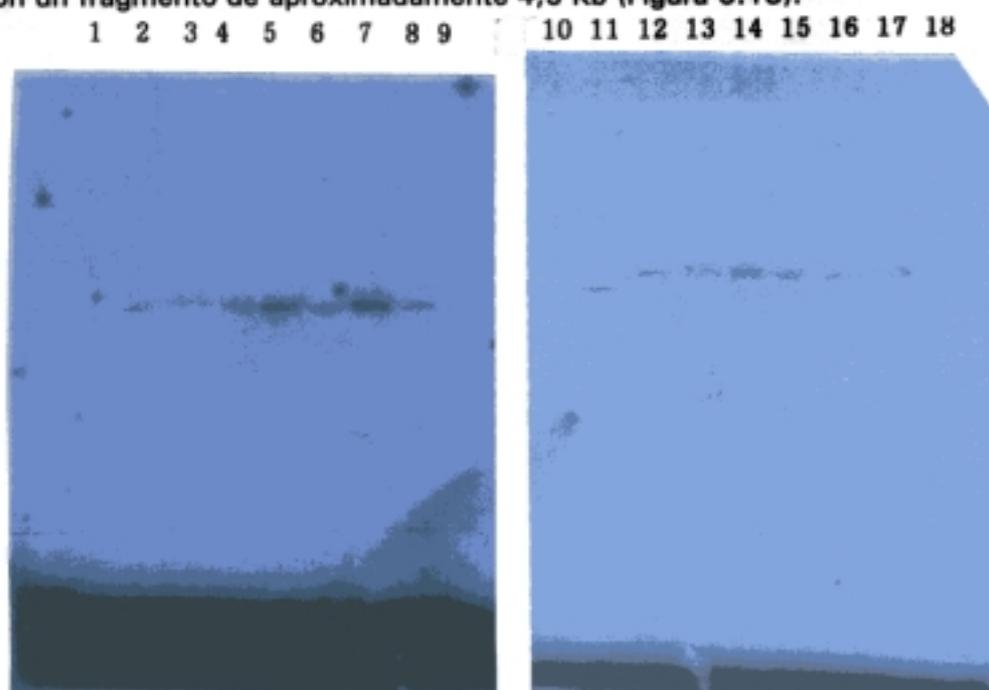


Figura 3.18. Hibridación del oligonucleótido con los diferentes plásmidos digeridos con *EcoRI* (A) y *HindIII* (B), carriles (en paréntesis la cepa origen del plásmido): 1- λ *HindIII*, 2- pVR-1 (RYC37509), 3- pVR-2 (RYC44749), 4- pVR-3 (PE282), 5- pVR-4 (PE435), 6- pVR-5 (PE477), 7- pVR-1 (MT77628), 8- pVR-1 (MT77693).

4. DISCUSSION

Las primeras publicaciones donde se citan enterococos resistentes a vancomicina tienen lugar en los años 1969 y 1973 (114, 232), pero no se consideró el desarrollo de esta resistencia como un problema serio hasta el trabajo de Uttley y cols. en 1988, en el que describen múltiples aislamientos de enterococos resistentes a vancomicina asociados al tratamiento empírico con vancomicina y ceftazidima de sepsis de etiología desconocida (237). A partir de ese año aparecen varias publicaciones que describen y estudian el mecanismo de resistencia a glicopéptidos (132, 142, 143, 213).

Tras la detección, en el Hospital Ramón y Cajal, de dos cepas de enterococos resistentes a vancomicina en el verano de 1988, nos propusimos caracterizar su mecanismo de resistencia, así como el de las cepas que nos fueron enviadas en 1989 de los hospitales Príncipes de España (Barcelona), Mutua de Tarrasa (Tarrasa, Barcelona), y Son Dureta (Palma de Mallorca). Corresponden a los primeros aislamientos que se produjeron en España, ya que el primero fue documentado en el año 1987, un *E. faecalis* enviado al Center for Disease Control de Atlanta (108). Las estirpes estudiadas son 7 *E. faecalis*, 1 *E. faecium* y 1 *E. avium*. Es destacable que la mayoría de las cepas españolas corresponden a *E. faecalis* mientras que en gran parte de las publicaciones se mencionan mayoritariamente *E. faecium* (39, 142, 143, 213, 237, 238). Los *E. avium* descritos son excepcionales (89, 238). Otras especies en las que se han encontrado resistencia a glicopéptidos son *E. gallinarum* (58, 39, 144), *E. casseliflavus* (58, 39, 144), *E. raffinosus* (39), y *E. durans* (102, 234).

Hemos analizado la sensibilidad de 3.333 enterococos aislados en el Hospital Ramón y Cajal en el período 1988-1993, con objeto de comparar su patrón de sensibilidad con el de los aislados resistentes a vancomicina, y conocer la frecuencia de cepas resistentes en un hospital general.

El patrón de sensibilidad de los *Enterococcus* fue considerado constante durante cierto tiempo al mantenerse uniformemente sensibles a aminopenicilinas y

vancomicina, y con resistencia de bajo nivel a aminoglicósidos. En la actualidad es precisa su vigilancia periódica al ser cada vez más común la resistencia de alto nivel a streptomycin y gentamicin en *E. faecalis* y *E. faecium* y a β -lactámicos en *E. faecium*. Grayson y cols. han puesto de manifiesto los cambios de sensibilidad a lo largo del tiempo en un trabajo donde estudiaron las CMI a β -lactámicos de *E. faecium* aisladas en 1968 de una población de las islas Salomón, que nunca había sido expuesta a los antibióticos, con aislados efectuados entre los años 1989 y 1990 de un hospital de Massachusetts. Hallaron alta susceptibilidad a β -lactámicos en los aislados de las islas Salomón (92). Nuestro estudio abarca un período de seis años, 1988-1993, en los cuales los patrones de sensibilidad no han sufrido cambios apreciables salvo en el grupo de las quinolonas y en el cloranfenicol.

La tasa de resistencia de las 3.333 cepas de enterococos estudiadas fue del 5,16%, 3,15%, y 3,16% para penicilina, ampicilina y ampicilina /sulbactam respectivamente. El 3,15% de aislados resistentes a ampicilina es equivalente al publicado en otros trabajos canadienses y españoles, 2,9% y 4,2 % respectivamente (28, 35). No obstante es inferior a los resultados de Watanakunakorn (8,9%) con aislados de hemocultivo efectuados entre 1990 y 1991 (253), aunque el mismo autor con cepas de igual procedencia publicó < 1 % de resistentes en un estudio de la década anterior (252). Nuestras tasas de resistencia a ampicilina son también inferiores a los publicados por autores estadounidenses, ingleses e italianos (90, 93, 241).

Al igual que otros autores, hallamos a ampicilina ligeramente más activa que penicilina, con CMI₉₀ de 2 y 4 μ g/ml respectivamente (85, 90, 93).

La evolución de la sensibilidad de ampicilina, penicilina, y ampicilina/sulbactam siguen la misma tendencia, observándose un incremento de la resistencia en el tramo 1988-1990. Las causas que explican la elevada proporción de aislados resistentes a ampicilina, y especialmente a penicilina, de 1990 no es conocida, aunque podría estar relacionada con la proporción de *E. faecium* y *E. faecalis*

Estudiados. Observamos una ligera tendencia hacia el incremento de cepas resistentes a ampicilina; en 1993 se encontraron 1,88% más que en 1988. Sin embargo, esta pérdida de actividad es más evidente si consideramos los porcentajes de cepas con CMI ≤ 1 ; en estas cepas, la disminución entre 1988 y 1993 es del 5,72%.

El 87,47% de las 3.034 cepas ensayadas fueron sensibles a fosfomicina (CMI $\leq 32 \mu\text{g/ml}$). Las diferencias interanuales no sufren variaciones considerables ni muestran una tendencia. La proporción de aislados sensibles es superior al 52,5% comunicado por Rodeño (197). La fosfomicina podría ser una alternativa en el tratamiento de infecciones producidas por enterococos resistentes a β -lactámicos y/o copéptidos.

El 99,16% de los 3.333 aislados son sensibles a vancomicina, el 0,18% presentan sensibilidad intermedia (CMI 8-16 $\mu\text{g/ml}$), y el 0,66% son resistentes (CMI $\geq 16 \mu\text{g/ml}$). Se observa una distribución irregular de las cepas resistentes en el período de estudio, 1990 fue el año con mayor porcentaje (1,89%) y 1992 el de menor (0,11%).

El número de cepas resistentes a vancomicina es semejante a las encontradas en varios trabajos de diferentes países (90, 241), aunque discrepan con los resultados de trabajos como los de Flournoy (74) y Woodford y cols. (262) que encontraron un 22% y 27,2% respectivamente de resistencia. En el primero, se proporcionan datos de *E. faecium* aislados de pacientes que reciben asistencia de enfermería domiciliaria (74), resulta inexplicable el alto porcentaje de cepas resistentes si lo comparamos con el 11% de cepas resistentes aisladas de áreas de cuidados intensivos en U.S.A. (36). Woodford y cols. aportan datos de un laboratorio de referencia del Reino Unido, este origen hace que la cifra del 27,2% no sea comparable con los datos de hospitales generales (90, 241). Además, consideran resistentes a partir de $> 4 \mu\text{g/ml}$ de vancomicina (262), mientras que el NCCLS considera $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ resistente e intermedio 8-16 $\mu\text{g/ml}$ (171). El 0,18% de nuestros aislados presentaron

sensibilidad intermedia muy inferior al 11,23% publicado por Watanakunakorn de cepas aisladas de hemocultivo (253). Los enterococos resistentes a vancomicina también se han encontrado en aguas residuales en una proporción similar o algo inferior a los hallados en clínica. La proporción de enterococos resistentes fue de alrededor del 0,4% en un estudio realizado por nosotros en aguas del río Ebro (234), y entre 0,1 y 0,01% en los datos comunicados por un grupo alemán (134).

La resistencia de alto nivel a estreptomicina fue del 39,57%, equivalente a la encontrada por otros autores en hospitales españoles (33, 197); la frecuencia de resistencia hallada por nosotros presenta un valor medio entre las publicadas por algunos autores estadounidenses e ingleses (90, 93) con menos del 25% de resistencia, y las comunicadas por otros centros estadounidenses e italianos que poseen más del 50% de cepas resistentes (159, 241). El 32% de los aislados efectuados entre 1992 y 1993 poseen resistencia de alto nivel a gentamicina, tasa comprendida entre el 20 y 40% que comunican autores de procedencia diversa (33, 90, 197, 241, 262).

La sensibilidad a cloranfenicol ha sufrido una disminución progresiva en el período analizado, pasando del 73,24% inicial al 53,88% de 1993. Este hecho resulta especialmente llamativo debido a la reducción en el consumo humano de este fármaco. Es posible que los genes de resistencia puedan estar asociados a los de otros antimicrobianos que sí se prescriben, o bien el cloranfenicol se utiliza abusivamente en alimentación animal. Tetraciclina y eritromicina son inactivas para más del 50% de las cepas ensayadas.

La evolución de la sensibilidad a cotrimoxazol sufrió un valle en 1990 y 1991, donde cayó al 80%, mientras que en el resto del período se mantuvo próxima al 90%.

El número de cepas resistentes a norfloxacin se ha multiplicado por quince entre 1988 (2,34%) y 1993 (35,09%). El incremento de la resistencia a

ciprofloxacina también ha sido apreciable pasando del 13,13% de 1989 al 31,97% de 1993. Nuestros datos concuerdan con los de Schaberg y cols. (209), que obtuvieron una sensibilidad a la ciprofloxacina del 100% con aislados de enterococo resistentes a aminoglicósidos del período 1985-1986, que se redujo a un 76% (24% de resistentes) con aislados del mismo tipo en el período 1989-1990. Woodford y cols. han publicado que el 51,2% de las cepas recibidas en un centro de referencia británico son resistentes (262). Resultados que sin duda tienen relación con la difusión del uso de las quinolonas. Estos datos contrastan con los obtenidos por Gordon y cols. (90) que sólo encuentran un 1,3% resistentes, considerando la CMI $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ como punto de corte y no $> 2 \mu\text{g/ml}$ como nosotros.

El estudio de sensibilidad de las nueve cepas de enterococos, 7 de *E. faecalis*, 1 de *E. faecium*, y 1 de *E. avium*, resistentes a vancomicina, reflejó que todos fueron sensibles a ampicilina, con excepción de *E. faecium* RYC37509 también lo fueron a penicilina. La CMI obtenida por cada cepa fue igual o inferior a la CMI₉₀ de ampicilina y penicilina con las excepciones de *E. avium* SON144 con CMI de $4 \mu\text{g/ml}$ para ampicilina y *E. faecium* RYC37509 con CMI $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ para penicilina. Ampicilina fue el β -lactámico más activo seguido de imipenem, penicilina, piperacilina y meropenem. Nuestros datos contrastan con muchas de las publicaciones que describen enterococos resistentes a vancomicina, ya que hacen referencia principalmente a *E. faecium* resistentes a ampicilina (22, 39, 61, 107, 142, 143, 174, 213, 238, 257). En estudios donde se incluyen *E. faecalis*, como en nuestro caso, resultan mayoritariamente sensibles a ampicilina (61, 238, 257), aunque en dos artículos estadounidenses han sido descritos aislados productores de β -lactamasa (149, 107).

Ninguna cepa vancomicina-resistente presentó resistencia a cloranfenicol, quinolonas, nitrofurantoína, cotrimoxazol, ni resistencia de alto nivel a estreptomicina, resultando semejantes a la mayoría de los aislados del Hospital Ramón y Cajal, o si cabe, algo más sensibles, ya que hemos descrito tasas próximas al 40% de resistencia para norfloxacina, cloranfenicol, y resistencia de alto nivel a estreptomicina. En algunos

estudios se han citado enterococos resistentes a vancomicina con resistencia de alto nivel a estreptomicina y/o gentamicina (39, 142, 238).

La resistencia a eritromicina ha sido asociada frecuentemente con la resistencia a vancomicina (108, 142, 143, 174, 238). En nuestra serie todos los aislamientos fueron resistentes salvo *E. avium* SON144, una tasa muy superior a la observada en los aislados vancomicina-sensibles del Hospital Ramón y Cajal, en los que encontramos el 53% resistentes. Seis de los nueve aislados fueron resistentes a tetraciclina proporción similar a la descrita para el conjunto de aislados del período 1988-1993. Únicamente los dos *E. faecalis* procedentes de la Mutua de Tarrasa fueron resistentes a fosfomicina.

Todos los aislados de este estudio presentaron CMI de 512 $\mu\text{g/ml}$ para vancomicina, excepto *E. avium* SON144 que tuvo 2048 $\mu\text{g/ml}$. El rango de la CMI a teicoplanina se encontró entre 128 y 32 $\mu\text{g/ml}$, presentando por tanto resistencia de alto nivel a vancomicina y teicoplanina, al considerarse ésta cuando se poseen CMI mayores o iguales a 64 y 16 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (48). Los valores de las CMI obtenidas para vancomicina y teicoplanina son semejantes a los publicados por otros autores con cepas que también poseen resistencia de alto nivel a vancomicina (142, 143, 174, 213, 216), aunque la CMI obtenida para la cepa de *E. avium* es la más alta de todas las comunicadas. A la luz de estos datos podríamos considerar a todos los aislados como pertenecientes al fenotipo VanA, no pudiéndose descartar totalmente el fenotipo VanB al haber sido descrito cepas de este fenotipo resistentes a teicoplanina (115) y otras con CMI de hasta 1024 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina (187). Como en otros trabajos observamos que la sensibilidad a daptomicina no está relacionada con la resistencia a vancomicina y teicoplanina, al mantenerse sensibles todos los aislados (61, 107, 143, 174).

Los primeros trabajos sobre la resistencia a vancomicina pusieron de manifiesto que en los fenotipos VanA y VanB la resistencia se expresaba de forma inducible (142, 143, 213, 216, 258); sin embargo en el fenotipo VanC la expresión es

constitutiva (217). En nuestro trabajo, la caracterización del mecanismo de resistencia a glicopéptidos se inició con el estudio de inducibilidad de la resistencia por vancomicina. Se pudo comprobar que los 7 *E. faecalis* y el *E. faecium* presentaron un retraso en el tiempo de latencia mayor en caldo con vancomicina cuando el preinóculo no provenía de un cultivo con vancomicina (Figuras 3.1 y 3.2). Al presentar resistencia inducible nuestros aislamientos pueden ser incluidos en los fenotipos VanA o VanB. La estirpe *E. avium* SON144 no presentó retraso en el tiempo de latencia en caldo con vancomicina cuando el preinóculo procedía de un cultivo crecido sin vancomicina con respecto al preinóculo con vancomicina (Figura 3.3); por tanto, posee resistencia no inducible a glicopéptidos. El único fenotipo que presenta resistencia constitutiva es VanC, hallado exclusivamente en *E. gallinarum*, *E. flavescens* y *E. casseliflavus* pero el nivel de resistencia a vancomicina es bajo, no superando los 32 $\mu\text{g/ml}$, y la CMI de teicoplanina es $\leq 1\mu\text{/ml}$ (7), mientras que las CMI de *E. avium* SON144 para vancomicina y teicoplanina son de 2048 y 128 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, no pudiendo incluirse en este fenotipo ni en VanA o VanB.

Shlaes y cols. fue el primero en asociar, en enterococos de fenotipo VanA, una proteína inducible de 39-40 KD con la resistencia a vancomicina (214, 216), lo que posteriormente fue confirmado por otros autores (59). En los de fenotipo VanB, Williamson y cols. observaron la inducción de una proteína de 39,5 KD, VanB (258), que como VanA es una D-Ala-D-Ala-ligasa (66). Los extractos crudos de cada uno de los aislados de nuestro estudio, crecidos en presencia y ausencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina, se analizaron en geles de poliacrilamida al 12%, y se observó en todas las cepas, excepto en el *E. avium* SON144, la presencia de una banda con un peso aproximado de 39,8 KD ausente en los extractos crecidos sin vancomicina. Esta banda es de hecho equivalente a la de las proteínas VanA y VanB descritas previamente. En nuestro caso, se ha identificado como VanA, de acuerdo con el fenotipo del conjunto de cepas, y en los datos que se discutirán posteriormente de la hibridación con un oligonucleótido específico del gen *vanA*.

Al inmunizar conejos con un extracto de membranas de la estirpe JVR-2 crecida en presencia de vancomicina y adyuvante completo de Freund, se obtuvo en primer lugar un antisuero que reaccionaba con gran parte de las proteínas de los extractos. Cuando éste antisuero fue purificado parcialmente mediante absorciones sucesivas con extractos de la misma cepa crecidos en ausencia de vancomicina, el producto final fue capaz de reconocer específicamente la banda de 39,8 KD. Este antisuero denominado anti-39KD, se utilizó para facilitar la observación de la proteína inducible en los geles de poliacrilamida en ensayos posteriores, y para estudiar su presencia, o de proteínas relacionadas, en el aislado *E. avium* SON144 en el que no se habían detectado proteínas inducibles por vancomicina, quizás debido a que la resistencia fuese constitutiva. Los resultados obtenidos revelan que los extractos de *E. avium* crecidos con y sin vancomicina no reaccionaron con el antisuero anti-39KD, indicando la falta de relación con el resto de los aislados resistentes.

En las Figuras 3.9.A, 3.9.B y 3.10 se puede observar que todos los extractos, excepto los de *E. avium* SON144, reaccionan con el antisuero anti-39KD cuando fueron crecidos en presencia de vancomicina. Los extractos de *E. faecium* RYC37509 crecidos con y sin vancomicina reaccionan con otra proteína de 29 KD aproximadamente. Esta proteína probablemente no está relacionada con la resistencia, ya que los extractos de la cepa *E. faecalis* JVR-1 (transconjugante de *E. faecium* RYC37509) no presentan esa banda, y sin embargo sí aparece en otros *E. faecium* resistentes a vancomicina estudiados por nosotros (234).

Con objeto de conocer algo más del mecanismo de resistencia de nuestras cepas, efectuamos un estudio de sensibilidad en presencia de cloruro sódico al 7%. Los aislados fueron 4 a 8 veces más sensibles a vancomicina y teicoplanina (CMI en el rango sensible, entre 2 y 0,25 µg/ml). Williamson y cols. observaron resultados similares con *E. faecium* D366 de fenotipo VanB (258). La reversión de la sensibilidad a glicopéptidos puede deberse a que la presencia de NaCl al 7% impidiese la activación del sensor VanS por vancomicina, caso de que ésta fuese la activadora, debido al

incremento de fuerza iónica. Esta hipótesis parece improbable, si tenemos en cuenta que una molécula no relacionada con los glicopéptidos pero capaz de inhibir la reacción de transglicosilación, la moenomocina, también induce la resistencia a vancomicina y la síntesis de VanA (106). Si VanS respondiese al incremento de presión sobre la membrana citoplásmica previo a la lisis inducida por el glicopéptido, la presencia de un medio extracelular hiperosmótico no provocaría cambios de presión, no activándose el sistema VanS-VanR. No obstante, esto implicaría que cualquier antimicrobiano que actúe sobre la pared celular inducirá la resistencia glicopéptidos, fenómeno que no ocurre en presencia de concentraciones subinhibitorias de ampicilina, fosfomicina, y D-cicloserina como se ha mostrado en la Figura 3.11. No se detectó la producción de VanA mediante "inmunoblot" con el antisuero anti-39KD en presencia de estos fármacos. Resultados similares han sido obtenidos por Handwerger y Kolokathis (106). El efecto del cloruro sódico así como el de algunos aminoácidos (267) en la reversión de la sensibilidad sólo podrá ser explicado cuando se conozca el mecanismo de inducción por VanS (249). Si el sistema de regulación es activado por señales de lesión de la pared celular producidas por vancomicina, experimentos de expresión de estos genes, una vez clonados en una bacteria intrínsecamente resistente a vancomicina, y en presencia de vancomicina, podría dar la solución. En estas condiciones el sistema VanS-VanR no debería expresarse. Si lo hace, es que VanS responde directamente a la vancomicina.

El análisis de las PBP puso de manifiesto la ausencia de alteraciones en el patrón de PBP de extractos de membrana de las cepas *E. faecium* RYC37509 y *E. faecalis* RYC44749 crecidas con y sin vancomicina, confirmando los resultados obtenidos por otros autores con cepas de fenotipo VanA (100, 107) y VanB (258, 107).

La cepa *E. avium* SON144 fue la única incapaz de transferir la resistencia a glicopéptidos mediante conjugación en filtro a las estirpes JH2-2 u OG1X. El resto de los aislados transfirieron la resistencia a la cepa JH2-2 tanto en filtro como en caldo, con la excepción del *E. faecium* RYC37509 que sólo lo hizo en filtro, y con una

frecuencia de conjugación de $2,5 \times 10^{-6}$, dentro del rango de 10^{-6} a 10^{-8} de la mayoría de los artículos publicados (61, 143, 174, 213, 216, 238). El resto de las cepas *E. faecalis* obtuvieron frecuencias de conjugación en filtro entre 1×10^{-1} y $2,5 \times 10^{-5}$, mientras que en caldo fueron en general de un orden de magnitud menor, entre 1×10^{-2} y 2×10^{-5} . Son pocos los artículos que describen transferencia de resistencia a vancomicina con frecuencias de conjugación del orden de 10^{-2} (61, 108).

Las altas frecuencias de conjugación obtenidas sugirieron la implicación de feromonas. Handwerger y cols. caracterizaron una cepa de *E. faecium*, aislado en España, que transfirió el plásmido pHKK100 con resistencia a vancomicina mediante conjugación con frecuencia de $2,5 \times 10^{-2}$, siendo la primera vez que se ha descrito una cepa de *E. faecium* que alberga un plásmido que responde a feromonas y también la primera asociación entre feromonas y la resistencia a glicopéptidos (108). Los aislados RYC44749, PE435, PE477, PE491, MT77693 y sus transconjugantes respectivos responden a una o varias feromonas distintas de cPD1, cAM373, y cAD1, aunque podrían estar relacionadas con esta última. No podemos afirmar que los aislados respondan a la misma feromona, aunque el hecho de que todos los aislados clínicos que responden a feromonas tengan un comportamiento similar con las estirpes FA373, OG1X(pAM351) y especialmente con OG1X(pAM714) podría sugerirlo.

Ninguna de las cepas ni de sus transconjugantes fue productor de bacteriocinas y/o hemolisina, productos codificados por plásmidos que en ocasiones han sido asociados a plásmidos que responden a feromonas (43, 45, 124), Handwerger y cols. demostraron la producción de hemolisina codificada por el plásmido pHKK100 que responde a feromonas y alberga resistencia a vancomicina (108).

Todos los aislados excepto *E. avium* SON144 son de genotipo VanA. La caracterización se efectuó mediante hibridación del ADN total de cada uno de los aislados frente al oligonucleótido 5'-CAGCTGTACTCTCGCCGGAT-3' específico para *vanA*.

El análisis del ADN plasmídico puso de manifiesto su presencia en todos los aislados capaces de transferir la resistencia por conjugación. La única cepa de la que no obtuvimos ADN plasmídico fue *E. avium* SON144. Hallamos un solo plásmido por estirpe aunque es frecuente la presencia de múltiples plásmidos en los aislados de enterococos, especialmente en los de la especie *E. faecium* (39, 43). Los genes de resistencia a vancomicina se encuentran en los plásmidos de cada aislado ya que el oligonucleótido hibridó con cada uno de ellos.

La localización de la agrupación de genes *vanA* mayoritariamente es plasmídica, aunque también se han descrito cepas con genes *vanA* situados en el cromosoma (261). El gen *vanA* ha sido hallado en plásmidos de diversos tamaños entre 34 y 60 KB, siendo el rango de tamaño más frecuente el de 34-40 Kb (142, 143, 238, 261), y mas infrecuentemente los plásmidos de 40-50 (61), 55 (105) y 60 Kb (39, 238). La mayoría de los plásmidos de nuestros aislados tienen tamaños similares a los indicados anteriormente, entre 36 y 70 Kb, pero la cepa PE282 posee un plásmido de 105 Kb que es el mayor de los descritos.

De las ocho cepas con ADN plasmídico hemos encontrado 5 patrones de restricción diferentes con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. El plásmido pVR-2 lo poseen tres estirpes RYC44749, MT77628, y MT77693, los dos últimos aislados en el Hospital de la Mutua de Tarrasa y el primero en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid entre los años 1988 y 1989. El plásmido pVR-5 se encuentra en dos aislados, PE477 y PE491, del Hospital Príncipes de España de Barcelona. Los plásmidos pVR-1, pVR-3, y pVR-4 se han hallado en un único aislado respectivamente en RYC37509, PE282, y PE435.

Los plásmidos pVR-2, pVR-4, y pVR-5 están muy relacionados ya que comparten la mayoría de los fragmentos obtenidos de la digestión con *EcoRI*, a pVR-5 le falta un fragmento de 13 Kb que posee pVR-2, y a pVR-4 le falta además del fragmento de 13 Kb otro de 8 Kb siendo este la única diferencia con pVR-4. La digestión con *HindIII* confirmó la relación de los plásmidos pVR-2, pVR-4, y pVR-5, así pVR-5

tiene el mismo patrón que pVR-2 excepto dos fragmentos de 8,4 y 7,2 Kb, pVR-4 se diferencia de pVR-5 por la ausencia de un fragmento de 8,1 Kb y que presenta un fragmento doble de 10,4 Kb mientras que pVR-5 tiene un fragmento simple de 10 Kb.

Todos los plásmidos estudiados por nosotros parecen estar estrechamente relacionados. En un ensayo no recogido en este trabajo observamos que cada uno de los plásmidos marcado con P^{32} mediante "nick translation" hibridaba con prácticamente la totalidad de los fragmentos originados en la digestión con *EcoRI* del resto de los plásmidos.

La diseminación interhospitalaria de plásmidos con resistencia a vancomicina ha sido descrita previamente con implicación de varios centros estadounidenses de distintas ciudades (39). No obstante, en ese trabajo no se estudiaron los plásmidos mediante análisis del patrón de restricción, y por tanto no quedó inequívocamente demostrada la identidad de los plásmidos estudiados. Sí se comprobó la identidad de las cepas resistentes a vancomicina mediante el análisis de electroforesis de geles en campo pulsado, y del patrón bandas plasmídicas. En nuestro caso se pudo demostrar la diseminación de un plásmido en hospitales de diferentes ciudades. Aunque la mayoría de los trabajos recomiendan la realización de estudios epidemiológicos en enterococos resistentes mediante técnicas de electroforesis de geles en campo pulsado (22, 39, 201) o ribotipia (261), nosotros consideramos que cuando la resistencia es plasmídica es preciso conocer además la epidemiología de esos plásmidos y ello especialmente como, en nuestro caso, cuando son conjugativos.

La localización del gen *vanA* en un fragmento de 4,3 Kb en todos los plásmidos estudiados, y el patrón de restricción concuerda con el mapa del transposon Tn1546 (Figura 4.1) que presenta 3 puntos de corte *EcoRI*, produciéndose tras la digestión dos fragmentos uno de 4,113 Kb y otro de 5,677 Kb. Consideramos que el

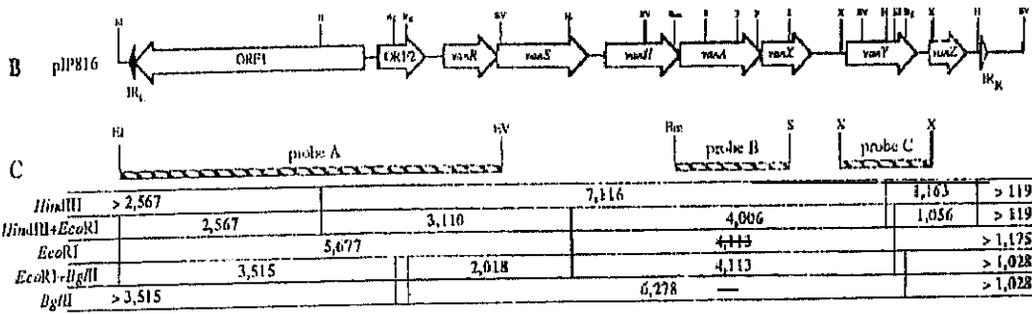


Figura 4.1. Mapa del transposón Tn1546 en el que aparecen las posiciones de las diferentes dianas para las enzimas de restricción (12).

fragmento de 4,113 Kb donde se sitúa *vanA* es equivalente al de 4,3 Kb calculado por nosotros. En cuanto al fragmento de 5,677 Kb, todos los plásmidos excepto pVR-1 presentan un fragmento de 5,4 o 5,6 Kb. La hibridación con el oligonucleótido 5'-CAGCTGTACTCTCGCCGGAT-3' de los plásmidos digeridos con *HindIII* revela que todos excepto pVR-1 poseen el gen *vanA* en un fragmento de 7 Kb. El Tn1546 digerido con *HindIII* proporciona un fragmento de 7,116 Kb que alberga a *vanA*, y otros dos fragmentos, uno de 1,163 kb y otro mayor de 2,567 Kb. Todos los plásmidos de nuestro estudio incluyendo a pVR-1 poseen un fragmento de 0,8 a 1,1 Kb, probablemente equivalente al de 1,163 Kb. El fragmento de 4,5 Kb de pVR-1 es el que hibrida con el oligonucleótido 5'-CAGCTGTACTCTCGCCGGAT-3' y no posee ningún fragmento de 7 Kb, lo que nos induce a proponer la inclusión de un fragmento en el transposon con al menos una diana *HindIII*. Este tipo de inserciones ya han sido demostradas previamente (12). Handwerger y cols. han demostrado la inserción de un fragmento de 1.496 pb entre los genes *vanS* y *vanA*. Cuando digirieron el ADN de la cepas con *HindIII* encontraron que una sonda *vanHAXY* hibridaba con un fragmento de 4,0 Kb y otro de 1,2 Kb, y no hallaron ninguno de 7,2 Kb (111). Esto podría explicar la ausencia del fragmento de 5,6 Kb en la digestión *EcoRI*, Dado que el grado de resistencia de la cepa RYC37509 y del transconjugante JVR-1 son equivalentes al resto

de los aislados clínicos y sus transconjugantes, dicho fragmento no se habría insertado en ninguno de los genes implicados en la resistencia.

En las escasas ocasiones que se han publicado aislamientos de *E. avium* resistentes a vancomicina éstos han sido de genotipo VanA (89, 238, 198). La estirpe *E. avium* SON144 presenta un nuevo tipo de resistencia a glicopéptidos, ya que la resistencia a teicoplanina y vancomicina es de alto nivel, la resistencia no es inducible, probablemente sea cromosómica (dado que no visualizamos ADN plasmídico), no hibrida con el oligonucleótido específico de *vanA* y las proteína/s implicadas con la resistencia no están relacionadas inmunológicamente con VanA.

5. CONCLUSIONES

- 1° La evolución de la sensibilidad de los enterococos en el período 1988-1993 fue variable, distinguimos tres grupos. A- Los antibióticos que sufrieron ligeras variaciones a lo largo del período con escasa tendencia al incremento de aislados resistentes, fueron: ampicilina, penicilina, fosfomicina, vancomicina, tetraciclina, rifampicina, y nitrofurantoina. B- Otro grupo lo integran antimicrobianos con una evolución imprecisa con picos y valles a lo largo del período, compuesto por: estreptomina y cotrimoxazol. Y C- Antimicrobianos que presentaron una clara tendencia al incremento de la resistencia: eritromicina, cloranfenicol, norfloxacin y ciprofloxacina.
- 2° El porcentaje de aislados resistentes en el período 1988-1993 para ampicilina, penicilina, fosfomicina, y vancomicina fue 3,15, 5,16, 12,53, y 0,66% respectivamente, similar al de otros estudios. Tan sólo el 0,18% de las cepas presentó sensibilidad intermedia a vancomicina. La resistencia de alto nivel a estreptomina fue del 39,57% equivalente a la encontrada por otros autores españoles.
- 3° Los nueve enterococos resistentes a glicopéptidos presentaron resistencia de alto nivel para vancomicina y teicoplanina. Todos fueron sensibles a ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina, cloranfenicol, estreptomina (2000 µg/ml), norfloxacin, ciprofloxacina, nitrofurantoina, y daptomicina. Penicilina también fue activa frente a todos los aislados excepto *E. faecium* RYC37509. Todas las cepas excepto *E. avium* SON144 fueron resistentes a eritromicina.
- 4° La resistencia a vancomicina fue inducible en todos los aislados, excepto en *E. avium* SON144 que fue resistente de forma constitutiva. En todos los extractos proteicos de las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* se observó una proteína inducible de aproximadamente 39,8 KDa cuando se crecieron en presencia de vancomicina. Esta proteína fue reconocida en los ocho aislados por el antisuero

- anti-39KDa. En los extractos de *E. avium* SON144 crecido con y sin vancomicina no se apreciaron diferencias en los perfiles proteicos. Ninguna proteína fue reconocida por el antisuero anti 39-KDa, indicando que esta cepa poseerá un mecanismo de resistencia diferente a los otros aislados.
- 5° El ADN total de todas las estirpes, excepto *E. avium* SON144, hibridaba con el oligonucleótido específico de *vanA*. Basándonos en los valores de sensibilidad a vancomicina y teicoplanina, en la aparición de una proteína inducible en presencia de glicopéptidos, y en los resultados de la hibridación con el oligonucleótido específico *vanA* concluimos que todas las cepas excepto SON144 son de fenotipo y genotipo VanA.
- 6° La cepa *E. avium* SON144 presenta un fenotipo distinto a los definidos hasta la fecha, ya que la resistencia es constitutiva como VanC pero de alto nivel como VanA. No está relacionada inmunológicamente con VanA.
- 7° *E. avium* fue la única cepa incapaz de transferir la resistencia a vancomicina por conjugación. La resistencia a eritromicina y vancomicina estaban asociadas en siete de los ocho aislados con resistencia a vancomicina transferible. Cuando presentaron resistencia a tetraciclina, ésta se transfirió independientemente de la de vancomicina. La resistencia fue plasmídica en todas las cepas excepto *E. avium* SON144.
- 8° La agrupación de genes *vanA* se halló en 5 plásmidos diferentes. Un mismo plásmido se encontraba en aislados procedentes de hospitales de Madrid y Tarrasa, el pVR-2 hallado en las cepas RYC44749, MT77628, y MT77693. Las 4 estirpes del Hospital Príncipes de España de Barcelona poseían 3 plásmidos diferentes, el pVR-3 poco relacionado con el resto y los plásmidos pVR-4 y pVR-5 relacionados entre sí y con el pVR-2. Los plásmidos pVR-2 y pVR-5 respondían a una feromona distinta de cAD1, cPD1 y de cAM373.

6. BIBIOGRAFIA

1. **Al-Obeid, S., D. Billot-Klein, J. Van Heijenoort, E. Collatz, L. Gutmann. 1992.** Replacement of the essential penicillin-binding protein 5 by high-molecular mass PBPs may explain vancomycin-beta-lactam synergy in low-level vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* D366. *FEMS Microbiol. Lett.* 70: 79-84.
2. **Al-Obeid, S., E. Collatz, L. Gutmann. 1990.** Mechanism of resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366 and *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 252-256.
3. **Al-Obeid, S., L. Gutmann, D.M. Shlaes, R. Williamson, E. Collatz. 1990.** Comparison of vancomycin-inducible proteins from four strains of Enterococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 70: 101-106.
4. **Al-Obeid, S., L. Gutmann, R. Williamson. 1990.** Modification of penicillin-binding proteins of penicillin-resistant mutants of different species of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 613-618.
5. **Amalfitano, G., A. Grossato, R. Fontana. 1991.** Mechanism of action of BAY v 3522, a new cephalosporin with unusually good activity against enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1900-1904.
6. **Anderson, D.G., L.L. McKay. 1983.** Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 549-552.
7. **Arthur, M., P. Courvalin. 1993.** Genetics and mechanism of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1563-1571.
8. **Arthur, M., F. Depardieu, H.A. Snaith, P.E. Reynolds, P. Courvalin. 1994.** Contribution of VanY D,D carboxipeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* by hydrolysis of peptidoglycan precursors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1899-1903.
9. **Arthur, M., C. Molinas, T.D.H. Bugg, G.D. Wright, C.T. Walsh, P. Courvalin. 1992.** Evidence for in vivo incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 867-869.
10. **Arthur, M., C. Molinas, P. Courvalin. 1992.** The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* 174: 2582-2591.

11. **Arthur, M., C. Molinas, P. Courvalin. 1992.** Sequence of the *vanY* gene required for production of a vancomycin-inducible D,D-carboxipeptidase in *Enterococcus faecium* BM4147. *Gene* 120: 111-114.
12. **Arthur, M., C. Molinas, F. Depardieu, P. Courvalin. 1992.** Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* 175: 117-127.
13. **Arthur, M., C. Molinas, S. Dutka-Malen, P. Courvalin. 1991.** Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. *Gene*. 133: 133-134.
14. **Awada, A., P. van der Auwera, F. Meunier, D. Daneau, J. Klastersky. 1992.** Streptococcal and enterococcal bacteremia in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* 15: 33-48.
15. **Barna, J.C.J., D.H. Williams. 1984.** The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Ann. Rev. Microbiol.* 38: 339-357.
16. **Barry, A.L., R.N. Jones, T.L. Gavan, C. Thornsberry. 1987.** Quality control limits for teicoplanin susceptibility tests and confirmation of disk diffusion interpretative criteria. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1812-1814.
17. **Bates, J., J.Z. Jordens, D.T. Griffiths. 1994.** Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J. Antimicrob. Chemother.* 34: 507-514.
18. **Bentorcha, F., G. Cespédès, T. Horaud. 1991.** Tetracycline resistance heterogeneity in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 808-812.
19. **Besnier, J.M., C. Leport, A. Buré, J.L. Vildé. 1990.** Vancomycin-aminoglycoside combinations in therapy of endocarditis caused by *Enterococcus* species and *Streptococcus bovis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 130-133.
20. **Billot-Klein, D., L. Gutmann, E. Collatz, J. van Heijenoort. 1992.** Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1487-1490.

21. **Billot-Klein, D., L. Gutmann, S. Sablé, E. Guittet, J. van Heijenoort. 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*. *J. Bacteriol.* 176: 2398-2405.
22. **Bingen, E.H., E. Denamur, N.Y. Lambert-Zechovsky, J. Elion. 1991.** Evidence for the genetic unrelatedness of nosocomial vancomycin resistant *Enterococcus faecium* strains in a pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1888-1892.
23. **Boaretti, M., P. Canepari, M.M. Lleò, G. Satta. 1993.** The activity of daptomycin on *Enterococcus faecium* protoplasts: indirect evidence supporting a novel mode of action on lipoteichoic acid synthesis. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 227-235.
24. **Boulanger, J.M., E.L. Ford-Jones, A.G. Matlow. 1991.** Enterococcal bacteremia in a pediatric institution: a four-year review. *Rev. Infect. Dis.* 13: 847-856.
25. **Boyce, J.M., S.M. Opal, J.W. Chow, M.J. Zervos, G. Potter-Bynoe, C.B. Sherman, R.L.C. Romulo, S. Fortna, A.A. Medeiros. 1994.** Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable *vanC* class vancomycin resistance. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1148-1153.
26. **Brisson-Noél, A., S. Dutka-Malen, C. Molinas, R. Leclerq, P. Courvalin. 1990.** Cloning and heterospecific expression of the resistance determinant *vanA* encoding high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus faecium* BM4147. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 924-927.
27. **Brunet, F., G. Vedel, F. Dreyfus, J.F. Vaxelaire, T. Giraud, B. Schremmer, J.F. Monsallier. 1990.** Failure of teicoplanin therapy in two neutropenic patients with staphylococcal septicemia who recovered after administration of vancomycin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 145-147.
28. **Bryce, E.A., S.J.V. Zmcov, A.M. Clarke. 1991.** Species identification and antibiotic resistance patterns of the enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 745-747.
29. **Bugg, T. D. H., Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, C. T. Walsh. 1991.** Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-Alanine: D-Alanine ligase of altered substrate specificity. *Biochemistry.* 30: 2017-2021.

30. **Bugg, T.D.H., G.D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, C.T. Walsh. 1991.** Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry*. 30: 10408-10415.
31. **Canepari, P., M. Boaretti, M. LLeó, G. Satta. 1990.** Lipoteichoic acid as a new target for activity of antibiotics: mode of action of daptomycin (LY146032). *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1220-1226.
32. **Caron, F., C. Carbon, L. Gutmann. 1991.** Triple-combination penicillin-vancomycin-gentamicin for experimental endocarditis caused by moderately penicillin- and highly glycopeptide- resistant isolate of *Enterococcus faecium*. *J. Infect. Dis.* 164: 888-893.
33. **Casal, J., O. del Valle, G. Gallés, G. Roig, M.D. Viu. 1990.** Enterococos: alto nivel de resistencia a aminoglicósidos en cepas aisladas por distintos laboratorios de Cataluña. *Enf. Infe. Microbiol. Clín.* 8: 213-217.
34. **Cercenado, E., G.M. Eliopoulos, C.B. Wennersten, R.C. Moellering, JR. 1992.** Absence of synergistic activity between ampicillin and vancomycin against highly vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2201-2203.
35. **Cercenado, E., M.E. García-Leoni, P. Rodeño, M. Rodríguez-Creixems. 1990.** *Carta. J. Clin. Microbiol.* 28: 829.
36. **Centers for Disease Control. 1993.** Nosocomial enterococci resistant to vancomycin United States, 1989-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 42: 589-599.
37. **Chenoweth, C., D. Schaberg. 1990.** The Epidemiology of enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 80-89.
38. **Chmara, H., S. Ripa, F. Mignini, E. Borowski. 1991.** Bacteriolytic effect of teicoplanin. *J. Gen. Microbiol.* 137: 913-919.
39. **Clark, N.C., R.C. Cooksey, B.C. Hill, J.M. Swenson, F.C. Tenover. 1993.** Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2311-2317.

40. Clewell, D.B. 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 90-102.
41. Clewell, D.B., F.Y. An, B.A. White, C. Gawron-Burke. 1985. *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918). *J. Bacteriol.* 162: 1212-1220.
42. Clewell, D.B., Y. Yagi, Y. Ike, R.A. Craig, B.L. Brown, F. An. 1982. Sex pheromone in *Streptococcus faecalis*: multiple pheromone system in strain DS5, similarities of pAD1 and pAM 1, and mutants of pAD1 altered in conjugative properties. In: Schlessinger, D. *Microbiology 1982*, pp. 97- 100. American Society for Microbiology, Washington.
43. Clewell, D.B.. 1981. Plasmids, drugs resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol. Rev.* 45: 409-436.
44. Clewell, D.B., C. G.Gawron-Burke. 1986. Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci. *Ann. Rev. Microbiol.* 40: 635-659.
45. Clewell, D.B., K.E. Weaver. 1989. Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid.* 21: 175-184.
46. Colmar, I., T. Horaud. 1987. *Enterococcus faecalis* hemolysin-bacteriocin plasmid belong to the same incompatibility group. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 567-570.
47. Collins, M.D., D. Jones, J.A.E. Farrow, R. Kilpper-Bälz, K.H. Schleifer. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 220-223.
48. Courvalin, P. 1990. Resistance of enterococci to glycopeptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2291-2296.
49. Courvalin, P., C. Carlier, E. Collatz. 1980. Plasmid- mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *J. Bacteriol.* 143: 541-551.
50. Crider, S.R., S.D. Colby. 1985. Susceptibility of enterococci to trimethoprim and trimethoprim-sulfametoxazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 71-75.

51. Daub, E., L.E. Zawadzke, D. Botstein, C.T. Walsh. 1988. Isolation, cloning, and sequencing of the *Salmonella typhimurium* *ddlA* gene with purification and characterization of its product, D-Alanine:D-Alanine ligase (ADP forming). *Biochemistry*. 27: 3701-3708.
52. Daum, R.S., S. Gupta, R. Sabbagh, W.M. Milewski. 1992. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *J. Infect. Dis.* 166: 1066-1072.
53. Dever, L.L., J.H. Jorgensen, A.G. Barbour. 1993. In vitro activity of vancomycin against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1115-1121.
54. Devriese, L. A., A. Van de Kerckhove, R. Kilpper-Bälz, K. H. Schleifer. 1987. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 37: 257-259.
55. Doucet-Populaire, F., P. Trieu-Cout, A. Andremont, P. Courvalin. 1992. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli* in digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 502-504.
56. Dubettier, S., A. Boibieux, M. Lagable, L. Crevon, D. Peyramond, H. Milon. 1991. Red man syndrome with teicoplanin. *Rev. Infect. Dis.* 13: 770.
57. Dunny, G.M., B.L. Brown, D.B. Clewell. 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: Evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3479-3483.
58. Dutka-Malen, S., B. Blaimont, G. Wauters, P. Courvalin. 1994. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 1675-1677.
59. Dutka-Malen, S., C. Molinas, M. Arthur, P. Courvalin. 1990. The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl -D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *Mol. Gen. Genet.* 224: 364-372.
60. Dutka-Malen, S., C. Molinas, M. Arthur, P. Courvalin. 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.

61. Dutka-Malen, S., R. Leclercq, V. Coutant, J. Duval, P. Courvalin. 1990. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1875-1879.
62. Ehrenfeld, E.E., R.E. Kessler, D.B. Clewell. 1986. Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J. Bacteriol.* 168: 6-12.
63. Eliopoulos, G.M., C.T. Eliopoulos. 1990. Therapy of Enterococcal Infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 118-126.
64. Eliopoulos, G.M., C. Wennersten, S. Zigelboim-Daum, E. Reiszner, D. Goldmann, R.C. Moellering, JR. 1988. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus (Enterococcus) faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1528-1532.
65. Evers, S., P.E. Reynolds, P. Courvalin. 1994. Sequence of the *vanB* and *ddl* genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583. *Gene* 140: 97-102.
66. Evers, S., D.F. Sahm, P. Courvalin. 1993. The *vanB* gene of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to genes encoding D-Ala:D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC. *Gene* 124: 143-144.
67. Facklam, R.R., M.D. Collins. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27: 731-734.
68. Facklam, R., D. Hollis, M.D. Collins. 1989. Identification of gram-positive cocci and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 27: 724-730.
69. Facklam, R.R., J.A. Washington II. 1991. *Streptococcus* and related catalase-negative gram-positive cocci. En: Balows, A., W.J. Hausler, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy. *Manual of Clinical Microbiology*, 5^a Ed. pp. 238-257. American Society for Microbiology. Washington.

70. Fantin, B., R. Leclerq, M. Arthur, J. Duval, C. Carbon. 1991. Influence of low-level resistance to vancomycin on efficacy of teicoplanin and vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1570-1575.
71. Farrow, J.A.E., M.D. Collins. 1985. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. Int. J. Sys. Bacteriol. 35: 73-75.
72. Fekety, R. 1990. Vancomycin and teicoplanin. En: Mandell, G.L., R.G. Douglas, J.E. Bennet. Principles and Practice of Infectious Diseases, 3^a Ed. pp. 317-323. Churchill Livingstone. New York.
73. Fiedler, S., R. Wirth. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. Anal. Biochem. 170: 38-44.
74. Flournoy, D.J. 1994. Antimicrobial susceptibilities of bacteria from nursing home residents in Oklahoma. Gerontology 40: 53-56.
75. Fontana, R., P. Canepari, M. M. Lleò, G. Satta. 1990. Mechanism of resistance of enterococci to beta-lactam antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9: 103-105.
76. Fontana, P., A. Grossato, L. Rossi, Y.R. Cheng, G. Satta. 1985. Transition from resistance to hypersusceptibility to β -lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* highly resistant to penicillin. Antimicrob. Agents Chemother. 28: 678-683.
77. Fraimow H.S., D.L. Jungkind, D.W. Lander, D.R. Delso, J.L. Dean. 1994. Urinary tract infection with an *Enterococcus faecalis* isolate that requires vancomycin for growth. Ann. Intern. Med. 121: 22-26.
78. Fraimow, H.S., E. Venuti. 1992. Inconsistent bactericidal activity of triple-combination therapy with vancomycin-ampicillin, and gentamicin against vancomycin-resistant, highly ampicillin resistant *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 1563-1566.
79. French, G., Y. Abdulla, R. Heathcock, S. Poston, J. Cameron. 1992. Vancomycin resistance in south London. Lancet 339: 818-819.

80. Galvez, A., E. Valdivia, M. Maqueda, E. Montoya. 1985. Production of bactericin-like substances by group D streptococci of human origin. *Microbios*. 43: 223-232.
81. Galanakis, N., H. Giamarellou, N. Vlachogiannis. 1988. Poor efficacy of teicoplanin in treatment of deep-seated staphylococcal infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7: 130-134.
82. Galli, D., F. Lottspeich, R. Wirth. 1990. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol. Microbiol.* 4: 895-904.
83. Galli, D., R. Wirth. 1991. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* sex pheromone plasmids identifies a single homologous DNA region which codes for aggregation substance. *J. Bacteriol.* 173: 3029-3033.
84. Garrison, M.W., K. Vance-Bryan, T.A. Larson, J.P. Toscano, J.C. Rotschafer. 1990. Assessment of effects of protein binding on daptomycin and vancomycin killing of *Staphylococcus aureus* by using an in vitro pharmacodynamic model antimicrob. *Agents Chemother.* 34: 1925-1931.
85. George, R.C., A.H.C. Uttley. 1989. Susceptibility of enterococci and epidemiology of enterococcal infection in the 1980s. *Epidem. Inf.* 103: 403-413.
86. Gold, H.S., E. Cercenado, C. Thauvin-Eliopoulos, G.M. Eliopoulos, C.B. Wennersten, R.C. Moellering. 1993. A gene conferring resistance to vancomycin but not teicoplanin in isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* demonstrates homology with *vanB*, *vanA*, and *vanC* genes of enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1604-1609.
87. Goldstein, E.J.C., D.M. Citron. 1985. Comparative *in vitro* inhibitory activity of cefpirome, ceftazidime and cefotaxime against *Pseudomonas aeruginosa*, enterococci, *Staphylococcus epidermidis* and methicillin -susceptible and -resistant and tolerant and non-tolerant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 160-162.
88. Goldstein, F. W., A. Coutrot, A. Sieffer, J. F. Acar. 1990. Percentages and distributions of teicoplanin- and vancomycin- resistant strains among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 899-900.

89. **Gopal Rao, G., K.J. Morris, R.C. George, N. Woodford. 1992.** Vancomycin-resistant enterococci in a district general hospital. *Lancet.* 340: 1471-1472.
90. **Gordon, S., J.M. Swenson, B.C. Hill, N.E. Pigott, R.R. Faklam, R.C. Cooksey, C. Thornsberry, Enteroc. Study Group, W.R. Jarvis, F.C. Tenover. 1992.** Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2373-2378.
91. **Graninger, W., R. Ragette. 1992.** Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. *Clin. Infect. Dis.* 15: 49-57.
92. **Grayson, M.L., G.M. Eliopoulos, C.B. Wennersten, K.L. Ruoff, P.C. Girolami, M. Ferraro, R.C. Moellering, JR.. 1991.** Increasing resistance to β -lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22-year review at one institution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2180-2184.
93. **Gray, J.W., D. Stewart, S.J. Pedler. 1991.** Species identification and antibiotic susceptibility testing of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1943-1945.
94. **Green, M., K. Barbadora, R.M. Wadowsky. 1994.** Simple test of synergy between ampicillin and vancomycin for resistant strains of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2837-2839.
95. **Green, M., B. Binczewski, A.W. Pasculle, M. Edmund, K. Barbadora, S. Kusne, D.M. Shlaes. 1993.** Constitutively vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to synergistic β -lactam combinations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1238-1242.
96. **Greenwood, D. 1989.** Antibiotic resistance in enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 631-635.
97. **Greenwood, D. 1988.** Microbiological properties of teicoplanin. *J. Antimicrob. Chemother.* 21, Sup. A: 1-13.
98. **Guiot, H.F.L., W.E. Peetermans, F.W. Sebens. 1991.** Isolation of vancomycin-resistant enterococci in haematologic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10: 32-34.

99. Gutmann, L., S. Al-Obeid, D. Billot-Klein, M. Guerrier, E. Collatz. 1994. Synergy and resistance to synergy between β -lactam antibiotics and glycopeptides against glycopeptide resistant strains of *Enterococcus faecium*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 824-829.
100. Gutmann, L., D. Billot-Klein, S. Al-Obeid, I. Klare, S. Francoual, E. Collatz, J. van Heijenoort. 1992. Inducible carboxypeptidase activity in vancomycin resistant enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 36: 77-80.
101. Hall, L.M., B. Duke, M. Guiney, R. Williams. 1992. Typing of *Enterococcus* species by DNA restriction fragment analysis. J. Clin. Microbiol. 30: 915-919.
102. Hall, L.M., H.Y. Chen, R.J. Williams. 1992. Vancomycin-resistant *Enterococcus durans*. Lancet. 340:1105.
103. Hanberger, H., L.E. Nilsson, R. Maller, B. Isaksson. 1991. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of initial killing and postantibiotic effect and influence of Ca^{+2} and albumin on these drugs. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1710-1716.
104. Handwerger, S. 1994. Alterations in peptidoglycan precursors and vancomycin susceptibility in Tn917 insertion mutants of *Enterococcus faecium* 221. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 473-475.
105. Handwerger, S., L.F. Discotto, J. Thanassi, M.J. Pucci. 1992. Insertional inactivation of a gene which controls expression of vancomycin resistance on plasmid pHKK100. FEMS Microbiol. Lett. 71: 11-14.
106. Handwerger, S., A. Kolokathis. 1990. Induction of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* by inhibition of transglycosylation. FEMS Microbiol. Lett. 70: 167-170.
107. Handwerger, S., D.C. Perlman, D. Altarac, V. McAuliffe. 1992. Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of enterococci. Clin. Infect. Dis. 14: 655-661.
108. Handwerger, S., M.J. Pucci, A. Kolokathis. 1990. Vancomycin resistance is encoded on a pheromone response plasmid in *Enterococcus faecium* 228. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 358-360.

109. Handwerger, S., M.J. Pucci, K.J. Volk, J. Liu, M.S. Lee. 1992. The cytoplasmic peptidoglycan precursor of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* terminates in lactate. J. Bacteriol. 174: 5982-5984.
110. Handwerger, S., M.J. Pucci, K.J. Volk, J. Liu, M.S. Lee. 1994. Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. J. Bacteriol. 176: 260-264.
111. Handwerger, S., J. Skoble, L.F. Discotto, M.J. Pucci. 1995. Heterogeneity of the *vanA* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 362-368.
112. Hardie, J.M. 1986. Other Streptococci. En: Sneath, P.H.A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. pp. 1068-1071. Williams & Wilkins. Baltimore.
113. Hardie, J.M. 1986. Genus *Streptococcus*. En: Sneath, P.H.A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. pp. 1043-1047. Williams & Wilkins. Baltimore.
114. Harwick, H.J., G.M. Kalmanson, L.B. Guze. 1973. In vitro activity of ampicillin or vancomycin combined with gentamicin or streptomycin against enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 4: 383-387.
115. Hayden, M.K., G.M. Trenholme, J.E. Schultz, D.F. Sahm. 1993. In vivo development of teicoplanin resistance in a *vanB* *Enterococcus faecium* isolate. J. Infect. Dis. 167: 1224-1227.
116. Healy, D.P., J.V. Sahai, S.H. Fuller, R.E. Polk. 1990. Vancomycin-induced histamine release and "red man syndrome": comparison of 1- and 2-hour infusions. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 550-554.
117. Herman, D.J., D.N. Gerding. 1991. Antimicrobial resistance among enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1-4.
118. Herman, D.J., D.N. Gerding. 1991. Screening and treatment of infections caused by resistant enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 215-219.
119. Holman, T.R., Z. Wu, B.L. Wanner, C.T. Walsh. 1994. Identification of the DNA-binding site for the phosphorylated VanR protein required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Biochemistry 33: 4625-4631.

120. **Hodel-Christian, S.L., B.E. Murray. 1991.** Characterization of the gentamicin resistance transposon Tn5281 from *Enterococcus faecalis* and comparison to staphylococcal transposons Tn4001 and Tn4031. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1147-1152.
121. **Hoge, C.W., J. Adams, B. Buchanan, S.D. Sears. 1991.** Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal. *Rev. Infect. Dis.* 13: 600-605.
122. **Huygens, F. 1993.** Vancomycin binding to cell walls of non-streptococcal vancomycin-resistant bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 551-558.
123. **Ike, Y., R. A. Craig, B. A. White, Y. Yagi, D. B. Clewell. 1983.** Modification of *Streptococcus faecalis* sex pheromones after acquisition of plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 5369-5373.
124. **Jacob, A., G.I. Douglas, S.J. Hobbs. 1975.** Self-transferable plasmids determining the hemolysin and bacteriocin of *Streptococcus faecalis var. zymogenes*. *J. Bacteriol.* 121: 863-872.
125. **Jhonson, A. P., A. H. Uttley, N. Woodford, R. C. George. 1990.** Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 280-291.
126. **Jhonson, C.C., S. Taylor, P. Pitsakis, P. May, M.E. Levison. 1992.** Bactericidal activity of ramoplanin against antibiotic-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2342-2345.
127. **Jones, R.N. 1989.** Effects of reduced cation supplement recommendations (National Committee for Clinical Laboratory Standards) on daptomycin antistaphylococcal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1652-1653.
128. **Jones, R.N., A.L. Barry. 1989.** In vitro evaluation of ramoplanin (A16686 or MDL62198): a new depsipeptide complex for potential topical use. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12: 279-282.
129. **Jordan, D.C., P.E. Reynolds. 1975.** Vancomycin. En: Corcoran, J.W., E. Hahn. *Antibiotics. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents. Vol. III.* pp. 704-718. Springer-Verlag. Berlin.

130. **Jordens, J.Z., J. Bates, D.T. Griffiths. 1994.** Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 34: 515-528.
131. **Kalima, A.P. 1970.** The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 185-189.
132. **Kaplan, A.H., P.H. Gillian, R.R. Facklam. 1988.** Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1216-1218.
133. **Karanfil, L.V., M. Murphy, A. Josephson, R. Gaynes, L. Mandel, B.C. Hill, J.M. Swenson. 1992.** A cluster of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 13: 195-200.
134. **Klare, I., H. Heier, H. Claus, W. Witte. 1993.** Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible high-level resistance to glycopeptides. *FEMS Microbiol. Lett.* 106: 23-30.
135. **Klare, I., A.C. Rodloff, J. Wagner, W. Witte, R. Hakenbeck. 1992.** Overproduction of a penicillin-binding protein is not the only mechanism of penicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 783-787.
136. **Knight, R.G., D.M. Shlaes. 1986.** Deoxyribonucleic acid relatedness of *Enterococcus hirae* and "*Streptococcus durans*" homology group. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 111-113.
137. **Krogstad, D.J., R.C. Moellering, JR. 1986.** Antimicrobial combinations. En: Lorian, V. *Antibiotics in laboratory medicine.* 2^a Ed. pp. 537-560. Williams & Wilkins. Baltimore.
138. **Kureishi, A., P.J. Jewesson, M. Rubinger, C.D. Cole, D.E. Reece, G.L. Phillips, J.A. Smith, A.W. Chow. 1991.** Double-blind comparison of teicoplanin versus vancomycin in febrile neutropenic patients receiving concomitant tobramycin and piperacillin: effect on cyclosporin A-associated nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2246-2252.
139. **Landman, D., N.K. Mobaraki, J.M. Quale. 1993.** Novel antibiotic regimens against *Enterococcus faecium* resistant to ampicillin, vancomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1904-1908.

140. Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227: 680-685.
141. Leblanc, D.J., J.M. Inamine, L.N. Lee. 1986. Broad geographical distribution of homologous erythromycin, kanamycin, and streptomycin resistance determinants among group D streptococci of human and animal origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29: 549-555.
142. Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, P. Courvalin. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* 319: 157-161.
143. Leclercq, R., E. Derlot, M. Weber, J. Duval, P. Courvalin. 1989. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 10-15.
144. Leclercq, R., S. Dutka-Malen, J. Duval, P. Courvalin. 1992. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2005-2008.
145. Leclercq, R., E. Bingen, Q.H. Su, N. Lambert-Zechovski, P. Courvalin, J. Duval. 1991. Effects of combinations of β -lactams, daptomycin, gentamicin, and glycopeptides against glycopeptide-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 92-98.
146. Lewis, C.M., M.J. Zervos. 1990. Clinical manifestations of enterococcal infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 111-117.
147. Livornese, L.L.Jr., S. Dias, C. Samel, B. Romanowski, S. Taylor, P. May, P. Pitsakis, G. Woods, D. Kaye, M.E. Levison, C.C. Johnson. 1992. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann. Intern. Med.* 117: 112-116.
148. Maniatis, T., E.F. Fritsch, J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
149. Markowitz, S.M., V.D. Wells, D.S. Williams, C.X.G. Stuart, P.E. Coudron, E.S. Wong. 1991. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of β -lactamase producing, aminoglycoside-resistant isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1075-1080.

150. **Martínez-Bueno, M., A. Galvez, E. Valdivia, M. Maqueda. 1990.** A transferable plasmid associated with AS-48 production in *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol. 172: 2817-2818.
151. **Maugein, J., J.L. Pellegrin, G. Brossard, J. Fourche, B. Leng, J. Reiffers. 1990.** In vitro activities of vancomycin and teicoplanin against coagulase-negative staphylococci isolated from neutropenic patients. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 901-903.
152. **Mederski-Samoraj, B.D., B.E. Murray. 1983.** High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of enterococci. J. Infect. Dis. 147: 751-757.
153. **Megran, D.W. 1992.** Enterococcal endocarditis. Clin. Infect. Dis. 15: 63-71.
154. **Messer, J, P.E. Reynolds. 1992.** Modified peptidoglycan precursors produced by glycopeptide-resistant enterococci. FEMS Microbiol. Lett. 73: 195-200.
155. **Meziane-Cherif, D., M. Badet-Denisot, S. Evers, P. Courvalin, B. Badet. 1994.** Purification and characterization of the VanB ligase associated with type B vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* V583. FEBS Lett. 354: 140-142.
156. **Montecalvo, M.A., H. Horowitz, C. Gedris, C. Carbonaro, F.C. Tenover, A. Issah, P. Cook, G.P. Wormser. 1994.** Outbreak of vancomycin-, ampicillin-, and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in a adult oncology unit. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1363-1367.
157. **Moore, W.E.C., E.P. Cato, L.V.H. Moore. 1985.** Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 approved list of bacterial names (1 January 1980 to 1 January 1985). Int. J. Sys. Bacteriol. 35: 382-407.
158. **Mundt, J.O. 1986.** Enterococci. En: Sneath, P.H.A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. pp. 1063-1065. Williams & Wilkins. Baltimore.
159. **Murray, B.E. 1990.** The Life and Times of the *Enterococcus*. Clin. Microbiol. Rev. 3: 46-65.
160. **Murray, B.E., B. Mederski-Samaroj. 1983.** Transferable β -lactamase. A new mechanism for in vitro penicillin resistance in *Streptococcus faecalis*. J. Clin. Invest. 72: 1168-1171.

161. Murray, B.E., B. Mederski-Samoraj, S.K. Foster, J.L. Brunton, P. Harford. 1986. In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggest a staphylococcal origin. J. Clin. Invest. 77: 289-293.
162. Murray, B.E., F.Y. An., D.B. Clewell. 1988. Plasmids and pheromone response of the β -lactamase producer *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* HH22. Antimicrob. Agents Chemother. 32: 547-551.
163. Murray, B.E., K.V. Singh, S.M. Markowitz, H.A. Lopardo, J.E. Patterson, M.J. Zervos, E. Ruboglio, G.M. Eliopoulos, L.B. Rice, et al. 1991. Evidence for clonal spread of a single strain of β -lactamase-producing *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* to six hospital in five states. J. Infect. Dis. 163: 780-785.
164. Nagarajan, R. 1991. Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 605-609.
165. Nakanishi, N., S. Yoshida, H. Wakebe, M. Inoue, S. Mitsuhashi. 1991. Mechanism of clinical resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1053-1059.
166. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1987. Approved standar M2-A3-S2. Performace standars for antimicrobial disk susceptibility test. National Committee for Clinical Laboratory Standars, Villanova Pa.
167. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1988. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved Standar, M7-A. National Committee for Clinical Laboratory Standars, Villanova Pa.
168. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1990. Approved standar M2-A4. Performace standars for antimicrobial disk susceptibility test, 4^o Ed. National Committee for Clinical Laboratory Standars, Villanova Pa.
169. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1991. Third informational supplement M100-S3. Performace standars for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standars, Villanova Pa.
170. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1992. Fourth informational supplement M100-S4. Performace standars for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standars, Villanova Pa.

171. **National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993.** Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standar M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova Pa.
172. **Navarro, F., P. Courvalin. 1994.** Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1788-1793.
173. **Nicas, T.I., C.T. Cole, D.A. Preston, A.A. Schabel, R. Nagarajan. 1989.** Activity of glycopeptides aganist vancomycin-resistant gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1477-1481.
174. **Nicas, T.I., C.Y.E. Wu, J.N. Hobbs, JR., D.A. Preston, N.E. Allen. 1989.** Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1121-1124.
175. **Nichols, R.L., A.C. Muzik. 1992.** Enterococcal infections in surgical patients: the mystery continues. Clin Infect. Dis. 15: 72-76.
176. **Nikaido, H., M. Vaara. 1987.** Outer Membrane. En: Neidhart, F.C., *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. pp. 7-22. American Society for Mycrobiology. Washington.
177. **Noble, W.C., Z. Virani, R.G. Cree. 1992.** Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 72: 195-198.
178. **Oliva, S.L., B.J. Guglielmo, R. Jacobs, V.G. Pons. 1989.** Faliure of intravenous vancomycin and intravenous metronidazole to prevent or treat antibiotic-associated pseudomembranous colitis. J. Infect. Dis. 159: 1154-1155.
179. **Ortega, L., J. Lite, J. Garau. 1991.** Bacteriemia por *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. A propósito de dos casos. Enf. Infec. Microbiol. Clin. 9: 547-550.
180. **Patterson, J.E., A. Wagner, K.K. Zscheck, M.J. Zervos, B. E. Murray. 1990.** Molecular epidemiology of β - lactamase- producing enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 302-305.
181. **Pérez-Díaz, J.C., M.F. Vicente, F. Baquero. 1982.** Plasmids in *Listeria*. Plasmid. 8: 112-118.

182. Perri, M.B., J.W. Chow, M.J. Zervos. 1993. In vitro activity of sparfloxacin and clinafloxacin against multidrug-resistant enterococci. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 17: 151-155.
183. Pfeiffer, R.R. 1981. Structural features of vancomycin. *Rev. Infect. Dis.* 3(Suppl): 205-209.
184. Pompei, R., G. Lampis, F. Berlutti, M.C. Thaller. 1991. Characterization of yellow-pigmented enterococci from severe human infections. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2884-2886.
185. Popieniek, P.H., R.F. Pratt. 1991. Kinetics and mechanism of binding of specific peptides to vancomycin and other glycopeptide antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 2264-2270.
186. Poyart-Salmeron, C., P. Trieu-Cout, C. Carlier, A. MacGowan, J. McLauchlin, P. Courvalin. 1992. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 463-466.
187. Quintiliani Jr, R., S. Evers, P. Courvalin. 1993. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *J. Infect. Dis.* 167: 1220-1223.
188. Quintiliani Jr, R., P. Courvalin. 1994. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements from chromosome to chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* 119: 354-364.
189. Rake, J.B., R. Gerber, R.J. Mehta, D.J. Newman, Y.K. Oh, C. Phelen, M.C. Shearer, R.D. Sitrin, L.J. Nisbet. 1986. Glycopeptide antibiotics: a mechanism-based screen employing a bacterial cell wall receptor mimetic. *J. Antibiotics.* 39: 58-67.
190. Reguera, J.A., J.C. Pérez-Díaz, M. Martínez-Ferrer, F. Baquero. 1989. Conjugative vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in Spain. 4th European Congress of Clinical Microbiology. Nice. resúmen nº614/OS31
191. Reynolds, P.E. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 943-950.

192. Reynolds, P.E., F. Depardieu, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin. 1994. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol. Microbiol.* 13: 1065-1070.
193. Reynolds, P.E., H.A. Snaith, A.J. Maguire, S. Dutka-Malen, P. Courvalin. 1994. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Biochem. J.* 301: 5-8.
194. Rice, L.B., G.M. Eliopoulos, C. Wennersten, D. Goldmann, G.A. Jacoby, R.C. Moellering. 1991. Chromosomally mediated β -lactamase production and gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 272-276.
195. Rice, L.B., S.B. Calderwood, G.M. Eliopoulos, B.F. Farber, A.W. Karchmer. 1991. Enterococcal endocarditis: a comparison of prosthetic and native valve disease. *Rev. Infect. Dis.* 13: 1-7.
196. Rice, L.B., S.H. Marshall. 1992. Evidence of incorporation of the chromosomal β -lactamase gene of *Enterococcus faecalis* CH19 into a transposon derived from staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1843-1846.
197. Rodeño, M. 1990. Estudio prospectivo de los aislados de *Enterococcus* en un hospital general. Tesis Doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
198. Rosato, A., J. Pierre, D. Billot-Klein, A. Buu-Hoi, L. Gutman. 1995. Inducible and constitutive expression of resistance to glycopeptides and vancomycin dependence in glycopeptide-resistant *Enterococcus avium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 830-833.
199. Ruoff, K.L. 1990. Recent Taxonomic Changes in the Genus *Enterococcus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 75-79.
200. Ruoff, K.L., L. Maza, M.J. Murtagh, J.D. Spargo, M.J. Ferraro. 1990. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28: 435-437.
201. Sader, H.S., M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.J. Hollis, R.N. Jones. 1994. Evaluation and characterization of multiresistant *Enterococcus faecium* from 12 U.S. medical centers. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2840-2842.

202. Sahm, D.F., J. Kissinger, M. S. Gilmore, P. R. Murray, R. Mulder, J. Solliday, B. Clarke. 1989. In Vitro Susceptibility Studies of Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1588-1591.
203. Sahm, D.F., S. Boonlayangoor, P.C. Iwen, J.L. Baade, G.L. Woods. 1991. Factors influencing determination of high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 1934-1939.
204. Sahm, D.F., C. Torres. 1988. High-content aminoglycoside disks for determining aminoglycoside- penicillin synergy against *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Microbiol.* 26: 257-260.
205. Sanyal, D., D. Greenwood. 1993. An electronmicroscope study of glycopeptide antibiotic- resistant strains of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 39: 204-210.
206. Sanyal, D., A.P. Johson, R.C. George, R. Edwards, D. Greenwood. 1993. In-vitro characteristics of glycopeptide resistant strains of *staphylococcus epidermidis* isolated from patients on CAPD. *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 267-278.
207. Sapico, F.L., H.N. Canawati, V.J. Ginunas, D.S. Gilmore, J.Z. Montgomerie, W.J. Tuddenham, R.R. Facklam. 1989. Enterococci highly resistant to penicillin and ampicillin: an emerging clinical problem ?. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2091-2095.
208. Schaberg, D.R., M.J. Zervos. 1986. Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 817-822.
209. Schaberg, D.R., W.I. Dillon, M.S. Terpenning, K.A. Robinson, S.F. Bradley, C.A. Kauffman. 1992. Increasing resistance of enterococci to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 2533-2535.
210. Schleifer, K.H., R. Kilpper-Bälz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov.. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 34: 31-34.
211. Schwalbe, R.S., J.T. Stapleton, P.H. Gilligan. 1987. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. *N. Engl. J. Med.* 316: 927-931.

212. **Sheldrick, G.M., P.G. Jones, O. Kennard, D.H. Williams, G.A. Smith. 1978.** Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature*. 271: 223-225.
213. **Shlaes, D.M., S. Al-Obeid, J.H. Shlaes, A. Boisivon, R. Williamson. 1989.** Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium*, D399. *J. Antimicrob. Chemother.* 23: 503-508.
214. **Shlaes, D.M., S. Al-Obeid, J.H. Shlaes, R. Williamson. 1989.** Activity of various glycopeptides against an inducibly vancomycin-resistant strain of *Enterococcus faecium* (D366). *J. Infect. Dis.* 159: 1132-1135.
215. **Shlaes, D.M., B. Binczewski. 1990.** Enterococcal resistance to vancomycin and related cyclic glycopeptide antibiotics. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 106-110.
216. **Shlaes, D.M., A. Bouvet, C. Devine, J.H. Shlaes, S. Al-Obeid, R. Williamson. 1989.** Inducible, transferable resistance to vancomycin in *Enterococcus faecalis* A256. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 198-203.
217. **Shlaes, D.M., L. Etter, L. Gutmann. 1991.** Synergistic killing of vancomycin-resistant enterococci of classes A, B, and C by combinations of vancomycin, penicillin, and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 776-779.
218. **Shlaes, D.M., J.H. Shlaes, J. Davies, R. Williamson. 1989.** *Escherichia coli* susceptible to glycopeptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 192-197.
219. **Simon, C., W. Stille, E.J. Perea. 1987.** Vancomicina. En: Simon, C., W. Stille, E.J. Perea. *Manual de terapéutica antimicrobiana*. pp. 222-227. Salvat Editores. Barcelona.
220. **Simon, C., W. Stille, E.J. Perea. 1987.** Teicoplanina. En: Simon, C., W. Stille, E.J. Perea. *Manual de terapéutica antimicrobiana*. pp. 227-228. Salvat Editores. Barcelona.
221. **Smith, M.C., B.E. Murray. 1992.** Comparison of enterococcal and staphylococcal β -lactamase-encoding fragments. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 273-276.

-
222. **Somner, E.A., P.E. Reynolds. 1990.** Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramoplanin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 413-419.
223. **Soussy, C.S., R. Cluzel, P. Courvalin, the comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 1994.** Definition and determination of in vitro antibiotics susceptibility breakpoints for bacteria in France. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 238-246.
224. **Sprat, B.G., A.B. Pardee. 1975.** Penicillin-binding proteins and cell-shape in *Escherichia coli* *Nature (London)*. 254: 516-517.
225. **Standiford, H.C. 1990.** Tetracyclines and chloramphenicol. En: Ed. Mandell, G.L., R.G. Douglas, J.E. Bennet. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3^a Ed. pp. 284-295. Churchill Livingstone. New York.
226. **Steigbigel, N.H. 1990.** Erythromycin, lincomycin, and clindamicin. En: Ed. Mandell, G.L., R.G. Douglas, J.E. Bennet. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3^a Ed. pp. 308-317. Churchill Livingstone. New York.
227. **Stock, J.B., A.J. Ninfa, A.M. Stock. 1989.** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* 53: 450-490.
228. **Swenson, J.M., N.C. Clark, M.J. Ferraro, D.F. Sahn, G. Doern, M.A. Pfaller, L.B. Reller, M.P. Weinstein, R.J. Zabransky, F.C. Tenover. 1994.** Development of a standardized screening method for detection of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1700-1704.
229. **Swenson, J.M., R.R. Facklam, C. Thornsberry. 1990.** Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 543-549.
230. **Swenson, J.M., M.J. Ferraro, D.F. Sahn, P. Charache, The National Committee for Clinical Laboratory Standards Working Group on Enterococci, F.C. Tenover. 1992.** New vancomycin disk diffusion breakpoints for enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 2525-2528.
231. **Swenson, J.M., B.C. Hill, C. Thornsberry. 1989.** Problems with the disk diffusion test for detection of vancomycin resistance in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2140-2142.

232. Toala, P., A. McDonald, C. Wilcox, M. Finland. 1969. Susceptibility of group D *Streptococcus* (*Enterococcus*) to 21 antibiotics in vitro, with special reference to species differences. *Am. J. Med. Sci.* 258: 416-430.
233. Tortorello, M.L., G.M. Dunny. 1985. Identification of multiple cell surface antigens associated with the sex pheromone response of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 162: 131-137.
234. Torres, C., J.A. Reguera, M.J. Sanmartin, J.C. Pérez-Díaz, F. Baquero. 1994. VanA- mediated vancomycin- resistant *Enterococcus* in Sewage. *J. Antimicrob. Chemother.* 33: 553-561.
235. Trieu-Cout, P., C. Carlier, P. Courvalin. 1988. Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 4388-4391.
236. Tuomanen, E., D.T. Durack, A. Tomasz. 1986. Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 521-527.
237. Uttley, A.H.C., C.H. Collins, J. Naidoo, R.C. George. 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* i: 57-58.
238. Uttley, A.H.C., R.C. George, J. Naidoo, N. Woodford, A.P. Johnson, C.H. Collins, D. Morrison, A.J. Gilfillan, L.E. Fitch, J. Heptonstall. 1989. High- level vancomycin- resistant enterococci causing hospital infections. *Epidem. Infect.* 103: 173-181.
239. Vaitukaitis, J.L. 1981. Production of antisera with small doses of immunogen: Multiple intradermal injections. *Methods in Enzimology.* 73: 46-51. Academic Press. New York.
240. Venditti, M., V. Gelfusa, P. Serra, C. Brandimarte, A. Micozzi, P. Martino. 1992. 4-Week treatment of streptococcal native valve endocarditis with high- dose teicoplanin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 723-726.
241. Venditti, M., A. Tarasi, V. Gelfusa, E. Nicastrì, A. Penni, P. Martino. 1993. Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from hospitalized patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1190- 1192.
242. Vicente, M.F., J.C. Pérez-Díaz, F. Baquero, M.A. de Pedro, J. Berenguer. 1990. Penicillin-binding protein 3 of *Listeria monocytogenes* as the primary lethal target for β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 539-542.

243. Vincent, S., P. Minkler, B. Binciewski, L. Etter, D.M. Shlaes. 1992. Vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1392-1399.
244. Volk, W.A., B. Bizzini, K.R. Jones, F.L. Macrina. 1988. Inter- and intragenic transfer of Tn916 between *Streptococcus faecalis* and *Clostridium tetani*. *Plasmid.* 19: 255-259.
245. Vuorio, R., M. Vaara. 1992. The lipid A biosynthesis mutation lpxA2 of *Escherichia coli* results in drastic antibiotic supersusceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 826-829.
246. Wagner, A.R., B.E. Murray. 1991. Comparison of enterococcal and staphylococcal β -lactamase plasmids. *J. Infect. Dis.* 161: 54-58.
247. Wale, L.J., A.P. Shelton, D. Greenwood. 1989. Scanning electron microscopy of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* exposed to daptomycin. *J. Med. Microbiol.* 30: 45-49.
248. Wallace, M.R., J.R. Mascola, E.C. Oldfield III. 1991. Red man syndrome: incidence, etiology, and prophylaxis. *J. Infect. Dis.* 164: 1180-1185.
249. Walsh, C.T. 1993. Vancomycin resistance: decoding the molecular logic. *Science* 261: 308-309.
250. Watanakunakorn, C. 1981. The antibacterial action of vancomycin. *Rev. Infect. Dis.* 3(Suppl): 210-213.
251. Watanakunakorn, C. 1988. In-vitro induction of resistance in coagulase-negative staphylococci to vancomycin and teicoplanin. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 321-324.
252. Watanakunakorn, C. 1990. Enterococci from blood cultures during 1980-1990: susceptibility to ampicillin, penicillin and vancomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 26: 602-604.
253. Watanakunakorn, C. 1993. Increasing prevalence of resistance to ampicillin, penicillin and vancomycin of enterococci isolated from blood cultures during 1990-1991. *J. Antimicrob. Chemother.* 31: 325-326.

254. Whiteside, M., J. Moore, K. Ratzan. 1993. An investigation of enterococcal bacteriemia. *Am. J. Infect. Control.* 11: 125-129.
255. Whitman, M.S., P.G. Pitsakis, A. Zausner, L.L. Livornese, A.J. Osborne, C.C. Johnson, M.E. Levison. 1993. Antibiotic treatment of experimental endocarditis due to vancomycin- and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2069-2073.
256. Willey, B.M., B.N. Kreiswirth, A.E. Simor, Y. Faur, M. Patel, G. Willians, D.E. Low. 1993. Identification and characterization of multiple species of vancomycin-resistant enterococci, including an evaluation of Vitek software version 7.1. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2777-2779.
257. Willey, B.M., B.N. Kreiswirth, A.E. Simor, G. Willians, S.R. Scriver, A. Phillips, D.E. Low. 1992. Detection of vancomycin resistance in *Enterococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1621-1624.
258. Williamson, R., S. Al-Obeid, J.H. Shlaes, F.W. Goldstein, D.M. Shlaes. 1989. Inducible resistance to vancomycin in *Enterococcus faecium* D366. *J. Infect. Dis.* 159: 1095-1104.
259. Wirth, R., F.Y. AN, D.B. Clewell. 1986. Highly efficient protoplast transformation system for *Streptococcus faecalis* and a new *Escherichia coli*-*S. faecalis* shuttle vector. *J. Bacteriol.* 165: 831-836.
260. Wolfson, J.S., D.C. Hooper. 1989. Fluorquinolone antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 378-424.
261. Woodford, N., D. Morrison, A.P. Johnson, V. Briant, R.C. George, B. Cookson. 1993. Application of DNA probes for rRNA and *vanA* genes to investigation of a nosocomial cluster of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 31: 653-658.
262. Woodford, N., D. Morrison, A.P. Johnson, R.C. George. 1993. Antimicrobial resistance amongst enterococci isolated in the United Kingdom: a reference laboratory perspective. *J. Antimicrob. Chermother.* 32: 344-346.
263. Wright, G.D., T.R. Holman, C.T. Walsh. 1993. Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: A two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry* 32: 5057-5063.

264. Wright, G.D., C. Molinas, M. Arthur, P. Courvalin, C.T. Walsh. 1992. Characterization of Van Y, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM 4147. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1514-1518.
265. Yagi, Y., R.E. Kessler, J.H. Shaw, D.E. Lopatin, F. An, D.B. Clewell. 1983. Plasmid content of *Streptococcus faecalis* strain 39-5 and identification of a pheromone (cPD1)-induced surface antigen. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1207-1215.
266. Yagupsky, P., S. Petry, M.A. Menegus. 1990. Comparison of four methods for testing high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 133-135.
267. Zarlenga, L.J., M.S. Gilmore, D.F. Sahm. 1992. Effects of amino acids on expression of enterococcal vancomycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 902-905.
268. Zigelboim-Daum, S., R.C. Moellering. 1988. Mechanism and significance of antimicrobial resistance in enterococci. En: Actor, P., L. Daneo-Moore, M.L. Higgins, M.R.J. Salton, G.D. Shockman. *Antibiotic inhibition of bacterial cell surface assembly and function.* pp. 603-615. American Society for Microbiology. Washington.
269. Zscheck, K.K., R. Hull, B.E. Murray. 1988. Restriction mapping and hybridization studies of a β -lactamase-encoding fragment from *Streptococcus (Enterococcus) faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 768-769.

Presidencia:

Dr. LESAR NOMBELA CANO

Vocales:

Dr. BERNARDO BACQUERO

Dr. CARMEN TORRES

Dr. JOAQUIN MTNEZ

Secretario:

Dr. ANGELA GOMEZ ALFARO

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que al
margen se expresa, para juzgar esta causa Nocturna,
acordó por UNANIMIDAD calificarla

de APTO. CUM LAUDE

Madrid, 6 de Julio de 1995

El Secretario del Tribunal

Angela Gómez