



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**IMPORTANCIA CRECIENTE DEL GRUPO  
ENTEROCOCCUS EN LA PATOLOGÍA  
CLÍNICA**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
**ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

**P r e s e n t a:**

**Q.F.B. HELEN YAMPARA IQUISE**



México, D.F.

1998



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:**

<b>Presidente:</b>	<b>Dra. Silvia Giono Cerezo</b>
<b>Primer Vocal:</b>	<b>Dr. José Pedraza Chaverri</b>
<b>Secretario:</b>	<b>Dra. Ma. Dolores Lastra Azpillicueta</b>
<b>1er. Suplente:</b>	<b>Q.F.B. Eva Hilda González López</b>
<b>2do. Suplente:</b>	<b>Q.F.B. Lilia Pichardo Villalón</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Laboratorio de bacteriología, Depto. de Laboratorios Clínicos**

**Hospital Infantil de México "Federico Gómez"**

**Sustentante**

  
\_\_\_\_\_  
**Q.F.B. Helen Yampara Iquise**

**Asesor**

\_\_\_\_\_  
**Dr. Adolfo Pérez-Miravete**

A alejandro por su apoyo y cariño  
en todo momento

A mis padres por confiar en mí,  
a mis hermanos, cuñados,  
sobrinos y abuelos.

## AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Adolfo Pérez-Miravete mi más sincero agradecimiento por permitirme trabajar bajo su dirección durante todo este tiempo, brindándome siempre su invaluable apoyo y sus acertados consejos en mi formación profesional.

A Yolanda y Patricia les agradezco el haberme apoyado en las diferentes facetas de este trabajo.

A los miembros del jurado, por la revisión crítica y acertados comentarios de este trabajo.

# ÍNDICE

	pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	3
1. CLASIFICACIÓN	3
2. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA	4
3. IMPORTANCIA CLÍNICA	6
3.1. Infecciones causadas por Enterococci	
3.1.1. Tracto urinario	
3.1.2. Bacteriemia	
3.1.3. Endocarditis	
3.1.4. Infecciones intraabdominal y pélvica	
3.1.5 Infecciones neonetales	
4. ENTEROCOCCI COMO PATÓGENO NOSOCOMIAL	8
5. ADHERENCIA AL TEJIDO HUÉSPED	9
6. MODULACIÓN DE LA INMUNIDAD DEL HUÉSPED	9
6.1. Ácido lipoteicoico en la respuesta inmune	
6.2. Complemento y neutrófilos	
7. FACTORES DE VIRULENCIA	10
7.1. Citolisina	
7.2. Proteasa	
7.3. Hialuronidasa	
7.4. AS-48	
8. RESISTENCIA	12
8.1. Resistencia Intrínseca	
8.1.1. $\beta$ -lactámicos	
8.1.2. Aminoglucósidos	
8.1.3. Sulfonamidas y trimetoprin	
8.1.4. Glucopéptidos	
8.2. Resistencia adquirida	
8.2.1 $\beta$ -lactámicos	
8.2.2. Aminoglucósidos	
8.2.3. Glucopéptidos	

OBJETIVOS	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
1. Identificación de género	19
1.1. Catalasa	
1.2. Pirrolidonil- $\beta$ -naftilamida (PYR)	
1.3. Bilis esculina	
1.4. Reducción de leche-azul de metileno	
1.5. NaCl al 6.5%	
2. Identificación de especie	23
2.1. Sistema API 20 STREP	
2.2. Hemólisis	
3. Sensibilidad antimicrobiana	27
3.1. Método de Bauer-Kirby	
3.2. Método de dilución en agar	
3.3. Técnica de tamiz (“Screen”)	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
1. Especies identificadas	33
2. Distribución de especies según el origen de la muestra	34
3. Resistencia a antibióticos	35
CONCLUSIONES.	37
BIBLIOGRAFÍA	39

## RESUMEN

El género *Enterococcus* representa la segunda causa más importante en infecciones nosocomiales, especialmente del tracto urinario, y la tercera causa de bacteriemia nosocomial después de *E. coli* y *Staphylococcus* (1). Las especies que causan infecciones en humanos son *Enterococcus faecalis* y el segundo más común es *E. faecium*. En menor número se han atribuido a *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, etc. En los últimos años se ha encontrado que la tasa de incidencia de infecciones por *Enterococcus* tiene una tendencia ascendente. Además del problema anterior, se ha observado un incremento en la aparición de cepas multirresistentes a los antibióticos de uso común, razón por la cual se realizó éste estudio. De diciembre de 1997 a julio de 1998 se aislaron 49 cepas de *Enterococcus*: 15 de urocultivos (30.6%), 11 de puntas de catéter (22.4%), 7 de hemocultivos (14.3%), 3 de líquido peritoneal (6.1%), 2 de LCR (4.1%) y 11 de secreciones (ocular, uretral, broncoaspirado, fistula biliar y absceso hepático) (22.4%) de pacientes del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". La identificación fenotípica de las especies se realizó con el sistema API 20STREP. Las especies identificadas fueron: 29 cepas (59%) de *E. faecalis*, 11 cepas (22%) de *E. faecium*, 7 cepas (14%) de *E. durans*, 1 cepa (2%) de *E. avium* y 1 cepa (2%) de *E. casseliflavus*.

La importancia de cepas resistentes a vancomicina se ha observado con temor, debido a que es el último recurso terapéutico después de una transmisión específica de esta resistencia a otros microorganismos patógenos. Probadas por el método de Bauer-Kirby la mayor parte de las cepas fueron sensibles a vancomicina, aunque algunas de ellas en los límites de resistencia, por lo que se determinó su susceptibilidad mediante la prueba de tamiz ("screen") siguiendo las pautas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). El 14% de las cepas fue sensible a ampicilina. A las cepas aisladas de urocultivos también se les determinó su susceptibilidad a ciprofloxacina (33%), nitrofurantoina (100%) y tetraciclina (13%).

Los datos obtenidos en cuanto a la frecuencia de especies de *Enterococcus* según la fuente de origen, fueron igual a los reportados en otros hospitales. La especie que

generalmente presenta resistencia a vancomicina es *E. faecium*, en cambio nuestros datos indican que sólo una cepa de *E. faecium* fue no sensible a este antibiótico. Por lo tanto, nuestros datos indican que en nuestro Hospital la resistencia a antibióticos en particular a vancomicina es muy baja como en otros Hospitales de México, pero nosotros sugerimos que además del método de Kirby-Bauer realizar otro método como el "screen" o dilución en agar para estar completamente seguros que nuestras cepas no son resistentes.

#### Conclusiones:

- 1) Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *E. faecalis*, siguiendo en orden de frecuencia: *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium* y *E. casseliflavus*.
- 2) Las cepas aisladas no presentaron resistencia a vancomicina (Bauer-Kirby), sin embargo, se encontraron 2 cepas de *E. durans* y 1 de *E. faecium* no susceptibles a vancomicina (prueba de "screen").
- 3) La resistencia a ampicilina fue del 86%, las cepas aisladas de urocultivos mostraron elevada resistencia a tetraciclina (80%).

# INTRODUCCIÓN

## 1. Clasificación

Uno de los esquemas más útiles para la clasificación preliminar de los *Streptococcus* se basa en el tipo de hemólisis que se produce en las placas de gelosa sangre y a diferencias serológicas en los polisacáridos C de la pared celular (clasificación de Lancefield) (Tabla 1). Algunos *Streptococcus* producen una zona clara de hemólisis ( $\beta$ -hemólisis) alrededor de la colonia como consecuencia de la lisis completa de los glóbulos rojo. Otros *Streptococcus* producen una zona de hemólisis parcial con una coloración verdosa ( $\alpha$ -hemólisis) del medio, y aún otras especies son no hemolíticas ( $\gamma$ -hemólisis) en gelosa sangre (2).

Tabla 1. Clasificación de Lancefield.

GRUPO DE LANCEFIELD	ESPECIES	HEMÓLISIS (sangre ovina)
A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	beta
B	<i>Streptococcus agalactiae</i>	beta
C	<i>S. equi</i> <i>S. equisimilis</i> <i>S. dysgalactiae</i>	(alfa) beta
D	<b>Enterococcus</b> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i> <b>No Enterococcus</b> <i>E. bovis</i> <i>E. equinus</i>	gammarreactivos (alfa) (beta)
F	<i>S. minutus-angiosus</i> "Estrepto MG"	beta
G	<i>S. canis</i>	beta
H	<i>S. sanguis</i>	alfa
K	<i>S. salivarius</i>	alfa

El antígeno de grupo D se distingue de los carbohidratos antigénicos de los demás grupos, por estar formado por ácido lipoteicoico asociado a la membrana citoplasmática.

Streptococcus se clasifica en 18 grupos: de la A a la H y de la K a la T según Lancefield. Sin embargo, en la mayoría de los laboratorios clínicos sólo se identifican rutinariamente los grupos A, B y D, ya que dichos grupos son responsables de la mayoría de las infecciones humanas (3).

El antígeno de grupo D se distinguen de los carbohidratos antigénicos de los demás grupos, por estar formado por ácido lipoteicoico asociado con la membrana citoplasmática. Entre los Enterococcus aislados del ser humano, que poseen antígenos del grupo D de Lancefield se incluyen dos grupos diferente fisiológica y genéticamente (por estudio de homología de ADN): 1) el grupo Enterococcus: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, y 2) los no Enterococcus. Otros Enterococcus como son: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. solitarius*, *E. pseudoavium*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. seriolicida* y *E. flavescens* sólo se han encontrado rara vez asociados con cuadros clínicos en el ser humano (4,5).

Si bien el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ha mantenido a los Enterococcus, como un subgrupo dentro del género Streptococcus, los esquemas actuales de clasificación reconocen un nuevo género, Enterococcus basado en estudios de la hibridación de DNA/DNA y DNA/rRNA (2,6).

En una reclasificación más reciente las especies de Enterococcus se separan en 5 grupos basado en la formación de ácido en caldo manitol, sorbitol y sorbosa e hidrólisis de arginina (5,7) ver **Tabla 2**.

## 2. Morfología y fisiología

Los Enterococcus son microorganismos gram-positivos de forma esférica a ovalada, son anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo, de menos de 2 µm de diámetro y son negativas a la prueba de la catalasa.

Por lo general proliferan como diplococos o en cadenas cortas. A veces se encuentran cepas raras móviles. Los Enterococcus se diferencian de casi todos los otros *Streptococci* por su capacidad para crecer en NaCl al 6.5%, a 45° C y de soportar

**Tabla 2.** Características fenotípicas usadas para la identificación de especies de *Enterococcus*.

Especies	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU
<b>Grupo I</b>											
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
<b>Grupo II</b>											
<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>Lactococcus spp.</i>	+		+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. faecium</i>	+	-	+	+	v	v	-	-	-	+	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	+	v	+	-*	+	+	+	v
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	v	+	-	-	+	+	-
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>Grupo III</b>											
<i>E. durans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	-	-	-	v	-	-	-	+	-
<i>E. dispar</i>	-		-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>E. faecalis (var)</i>	-		-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>E. faecium</i>	-		-	+	-	v	-	-	-	+	-
<b>Grupo IV</b>											
<i>E. sulfureus</i>	-		-	-	-	+		-	+	+	-
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+		-	-	+	+
<b>Grupo V</b>											
<i>E. casseliflavus</i>	+		-	+	v	+	v	+	+	+	v
<i>E. gallinarum</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Vagococcus spp.</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-

Abreviaciones y símbolos: MAN, manitol; SOR, sorbosa; ARG, arginina; ARA, arabinosa; SBL, sorbitol; RAF, rafinosa; TEL, 0.04% de telurito; MOT, motilidad; PIG, pigmento; SUC, sacarosa; PYU, piruvato; +, positivo >90%; -, positivo < 10%; +\* o -\*, excepción ocasional (< del 3% de las especies presentan reacciones aberrantes).

Tabla que se tomó de la referencia 5.

temperaturas cercanas a los 60° C por 30 min. Además, proliferan en presencia de bilis al 40% e hidrolizan la esculina. Todos dan la hemólisis alfa ( $\alpha$ ) o gamma ( $\gamma$ ) en gelosa sangre de carnero, con la excepción de un subgrupo de *E. faecalis* conocido antiguamente como la subespecie var, *zimogenes*, que es  $\beta$ -hemolítica (2).

### 3. Importancia clínica

*E. faecalis*, *E. faecium* son residentes de la mucosa del tracto intestinal de humanos y de la mayoría de los animales (8). Además, estas dos especies son las de mayor importancia clínica humana. *E. faecalis* se aísla en mayor cantidad (85-90%) que *E. faecium* (5-10%) (9). Las demás especies de *Enterococcus* se encontraban raramente o casi nunca en el laboratorio microbiológico y algunos se encontraban casi exclusivamente de fuentes agrícolas o veterinarias (9). Sin embargo, reportes recientes indican el aumento de infecciones en humanos debido a *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* (9).

#### 3.1. Infecciones causadas por *Enterococci*

*Enterococcus* es causa frecuente de una gran variedad de infecciones en humanos. Estos organismos infectan comúnmente el tracto urinario, sangre, endocardio, abdomen, tracto biliar, heridas e instrumentos como catéteres intravasculares. Aunque, *Enterococci* también pueden infectar el sistema nervioso central, pulmón, tejidos blandos, senos paranasales, oídos y ojos (10).

##### 3.1.1. Infección del tracto urinario

En humanos las infecciones del tracto urinario son por mucho las más comunes. La mayoría de estas infecciones son nosocomiales y están asociadas con instrumentación, anomalías estructurales del tracto urinario o como consecuencia del uso de catéteres (9,10). Las heridas intraabdominales o pélvicas son las más comunes de las cuales se aísla *Enterococci* (9). Las infecciones probablemente ocurren a través de organismos que ascienden la uretra y uréteres (10).

### **3.1.2. Bacteriemia**

Esta es la tercera infección más común causada por Enterococci (9,10). El origen usual de los microorganismos que entran al torrente sanguíneo se debe a: infección del tracto urinario, sepsis intraabdominal, abscesos, y más recientemente infecciones de líneas intravenosas o intraarteriales de administración de medicamentos (10).

### **3.1.3. Endocarditis**

La endocarditis se encuentra con mayor frecuencia en válvulas cardíacas dañadas, cardiopatías congénitas o en prótesis valvulares. Esta puede seguir un curso fulminante (agudo) o ser una enfermedad insidiosa o prolongada (subaguda) y la infección se puede complicar en otros sitios, provocando neumonía, abscesos, infección del tracto urinario o puede dar una bacteriemia transitoria (2). Lo cual es reproducible en la endocarditis experimental inducida por catéter (11). La capacidad de Enterococcus para unirse a los componentes de la matriz del tejido o célula endocardial es el factor más crítico para causar infección (10). Algunas investigaciones asocian la capacidad de estos microorganismos a adherirse al tejido endocardial con la presencia de endocarditis (10). Crawford y Russell (12) examinaron Streptococci de pacientes con endocarditis bacteriana subaguda y encontraron que especies de *E. faecalis* fueron menos adherentes que especies de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, pero más adherente que las especies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitior*, o *Streptococcus salivarius* (12).

### **3.1.4. Infecciones Intraabdominal y pélvica**

Si bien Enterococci son parte de la flora normal del intestino de la mayoría de las personas y son aislados de cultivos vaginales alrededor del 17%, las infecciones intraabdominal y pélvica son controversiales (13). Datos experimentales de animales indican que Enterococci no causa sepsis cuando se inyectó solo Enterococci, pero puede actuar sinérgicamente con otros microorganismos o sustancias que causan la formación de abscesos. Estas investigaciones fueron confirmadas recientemente por otros

autores (14,15,16,17).

### **3.1.5. Infecciones neonatales**

Si bien, Streptococci y *Escherichia coli* son la causa más común de infecciones neonatales, está bien documentado que Enterococci puede causar infección en esta población. Un estudio retrospectivo realizado en un hospital pediátrico en Cincinnati, encontraron 9 casos de sepsis neonatal o meningitis o ambos entre 1970 y 1976. Un brote de sepsis neonatal por Enterococci se reportó recientemente. Durante el periodo del brote (6 meses), Enterococci causó 8 episodios de bacteriemia neonatal de 19 (42%) contra solo 8 episodios de 159 (5%) durante un periodo de 5 años (13).

## **4. Enterococci como patógeno nosocomial**

La importancia de Enterococci como patógeno nosocomial se ha incrementado en los últimos años, siendo la segunda causa de este tipo de infecciones después de *Escherichia coli* (9,18). La mayoría de las infecciones adquiridas en el hospital debido a Enterococci se asientan en el tracto urinario (9).

Originalmente se consideró que la infección por Enterococci era endógena y fue atribuida a la flora del intestino del paciente. Además, algunos estudios que mostraron el potencial de Enterococci para traslocar del tracto gastrointestinal al nódulo linfático mesentérico en animales de experimentación, lo que bajo ciertas condiciones da credibilidad a esta teoría. No obstante estudios recientes documentaron claramente que la resistencia de especies de Enterococci favorece que se pueda extender la infección de paciente a paciente en el ambiente del hospital. Por otro lado, estos microorganismos puede colonizar al personal del hospital, quienes pueden llevar la bacteria en su flora intestinal por varios periodos y algunas veces se pueden extender a los pacientes. Bajo circunstancias normales, el personal puede ser el mecanismo de diseminación primaria de infecciones nosocomiales por Enterococci (9,18,19).

## 5. Adherencia al tejido huésped

En la adherencia por *Enterococcus* participan **adhesinas** expuestas en la superficie a células epiteliales, células endoteliales, leucocitos, o matriz extracelular, este representa el primer paso en la infección y son las que promueven la unión a receptores eucarióticos sobre la mucosa. El sistema de adhesinas se describió para varios patógenos, incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Bordetella pertussis*, *Streptococcus pyogenes*, y *Streptococcus sanguis*. Estas adhesinas juegan diversos papeles como moléculas efectoras: favoreciendo la fagocitosis, iniciando o reduciendo la respuesta inflamatoria local, o actuando como factores de patogenicidad (9,10).

La **substancia de agregación** es codificada por plásmidos de *E. faecalis* que responden a feromonas originadas por la célula receptora. La substancia de agregación convierte la superficie de la bacteria del donador de una adherente a una potencial célula receptora, causando agregación o masa y facilitando la transferencia de plásmidos (10).

Las **feromonas** se producen por la célula receptora y actúan sobre la célula donadora para inducirle en esta la expresión de sustancias de agregación y así favorecer la interacción entre la donadora y la receptora que llevan a cabo la conjugación, mecanismo por el cual el plásmido se transfiere (10).

En adición el intercambio de plásmidos facilita el transporte de los genes que codifican para factores de virulencia, entre ellos los genes de resistencia a antibióticos, la substancia de agregación puede aumentar la adherencia de *Enterococcus* a células intestinal y renal, además de hemolisinas (9,10).

## 6. Modulación de la inmunidad del huésped

Los patógenos que atraviesan las mucosas y/o las barreras de la piel se adhieren al tejido o célula del huésped y pueden desarrollar infección sólo si otras defensas son neutralizadas, evadidas o restringidas. Los fagocitos profesionales como los neutrófilos, monocitos y suministro de macrófagos no específicos, pero potentes defensas del huésped, actúan contra todo tipo de patógenos. Los neutrófilos en particular migran

eficientemente a sitios de infección en respuesta a señales quimiotácticas, como son el uso del complemento y anticuerpos para el reconocimiento de patógenos y muerte por ingesta de organismos por mecanismos oxidativos y no oxidativos. Los patógenos gram positivos tienen diversos factores de virulencia (cápsula de polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*, proteína M, de *S. pyogenes*, leucocidina de *S. aureus*, hemolisina de *L. monocytogenes* y catalasa y superóxido dismutasa de *S. aureus* y *Nocardia asteroides*) que favorecen su sobrevivencia contra estas defensas del huésped (10).

### **6.1. Ácidos lipoteicoicos en la respuesta inmune**

Los ácidos lipoteicoicos están asociados a la membrana de organismos procariontes. Para Enterococci estas moléculas de superficie se identifican como antígeno del grupo D. Este factor puede ser relevante para un proceso inflamatorio local, porque la unión del ácido lipoteicoico a células eucarióticas retiene la especificidad antigénica. Como resultado, estas células pueden sufrir lisis mediada por complemento. Increíblemente, el daño al tejido en sitios de infección puede surgir de la activación del complemento por la célula huésped asociada al ácido lipoteicoico de la membrana de la bacteria (10).

### **6.2. Complemento y neutrófilos**

Recientemente se ha reportado el mecanismo de interacción de Enterococci con neutrófilos humanos y el complemento. Este inicia mediante la opsonización de *E. faecalis* y *E. faecium*, y se realiza por la vía alterna del complemento (10). Se ha sugerido que la muerte de Enterococci por neutrófilos depende primariamente de la activación del complemento y de una inmunoglobulina no específica (20), además las especies capaces de expresar proteasa, citolisina o sustancia de agregación no prueban tener más resistencia a fagocitosis que las especies que carecen de estos fenotipos (20).

## **7. Factores de virulencia**

### **7.1. Citolisina**

Generalmente, el fenotipo citolítico es específico de plásmidos transmisibles,

altamente estables. En 1949 se reportó que 5 de 8 Enterococci inhibieron el crecimiento de otros microorganismos. Estas observaciones fueron confirmadas por otros autores (10), los cuales encontraron 16 especies de *E. faecalis* con hemólisis  $\beta$  que también inhibieron el crecimiento de bacterias gram-positivas pero no de gram-negativas. Estos investigadores además demostraron que las actividades citolítica y bacteriolítica de algunas especies de *E. faecalis* fueron perdiendo después de exposiciones a irradiaciones UV y que se recobró simultáneamente por reversión. Este comportamiento nos dá evidencia para hacer responsable a Enterococcus de actividades citolítica y bacteriolítica (10).

### **7.2. *Proteasa (gelatinasa)***

Esta es una Zinc-endopeptidasa (metaloendopeptidasa II) extracelular, capaz de hidrolizar la gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina y péptidos pequeños biológicamente activos. Además, se ha reportado que la producción de proteasas por *E. faecalis* es común en un 63.7% de muestras quirúrgicas y neuroquirúrgicas de la unidad de cuidado intensivo (10).

Por otra parte, se han analizado 95 muestras de pacientes con endocarditis y otras infecciones nosocomiales en los que encontraron que 54% producían proteasas. Además, estudios epidemiológicos sugieren la asociación entre la producción de proteasa y la infección (10).

### **7.3. *Hialuronidasa***

Estudios sobre la hialuronidasa en otros microorganismos proporciona bases indirectas para especular que esta enzima contribuye a la virulencia de Enterococci favoreciendo la diseminación(10).

### **7.4. *AS-48***

AS-48 es un péptido producido por *E. faecalis* que inhibe y lisa un espectro amplio de bacterias gram negativas y gram positivas, incluyendo Enterococci. Este

péptido básico genera poros en la membrana citoplasmática de la célula blanco lo que conduce a una depolarización. Esto aparentemente induce lisis de Enterococci seleccionados por medio de la activación de una autolisina. El significado de esta bacteriocina permanece incierta (10).

## 8. Resistencia

La atención reciente a Enterococci no sólo es por el incremento en infecciones nosocomiales, sino por su notable incremento de resistencia a antimicrobianos (13). La resistencia a actividades inhibitoria y bactericida es una notable característica de la mayoría de las especies de Enterococcus (5).

Consecuentemente, Enterococci están muy bien adecuados a la sobrevivencia en el ambiente hospitalario, donde el amplio uso de antibióticos condiciona un ambiente selectivo (21,22).

La resistencia a antimicrobianos pueden ser intrínseca o adquirida (5,13)

### 8.1. Resistencia intrínseca

La característica de resistencia intrínseca esta presente en todas o la mayoría de las especies de Enterococcus, y por lo tanto puede ser codificado cromosomalmente (5). Enterococci son intrínsecamente resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas. Adicionalmente las características de la resistencia intrínseca son especie específicas (21).

#### 8.1.1. $\beta$ -lactámicos

La resistencia o relativa resistencia de Enterococci a antibióticos  $\beta$ -lactámicos es una característica de este microorganismo; esto se debe a la baja afinidad de la proteína fijadora de penicilina (PBP) (5,13,24). En adición, los agentes  $\beta$ -lactámicos que tienen actividad no son bactericidas contra la mayoría de las especies (21).

Pruebas *in vitro* de *E. faecalis* muestran que las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) de penicilina G ampicilina, amoxicilina, piperacilina e imipenem son de 10-100 veces más grande que para la mayoría de los Streptococci (13,21). *E. faecium*

es más resistente con un MIC de 16-32  $\mu\text{g/ml}$  o más alto para penicilina (13).

### 8.1.2. Aminoglucósidos

La resistencia para alcanzar concentraciones terapéuticas de aminoglucósidos es también intrínseca y se debe a la baja producción de este agente. En esta resistencia antimicrobiana, la terapia recomendada para infecciones serias (como son: endocarditis, meningitis y otras infecciones sistémicas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos) incluye una combinación de  $\beta$ -lactámicos (usualmente penicilina) o glucopéptidos (vancomicina) con aminoglucósidos (usualmente gentamicina) (5). Esta combinación tiene actividad bactericida sinérgica, aunque los MICs de los aminoglucósidos es generalmente de 8-64 mg/L (13).

Se ha propuesto que el sinergismo en la actividad bactericida de un inhibidor de la pared celular y el aminoglucósido se deba a que la ruptura de la pared celular provocada por el agente activo contra la pared celular, facilite la entrada del aminoglucósido (21,23).

Todas las especies de *E. faecium* producen la enzima aminoglucósido-6'-acetil transferasa, codificada por el gen cromosomal *aac(6')-Ii*. La producción de esta enzima es suprimida por la actividad bactericida de una penicilina o un glucopéptido con un aminoglucósido, excepto con aminoglucósidos que no son sustratos de la enzima, como estreptomina y gentamicina (21).

### 8.1.3. Sulfonamidas y trimetoprim

Enterococci parece sensible a la combinación de estos antibióticos. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias Enterococci pueden usar folatos exógenos, por ejemplo en la orina. Ellos así pueden escapar de la inhibición por agentes antifolato y pueden ser resistentes *in vivo* para estos antimicrobianos (21).

### 8.1.4. Glucopéptidos

La vancomicina tiene baja actividad intrínseca (MIC, 2-32 mg/L) contra algunas especies de Enterococci raramente aislados como son *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* (21).

## 8.2. Resistencia adquirida

La resistencia adquirida resulta de mutaciones en el ADN existente o adquieren de un nuevo ADN que se encuentran en los plásmidos o transposones. En general, la adquisición de ADN ocurre por transformación (proceso que no se conoce como ocurre en Enterococci), transducción ( un proceso recientemente sugerido para Enterococci) o conjugación (5).

La característica de resistencia a antimicrobianos, especialmente a aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos y más recientemente a vancomicina son adquiridos (10).

### 8.2.1. $\beta$ -lactámicos

La resistencia adquirida a antibióticos  $\beta$ -lactámicos se debe a la síntesis de  $\beta$ -lactamasa y en la mayoría es codificado por un plásmido transferible que también codifica resistencia gentamicina. La resistencia de especies que producen  $\beta$ -lactamasas no son detectados por el método de Bauer-Kirby, esto se debe al efecto del inóculo. Cuando un inóculo es deficiente (Bauer-Kirby, con  $10^4$  UFC/ml), las cepas aparecen como susceptible, pero si el inóculo es elevado ( $10^7$  UFC/ml) las especies aparecen susceptibles (MIC,  $>500$   $\mu$ g/ml). Los Enterococcus  $\beta$ -lactamasa hidrolizan: penicilina, ampicilina y piperacilina (13).

### 8.2.2. Aminoglucósidos

Enterococci adquiere resistencia a aminoglucósidos por tres mecanismos distintos: modificación del ribosoma blanco, interferencia con el transporte del antibiótico y destoxificación enzimática de antibiótico. Los primeros dos mecanismos están relacionados a mutaciones cromosomales, mientras que el tercer mecanismo está relacionado a la adquisición de plásmidos. Los niveles elevados de resistencia (MIC mayor de 1000 mg/L) se han asociado a enzimas que modifican aminoglucósidos (21,25).

### 8.2.3. Glucopéptidos

Los glucopéptidos son inhibidores de la síntesis de la pared celular. Estas son moléculas largas que forman complejos con el peptidil-D-alanil-D-alanina terminal de precursores del peptidoglucano en la superficie celular. Este complejo glucopeptídico

largo en la superficie de la membrana citoplasmática inhibe la síntesis de la pared celular por impedimento de la transferencia de precursores citoplasmáticos al crecimiento de la cadena del peptidoglucano y bloqueando la formación de uniones interpeptídicas (22,24,26).

La resistencia adquirida de Enterococci a gluco péptidos pueden deberse a tres fenotipos: A, B y C, con base en la expresión de resistencia a antibióticos (23,27,28).

*vanA*

Este gen confiere una elevada resistencia inducible a vancomicina (MIC  $\geq$  a 64 mg/L) y teicoplanina (MIC  $\geq$  16 mg/L) que puede ser transferida (27). Esta resistencia está mediada frecuentemente por plásmidos y tiene un alto potencial epidémico, estos plásmidos son autotransferibles de *E. faecium* a otro microorganismo Gram positivo, incluyendo *Staphylococcus aureus* (23).

Los siete polipéptidos involucrados en la expresión de *vanA* pueden ser asignados en tres grupos: a) regulación de los genes de resistencia a vancomicina ( $Van_R$  y  $Van_S$ ), b) resistencia a gluco péptidos por producción de un blanco modificado ( $Van_H$ ,  $Van_A$ , y  $Van_X$ ), y c) proteínas accesorias que no son esenciales para la expresión de resistencia a gluco péptidos ( $Van_Y$  y  $Van_Z$ ) (21).

Las proteínas  $Van_A$  y  $Van_H$  funcionan como ligasa de amplia especificidad para el substrato y como deshidrogenasa respectivamente, que actúan juntos para sintetizar el depsipéptido D-alanil-D-alanina terminal de precursores del peptidoglucano (21). Aunque los precursores modificados pueden ser incorporados normalmente en la pared celular por enzimas codificados por el cromosoma del huésped, la sustitución resulta en una dramática disminución de la afinidad por vancomicina. Por consiguiente, las especies son resistentes, puesto que vancomicina no puede inhibir la síntesis de la pared celular. Sin embargo, en adición a  $Van_H$  y  $Van_A$ , la proteína  $Van_X$  es también necesaria para la expresión de resistencia a gluco péptidos.  $Van_X$  es una D,D-dipeptidasa que hidroliza el dipéptido D-alanil-D-alanina, el cual de otro modo compite con la D-alanil-D-lactato (21,25).

Los genes de resistencia  $Van_A$ ,  $Van_H$ , y  $Van_X$  son regulados a nivel transcripcional

por dos componentes del sistema regulatorio VanR-VanS, los cuales son codificados río arriba de VanH. Las dos proteínas reguladoras están probablemente involucradas en la transmisión de señales en respuesta a la presencia de vancomicina en la superficie de la célula (21,25).

Los genes *van* han sido naturalmente detectados solo en Enterococci. Sin embargo, Enterococcus conocidos por ser capaces de intercambiar resistencia a gentamicina o macrólido con otras especies gram positivas vía transferencia de plásmido conjugativo, así como en gram negativas (21,25). Por lo tanto, no es sorprendente que algún plásmido de resistencia a glucopéptidos tenga amplio rango y pueda realmente transferir *in vitro* a una variedad de organismos gram positivos incluyendo Streptococci, *Lactococcus lactis* y *Listeria monocitogenes*. En adición, Enterococci tipo *vanA* están extensamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados de heces de portadores sanos, de animales de granja y de plantas de tratamiento de aguas residuales. Estas observaciones conducen anticipadamente a una diseminación de genes de resistencia a glucopéptido a patógenos más virulentos en un futuro (21,25).

*vanB*.

Las especies del tipo VanB tienen resistencia inducible a varios niveles de vancomicina (MICs de 4 a mayor o igual de 1,000 mg/L) y son susceptibles a teicoplanina. Este fenotipo disociado es debido al hecho de que vancomicina actúa como un inductor, puesto que teicoplanina no lo hace. Los niveles alto y bajo de resistencia asociados a *vanB* son transferibles por conjugación en ciertas especies. La transferencia de resistencia se asocia con la movilización de elementos genéticos de cromosoma a cromosoma (21,25).

*vanC*.

Este tipo de gen se encuentra en especies de *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* que son intrínsecamente resistentes a vancomicina (MICs de 4-32 mg/L) pero son susceptibles a teicoplanina. *E. gallinarum* y *E. caseliflavus-flavescens* contienen el gen *vanC1* y el *vanC2* respectivamente, que participan en la síntesis de precursores de peptidoglicanos que finalizan en D-Ala-D-Ser a los que vancomicina tiene menor

afinidad (25).

En este tipo de fenotipo hay cooperación de cinco genes que son responsables para la síntesis de precursores de peptidoglicanos modificados, que muestran una baja afinidad para antibióticos glucopéptido, por lo tanto, las especies de bacterias son resistentes porque vancomicina no puede inhibir más la síntesis de la pared celular.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Aislar, identificar y realizar el perfil de susceptibilidad de Enterococcus.

### Objetivos particulares

- Aislar e identificar las especies de Enterococcus mediante el sistema API 20 STREP.
- Investigar la frecuencia de las especies de Enterococcus en muestras de urocultivos, hemocultivos, LCR, líquido peritoneal, puntas de catéter y secreciones, seleccionando aquellos productos en los cuales la presencia de Enterococcus pudiera tener significado patológico.
- Determinar la resistencia de las especies de Enterococcus a vancomicina y ampicilina dando particular énfasis en la resistencia a vancomicina, dada la importancia que pudiera tener en el tratamiento y diseminación de genes de resistencia a otras especies; y en el caso cepas aisladas de urocultivos a tetraciclina, nitrofurantoína y ciprofloxacina.

## MATERIAL Y MÉTODOS

De diciembre de 1997 a julio de 1998 se seleccionaron 49 cepas de *Enterococcus* aisladas de muestras clínicas de rutina en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Los criterios que se tomaron en cuenta para la inclusión de una muestra clínica fueron las siguientes:

- Presencia únicamente de *Enterococcus sp.* en la muestra clínica.
- Los urocultivos positivos a *Enterococcus sp.* con más de 100,000 UFC/ml.
- Los hemocultivos positivos a *Enterococcus sp.*
- Los cultivos de LCR positivos a *Enterococcus sp.*
- Los cultivos positivos a *Enterococcus sp.* de líquido peritoneal.
- Los cultivos de secreciones positivos a *Enterococcus sp.*

En éste estudio se excluyeron las muestras de coprocultivos y las muestras en las que otras bacterias coexistían con igual número de *Enterococcus*.

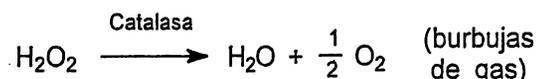
### 1. Identificación de género

Las cepas que se identificaron como *Enterococcus sp.* tuvieron las siguientes características:

- Cocos gram-positivos.
- Prueba de catalasa negativa.
- Pyr positivo.
- Crecimiento en NaCl al 6.5% y a temperaturas de 10-45° C.
- Hidrólisis de la esculina positiva.
- Reducción de la leche con azul de metileno.

#### 1.1. Catalasa

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en oxígeno y agua.



Excluyendo los *Streptococcus*, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad de catalasa (3).

**Técnica.** Con un palillo aplicador transferir células del centro de una colonia bien aislada a la superficie de un portaobjeto. Añadir 1 o 2 gotas de  $H_2O_2$  al 3%. La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva.

### 1.2. Pirrolidoni- $\beta$ -naftilamida (PYR)

Prueba que identifica presuntivamente a los *Streptococcus* del grupo A y a los *Enterococcus* por la hidrólisis de la L-pirrolidoni- $\beta$ -naftilamida.

**Técnica.** Una colonia de *Enterococcus* se frota sobre un papel filtro impregnado con el sustrato desarrollará un color rojo al agregarse el indicador de color en no más de 2 minutos (4) (Figura 1).

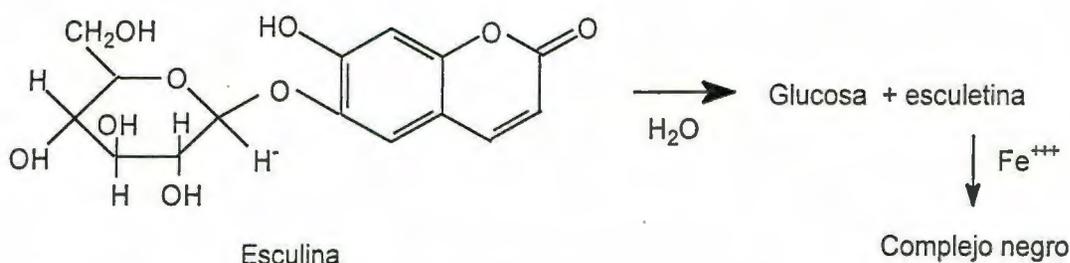


**Figura 1.** Prueba de PYR para identificar a *Enterococcus*. C, sin muestra; (+), positivo para *Enterococcus*; y (-), control negativo (*Streptococcus viridans*).

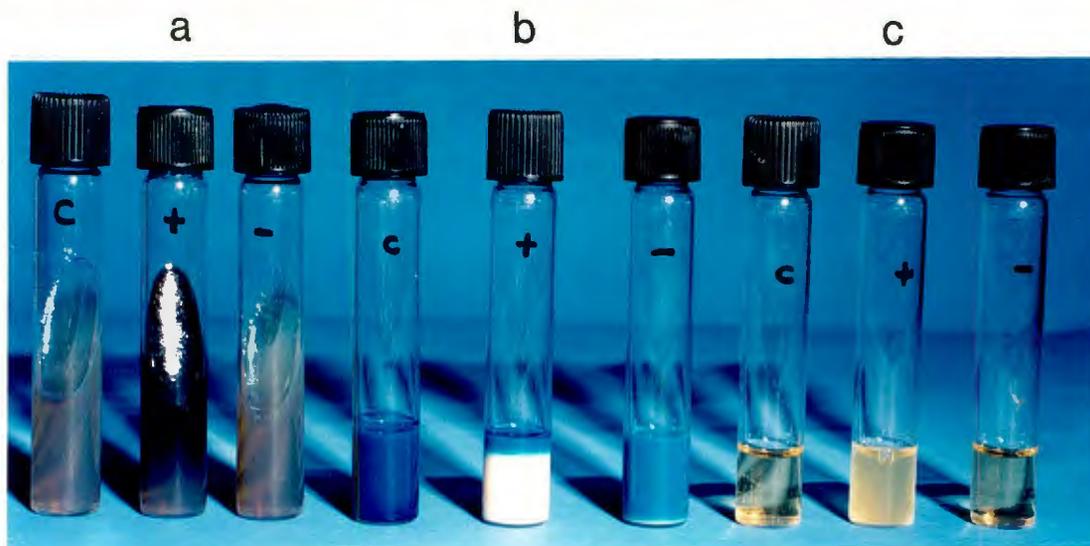
### 1.3. Bilis esculina

La prueba de bilis-esculina está basada en la capacidad de ciertas bacterias, particularmente los Streptococcus del grupo D, de hidrolizar esculina en presencia de bilis al 1% a 4%.

Las bacterias capaces de desarrollar en bilis y también de hidrolizar esculina producen glucosa y aglucona esculetina en un medio edecuada. La esculetina reacciona con una sal de hierro, para formar un complejo marrón oscuro o negro, produciendo un ennegrecimiento difuso del medio bilis esculina, que contiene citrato férrico como fuente de iones férricos (3).



Técnica. El medio bilis esculina se preparó en tubos, en forma de pico de flauta. La reacción es positiva si se observa un ennegrecimiento difuso del pico (Figura 2).



**Figura 2.** Pruebas para identificar a Enterococcus. a, Hidrólisis de la bilis esculina;

b, Reducción de leche-azul de metileno; c, crecimiento en NaCl al 6.5%.

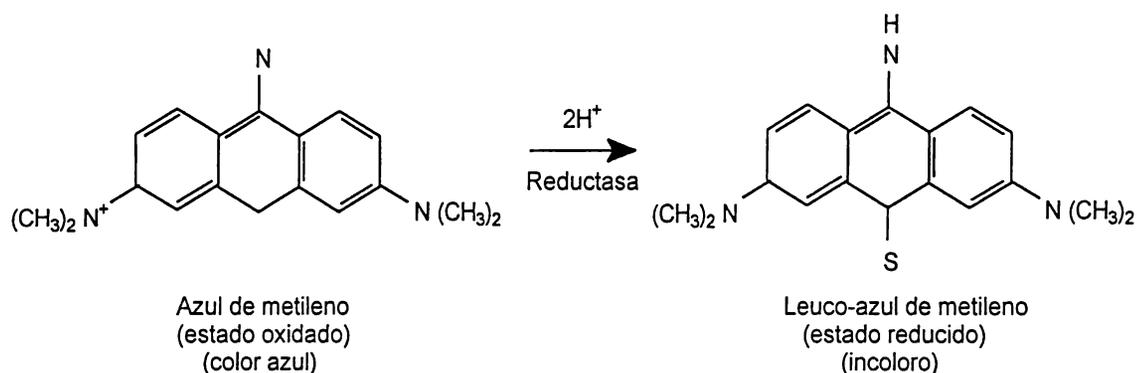
(C), control sin muestra; (+), positivo para Enterococcus; (-), control negativo para *S. viridan*.

#### 1.4. Reducción de la leche con azul de metileno

Esta prueba puede diferenciar organismos por su capacidad enzimática de reducir el azul de metileno en un medio con leche. Esta capacidad enzimática se utiliza fundamentalmente para diferenciar los *Enterococcus* de otros miembros del género *Streptococcus* (29).

El azul de metileno, sal básica es un indicador de la oxidación-reducción que, cuando es incorporado a un medio, indica los cambios en el potencial de oxidación-reducción producidos por un organismo. Algunos organismos, utilizando el oxígeno disuelto en un medio, son capaces de reducir el potencial de oxidación-reducción; la reducción es catalizada por la enzima reductasa, que es una enzima respiratoria vinculada con la oxidación celular (29).

La reducción del medio por producción de una leucobase incolora nos indica una prueba positiva; si no hay cambio de coloración (azul) es negativa (**Figura 2**).



#### 1.5. NaCl al 6.5%

Las especies *Enterocóccicas* se diferencian generalmente de las especies no *Enterocóccicas* por la prueba de tolerancia a NaCl al 6.5%.

Para la prueba se inoculan dos o tres colonias de *Enterococcus* en el caldo y se incuba a 35° C por 24 horas (ver **Figura 2**).

## ***2. Identificación de especie***

Para la identificación de especies se usó un sistema rápido de identificación de Streptococcus (API 20 STREP) y el tipo de hemólisis, ayudados por el programa informático (APILAB) el cual utiliza los resultados del API 20 STREP y la hemólisis para la identificación de las especies de Enterococcus, tomando como criterios el % de reacciones positivas mostradas en la **Tabla 3**.

### ***2.1. Sistema API 20 STREP***

El API 20 STREP se compone de una galería constituida por 20 pruebas bioquímicas que presentan un gran poder discriminante. Dicha galería contiene los substratos deshidratados para poner de manifiesto enzimas o fermentación de azúcares. Las pruebas enzimáticas se inoculan con una suspensión densa (4 de Mc Farland) y la fermentación de los carbohidratos en un medio que incluye el sistema. Posteriormente se incubaron por 4 horas y en algunos casos 24 horas a 35° C. Las reacciones y los resultados de pruebas de éste sistema se muestra en la **Tabla 4 y Figura 3**.

**Tabla 3.** Identificación de especies de *Enterococcus*

ESPECIE	V P	H I P	E S C	P Y R	$\alpha$ G A L	$\beta$ G U R	$\beta$ G A L	P A L	L A P	A D H	R I B	A R A	M A N	S O R	L A C	T R E	I N U	R A F	A M D	G L Y G	$\beta$ H E M
<i>E. casseliflavus</i>	96	34	100	96	83	17	100	0	96	66	100	100	100	16	100	100	70	99	89	3	0
<i>E. durans</i>	100	43	100	97	32	2	80	0	91	100	99	15	2	0	84	81	0	0	56	0	18
<i>E. faecalis</i>	99	46	99	97	0	0	20	4	99	97	98	0	98	92	94	100	0	0	96	2	0
<i>E. faecium</i>	94	43	99	95	42	0	94	2	97	93	85	84	83	14	90	98	20	0	73	3	0
<i>E. gallinarum</i>	100	99	100	100	95	80	100	0	99	100	100	100	100	1	100	100	99	100	83	20	0
<i>E. avium</i>	100	60	100	94	6	0	10	1	99	0	99	40	100	95	95	99	1	40	15	0	1

\* % de las reacciones positivas después de 24 horas a 35-37° C

**Tabla 4.** Reacciones y resultados del sistema API 20 STREP, usado para identificar especies de *Enterococcus* en muestra del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

TESTS	SUBSTRATOS	REACCIONES /ENZIMAS	RESULTADOS			
			Negativo		Positivo	
VP	Piruvato	Producción de acetoina	Incoloro		Rosa-rojo	
HIP	Hipurato	Hidrólisis	Incoloro/azul pálido		Azul fuerte/violeta	
ESC	Esculina	$\beta$ -glucosidasa	4 h Incoloro/ amarillo pálido	24 h Incoloro/ama- rillo pálido Gris claro	4 h Negro Gris	24 h Negro
PYR	Pirrolidonil 2-naftilamida	Pirrolidonilari- lamidasa	Incoloro o Naranja muy pálido		Naranja	
$\alpha$ -GAL	6-Bromo-2-naftil $\alpha$ -D-galactopiranosido	galactosidasa	Incoloro		violeta	
$\beta$ -GUR	Naftol AS-BI $\beta$ -D-Glucoronato	$\beta$ -glucoronidasa	Incoloro		Azul	
$\beta$ -GAL	2-Naftil- $\beta$ -D galactopiranosido	$\beta$ -galactosidasa	Incoloro o Violeta muy pálido		Violeta	
PAL	2-Naftil fosfato	Fosfatasa alcalina	Incoloro o Violeta muy pálido		Violeta	
LAP	L-Leucina-2-naftil amida	Leucina arilamidasa	Incoloro		Naranja	
ADH	Arginina	Arginina dihidrolasa	Amarillo		Rojo	
RIB	Ribosa	Acidificación	4 h Rojo	24 h Naranja/Rojo	4 h Naranja/amarillo	24 h Amarillo
ARA	L-Arabinosa	Acidificación	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
MAN	Manitol	Acidificación	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
SOR	Sorbitol	Acidificación	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
LAC	Lactosa	Acidificación	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
TRE	Trehalosa	Acidificación	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
INU	Inulina	Acidificación	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
RAF	Rafinosa	Acidificación	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
AMD	Almidón	Acidificación	Rojo	Naranja/Rojo	Naranja/amarillo	Amarillo
GLYG	Glucógeno	Acidificación	Rojo/Naranja		Amarillo	

Equipo y reactivos



*Enterococcus faecalis*



*Enterococcus casseliflavus*



*Enterococcus faecium*



*Enterococcus durans*



*Enterococcus avium*

Figura 3. Equipo y reactivos para la identificación de especies de *Enterococcus*

## 2.2. Hemólisis

Para la identificación de la hemólisis, las cepas aisladas de *Enterococcus* se sembraron en un medio de agar sangre de carnero y se incubaron a 35° C por 24 horas, si se observó una zona clara en el medio es  $\beta$ -hemolítico y si se observó una zona de hemólisis parcial (color verdosa) es un  $\alpha$ -hemolítico y si no se observó hemólisis es un  $\gamma$ -hemolítico (Figura 4).

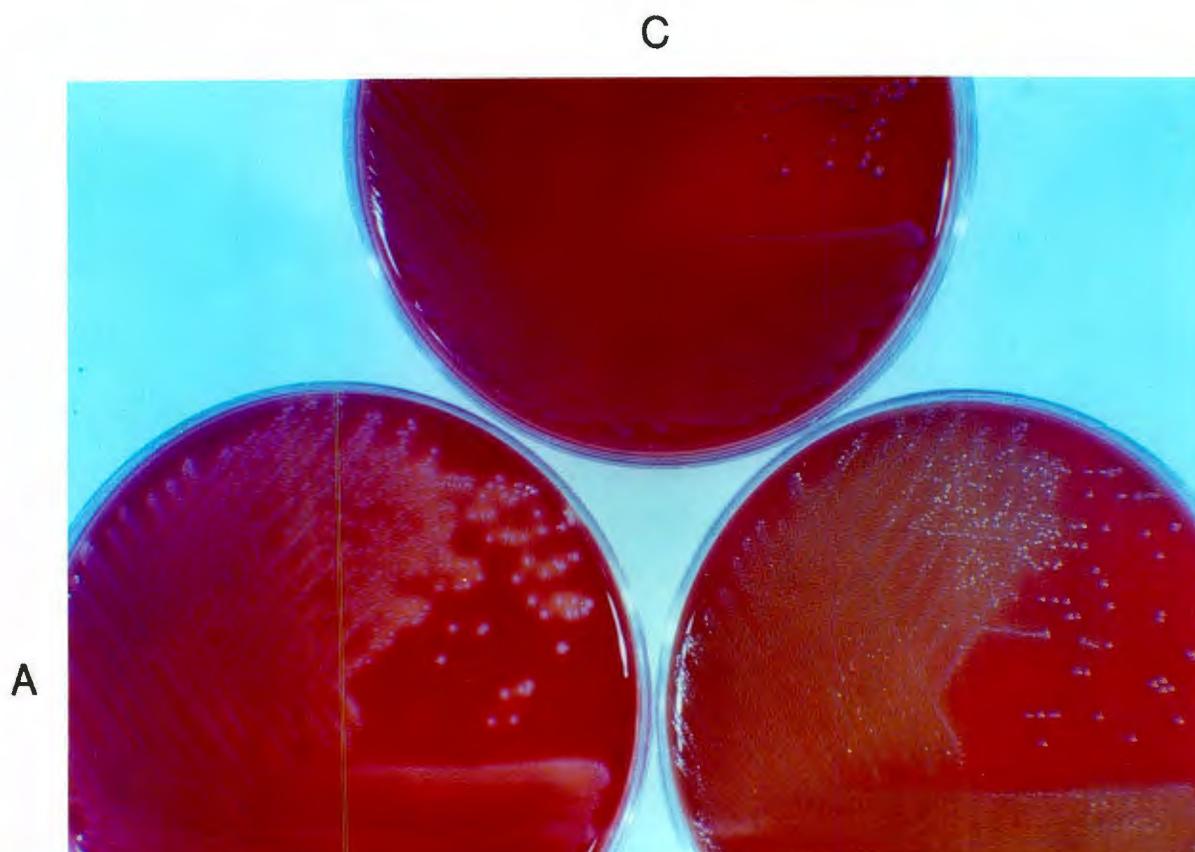


FIGURA 4. Placas de gelosa sangre para identificar las diferentes hemólisis.

A, hemólisis  $\beta$ ; B, hemólisis  $\alpha$ ; C, sin hemólisis.

## 3. Sensibilidad antimicrobiana

### 3.1. Método de Bauer-Kirby

Se realizó la sensibilidad a *Enterococcus* por el método de Bauer-Kirby a 5 antibióticos (Vancomicina, Ampicilina, Ciprofloxacina, Tetraciclina y Nitrofurantoína) a los *Enterococcus* obtenidos de urocultivos y a 2 antibióticos (Vancomicina y Ampicilina) a *Enterococcus* aisladas de las demás muestras.

Para realizar esta prueba se usaron placas de agar de Mueller-Hinton con un espesor uniforme de 4 mm. Las placas de agar se inocularon con una suspensión de 0.5 de la escala de McFarland que equivale a una concentración de aproximadamente  $10^8$  organismos/ml. Después de aproximadamente 10 min. se colocaron los discos con antibiótico sobre la superficie del agar.

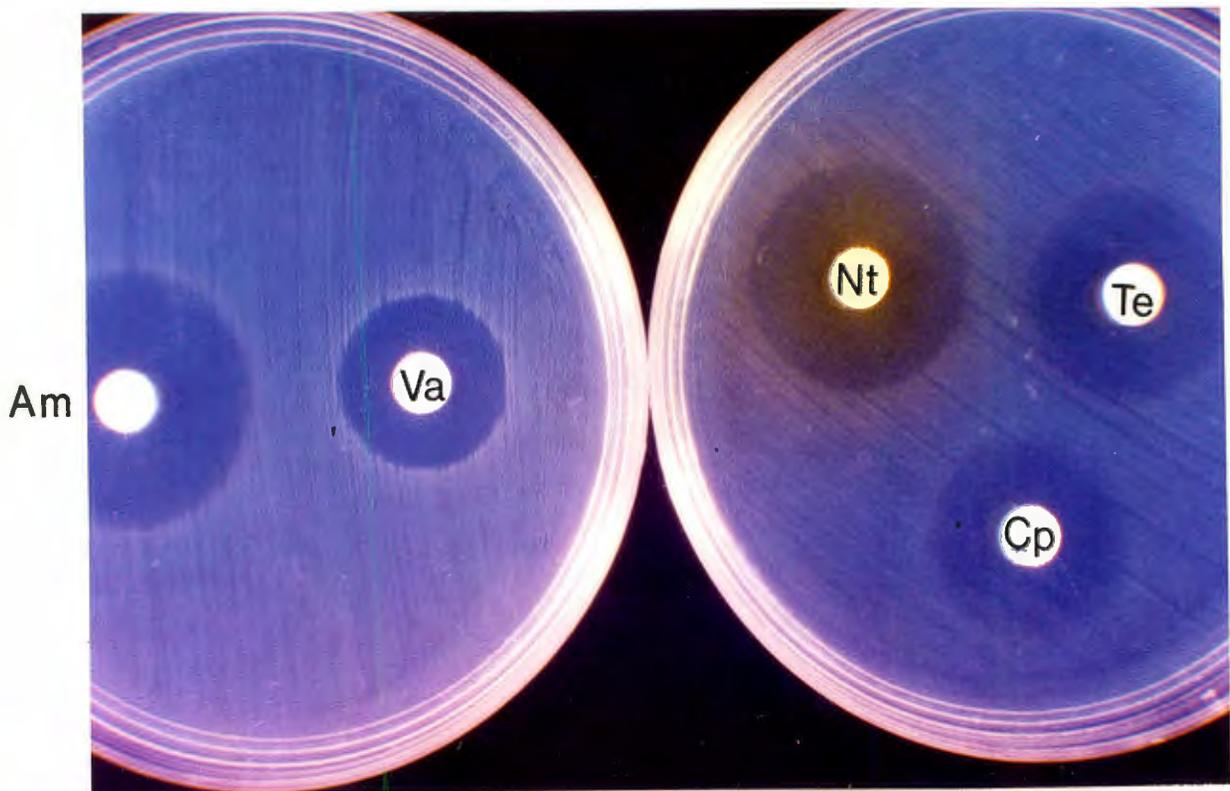
Las concentraciones de los discos empleados son las siguientes:

Vancomicina	30 µg.
Ampicilina	10 µg.
Ciprofloxacina	5 µg.
Tetraciclina	30 µg.
Nitrofurantoína	300 µg.

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se incuban a 35° C por 18 horas. Después de éste tiempo de incubación, aparecen las zonas de inhibición alrededor de los discos que contienen antibióticos a los cuales *Enterococcus* es susceptible. Los diámetros de estas zonas se miden cuidadosamente por la parte posterior de la placa en milímetros. La **Tabla 5** muestra los valores de sensibilidad según el NCCLS y la **Figura 5** muestra las zonas clara de inhibición. Como en algunos aislamientos el diámetro del halo de inhibición llegaba al límite para considerarlo como de resistencia intermedia se determinó el MIC.

**Tabla 5.** Valores obtenidos para definir sensibilidad o resistencia a antibióticos según el NCCLS para el método de Bauer-Kirby.

Antibiótico	Resistente (mm.)	Intermedio (mm.)	Sensible (mm.)
Vancomicina	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Ampicilina	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Ciprofloxacina	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Tetraciclina	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Nitrofurantoína	≤ 14	15 - 16	≥ 17



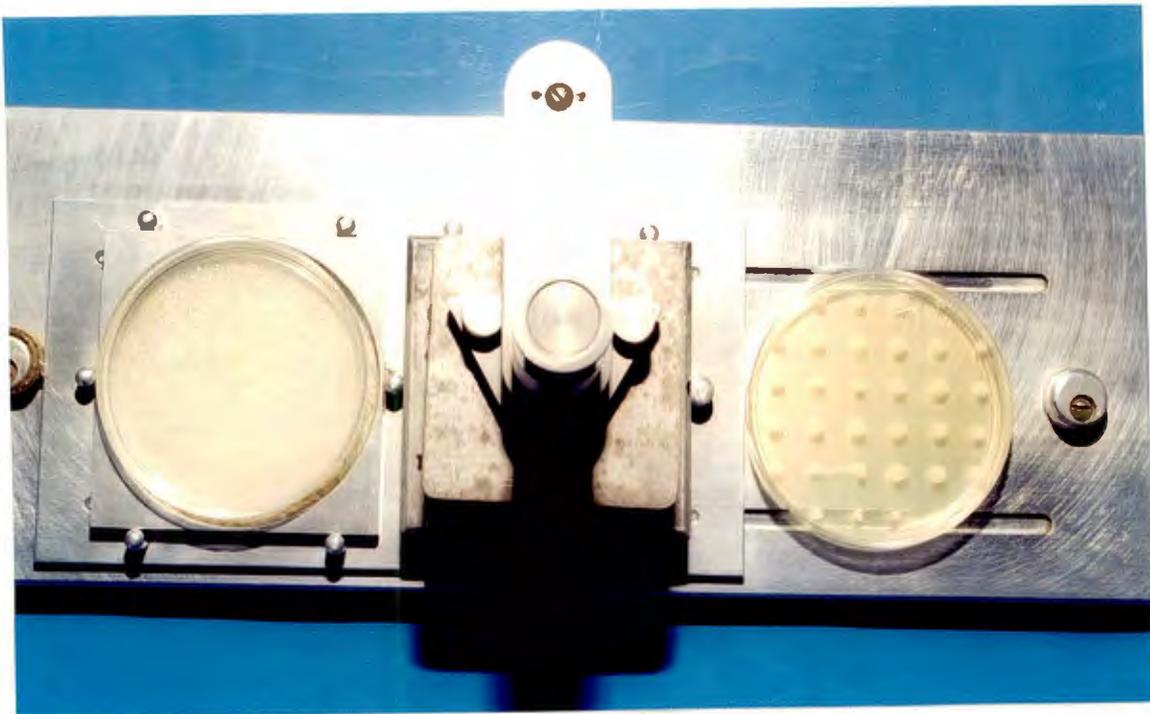
**Figura 5.** Placas de agar Miuler-Hinton utilizadas para identificar la sensibilidad a antibióticos. Am, ampicilina; Va, vancomicina; Nt, nitrofurantoina; Cp, ciprofloxacina; Te, tetraciclina.

### **3.2. Método de dilución en agar**

El método de dilución en agar se ha utilizado para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y ha sido el método estándar de referencia para comparar las pruebas de difusión. En éste método se usó un sistema replicador (replicador de Steers) para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad a los antibióticos por dilución en agar.

La característica principal de este instrumento es una cabeza de resorte provista de 32 púas de inoculación, con superficie plana, cada una de aproximadamente 3 mm. de

diámetro. La cabeza está adosada a un mecanismo de pistón y cilindro mediante el cual se puede desplazar hacia arriba y abajo en un plano vertical. La contraparte es una placa de siembra de aluminio que contiene 32 concavidades. Cada concavidad de la placa constituye un receptáculo dentro del cual se colocan diferentes suspensiones de bacterias. Las púas se introducen en cada una de las concavidades, tomando muestras de aproximadamente 0.001 ml (aproximadamente  $1 \times 10^4$  UFC) de cada suspensión bacteriana de las placas de agar con antibiótico (Vancomicina). Se hace descender la cabeza de modo que la superficie plana de cada púa de inóculo toque sólo la superficie del agar. La cabeza se eleva nuevamente y se retira la placa de agar inoculado, que se reemplaza por la placa de aluminio (Figura 6). Este procedimiento se repite para todas las placas que tienen diferentes concentraciones de vancomicina (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 y 32.0  $\mu\text{m}/\text{ml}$ ). Una vez inoculadas todas las placas, se incuban a  $35^\circ \text{C}$  durante 18 horas.



**Figura 6.** Equipo (replicador de Steers) utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria de las especies de *Enterococcus*.

Los *Enterococcus* que son sensibles a la concentración de antibiótico contenida en una placa de agar determinada, no producen un botón de desarrollo en el sitio de inoculación, mientras que los que son resistentes aparecen como colonias circulares (Figura 7).

La MIC se considera como la concentración de antibiótico contenida en la primera placa de la serie que inhibe el desarrollo visible.

En esta técnica se usó una cepa testigo (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212).

Las cepas se consideraron resistentes cuando crecieron a las concentraciones referido por el NCCLS de la siguiente forma:

- $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  = sensible
- 8-16  $\mu\text{g/ml}$  = intermedio
- $\geq 32 \mu\text{g/ml}$  = resistente

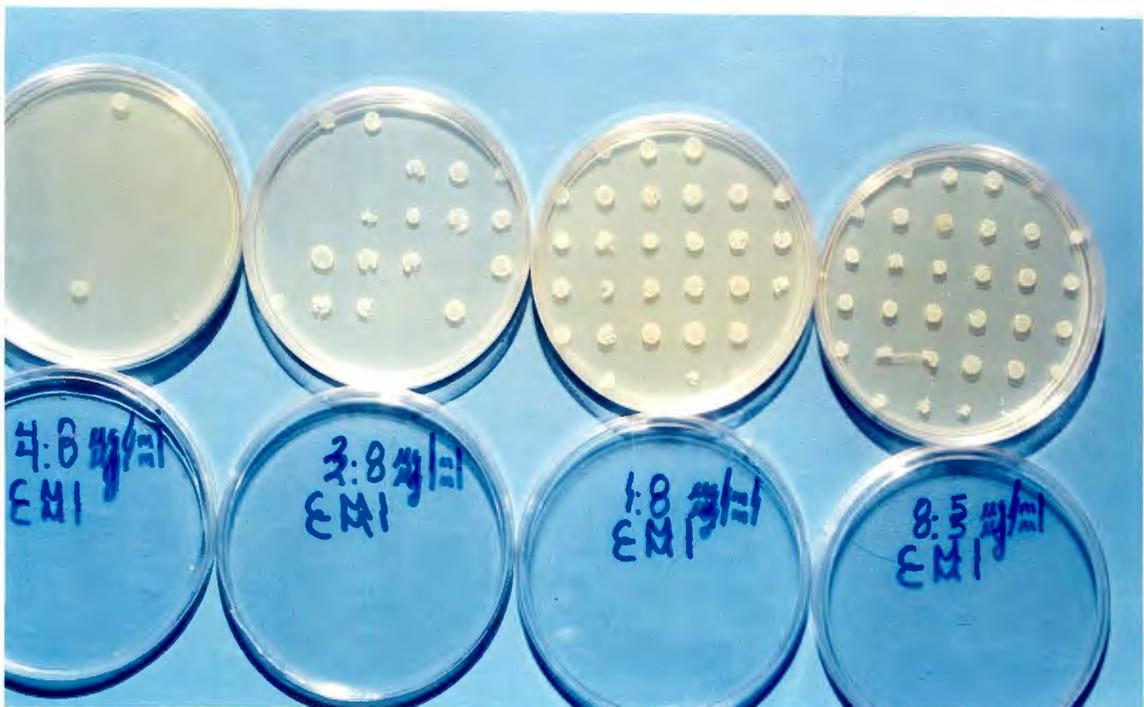


Figura 7. Determinación de la concentración mínima inhibitoria en placas de agar Miuler-Hinton.

### 3.3. Técnica de tamíz (“Screen”)

Para esta técnica se usan placas de agar infusión cerebro-corazón (BHI) suplementado con 6  $\mu\text{g/ml}$  de Vancomicina. Se preparó una suspensión de cada cepa de *Enterococcus* al 0.5 de Mc Farland en solución salina estéril y se inoculó 10  $\mu\text{L}$  (aproximadamente  $10^6$  UFC/ml) de la suspensión con una pipeta calibrada a la placa de agar BHI. Todas las placas inoculadas se incubaron a 35° C por 24 horas. El crecimiento de más de una colonia indica resistencia a Vancomicina y cuando no hay crecimiento indica susceptibilidad (Figura 8).



Figura 8. Placas de gelosa BHI para la técnica de tamíz.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Especies identificadas

De diciembre de 1997 a julio de 1998, seleccionamos 49 cepas del género *Enterococcus* procedentes de: urocultivos (15), puntas de catéter (11), hemocultivos (7), líquido peritoneal (3), LCR (2) y secreciones (11) (ocular, uretral, broncoaspirado, fístula biliar y absceso hepático) de pacientes del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". Estas cepas se identificaron previamente mediante las pruebas de género definidas en material y métodos.

Las especies identificadas en las 49 cepas se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Frecuencia de las especies de enterococcus encontradas en pacientes pediátricos.

Especie	No. de cepas	% de cepas totales
<i>E. faecalis</i>	29	59.2
<i>E. faecium</i>	11	22.4
<i>E. durans</i>	7	14.3
<i>E. avium</i>	1	2.0
<i>E. casseliflavus</i>	1	2.0
TOTAL	49	100

Como se puede observar en esta tabla, la mayor frecuencia fue para *E. faecalis* (59.2%) seguido de *E. faecium* (22.4) y en menor proporción las demás especies, resultado que concuerda con la mayoría de los reportes que consideran a *E. faecalis* y *E. faecium* como las especies aisladas con mayor frecuencia (85-90% y 5-10% respectivamente). La seguridad de identificación fue alto para todas las especies excepto para *E. durans*, que presentó un 60% de identificación.

## 2. Distribución de especies según el origen de la muestra

La mayor frecuencia de aislamiento de *Enterococcus* la presentó urocultivos (30.6%), seguido de puntas de catéter (22.4%) y de hemocultivos con un 14.3% (Tabla 7). Se estudiaron puntas de catéter dado que se ha descrito como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades sistémicas (7,6). Interesantemente la frecuencia de *Enterococcus* fue mayor en muestras de puntas de catéter que hemocultivos, lo que concuerda con la sugerencia de que la contaminación de puntas de catéter como lo indican algunos autores (26) es una consecuencia de bacteriemia.

Se ha reportado que de las infecciones causadas por el género *Enterococcus* se encuentran en primer lugar las infecciones del tracto urinario, seguido de las infecciones en cirugía abdominal y en tercer lugar las bacteriemias (26).

**Tabla 7.** Distribución de especies de *Enterococcus* según el origen de la muestra

Origen (muestra)	NÚMERO DE AISLAMIENTOS					% de cepas totales
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	
Urocultivos	11	2	1	-	1	30.6
P. de catéter	4	5	2	-	-	22.4
Hemocultivos	4	-	2	1	-	14.3
Liq. Peritoneal	-	3	-	-	-	6.1
LCR	2	-	-	-	-	4.1
Secreciones	8	1	2	-	-	22.4

### 3. Resistencia a antibióticos

Uno de los factores importantes en el estudio del género *Enterococcus* es evaluar su resistencia a antibióticos, por lo cual evaluamos la sensibilidad de todas las cepas a vancomicina y ampicilina y en el caso de las cepas aisladas de urocultivos se les determinó además, su sensibilidad a ciprofloxacina, tetraciclina y nitrofurantoína, todas determinadas por el método de Bauer-Kirby, cuyos resultados se encuentran en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Especies resistentes determinados por el método de Bauer-Kirby.

Antibiótico	NÚMERO DE AISLAMIENTOS				
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>
Vancomicina	-	-	-	-	-
Ampicilina	-	6	3	-	-
Ciprofloxacina	1	2	-	-	-
Tetraciclina	9	2	-	-	1
Nitrofurantoína	-	-	-	-	-

\* Se utilizó la cepa control ATCC 29212 (*E. faecalis*) como control positivo dando sensible a los 5 antibióticos.

Como se esperaba la sensibilidad a ampicilina fue sólo del 14%. La mayor parte de las cepas fueron sensibles a vancomicina por el método de Bauer-Kirby, aunque algunas de ellas en los límites de resistencia, por lo que se determinó su susceptibilidad mediante la prueba de Screen y dilución en agar (MIC). Los resultados de las MIC a Vancomicina se presentan en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las especies de *Enterococcus*.

Especie	CONCENTRACIÓN DE VANCOMICINA						
	0.5 (µg/ml)	1 (µg/ml)	2 (µg/ml)	4 (µg/ml)	8 (µg/ml)	16 (µg/ml)	32 (µg/ml)
<i>E. faecalis</i>	-	-	9	20	-	-	-
<i>E. faecium</i>	-	1	8	1	1	-	-
<i>E. durans</i>	-	2	3	-	2	-	-
<i>E. avium</i>	-	-	1	-	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	-	-	-	1	-	-	-

En estos resultados podemos observar que 1 cepa de *E. faecium* y 2 de *E. durans* presentaron resistencia intermedia a vancomicina (8 µg/ml), Estas mismas cepas presentaron resistencia a 6 µg/ml de vancomicina obtenidas por la técnica de Screen.

Cuando se analizó por especies la resistencia global, esta fue igual para las especies de *E. faecalis* y *E. faecium*. Por otro lado *E. faecium* presentó una elevada resistencia a ampicilina, en cambio *E. faecalis* a tetraciclina.

Varios trabajos han puntualizado que la elección del tratamiento debe ser adecuado debido a que *Enterococcus* ha mostrado capacidad para desarrollar resistencia, por lo que reportes de resistencia de *Enterococcus* ha aumentado en los últimos años (27).

Es muy importante tener conocimiento de los patrones de sensibilidad antimicrobiana en todos los Hospitales, ya que nos permitirá tener una idea sobre la resistencia in vitro y poder decidir el tratamiento más adecuado.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten concluir que:

1. Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron *E. faecalis* (59.2%) siguiendo en orden de frecuencia: *E. faecium* (22.4%), *E. durans* (14.3%), *E. avium* (2%) y *E. casseliflavus*(2%).

En cuanto a la fuente de origen la mayor frecuencia de aislamiento fue en urocultivos (30.6%), seguido de secreciones (22.4%) y puntas de catéter (22.4%); este último ha sido descrito recientemente como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades sistémicas.

Por lo anterior podemos concluir que nuestros resultados concuerdan bastante bien con reportes anteriores en cuanto a la fuente de origen y especies de *Enterococcus*.

2. Nuestros resultados comprueban la importancia que han adquirido el género *Enterococcus* en la patología hospitalaria; si bien es verdad que se encuentran con mayor frecuencia de infecciones de vías urinarias (30.6% de nuestras cepas) su presencia en sangre y aún en LCR está aumentando.

3. Las cepas aisladas no presentaron resistencia a vancomicina de acuerdo al método de Bauer-Kirby, sin embargo, se encontraron 2 cepas de *E. durans* y 1 de *E. faecium* que de acuerdo con la interpretación de la NCCLS se consideran no susceptibles a vancomicina con la prueba de "Screen" y dilución en agar. Aunque no podríamos catalogar algunas de nuestras cepas resistentes a vancomicina, nuestros hallazgos sugieren la presencia futura de cepas resistentes como sucede en otros países, por lo cual es necesaria una vigilancia constante de la sensibilidad a vancomicina de cepas de *Enterococcus* aislados en nuestro Hospital. Por lo que es importante resaltar que el método usualmente utilizado (Bauer-Kirby) no permite

detectar cepas con resistencia intermedia o baja, y sugerir la utilización de otro método como el "screen" o dilución en agar.

4. Las cepas aisladas de urocultivos (*E. Faecalis* y *E. faecium*) muestran elevada resistencia a tetraciclina (80%), antibiótico que frecuentemente se usa para infecciones de vías urinarias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Emori, T.G. & R.P. Gaynes. 1993. An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* 6(4): 428-442.
2. Joklik, W.K., H.P. Willett, D.B. Amos & C.M. Wilfert. © 1996. Streptococcus, p. 576-595. IN: W.K. Joklik, H.P. Willett, D.B. Amos & C.M. Wilfert. Zinsser Microbiología, 20a ed. Editorial Médica Panamericana, México.
3. Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell & H.M. Somers. © 1989. Diagnóstico Microbiológico; Texto y Atlas color. p. 453-480. Editorial Médica Panamericana, México.
4. Finegold, S.M. & E.J. Baron. © 1989. Estreptococos, con inclusión de Enterococos, Neumococos y Aerococos, p. 348-366. IN: S.M. Finegold & E.J. Baron. Bailey Scott Diagnóstico Microbiológico. 7a ed. Editorial Médica Panamericana, México.
5. Facklam, R.R. & L.M. Texeira. 1998. Enterococcus, p. 669-682.. IN: L. Collier, A. Balows & M. Sussman, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th. Ed. Press Edward Ortiold, London Unite of Kingdom.
6. Schleifer, K.H. & R. Kilpper-Balz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus Enterococcus nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 31-34.
7. Teixeira, L.M., M.D.G.S. Carvalho, V.L.C. Merquior, A.G. Steigerwalt, M.D.G.M. Teixeira, D.J. Brenner & R.R. Facklam. 1997. Recent approaches on the taxonomy of the Enterococci and some related microorganisms. *Adv. Exp. Med. Biol.* 418:397-400.

8. Hardie, J.M. © 1986. Genus *Streptococcus*, p. 1043-1065, IN: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, V. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
9. Moellering Jr., R.I. 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **14**:1173-1178.
10. Jett, B.D., M.M. Huycke & M.S. Gilmore. 1994. Virulence of *Enterococci*. *Clin. Microbiol. Rev.* **7**(4):462-478.
11. Baddour, L.M., G.D. Christence, J.H. Lowrance & W.A. Simpson. 1989. Pathogenesis of experimental endocarditis. *Rev. Infect. Dis.* **11**:452-463.
12. Crawford, I. & C. Russell. 1986. Comparative adhesion of seven species of streptococci isolated from the blood of patients with sub-acute bacterial endocarditis to fibrin-platelet clots *in vitro*. *J. Appl. Bacteriol.* **60**:127-133.
13. Murray, B.E. 1990. The Life and Times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**(1):46-65.
14. Onderdonk, A.B., J.G. Bartlett, T.J. Louie, N. Sullivan-Seigler & S.L. Gorbach. 1976. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. *Infect. Dis.* **13**:22-26.
15. Brook, I. 1988. Effect of *Streptococcus faecalis* on the growth of bacteroides species and anaerobic cocci in mixed infection. *Surgery.* **103**:107-110.
16. Martens, M.G., S. Faro & G. Riddle. 1993. Female genital tract abscess formation in the rat: use of pathogens including enterococci. *J. Reprod. Med.* **38**:719-724.
17. Matlow, A.G., J.M.A. Bohnen, C. Nohr, N. Christou & J. Meakins. 1989. Pathogenicity of enterococci in a rat model of fecal peritonitis. *J. Infect. Dis.* **160**:142-145.
18. McDonald, L.C. & W.R. Jarvis. 1997. The global impact of vancomycin-resistant enterococci. *Curr. Op. Infect. Dis.* **10**:304-309.

19. Korten, V. & B.E. Murray. 1993. The nosocomial transmission of enterococci. *Curr. Op. Infect. Dis.* 6:498-505.
20. Goldmann, D.A. 1992. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: Headline News. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 13:695-699.
21. Leclercq, R. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin. Infect. Dis.* 24(suppl 1):S80-S84.
22. Leclercq, R. 1997. Antibiotic resistance in Streptococci and Enterococci. *Adv. Exp. Med. Biol.* 418:419-427.
23. Leclercq, R. 1996. Epidemiology and control of multiresistant Enterococci. *Drugs.* 52(Suppl.2):47-49.
24. Fontana, R., G. Amalfitano, L. Rossi & G. Satta. 1992. Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by  $\beta$ -Lactam antibiotics in Enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 15:486-489.
25. Leclercq, R. & P. Courvalin. 1997. Resistance to glycopeptides in Enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 24:545-56.
26. Michel, M. & L. Gutmann. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. *Lancet.* 349:1901-1906.
27. Mouthon, L. & Jean-Luc Mainardi. 1996. Vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the Gram-positive challenges. *Curr. Op. Infect. Dis.* 9:256-260.
28. Arthur, M., P. Reynolds & P. Courvalin. 1996. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiol.* 4(10):401-407.
29. Mc Faddin, J.F. © 1984. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica, p. 121-125. Editorial Médica Panamericana, México.