



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE PRODUCCION DE BETA LACTAMASAS Y DE RESISTENCIA A CONCENTRACION ALTA DE AMINOGLUCOSIDOS EN CEPAS DE *Enterococcus faecalis*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
YAZMIN GARZON TEJEDA

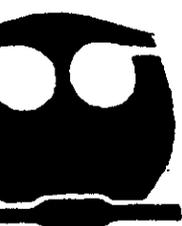
292322



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D.F.

2001





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado:**

**Presidente**

MA. DEL CARMEN CORTES DECUIR

**Vocal**

MAITE ASTIGARRAGA ZAVALAETA

**Secretario**

EFREN ALBERTO PICHARDO REYES

**1er Sup.**

ANTONIO CASTILLO DURAN

**2do Sup.**

ESTRELLA MIRELLA CERVANTES GARCIA

Sitio donde se desarrolló el tema: Hospital Central Militar

**Asesor:**

Gral. Brig. M. C. EFREN ALBERTO PICHARDO REYES



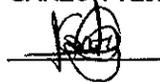
**Supervisor técnico:**

M. en C. JOSE ARELLANO GALINDO



**Sustentante:**

YAZMIN GARZON TEJEDA



## AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme disfrutar la maravillosa experiencia que es la vida.

A La Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad tan privilegiada que me brindó.

Al Dr. Pichardo, militar de gran calidad humana, que me ofreció su confianza y orientación; por la dedicación profesional en la dirección de este trabajo.

A José por la paciencia mostrada en todo momento, la ayuda invaluable en el desarrollo de este trabajo, y por ser además un excelente amigo.

A mis maestros de la Facultad de Química por compartir sus conocimientos y experiencias. Por ser verdaderos guías en la enseñanza.

A mis amigos de la facultad, por los felices momentos inolvidables. Por el aliento que me dieron en el camino tan áspero que impone esta carrera. Por ser amigos de verdad.

## DEDICATORIAS

A mi Padre por el amor que siempre me ha mostrado, por sus consejos con esa manera tan especial de ver la vida, por el apoyo que siempre me ha dado en todos los aspectos de mi vida.

A mi Madre por ser la persona mas admirable y ejemplar, por el amor, la dedicación y el esfuerzo inquebrantables en todo momento y de la cual aún tengo mucho que aprender.

A Marisol y Gerardo por el cariño tan grande que siempre nos hemos tenido y porque deseo firmemente que nos mantengamos unidos durante toda la vida.

A Gerardín y Ulani, el primero por poner a prueba mi carácter y amor; y la segunda por ponerme en la antesala de la maternidad.

A ti mi amado Manuel, por compartir tu vida conmigo, por ser la persona mas especial en mi existencia, por el inmenso amor que provocaste en mí. Por el estímulo y apoyo determinantes en la realización de este trabajo.

A Ariadna, que iluminó mi vida, con esta infinita ternura que puedo sentir. Por el eterno amor que le profesaré.

## INDICE

1. INTRODUCCION. ....	1
1.1 Generalidades. ....	1
1.2 Patogénesis. ....	3
1.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i> como agente nosocomial . . . . .	5
1.3 Resistencia a los agentes antimicrobianos. ....	6
1.4 Resistencia a altas concentraciones de Aminoglucósidos. ....	9
1.5 Resistencia por $\beta$ -lactamasas. ....	12
2. JUSTIFICACION. ....	13
3. OBJETIVOS. ....	15
3.1 Objetivo General. ....	15
3.2 Objetivos Particulares. ....	15
4. MATERIAL Y METODOS. ....	16
4.1 Metodología. ....	16
4.1.1 Identificación de cepas. ....	16
4.1.2 Conservación de cepas. ....	21
4.1.3 Resistencia a bajas concentraciones de Aminoglucósidos y a $\beta$ -lactámicos. ....	21
4.1.4. Prueba de nitrocefina. ....	22
4.1.5 Resistencia a altas concentraciones de Aminoglucósidos. ....	24
4.2 Material y Equipo. ....	26
4.2.1 Material biológico. ....	26
4.2.2 Equipo. ....	26
4.2.3 Reactivos. ....	27
4.2.4 Medios de cultivo. ....	28
5. RESULTADOS . . . . .	33
6. DISCUSION. . . . .	39
7. CONCLUSIONES . . . . .	42
8. BIBLIOGRAFÍA . . . . .	43

## I. INTRODUCCION

### II GENERALIDADES

El término enterococo lo utilizó por vez primera Thiercelin en 1899 para describir a los diplococos grampositivos provenientes de las heces. Los estudios realizados en la siguiente década hicieron referencia a esos aislamientos como *Streptococcus faecalis*; y fue hasta 1984 cuando mediante tecnología de DNA, se formó el género *Enterococcus*, el cual incluye a 19 especies en la actualidad.

*Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positiva en forma de coco que puede encontrarse en pares, cadenas cortas y en forma aislada. Es un microorganismo anaerobio facultativo, catalasa negativo, crece en concentraciones de NaCl de hasta un 6.5% e hidroliza la esculina en presencia de sales biliares; hidroliza pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida, reacciona con el antisuero D de Lancefield y crece en presencia de telurito de sodio. La temperatura óptima de crecimiento es de 35°C con un intervalo amplio entre 10-45°C. Las pruebas que aparecen en la tabla No. 1 se utilizan para la identificación y diferenciación de *Enterococcus* de otros cocos Gram positivos catalasa negativos (18, 33, 41, 54).

La naturaleza de esta bacteria le permite crecer y desarrollarse en condiciones hostiles, por lo que se puede encontrar en diverso sitios como en el suelo, comida, y agua, y utiliza como reservorio a animales. *Enterococcus faecalis* habita el tracto gastrointestinal y es una de las bacterias más comúnmente aislada en heces de humanos (figura 1) (18, 30, 33, 41).

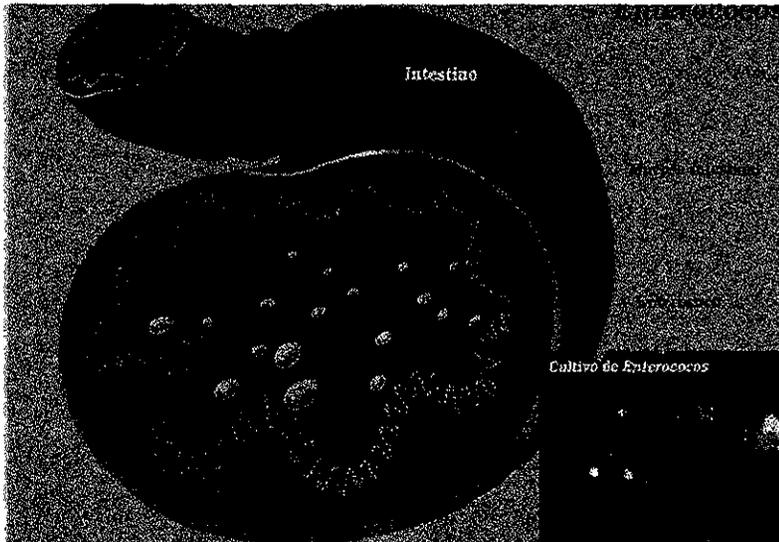
**Tabla No. 1** Características fenotípicas de cocos gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativa.

	VAN	PYR	BE	NaCl	DES. A 10 C	DES. A 45 C	MOT
<i>Enterococcus</i>	S	+	+	+	+	+	V
<i>Vagococcus</i>	S	+	+	+	+	-	+
<i>Lactococcus</i>	S	+	+	V	+	-	-
<i>Leuconostoc</i>	R	-	V	V	+	V	-
<i>Streptococcus</i>	S	-	-	-	V	V	-
<i>Globicatella</i>	S	+	-	+	-	-	-
<i>Pediococcus</i>	R	-	+	V	-	+	-
<i>Tetragenococcuss</i>	S	-	+	+	-	+	-
<i>Aerococcus</i>	S	+	V	+	-	+	-
<i>Gemella</i>	S	+	-	-	-	-	-
<i>Helcococcus</i>	S	+	+	+	-	-	-
<i>Alloiococcus</i>	S	+	+	+	-	-	-

Abreviaturas: VAN, susceptibilidad a vancomicina; PYR, producción de pirrolidoniaramidasa; BE, reacción en el medio de bilis esculina; NaCl, desarrollo en caldo con 6.5% de NaCl; MOT, motilidad; S, susceptible; R, resistente; -, <5% dan reacciones negativas; >95% dan reacciones positivas; V, reacciones variables.

Modificado de Facklam, R. R. and L. M. Texeira. 1996.

Es un microorganismo de fácil crecimiento, desarrolla bien en agar soya tripticaseína (TSA), agar infusión cerebro corazón (BHI) o cualquier base de agar adicionada con 5% de sangre de carnero, incluso la presencia de azida de sodio no impide el desarrollo satisfactorio de esta bacteria (30, 33). Algunos cultivos de *Enterococcus faecalis* pueden ser beta hemolíticos en agar que contiene sangre de conejo, caballo o humana, pero no con sangre de cordero. Las colonias tienen generalmente entre 1 y 2 mm de diámetro (17, 18, 33, 41).



**Figura 1.** Habitat natural de *Enterococcus faecalis*. A ) Corte transversal de intestino y en azul se muestra la bacteria adherida a la mucosa intestinal. B) Desarrollo de colonias en base de agar sangre.

## I.2 PATOGENESIS.

*Enterococcus faecalis* se encuentra en heces de adultos sanos y es reconocido como patógeno potencial en humanos debido a que se vincula con una gran variedad de cuadros clínicos, siendo los más importantes, por su gravedad o frecuencia, los siguientes:

1.- Endocarditis, los enterococos causan entre el 5% y el 10% de las endocarditis bacterianas, siendo *Enterococcus faecalis* la especie que más se ha recuperado (30, 33, 36, 41). La endocarditis enterocócica es mas frecuente en adultos mayores de 65 años, ocasionalmente ocurre en niños. Los factores de riesgo para presentar

endocarditis incluyen: infecciones en las vías genitourinaria y biliar; así como diversas patologías cardíacas estructurales, aunque puede presentarse sin ellos (15, 30).

2.- Bacteremia enterocócica: es más común que la endocarditis enterocócica; su mortalidad es mayor cuando se asocia con quemaduras, infecciones adquiridas en hospital y con enfermedades graves(30, 41). La bacteremia enterocócica sin endocarditis con frecuencia tiene su origen en las infecciones del aparato urinario. (33, 36, 40).

3.-Infecciones del aparato urinario: en pacientes hospitalizados entre el 5% y el 10% de ellas son causadas por *Enterococcus faecalis*. Se han reportados casos de prostatitis y abscesos perirrenales. El Centro para el Control de las Enfermedades en Atlanta, Ga., EUA, reporta que *Enterococcus faecalis* ocupa el tercer lugar como causante de infecciones del tracto urinario (14.8%) (40, 41). Los factores que contribuyen a la adquisición de este tipo de infecciones son: instrumentación frecuente en vías urinarias, terapia antimicrobiana, inmunosupresión y/o desnutrición del paciente y la transmisión de organismos resistentes (33).

4.- Formación de abscesos. Los enterococos se han encontrado como flora normal en casi el 17% de los cultivos vaginales de rutina, sin embargo, pueden causar y/o contribuir a la formación de abscesos pélvicos y abdominales. *Enterococcus faecalis* también puede causar salpingitis aguda, infección puerperal con bacteremia y sepsis y la formación de abscesos postcesárea (33, 41).

5.-Infección neonatal. Aunque el estreptococo del grupo B y *Escherichia coli* son la causa más común de infección neonatal, se ha establecido que *Enterococcus faecalis* también la puede producir (3).

6.-Meningitis. Los enterococos pueden causarla en escolares y en adultos. De los casos estudiados de meningitis enterocócica, se encontró que los pacientes habían cursado previamente con una enfermedad primaria de larga evolución, se les habían practicado procedimientos invasivos en el sistema nervioso central, habían tenido una terapia antimicrobiana o bien una combinación de las tres situaciones (41).

### **1.2.1 *Enterococcus faecalis* como patógeno nosocomial.**

Los estudios realizados indican que, *Enterococcus faecalis* participa como agente productor de infecciones nosocomiales (18, 30, 33, 41), ubicándose en el tercer lugar de esta categoría (58). Se ha demostrado la transmisión de estas bacterias de persona a persona (30, 58).

El incremento de infecciones vinculadas a *Enterococcus* se puede relacionar al uso de agentes antimicrobianos, a la manipulación de vías vasculares con agujas, al uso de catéteres urinarios y otros procedimientos invasivos; así como al estado inmune de los pacientes. El uso de agentes antimicrobianos que no tienen actividad contra enterococos, se ha implicado como un factor importante en el desarrollo de una superinfección enterocócica (1, 12, 30, 40, 41, 42).

En la patogénesis de *Enterococcus faecalis* los factores de virulencia son: la producción de hemolisinas, sustancias agregativas y adhesinas. Las adhesinas son citotoxinas que lisan eritrocitos humanos, de caballo y de conejo; al parecer las hemolisinas y las sustancias agregativas contribuyen a su virulencia en la endocarditis experimental (18, 35, 41).

### **1.3 RESISTENCIA A LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS.**

Uno de los mecanismos en la patogénesis de *Enterococcus faecalis*, es la resistencia múltiple a los antimicrobianos (15, 18, 40, 43) la cual puede ser de dos tipos:

a) Resistencia Intrínseca. Se caracteriza porque se encuentra codificada en el genóforo bacteriano, está presente en la mayor parte de las cepas. Se manifiesta para cefalosporinas, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol,  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos. El estudio de los dos últimos grupos es importante ya que el tratamiento de elección es una combinación de ambas drogas (un  $\beta$ -lactámico y un aminoglucósido) (5, 11, 15, 18, 20, 31, 36, 41, 49) . La resistencia intrínseca está relacionada a una mutación, favorecida por la presión selectiva del antibiótico (36).

La resistencia de *Enterococcus faecalis* a los  $\beta$ -lactámicos es un rasgo característico de estos microorganismos y parece ser debida a una baja afinidad de las proteínas fijadoras de penicilina; la resistencia a bajas concentraciones de aminoglucósidos relacionada con un incremento en la densidad de la pared que evita el ingreso del antibiótico, es también una propiedad inherente en los enterococos (1, 2, 41, 49, 52). El grado actual de resistencia varía entre los diferentes aminoglucósidos, la concentración

inhibitoria mínima (CIM) de estreptomina o kanamicina es de alrededor de 250 µg/ml, mientras que para gentamicina o tobramicina es de 8 a 64 µg/ml (36, 41).

Se postula que la resistencia a bajas concentraciones de aminoglucósidos se debe a la impermeabilidad de la pared para el ingreso del antibiótico a la bacteria (36). Cuando los enterococos se desarrollan en presencia de un agente inhibidor de la pared celular como penicilina o vancomicina, la pared se hace menos densa y la probabilidad de ingreso del antibiótico a la bacteria es mayor; por lo que, el aminoglucósido por sí solo es capaz de eliminar a la bacteria (54). Se conoce bien el efecto sinérgico de un inhibidor de la pared celular más un aminoglucósido (20, 33, 35, 41, 49).

b) Resistencia Adquirida. La resistencia adquirida, resulta de la adquisición de nuevo DNA a través de plásmidos y transposones (33, 36). Se conocen tres mecanismos.

A. Feromonas. Consiste en que la célula donadora presenta un plásmido inducible a feromonas. La unión de la feromona que es producida por la célula receptora, inicia en la donadora una vía de señalización, que resulta en la expresión de las funciones de conjugación (18, 36, 41).

B. Transposones conjugativos. Se encuentran ampliamente distribuidos entre los Gram positivos, y son elementos genéticos móviles, los cuales son transferidos usando como vehículo a plásmidos conjugativos o fagos transductivos y codifican para la resistencia a cloranfenicol (2, 18, 36).

C. Plásmidos de intervalo amplio. Ocurre de *Enterococcus* a otros géneros bacterianos incluso a Gram negativos. Se ha descrito la transferencia de genes en plásmidos como *aphA-3* que codifica para la fosfotransferasa de la amikacina y kanamicina entre *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Campylobacter* (2, 36, 41, 49).

La adquisición de material genético transferible, confiere resistencia a cloranfenicol, clindamicina, eritromicina y tetraciclina; la producción de  $\beta$ -lactamasas así como la resistencia a penicilina sin producción de  $\beta$ -lactamasas; e incluso la resistencia a altas concentraciones (*High Level Resistance*) de vancomicina y aminoglucósidos (2, 18, 33, 35, 36, 41). *Enterococcus faecalis*, ha mostrado variados mecanismos de resistencia. La tabla 2 resume tales mecanismos.

Tabla2. Patrones principales y mecanismos de resistencia en *Enterococcus*.

Patron de resistencia	Mecanismo de resistencia
Altos niveles de resistencia a aminoglucósidos. Gentamicina Kanamicina Estreptomycinina	<u>Enzimático</u> . Producción de enzimas modificadoras del aminoglucósido como acetil transferasas (AAC), fosfotransferasas (APH) y nucleotidiltransferasas (ANT) las cuales modifican el aminoglucósido disminuyendo la unión del aminoglucósido al RNA ribosomal.
Resistencia a glicopéptidos Vancomicina Teicoplanina	<u>Producción de proteínas inducibles</u> relacionadas a la unión y subsecuente modificación enzimática del pentapéptido precursor del peptidoglicano (VAN A, VAN B, VAN C y VAN semejante a C).
Resistencia a lactámicos Penicilina Ampicilina	<u>Disminución de la afinidad</u> a la penicilina por parte de las proteínas que fijan penicilina o por producción de lactamasas.
Resistencia al cloranfenicol	Producción de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT).
Resistencia al grupo MLS (macrólidos, lincosamidas y estreptogramina b).	Producción de enzimas metilasas

Tomado de Facklam and Teixeira, 1997

#### I.4 RESISTENCIA A ALTAS CONCENTRACIONES DE AMINOGLUCOSIDOS.

En *Enterococcus faecalis*, la resistencia a los aminoglucósidos está mediada por modificación enzimática del antibiótico. Los genes responsables (*aac*, *aph* y *ant*) están localizados en plásmidos transferibles (Figura 2) (7, 18, 32, 36, 37, 41)

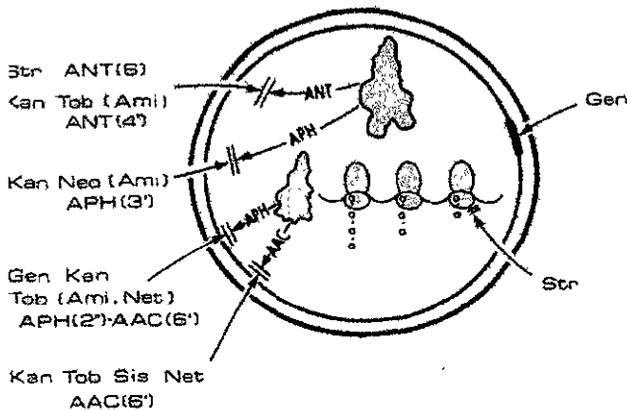


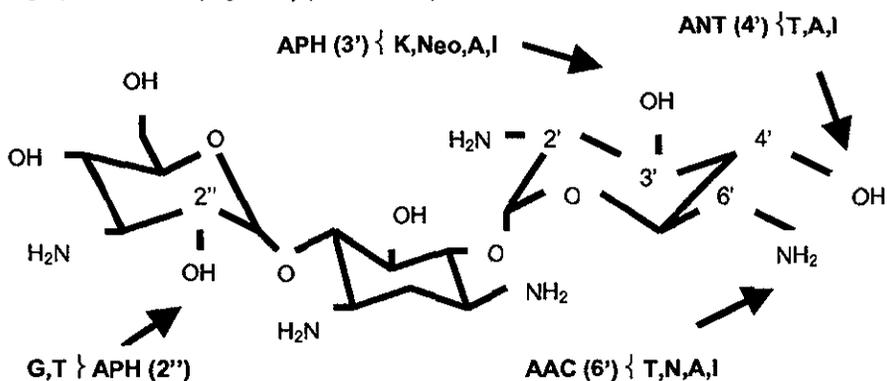
Figura 2. Mecanismo de resistencia de los enterococos a los aminoglucósidos. ANT= aminoglucósido nucleotidiltransferasa; APH = aminoglucósido fosfotransferasa; AAC= aminoglucósido acetiltransferasa; Str = estreptomicina; K = kanamicina; Tob = tobramicina; Ami = amikacina; Neo = neomicina; Gen = gentamicina; Net = netilmicina; Sis = sisomicina. El paréntesis indica que es un sustrato pobre. Tomado de Leclercq R. 1992.

Las cepas que expresan este tipo de resistencia a uno o más aminoglucósidos se han aislado con mayor frecuencia. Estas cepas tienen concentraciones mínimas inhibitorias  $\geq 2000 \mu\text{g/ml}$  (11, 20, 41, 42, 50, 52, 54) y no es posible detectarlas por medio de la prueba de difusión con discos convencionales (36, 41). Para esta prueba se utilizan discos especiales que contienen altas concentraciones de gentamicina ( $120 \mu\text{g}$ ) y de estreptomicina ( $300 \mu\text{g}$ ) los cuales fueron desarrollados para detectar este tipo de resistencia (31, 33, 41, 52). Otro método que también se recomienda es determinar el

crecimiento microbiano de un cultivo a una concentración del 0.5 del nefelómetro de Mac Farland en placa con 500µg/ml de gentamicina y 2000µg/ml de estreptomycin (41).

La modificación enzimática de los aminoglucósidos es llevada a cabo por enzimas que utilizan la acetil coenzima A para acetilar grupos aminos; por enzimas que utilizan ATP para adenilar ciertos grupos hidroxilos o por enzimas que utilizan ATP para fosforilar grupos hidroxilos específicos (7, 10, 22,36).

Las enzimas que acetilan, adenilan y fosforilan aminoglucósidos en los cocos Gram positivos son diferentes de las de los bacilos Gram negativos. Sin embargo, ambas modifican los mismos grupos funcionales, estos son: grupos hidroxilos 2'', 3' y 4' y al grupo amino 6'. (Figura 3) (7, 8, 11, 22).



**Figura 3.** Estructura general de un aminoglucósido y los sitios de reconocimiento por las enzimas modificadoras de aminoglucósidos que conduce a la disminución en la afinidad del aminoglucósido por el ribosoma bacteriano.

En *Enterococcus faecalis* se describen tres enzimas:

1. La proteína bifuncional APH(2'') + ACC(6') que utiliza ATP para fosforilar el grupo hidroxilo 2'' y acetil coenzima A para acetilar el grupo amino 6', de este modo se fosforilan la gentamicina, tobramicina, dibekacina y kanamicina (13).

La porción que resta de esta enzima utiliza acetil coenzima A para acetilar el grupo amino 6'. Los aminoglucósidos que son susceptibles a modificar son tobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina, dibekacina y fortimicina (7).

En casi todas las cepas bacterianas el nivel de resistencia causada por la porción que codifica a APH(2') es mucho mayor que la causada por AAC(6') (13). Por lo tanto muchas cepas tienen un alto grado de resistencia a gentamicina, tobramicina, kanamicina y dibekacina y un bajo grado de resistencia a netilmicina, amikacina e isepamicina. El gen bifuncional *aph(2'')* + *aac(6')* codifica la enzima modificadora de aminoglucósidos mas frecuentemente hallada en *Enterococcus faecalis*.

2. La enzima APH(3') es capaz de fosforilar a todos los aminoglucósidos que poseen un grupo hidroxilo en posición 3'. El gen responsable es *aph(3')* siendo capaz de modificar a amikacina, kanamicina e isepamicina (7, 15).

3. La enzima ANT(4') puede adenilar a todos los aminoglucósidos que poseen un grupo hidroxilo en posición 4', como tobramicina, amikacina, isepamicina y kanamicina. El gen que codifica para esta enzima es *ant(4')* y es la segunda proteína modificadora de aminoglucósidos mas frecuentemente hallada (7, 36).

### 1.5 RESISTENCIA POR $\beta$ -LACTAMASAS.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos derivan su nombre del hecho de que tienen un anillo lactámico beta que es el sitio activo. Este anillo actúa como análogo de la acil-D-alanina-D-alanina y se enlaza fuertemente con las enzimas transpeptidasas que catalizan la transpeptidación de las unidades MurNAc dentro de la pared celular. La transpeptidación es importante porque la formación de enlaces cruzados completa la mureína y le imparte la fuerza tensil necesaria para resistir la lisis osmótica. El anillo que poseen los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es susceptible de ser escindido por enzimas llamadas  $\beta$ -lactamasas lo que origina la inactivación del fármaco. Por ello la importancia *en determinar la presencia de este conjunto de enzimas en los enterococos, ya que permitiría predecir el comportamiento de la terapia combinada* (1, 6, 11, 14, 15, 18, 22, 23, 24, 33, 36).

Se han desarrollado diferentes pruebas para la detección de  $\beta$ -lactamasas, que incluye el método yodométrico, el acidométrico y una variedad de sustratos cromogénicos. La cefalosporina cromogénica nitrocefina, ha sido útil en la detección de todas las  $\beta$ -lactamasas conocidas (11, 14, 15, 33, 39, 41, 52, 54). Los discos de cefinase BBL® están impregnados con nitrocefina, este compuesto sufre un cambio de color del amarillo al rojo cuando el enlace amino del anillo  $\beta$ -lactámico es hidrolizado por una enzima  $\beta$ -lactamasa. Cuando la bacteria produce esta enzima en cantidades *significativas*, el disco de color amarillo cambia a rojo al extender el inóculo bacteriano sobre su superficie (11, 14, 15).

## 2. JUSTIFICACION.

Por mucho tiempo *Enterococcus faecalis* fue considerado como un componente de la flora normal del aparato gastrointestinal; sin embargo, desde hace algunos años este concepto ha cambiado debido a su relación con infecciones diversas, adquiriendo importancia principalmente como agente causal de infecciones nosocomiales (5, 15, 33, 42, 58, 63). Las infecciones producidas por *Enterococcus faecalis* tiene una amplia gama de presentaciones que incluye desde infecciones de heridas leves, hasta meningitis o endocarditis (15, 31, 41)

El ambiente hospitalario brinda condiciones adecuadas para la selección de bacterias resistentes a los antibióticos empleados con más frecuencia. La resistencia puede ser múltiple y/o de grado alto. Esto origina el fracaso de los esquemas antimicrobianos. Por esta razón se desarrollan nuevos medicamentos, para tratar de solucionar el problema de las cepas resistentes (18, 43).

En la terapéutica contra *Enterococcus faecalis*, generalmente se utiliza la combinación de dos antibióticos: un aminoglucósido y un  $\beta$ -lactámico como la penicilina o ampicilina (5, 11, 20, 49). Sin embargo, en los enterococos se ha encontrado a nivel mundial altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos lo que origina fracaso con el tratamiento combinado.

En México existen escasos reportes en relación a las cepas de *Enterococcus* con alto grado de resistencia a aminoglucósidos (53, 56). Este estudio se desarrolló con el fin de conocer la frecuencia de aislamiento de cepas resistentes a antibióticos beta lactámicos

y de aquellas altamente resistentes a aminoglucósidos en las infecciones asociadas a *Enterococcus faecalis* en el Hospital Central Militar.

Es importante mencionar que la resistencia a los antibióticos es mas frecuente en los hospitales de enseñanza y en aquellos con mas de 500 camas, como lo es el Hospital Central Militar (31).

*Enterococcus faecalis* es la especie del género, que con mayor frecuencia se aísla y por esta razón se seleccionó para este estudio (30, 33, 36, 41).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la frecuencia de alta resistencia a los aminoglucósidos, así como de resistencia a  $\beta$ -lactámicos asociada a  $\beta$ -lactamasas de cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas en un hospital de tercer nivel.

#### 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas de muestras de importancia clínica recuperadas del Hospital Central Militar durante 1998-1999.
2. Preservar y mantener puras en medio de Trypticase Soya Agar las cepas aisladas.
3. Identificar mediante la técnica de Nitrocefina las cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos.
4. Realizar el perfil de alta resistencia a aminoglucósidos mediante la técnica de Kirby-Bauer y la utilización de discos de papel impregnados con altas concentraciones de gentamicina y estreptomina.

## 4. MATERIAL Y METODOS.

### 4.1 METODOLOGIA.

#### 4.1.1 Identificación de cepas

Se aislaron e identificaron cepas de *Enterococcus faecalis* de diferentes muestras asociadas a infecciones de relevancia clínica, durante los años 1998-1999 en el Hospital Central Militar. Estas cepas se identificaron mediante el sistema automatizado MicroScan y por una serie de pruebas bioquímicas adicionales de acuerdo a los criterios de Facklam, en las que se incluyen: Crecimiento a 4°C, 10°C y 45°C, prueba de bilis-esculina, crecimiento en NaCl al 6.5% y telurito de potasio (18, 19).

A las colonias de cocos Gram positivos desarrolladas en medio de agar sangre de carnero que no presentaban hemólisis beta se les realizó la prueba de catalasa para su primera diferenciación de familia. Las colonias que dieron negativa la prueba, se sometieron a su identificación por medio del sistema MicroScan; mediante la utilización del Panel Positivo Combo 12.

Esta es una técnica miniaturizada que logra identificación y prueba de susceptibilidad simultánea. Para ello se tomaron dos o tres colonias, con las pipetas incluidas en el equipo de inoculación de un cultivo puro de no más de 24 horas de incubación, se retiró el collarín de las pipetas para eliminar el exceso de muestra y lograr la dilución requerida. Estas pipetas de toma son a la vez tapones de las botellas de inoculación del sistema Prompt, permitiendo homogeneizar la mezcla bacteriana y con la ayuda de las placas de inoculación y la multipipeta se llenaron cada uno de los pozos del panel de identificación. Los paneles se incubaron 18 horas a 37°C. Al término de la incubación, se hizo la lectura de las pruebas bioquímicas en el panel lector. (Figura 4)

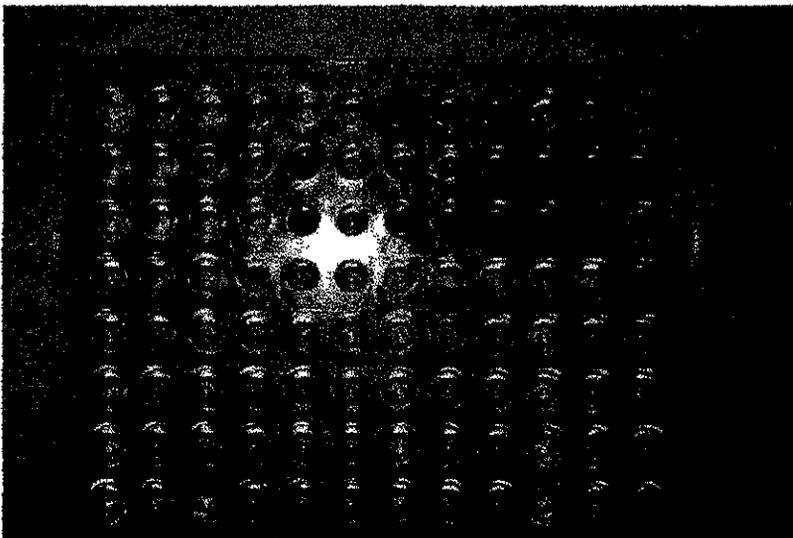


Figura 4. Panel positivo combo 12 para la identificación y susceptibilidad de cocos gram positivos. Las primeras 3 filas corresponden a las pruebas bioquímicas y las restantes a los antibióticos a los cuales se somete la cepa.

- Desarrollo a diferentes temperaturas:

Para observar el desarrollo, se inoculó el medio BHI (Infusión Cerebro Corazón) y se incubaron los tubos a 4, 10 y 45°C durante 24 horas. La presencia de turbidez en el medio indicó una prueba positiva. (Figura 5)

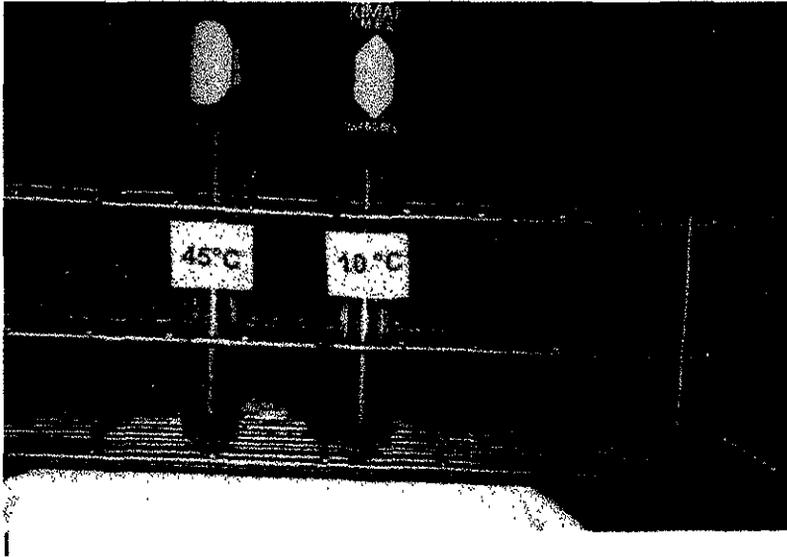


Figura 5. Los tubos con medio BHI se incubaron a 10 y 45 °C por 24 horas. La prueba positiva se evidenció por la turbidez debida al crecimiento.

- Prueba de bilis-esulina:

Se realizó inoculando los tubos con caldo bilis-esulina de manera masiva, descargando el asa dentro del tubo. Se incubaron 18-24 horas a 35-37°C. La prueba positiva se observó por la formación de un precipitado café oscuro. (Figura 6).

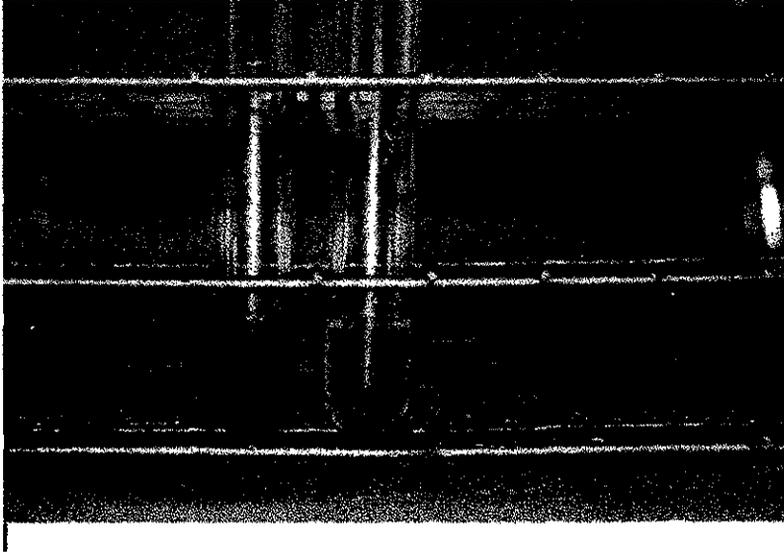


Figura 6. Prueba de bilis-esculina en caldo. La prueba positiva se observa claramente por la formación de un precipitado café oscuro comparando con la prueba negativa.

- Desarrollo en telurito sodio:

Se tomaron con el asa algunas colonias, se agitó el asa dentro del caldo de telurito de sodio hasta lograr la deposición del inóculo. Se incubaron los tubos 18-24 horas a 35-37 °C. Se determinó positiva la prueba al cambiar la coloración del medio a café grisáceo. (Figura 7).

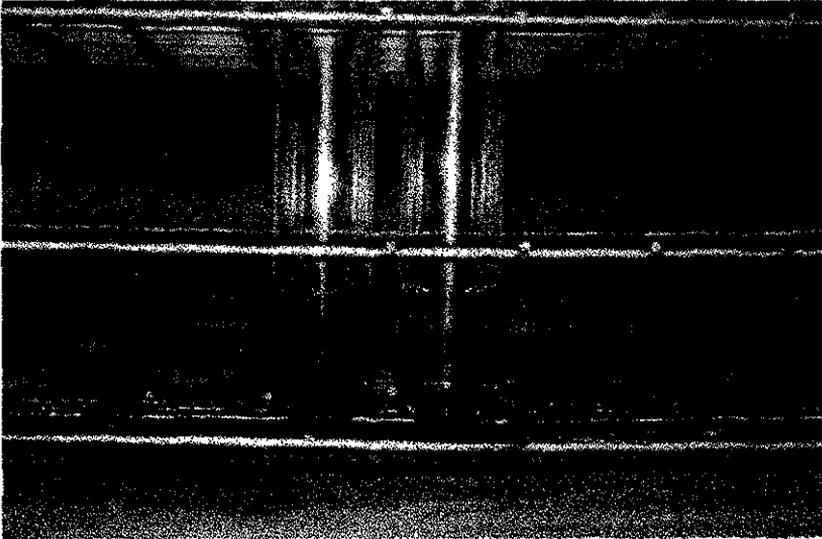


Figura 7. La prueba de telurito de sodio se considera positiva a la formación de un precipitado café grisáceo. La prueba es negativa cuando no hay cambio de color en el medio.

- Crecimiento en NaCl al 6.5 %.

La prueba de resistencia de cloruro de sodio se realizó inoculando caldo de soya tripticaseína adicionado con NaCl al 6.5%. Se incubaron los medios a 35-37°C durante 18-24 horas, dando como prueba positiva la observación de turbidez en el medio.

Para validar cada una de las pruebas se utilizó la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### **1.0.0 Conservación de cepas**

a) A corto tiempo. Las cepas se conservaron en medio de agar soya tripticaseína. El medio elaborado en tubo se inoculó por picadura y se extendió en la inclinación. Los tubos después de ser incubados 24 horas a 35-37°C, se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización, verificando su pureza y viabilidad cada 3 meses.

Para lo anterior se realizó una resiembra de cada una de las cepas en medio de agar sangre, incubando las placas a 35-37°C durante 24 horas. De este cultivo fresco se realizó su identificación nuevamente mediante los criterios de Facklam. Para evitar la deshidratación del medio y contaminación del mismo los tubos se taparon además con una película de cera. De esta manera se mantuvieron por tres o cuatro meses.

b) A largo tiempo. Para su conservación, las cepas se hicieron crecer en base de agar sangre y se cosecharon en un tubo con 0.5 ml de sangre de carnero de acuerdo a Facklam, después se congelaron a -70°C. De esta forma las cepas pueden conservarse hasta por dos años.

### **1.0.0 Resistencia a bajas concentraciones de aminoglucósidos y resistencia a $\beta$ -lactámicos.**

Las cepas se sembraron en base de agar sangre durante 24 horas a 37°C, de éste cultivo se tomaron dos colonias y se sembraron en caldo BHI durante 6 horas. Los tubos se ajustaron al tubo 0.5 del nefelómetro de Mac Farland y se sembraron masivamente en agar Mueller-Hinton, sobre el cual se colocaron discos de gentamicina, estreptomycinina y ampicilina de 10  $\mu$ g de concentración y de penicilina con 10 UI.

Las placas se incubaron a 35-37°C durante 24 horas, tiempo al cual se midió el halo de inhibición del crecimiento. Se clasificaron en sensibles y resistentes de la siguiente manera:

- a) Para ampicilina los halos de inhibición son menores o igual a 16mm para las cepas resistentes, y mayores o igual a 17mm para las cepas sensibles.
- b) Para penicilina con halos de inhibición menores o igual a 14mm se consideran cepas resistentes, y mayores o igual a 15 como cepas sensibles.
- c) En el caso de gentamicina las cepas con halos menores o igual a 12mm son resistentes, y mayores o igual a 15mm son sensibles.
- d) Para estreptomina se consideraron resistentes aquellas cepas con halos menores o igual a 11mm, y sensibles las que tuvieran halos mayores o igual a 15mm.

Para realizar el control de calidad de las pruebas se utilizaron las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

#### **4.1.4 Prueba de nitrocefina**

Esta técnica se realizó para identificar aquellas posibles cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas usando discos de cefinasa BBL®. Esta es una cefalosporina cromogénica, que exhibe un cambio de amarillo a rojo cuando se hidroliza el anillo  $\beta$ -lactámico. (Figura 8).



Figura 8. Prueba de nitrocefina para la detección de  $\beta$ -lactamasas. En el disco del lado izquierdo no hubo cambio de color al contacto con la colonia. El disco del lado derecho sufrió cambio de color a rojo, debido al rompimiento del anillo  $\beta$ -lactámico.

El procedimiento se realizó de la siguiente manera: con un asa estéril, se tomaron una o dos colonias de un cultivo puro de cada una de las cepas sembradas en agar sangre por 24 horas, y se colocaron sobre el disco de cefinase humedecido con solución salina estéril. La realización de la lectura se realizó en el lapso de 1 a 60 minutos.

Se realizó control de calidad de la prueba con la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como control positivo y *Haemophilus influenzae* ATCC 35540 como control negativo.

#### 4.1.5 Resistencia a altas concentraciones de aminoglucósidos

Se tomaron dos o tres colonias de un cultivo de 24 horas de cada una de las cepas y se trasladaron al caldo BHI, se incubaron a 35-37°C durante dos o más horas hasta alcanzar la turbidez comparable con el estándar 0.5 de McFarland. Con esta suspensión bacteriana se inoculó masivamente el medio de Mueller-Hinton de acuerdo a la técnica de Kirby-Bauer.

Para determinar si la resistencia a los aminoglucósidos era a altas concentraciones, se utilizaron discos de papel con 120µg de gentamicina y 300µg de estreptomina y no los discos rutinarios que contienen 10µg de cada uno de los antibióticos. Los discos se colocaron a una distancia mínima entre uno y otro de 4 centímetros en placas de 9 centímetros de diámetro. Se invierten las placas petri y se guardan en incubadora.

Después de haber incubado las placas a 35-37°C durante 24 horas, tiempo al cual se realizó la lectura de los halos de inhibición del crecimiento. La interpretación de las pruebas se realizó midiendo el diámetro de los halos. Una cepa se consideró con alto grado de resistencia cuando no presentó zona de inhibición (6mm) (Figura 9). Para los enterococos sensibles la zona de inhibición es mayor o igual a 11mm (figura 10). Si el crecimiento en la placa fue confluyente la prueba se aceptó, si el crecimiento fue menor fue preciso repetir la prueba.

Para la realización de la prueba, se usó como cepa de referencia *Enterococcus faecalis* ATCC 51219 del CDC de Atlanta, reportada como alta resistente y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 como sensible.

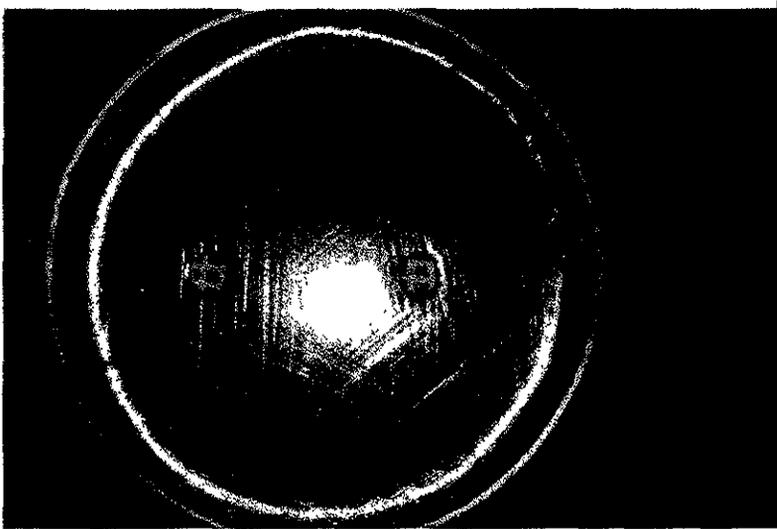


Figura 9. Método de Kirby-Bauer. No hay halos de crecimiento alrededor del disco, lo que manifiesta que se trata de una cepa resistente a altas concentraciones de aminoglucósidos.

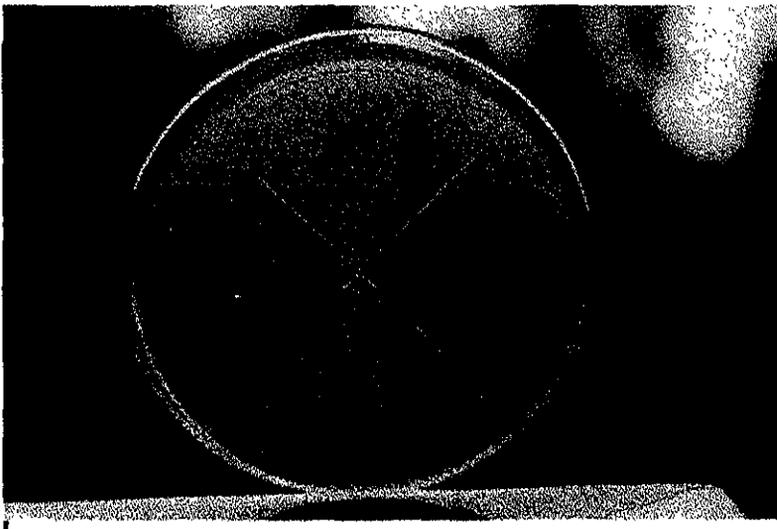


Figura 10. Los halos de inhibición del crecimiento muestran la susceptibilidad de la cepa a concentraciones altas de aminoglucósidos.

## 4.2 MATERIAL Y EQUIPO

### 4.2.1 Material biológico.

a) Cepas:

1. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
2. *Enterococcus faecalis* ATCC 51219.
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.
4. *Haemophilus influenzae* ATCC 35540.
5. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
6. *Escherichia coli* ATCC 25922.
7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

b) Aislamientos clínicos de *Enterococcus faecalis*.

### 4.2.2. Equipo.

1. Incubadoras a: 35 y 45°C
2. Autoclave.
3. 6 matraces Erlenmeyer.
4. Mechero de Bunsen.
5. 300 placas de Petri desechables.
6. Pinzas rectas.
7. 300 tubos de ensaye de 16x150 con tapón de rosca.
8. 6 gradillas.
9. Aplicadores de madera.
10. Hisopos de algodón estériles.
11. Tripie con tela de asbesto.

12. Balanza analítica.
13. Papel filtro.
14. Vernier o regla.
15. Asas bacteriológicas.
16. Laminillas y portaobjetos.
17. Microscopio óptico.
18. Refrigerador 2-8°C.
19. Congelador a -70°C.

#### **4.2.3. Reactivos.**

1. Agar de Mueller-Hinton.
2. Agar de soya tripticaseína.
3. Caldo soya tripticaseína.
4. Agar gelosa sangre.
5. Infusion cerebro corazón (BHI).
6. Agar bilis esculina.
7. Agua desionizada estéril.
8. Agua destilada.
9. Patrón de turbidez de MacFarland a 0.5.
10. Discos de papel con nitrocefina (cefina BBL®).
11. Solución salina isotónica
12. Aceite de inmersión.
13. Caldo cloruro de sodio al 6.5%.
14. Discos con 10 UI de penicilina.

15. Discos con 10 µg de ampicilina.
16. Discos con 10µg de gentamicina.
17. Discos con 120µg de gentamicina.
18. Discos con 10µg de estreptomina.
19. Discos con 300µg de estreptomina.
20. Agua oxigenada al 3.2 %.
21. Equipo de coloración para tinción de Gram.
22. Telurito de sodio.
23. Infusión cerebro corazón (BHI).

#### **4.2.4. Medios de cultivo**

##### Agar bilis-esculina.

Este medio se utiliza para determinar la facultad de los microorganismos de hidrolizar el glucósido esculina en esculetina y glucosa, en presencia de 4% de bilis. La esculetina liberada reacciona con una sal de hierro para formar un complejo castaño oscuro o negro.

Ingredientes:

Peptona	5 g.
Extracto de carne	3 g.
Bilis de buey	40g.
Esculina	1 g.
Citrato de hierro	0.5g.
Agar	15g.
Agua destilada	1.000 ml

### Agar Mueller-Hinton.

Este medio es recomendado para pruebas de susceptibilidad por la técnica de difusión en disco, en bacterias de rápido crecimiento, por el método de Kirby-Bauer.

Ingredientes:

Extracto de carne	2 g
Hidrolizado ácido de caseína	17.5g
Almidón	1.5g
Agar	17 g
Agua destilada	1000 ml

### Agar de soya y tripticaseína.

Se emplea para el aislamiento y desarrollo de microorganismos fastidiosos y no fastidiosos, incluyendo bacterias aerobias y anaerobias.

Ingredientes:

Digestivo pancreático de caseína	15 g
Digestivo de carne de soya	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g

### Caldo de soya y tripticaseína.

El propósito de este medio es para usarlo en procedimientos cualitativos en el cultivo de microorganismos patógenos de una variedad de especímenes clínicos y no clínicos. Adicionado con 6.5% de cloruro de sodio es usado para la diferenciación de enterococos.

**Ingredientes:**

Digestivo pancreático de caseína	17.0 g
Digestivo de carne de soya	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Dextrosa	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

**Base de agar sangre**

La base de agar sangre, adicionada de sangre estéril de carnero al 5 %, es usada para el aislamiento, desarrollo y detección de la actividad hemolítica de los estreptococos y otros microorganismo patógenos.

**Ingredientes:**

Músculo de corazón	2.0 g
Digestivo pancreático de caseína	13.0g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	15.0g
Agua destilada	1000ml

Para preparar agar sangre, se adiciona 5% de sangre desfibrinada estéril de carnero al medio basal ya estéril.

### Telurito de sodio.

Es usado como un agente diferencial en la preparación de medios de cultivos. Es usado como un medio de aislamiento de *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria sp*, *Streptococcus sp* y estafilococos patógenos.

El telurito de sodio inhibe microorganismos Gram negativos y muchas bacterias Gram positivas cuando es usado en las concentraciones adecuadas.

#### Ingredientes:

Telurito de sodio	1.0 g
Infusión de cerebro corazón	6.0 g
Peptona de carne	6.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	3.0 g
Peptona de gelatina	14.5g
Fosfato disódico	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

### Infusión cerebro corazón (BHI)

Es usado para el cultivo de microorganismos exigentes. Por su rico contenido de nutrientes permite la recuperación y desarrollo de bacterias de difícil crecimiento, como estreptococos, neiserias, entre otros.

Infusión de cerebro corazón	6.0 g
Peptona de carne	6.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g

Dextrosa	3.0 g
Peptona de gelatina	14.5g
Fosfato disódico	2.5 g
Agua destilada	1000 ml

## 5. RESULTADOS.

1. Se identificaron 91 cepas en el periodo de 1998 a 1999, de las cuales 83 (90%) correspondieron a *Enterococcus faecalis* y 8 (10%) a *Enterococcus faecium*. (Figura 11).

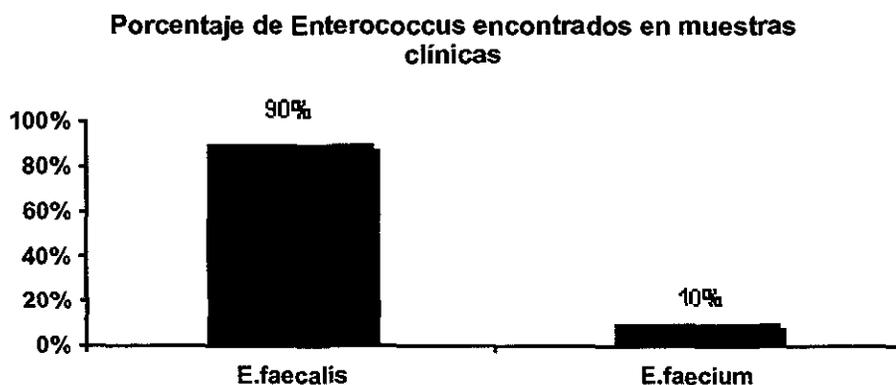


Figura 11. La gráfica muestra la distribución de los aislamientos del género *Enterococcus* en las diferentes muestras procesadas en el Hospital Central Militar.

Los aislamientos por tipo de muestra fueron: 64 (78%) urocultivos, 11 (13%) en secreciones de herida, 4 (5%) en hemocultivos, 1 (1%) en hueso, 1 (1%) en LCR, 1 (1%) en absceso hepático y 1 (1%) en punta de catéter. Figura No. 12.

**Porcentaje de aislamiento de las cepas con respecto a su origen**

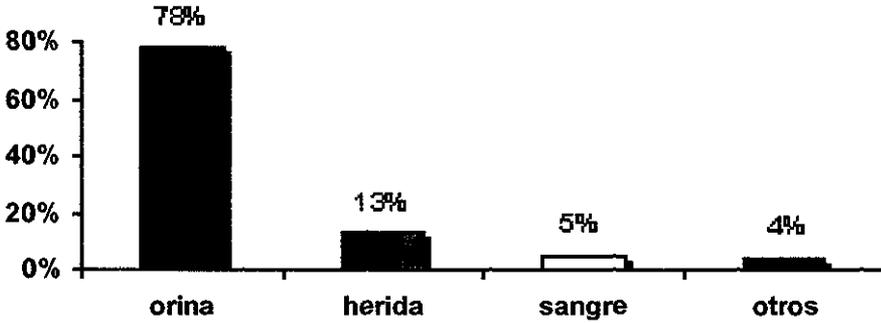


Figura 12. La gráfica muestra la distribución de los especímenes en los que se aislaron *E. faecalis*. Los cultivos de orina fueron los mas frecuentes de todos los aislamientos, en segundo lugar los cultivos de herida y en tercer lugar los hemocultivos con alto porcentaje de recuperación. Otros; hueso, líquido cefalorraquídeo, absceso hepático, punta de catéter.

Del total de muestras, 53 (64%) fueron de pacientes de hospitalización y 30 (36%) de consulta externa de diferentes especialidades. Figura13

**Tipo de pacientes**

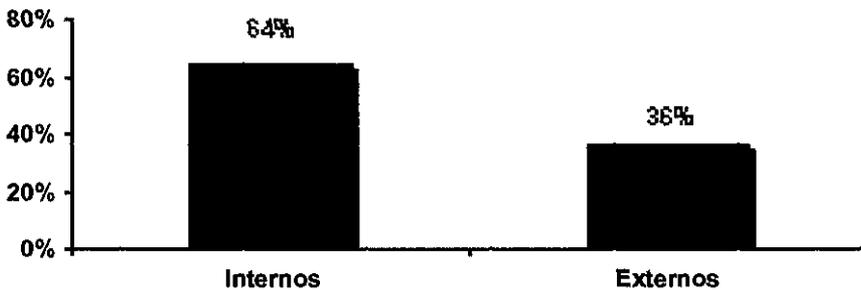


Figura 13. La gráfica muestra el predominio de muestras aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital contra las obtenidas de pacientes atendidos en consulta externa.

La distribución de los cultivos fue de 34 aislamientos en urocultivos y 19 en cultivos de las muestras diferentes a orina, de pacientes internos en el hospital y 30 de pacientes externos. Tabla no. 3

Tabla 3. Número de aislamientos y su porcentaje de cepas de *E. faecalis* realizados a pacientes internos en el hospital y a los atendidos en las diferentes especialidades de consulta externa.

CULTIVOS	INTERNOS	EXTERNOS
UROCULTIVOS	34 (41%)	30 (36 %)
SECRECION DE HERIDA	11 (13%)	0
HEMOCULTIVOS	1 (1%)	0
HUESO	1 (1%)	0
LCR	1 (1%)	0
ABSCESO HEPATICO	1 (1%)	0
PUNTA DE CATETER	1 (1%)	0
TOTAL	53 (64%)	30 (36%)

La resistencia a bajas concentraciones de aminoglucósidos fue de 48% para estreptomycin y 36 % para gentamicina. Figura 14.

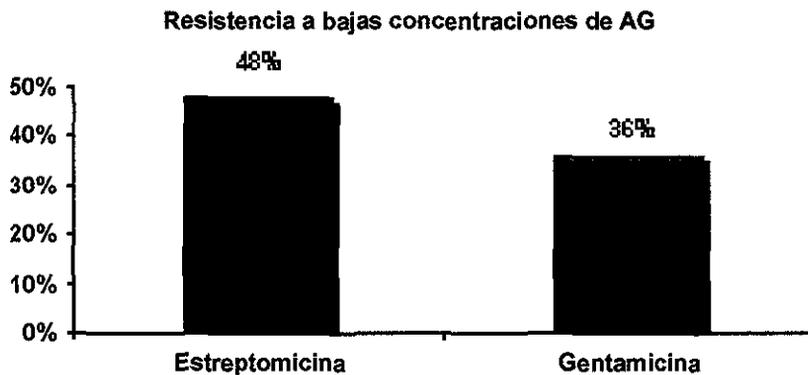


Figura 14. Porcentaje de resistencia a bajas concentraciones de estreptomicina y gentamicina utilizando discos de 10µg de cada uno de los antibióticos en cepas de *Enterococcus faecalis*.

No se detectó resistencia a penicilina ni a ampicilina en alguna de las cepas aisladas.

No se detectó resistencia a los β-lactámicos asociada a la producción de β-lactamasas en ninguna de las cepas de *Enterococcus faecalis*.

#### **Resistencia a altas concentraciones de aminoglucósidos.**

De las 83 cepas aisladas de *Enterococcus faecalis*, 12 (15%) se determinaron con alta resistencia a gentamicina y 71 (85%) fueron susceptibles. En el caso de la resistencia a altas concentraciones de estreptomicina 28 (33%) cepas se mostraron resistentes y 55 (67%) susceptibles. Figura 15.

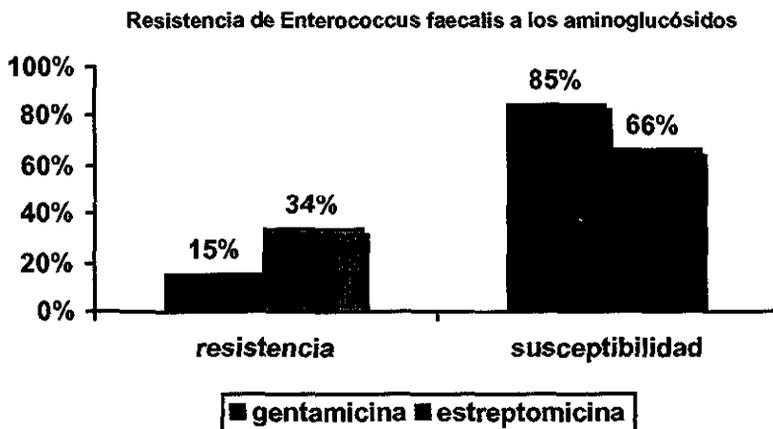


Figura 16. Resultados de las pruebas de Kirby-Bauer para determinar la resistencia a altas concentraciones de gentamicina (120µg) y estreptomicina (300µg).

El número de cepas resistentes por tipo de pacientes fue como lo indica la tabla 4.

Tabla 4. Cepas aisladas de muestras de pacientes internos y externos.

PACIENTES			
MUESTRAS	INTERNOS	EXTERNOS	TOTAL
UROCULTIVOS	16	5	21
HEMOCULTIVOS	2	0	2
LCR	1	0	1
SECRECION DE HERIDA	1	0	1
PUNTA DE CATETER	1	0	1
ABSCESO HEPATICO	1	0	1
TOTAL	22	5	27

Algunas cepas presentaron resistencia a altas concentraciones a un aminoglucósido, estreptomicina o gentamicina, mientras que otras a los dos. Tabla5.

Tabla5. Número de cepas resistentes a uno y dos aminoglucósidos por origen de las muestras así como el porcentaje para cada grupo.

MUESTRA	ALTA RESISTENCIA A UN AMINOGLUCÓSIDO	ALTA RESISTENCIA A DOS AMINOGLUCÓSIDOS	TOTAL DE CEPAS
UROCULTIVOS	21 (33%)	5 (8%)	26
HEMOCULTIVOS	2 (7.6%)	1 (3.8%)	3
LCR	1 (3.8%)	1 (3.8%)	2
SECRECION DE HERIDA	1 (3.8%)	0 (0 %)	1
PUNTA DE CATETER	1 (3.8%)	0 (0 %)	1
ABSCESO HEPATICO	1 (3.8%)	0 (0 %)	1

## 6. DISCUSION

De acuerdo a algunos estudios realizados, se ha observado que *Enterococcus* tiene un papel importante como patógeno. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que de los aislamientos bacterianos realizados, *Enterococcus faecalis* fue la especie que con mayor frecuencia se identificó (figura 12). Estos resultados son semejantes con los de otros estudios realizados en México (53, 56) y en el mundo (4, 10, 18, 22, 37, 41, 48).

De todos los aislamientos de *Enterococcus faecalis*, el 78% se recuperó de urocultivos, lo cual sugiere una importante participación como patógeno en infecciones de vías urinarias (25, 18, 41, 42) (figura 13). Aunque también se cultivó de otras muestras como hemocultivos, LCR y Hueso; que indican que *Enterococcus faecalis* es capaz de causar infecciones graves.

Al correlacionar el número de aislamientos en pacientes ambulatorios y en pacientes hospitalizados, en éstos últimos se encontró un porcentaje mayor (figura 14), lo que muestra la importancia de *Enterococcus faecalis* como patógeno nosocomial (tabla 3).

La terapia antimicrobiana de primera elección en infecciones originadas por estos patógenos consiste en la combinación de un aminoglucósido y un agente  $\beta$ -lactámico; el factor de virulencia mas importante que presenta el género *Enterococcus* es la resistencia a los antibióticos, por lo que se evaluaron los perfiles de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y a los aminoglucósidos a bajas y altas concentraciones; seleccionando las cepas de *Enterococcus faecalis*.

No se encontraron cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos, pero 48% de ellas fueron resistentes al aminoglucósido estreptomina y 36% a gentamicina, lo que muestra que un mecanismo importante de resistencia es la impermeabilidad de la pared bacteriana al antibiótico (figura 15).

Al evaluar la alta resistencia a los aminoglucósidos, 15% de las cepas en estudio fueron resistentes a gentamicina y 34% a estreptomina. En México se ha reportado resistencia a gentamicina y a estreptomina con porcentajes semejantes a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Los estudios realizados en otros países informan resistencia de 10 a 45% para gentamicina y 15 a 75% para estreptomina lo que muestra que la resistencia a los aminoglucósidos se encuentra en un rango muy amplio según diversos estudios.

Por otro lado también se evaluó la aparición de cepas resistentes a altas concentraciones de los aminoglucósidos, obteniéndose 18% de todas las cepas (tabla 5). Esta doble resistencia indica la alta frecuencia del fracaso terapéutico.

Los datos obtenidos demuestran la presencia de algunas cepas que dada su resistencia a estos antibióticos, requieren de otras drogas más eficaces como la vancomicina, ya que aunque las cepas fueron susceptibles a penicilina, esto no implica que los antibióticos  $\beta$ -lactámicos sean la posible solución, porque se ha demostrado que *Enterococcus faecalis* es capaz de adquirir con facilidad elementos genéticos móviles que tienen codificada la resistencia relacionada con proteínas que fijan penicilina de baja afinidad (2, 11).

En este trabajo se consideró importante valorar la posible aparición de resistencia a  $\beta$ -lactámicos asociadas a  $\beta$ -lactamasas, por lo tanto la combinación de un antibiótico aminoglucósido y un  $\beta$ -lactámico, puede funcionar de manera eficaz en aquellas cepas que no son resistentes a altas concentraciones.

## 7. CONCLUSIONES

- 1.- La cepa que con mayor frecuencia se aisló fue *Enterococcus faecalis*.
- 2.- *Enterococcus faecalis* se aisló principalmente de pacientes con infecciones de vías urinarias.
- 3.- Debido al mayor porcentaje de aislamientos de *Enterococcus faecalis* en individuos hospitalizados, es importante destacar el papel que tiene como patógeno nosocomial.
- 4.- No se encontraron cepas resistentes a  $\beta$ -lactámicos, lo que demuestra su uso como antibiótico que sinergiza eficientemente con los aminoglucósidos en la terapia antimicrobiana.
- 5.- De los aislamientos clínicos obtenidos con resistencia a altas concentraciones, fueron mas frecuentes para estreptomina que para gentamicina. Lo que sugiere que el uso de la gentamicina puede resultar mas efectivo que el de estreptomina.
- 6.- No se identificaron cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. **Acar, J.F. and F. W. Goldstein.**1998. Consequences of increasing resistance to antimicrobial agents. *Clin Infect Dis* 27(1): S125-30.
2. **Arthur, M., and P. Courvalin.**1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agent Chemother* 37:1563-1571.
3. **Bhat, K.G., C. Paul, M. G. Bhat.** 1997. Neonatal bacteremia due to high level aminoglycoside resistant (HLAR9 enterococci. *Indian J Pediatr* 64:4 537-539.
4. **Cirak, M. Y. and N. Sultan.** 1998. Prevalence of high level aminoglycoside and vancomycin resistance among enterococci in Turkey. *Acta Microbiol Pol* 47:3 267-273.
5. **Coque, T. M., R. C. Arduino., and B. E. Murray.** 1995. High-level resistance to aminoglycosides: comparison of community and nosocomial fecal isolates of enterococci. *Clin infect Dis* 20:1048-1051.
6. **Coudron, P. E., S. M. Markowitz, and E. S. Wong.** 1992. Isolation of  $\beta$ -lactamase-producing, aminoglycoside-resistant strain of *Enterococcus faecium*. 5:1125-1126.
7. **Corvalin, P.** 1994. Minireview. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1447-1451.
8. **Culebras, E. and J. L. Martínez.** 1999. Aminoglycoside resistance mediated by the bifunctional enzyme 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase-2"-O-aminoglycoside phosphotransferase. *Font Biosci* 14: D1-8.
9. **Chen, Y. S., S. A. Marshall, P. L. Wonokur, S. L. Coffman, W. W. Wilke, P. R. Murray, C. A. Spiegel, M. A. Pfaller, G. V. Doern, and R. N. Jones.** 1999. Use of

- molecular and reference susceptibility testin methods in a multicenter evaluation of microsacan dried overnight gram-positive MIC paneles for detection of vancomycin and high-level aminoglycoside resistances in enterococci. *Chem Biol* 6:2 99-110.
10. **Cherian, B. P., E. Mathai, and S. Chandy.** 1995. Determination of high level resistance to aminoglycoside among enterococci. *Indian J Med Res* 102: 255-257.
  11. **Chow, J. W., M. B. Perry., L. A. Thal and M. J: Zervos.** 1993. Mobilization of the penicilinase gene in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1187-1189.
  12. **Chow, J. W., S. M. Donabedian., and M. J. Zervos.**1997. Superinfection with *Enterococcus faecalis* during quinupristin/dalfopristin therapy. *Clin infect Dis* 24:91-92.
  13. **Daigle, D. M., D. W. Hughes, G. D. Wright.**1999. Prodigius substrate specificity of AAC(6<sup>'</sup>)-APH(2<sup>'</sup>), and aminoglycoside antibiotic resistance determinat in enterococci and staphylococci. 6:2 99-110.
  14. **Doern, G. V., R. N. Jones., E. H. Gerlach., J. A. Washington., D. J. Biedenbach., A. Brueggemann., M. E. Erwin., C. Knapp, and J. Raymond.** 1995. Multicenter clinical laboratory evaluation of a  $\beta$ -lactamase disk assay employing a novel chromogenic cephalosporin, S1. *J Clin Microbiol* 33:1665-1667.
  15. **Eliopoulos, G. M.** 1993. Aminoglycoside resistant enterococcal endocarditis. *Infect Dis Clin North Am* 7:117-133.
  16. **Emori, T. G., and R. P. Gaynes.** 193. An overview of nosocomial infections including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microb Rev* 6:428-442.
  17. **Facklam, R. R.** 1997. Screening for sterptococcal pharingitis: current technology. *Nat Cen Infect Dis Infect in Med* 14(11):891-898.

18. **Facklam, R. R. and L. M. Texeira.** 1996. Microbiology and microbial infections. Chapner Enterococcus. Ninth edition. Topley and Wilson. Leslie Collier Editor. 669-682.
19. **Facklam, R. R., D. Hollis and M. D. Collins.** 1989. Identification of gram positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. J Clin Microbiol 4:724-730.
20. **Free, L. and D. F. Saham.** 1995. Investigation of the reformulated remel synergy quad plate for detection of high-level aminoglycoside and vancomycin resistance among enterococci. J Clin Microbiol 33:1643-1645.
21. **Goossens, H., and M. J. W. Sprenger.** 1998. Community acquired infections and bacterial resistance. B M J 317:654-657.
22. **Gordon, S., J. M. Swenson., B. C. Hill., N. E. Piott., R. R. Facklam., R. C. Cooksey., C. Thornsberry. Enterococcal study group., W. R. Jarvis, and F. C. Tenover.** 1992. Anticicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of Enterococci causing infections in the United States. J Clin Microbiol 30:2373-2378.
23. **Grayson, M. L., G. M. Eliopoulos., C. B. Wennerstein, K. L. Ruoff, K. Klimm, F. L. Sapico, A. S. Bayer, and R. C. Moellering, JR.** 1991. Comparison of Enterococcus raffinosus with Enterococcus avium on the basis of penicillin susceptibility, penicillin-binding protein analysis, and high-level aminoglycoside resistance. Antimicrob Agents Chemother 35:1408-1412.
24. **Grayson, M. L., G. M. Eliopoulos, C. B. Wennerstein, K. L. Ruoff, P. C. De Girolami, M. Ferrara, and C. Moellering Jr.** 1991. Increasing resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics among clinical isolations of Enterococcus faecium: a 22-year review at one institution. Antimicrob Agents Chemother 35:2180-2184.

25. **Guinguitzova, B., D. Chankova, B. Zozilov, and N. Minvov.** 1998. Enterococci as uropathogens. Frequency of isolation and sensitivity to antibacterial agents. 1998. *Ann Urol (Paris)* 32:1b 15-19.
26. **Haubry, H., and P. Courvalin.** 1999. Bacterial resistance to antimicrobial agents: selected problems in France, 1996-1998. *Emerg Infect Dis* 5(3): 331-337.
27. **Hawkey, P. M.** 1998. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *B M J* 317: 657-660.
28. **Hoellman, D. B., M. A. Visalli., M R. Jacobs and P. C. Appelbaum.** 1998. Activities and time-kill studies of selected penicillins,  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations, and glycopeptides against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents & Chemother* 4:857-861.
29. **Huycke, M. M., C. A. Spiegel and M. S. Gilmore.** 1991. Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 8:1626-1634.
30. **Huycke, M. M., D. F. Saham, and M. S. Gilmore.** 1998. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 4(2):239-249.
31. **Jacoby, G. A.** 1996. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Ann Rev Med* 47:169-179.
32. **Kaufhold, A., A. Podbielsky, T. Horaud, and P. Ferrieri.** 1992. Identical genes confer high-level resistance to gentamicin upon *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1215-1218.

33. **Kafhold, A., and P. Ferrieri.** 1993. The microbiologic aspects, including diagnosis, of  $\beta$ -hemolytic streptococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 7:235-256.
34. **Lavery, A., A. S. Rossnery, D. Morrison, A. Power, and C. T. Keane.** 1997. Incidence and detection of multi-drug-resistant enterococci in Dublin hospitals. *J Med Microbiol* 46:2 150-156.
35. **Lavoie, S. R., E. S. Wong, P. E. Coudron, D. S. Williams, and S. M. Markowitz.** 1993. Comparison of ampicillin-sulbactam with vancomycin for treatment of experimental endocarditis due to a  $\beta$ -lactamase-producing, highly gentamicin-resistant isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:1447-1451.
36. **Leclercq, R., S. Dutka, A. Brission, C. Molinas, E. Derlot, M. Arthur, J. Duval, and P. Courvalin.** 1992. Resistance of Enterococci to aminoglycosides and glycopeptides. *Clin Infect Dis* 15:495-501.
37. **Louie, M., A. E. Simor, S. Szeto, M. Patel, B. Kreiswirth, and E. Low.** 1992. Susceptibility testing of clinical isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 30:41-45.
38. **Mangan, M. W., E. B. McNamara, E. G. Smyth, and M. Storrs.** 1997. Molecular genetic analysis of high-level gentamicin resistance in *Enterococcus hirae*. *J Antimicrob Chemother.* 40:3 377-382.
39. **Markowitz, S. M., V. D. Wells, D. S. Williams, C. G. Stuart, P. E. Coudron, and E. S. Wong.** 1991. Antibiotic susceptibility and molecular epidemiology of  $\beta$ -lactamase-producing, aminoglycoside-resistant isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1075-1080.
40. **Montecalvo, M. A., H. Harowitz, C. Gedris, C. Carbonaro, F. C. Tenover, A. Issah, P. Cook, and G. P. Wormser.** 1994. Outbreak of vancomycin-,ampicillin-

and aminoglycoside-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia in an adult oncology unit. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:1363-1367.

41. **Murray, B. E.** 1990. The life and times of the enterococcus. *Clin Microb Rev* 1:46-65.
42. **Murray, B. E.** 1998. Diversity among multidrug-resistant Enterococci. *Emerg Infect Dis* 1:37-47.
43. **Nicoletti, G., and S. Stefani.** 1995. Enterococci: susceptibility patterns and therapeutic potions. *Eur J Clin Microbiol Dis* 1:33-37.
44. **Paparaskevas, J., A. Vatopoulos, P. T. Tassios, A. Avlami, N. J. Lagakis, and V. Kalapothaki.** 200. Diversity among high-level aminoglycoside-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother* 45:3 277-283.
45. **Patterson, J. E., and M. J. Zervos.** 1990. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus*: microbiology, genetic basis and epidemiology. *Rev Infect Dis* 173:1129-1136.
46. **Patterson, J. E., and M. J. Zervos.** 1990. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus*: microbiology, genetic basis and epidemiology. *Rev Infect Dis* 173:1129-1136.
47. **Patterson, J. E., K. V. Sing, and B. E. Murray.** 1991. Epidemiology of an endemic strain of  $\beta$ -lactamase-producing *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 29:2513-2514.
48. **Ronconi, M. C., L. A. Merino.** 2000. Prevalence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* with high resistance to aminoglycosides in the cities of Resistencia and Corrientes, Republic of Argentina. *Enferm Infect Microbiol Clin* 18: 271-73.

49. **Saham, D. F., and C. Torres.** 1998. Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 26:250-256.
50. **Sanchez, M. L., M. S. Barret, and R. N. Jones.** 1992. Use of the e test to predict high-level resistance to aminoglycoside among enterococci. *J Clin Microbiol* 30:3030-3032.
51. **Schmit, J. L., R. Leclercq, A. Scheimberg, D. Launder.** 1994. Approche épidémiologique et clinique des enterocoques: résultat d'une enquête. *Medecine et Maladies Infectieuses*. 24S:141-148.
52. **Schultz, J. E., and D. F. Saham.** 1993. Reliability of the e test for detection of ampicillin, vancomycin and high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Clin Microbiol* 31:3336-3339.
53. **Sifuentes, J. A. Ponce de León, T. Muñoz, Y. Villalobos, C. Ontiveros, and C. Gómez.** 1996. Antimicrobial susceptibility patterns and high level gentamicin resistance among enterococci isolated in a mexican tertiary care center. *Rev Invest Clin* 48:91-96.
54. **Silverman, J., L. A. Thal, M. B. Perri, G. Bostic, and M. J. Zervos.** 1998. Epidemiologic evaluation of antimicrobial resistance in community-acquired enterococci. *J Clin Microbiol* 36:830-832.
55. **Simjee, S., S. E. Manzoor, A. P. Fraise, and M. Gill.** 2000. Nature of transposon-mediated high-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* isolated in the United Kingdom. 45:5 565-575.
56. **Solórzano, F., B. Leafios, M. G. Miranda, and H. Diaz.** 1996. Additional information of antimicrobial susceptibility of enterococci in México. *Rev Invest Clin* 48:407-408.

57. **Spiegel, C. A.** 1998. Laboratory detection of high-level aminoglycoside-aminocyclitol resistance in *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol* 26:2270-2274.
58. **Struelens, M.J.** 1998. The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. *B M J* 317:652-654.
59. **Swenson J. M., M. J. Ferraro, D. F. Saham, N. C. Clark, D. H. Culver, and F. C. Tenover.** *J Clin Microbiol* 33 3009-8-3018.
60. **Szeto, S., M. Louie, D. E. Low, M. Patel, and A. E. Simor.** Comparison of the new Microscan pos MIC type 6 and AMS-vitek gram positive susceptibility acrd (GPS-TA) for detection of high-level aminoglycoside resistance in *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 29:1258-1259.
61. **Tsai, S. F., M. J. Zervos, D. B. Clewell, S. M. Donabedian, D. F. Saham, and J. W. Chow.** 1998. A new high-level gentamicin resistance gene, *aph(2<sup>III</sup>)-id*, in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 45:5 1229-1232.
62. **Woods, G. L., B. Digiovanni., M. Levinson, P. Pitsakis, and D. La Temple.** 1993. Evaluation of microscan rapid panels for detection of high-level aminoglycoside resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 31:2786-2787.
63. **Zervos, M. J., M. S. Terpening, D. R. Schaberg, P. M. Therasse, S. V. Menderdorp, and C. A. Kauffman.** 1987. High-level aminoglycoside resistant enterococci: colonization of nursing home and acute care hospital patients. *Arch Intern Med* 147:1591-1594.