

LABORATORIO CLINICO

## *Puesta al día en enterococos - año 2001: Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana*

ELIZABETH PALAVECINO R.<sup>1</sup>

### UPDATE ON MICROBIOLOGICAL TOPICS OF ENTEROCOCCI - YEAR 2001: IDENTIFICATION OF SPECIES AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TECHNIQS

*In recent years, enterococci have emerged as important pathogens. These organisms are now the third most commonly encountered nosocomial bloodstream infection pathogens in many part of the world. Due to increasing frequency with which multi-drug resistant enterococci are isolated from clinical specimens, there is a need for rapid reporting of results of identification tests and tests for susceptibility testing to antimicrobial agents. In 1999, we published an update of regarding the identification of the different species of enterococci as well as the recommendations for accurately detecting resistance among these isolates. In the current report, we will discuss additional tests for identification of enterococcal species as well as, the current recommendations for susceptibility testing.*

**Key words:** *Enterococci; Species identification; In vitro susceptibility.*

Como discutiéramos en nuestra revisión anterior<sup>1</sup>, los enterococos son organismos que forman parte de la flora normal del intestino en humanos y debido a la capacidad que tienen de sobrevivir en todo tipo de ambientes, pueden ser aislados a partir de una gran variedad de muestras clínicas. Es importante evaluar la trascendencia clínica del aislamiento de una cepa de enterococo en una determinada muestra clínica, antes de realizar pruebas de identificación de especie o de realizar estudios de susceptibilidad que pueden ser costosos y difíciles de llevar a cabo en la diaria rutina del laborato-

rio de microbiología clínica. En esta revisión se entregan consejos prácticos relativos a la identificación de las diferentes especies de enterococos, comentando algunas de las nuevas recomendaciones de las normativas de NCCLS sobre el estudio de susceptibilidad de estos organismos. En esta ocasión, al igual que en la anterior, el objetivo es dar a conocer los estándares requeridos para realizar un determinado test y sugerir qué agentes antimicrobianos debieran ser probados, pero se advierte que cada laboratorio en particular debe decidir, de acuerdo a la población de pacientes que sirve,

---

<sup>1</sup> Department of Pathology. University Hospitals of Cleveland. Case Western Reserve University. Cleveland, Ohio, USA.

cuán extensivo debe ser el estudio relacionado con este patógeno en particular.

Los enterococos causan una gran variedad de infecciones y son patógenos importantes en infecciones urinarias, especialmente en aquellas adquiridas en forma nosocomial, infecciones de heridas intraabdominales, bacteremias y endocarditis. Estas infecciones son más comunes en pacientes seniles quienes tienen otras condiciones mórbidas, así como también en pacientes que han estado hospitalizados o que han recibido terapia antibiótica por largo tiempo. De hecho, el aumento de las infecciones producidas por estos organismos pareciera relacionarse con un aumento en el uso de cefalosporinas contra las cuales los enterococos son resistentes<sup>2</sup>.

#### **Identificación del género *Enterococcus*.**

Los enterococos son cocáceas Gram positivas, catalasa negativa, capaces de crecer en NaCl 6,5% y en el medio de bilis-esculina, y tienen el antígeno del grupo D. Además dan una reacción positiva para el PYR (*pirronidonil arilamidase*) y el LAP (*leucine aminopeptidase*). Estos dos últimos tests se encuentran disponibles comercialmente en forma de discos que contienen el sustrato. Son tests rápidos, el resultado es obtenido en minutos. Un resultado es positivo si el organismo contiene la enzima capaz de hidrolizar el sustrato dando una coloración roja en el lugar de inoculación.

Como se analizara más en detalle en nuestra revisión anterior<sup>1</sup>, es importante notar que existen otros géneros de bacterias Gram positivas y catalasa negativa, que ocasionalmente pueden ser aislados de infecciones en humanos y que pueden ser confundidos con enterococos porque pueden crecer en NaCl 6,5% y en bilis-esculina y tienen además una morfología muy similar a los enterococos. Entre éstos están los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Aerococcus*. La mayoría de los pediococos y casi la mitad de los leuconostoc tienen antígeno del grupo D y pueden dar una reacción de aglutinación positiva. Para mayor detalle en cómo diferenciar entre estos diferentes géneros, consulte la Tabla 1 de nuestra revisión anterior<sup>1</sup>.

**Identificación de especies del género *Enterococcus*.** Aunque existen cerca de 17

diferentes especies de enterococos, solamente dos especies son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos: *E. faecalis* y *E. faecium*. Hasta hace un par de años, *E. faecalis* era la única especie de enterococos que se aislaba de muestras clínicas (y esto sigue siendo la regla en muchos hospitales). Más recientemente, los laboratorios han comenzado a aislar cepas de *E. faecium*, especialmente en muestras de pacientes hospitalizados, cepas que pueden ser resistentes a vancomicina. En establecimientos de atención terciaria se sugiere mantener una vigilancia del aislamiento de *E. faecium* porque un aumento en el aislamiento de esta especie precede habitualmente la aparición de enterococos resistentes a vancomicina (*vancomycin resistant enterococci* - VRE) en un determinado hospital. En E.U.A., más de 95% de los VRE son *E. faecium* y sólo entre 3 y 5% son *E. faecalis*<sup>2</sup>. Estos organismos poseen resistencia de alto nivel a vancomicina, resistencia que puede ser transferida a otras cepas (genes *van A* y *van B*). En contraste, existen otras especies de enterococos que son intrínsecamente resistentes a vancomicina (genes *van C*) pero que no han sido implicadas en brotes, pueden considerarse de poca importancia para el control de infecciones intrahospitalarias. Dentro de ese contexto, la identificación de especies es indudablemente de gran importancia cuando se trata de una cepa VRE. Si un hospital no tiene todavía problemas con los VREs, la identificación de las diferentes especies de enterococo queda a criterio del laboratorio de microbiología en conjunto con el comité médico correspondiente.

Los sistemas automatizados de diagnóstico son capaces, en general, de identificar la mayoría de las especies de enterococos, constituyendo una buena alternativa para aquellos laboratorios con un alto volumen de muestras y que pueden absorber el costo. Sin embargo, también existen métodos convencionales que, en opinión del autor, son bastante buenos para diferenciar *E. faecalis* de *E. faecium* a bajo costo y que pueden ser adaptados fácilmente al flujo de trabajo del laboratorio. La mayoría de los laboratorios sólo necesitan diferenciar estas las especies de *E. faecalis* y *E. faecium* ya

**Tabla 1. Características fenotípicas usadas para la identificación de especies en enterococos con importancia clínica**

Especie	LM	ARA	MGP	EFRO
<i>E. faecalis</i>	+	-	-	R
<i>E. faecium</i>	-	+	-	S
<i>E. casseliflavus</i>	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	+	R
<i>E. gallinarum</i>	+	+ <sup>1</sup>	+	R

1: algunas cepas (< 10%) pueden dar una reacción negativa.

LM: *Litmus milk*; ARA: arabinosa; MGP: Metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido; EFRO: efrotomicina.

que la diferenciación de estas dos especies con las otras es relevante solamente cuando se trata de una cepa resistente a vancomicina.

La diferenciación entre *E. faecalis* y *E. faecium* se puede hacer básicamente con la ayuda de los siguientes tests: acidificación de la arabinosa, y el test de *litmus milk* (LM). El reactivo para el LM puede ser obtenido de BBL u otro fabricante y preparado de acuerdo a las instrucciones. El reactivo para el test de la arabinosa se prepara usando l-arabinosa al 1% disuelta en caldo de infusión cerebro/corazón (*brain heart infusion* - BHI) y con el indicador púrpura de bromocresol al 0,006%. Los reactivos se pueden autoclavar por 10 minutos a 121° C. Para realizar el test se pone aproximadamente 0,5 ml (o unas 6 gotas) en un tubo transparente y se agregan unas 4 o 5 colonias frescas del organismo en estudio. Los tubos se incuban durante 4 horas a 42° C. Un cambio de color de púrpura a amarillo es considerado una reacción positiva para la arabinosa y un cambio de coloración de rosado a blanco es positivo para el LM. *E. faecalis* es LM positivo y arabinosa negativo, *E. faecium* es LM negativo y arabinosa positivo<sup>3</sup>. (Tabla 1). Ocasionalmente otras especies de enterococos pueden ser aisladas de muestras clínicas, pero en general, no es necesario tratar de identificarlas, a menos que sean resistentes a vancomicina.

Ahora bien, si se aísla una cepa de enterococo resistente a vancomicina, debe hacerse la diferenciación de aquellos VREs de importancia clínica con aquellos intrínsecamente resistentes como son *Enterococcus gallinarum* y

*Enterococcus casseliflavus*. Aunque el estudio de la motilidad y de la producción de pigmento es importante para diferenciar estos dos grupos de organismos, estos tests no siempre dan los resultados esperados y son, en algunos casos, bastante subjetivos. El test que pareciera ser más específico es la acidificación de metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (MGP). El reactivo se prepara usando caldo de BHI con MGP al 1% y 0,06% de púrpura de bromocresol. En la mayoría de los casos, este test necesita incubación a 35° C durante 18 horas, aunque una incubación más prolongada puede ser necesaria en aquellos casos de resultados dudosos. El desarrollo de un color amarillo demuestra una reacción positiva<sup>4</sup>.

Como describiéramos en nuestra revisión anterior, el test de la susceptibilidad a la efrotomicina (disco de 100  $\mu$ g) ha sido recomendado para diferenciar entre las especies de enterococos. En este caso, la cepa en estudio es inoculada en una placa de agar sangre usando la técnica de cuadrantes y el disco se coloca en el primer cuadrante donde el crecimiento es más denso. La placa se incuba a 35° C durante 18 a 24 horas. Si después de la incubación por 18 horas se observa un área de inhibición alrededor del disco, independiente de su tamaño, el organismo es clasificado como susceptible a la efrotomicina<sup>4</sup>. Hasta el momento, este disco no se encuentra disponible comercialmente y aunque los discos se pueden preparar, este es un test que se utiliza fundamentalmente en investigación (Tabla 1).

**Estudio de susceptibilidad para enterococos.** Esta revisión incluye las sugerencias

de NCCLS los métodos a usar están bien estandarizados, pero la profundidad del estudio, el número de antimicrobianos y qué cepas van a ser sometidas a estudio es una decisión que cada hospital en particular debe asumir dependiendo de la población de pacientes a los cuales atiende.

Las recomendaciones que discutiéramos en nuestro anterior artículo se encuentran todavía vigentes y pueden ser usadas como tales<sup>1-5</sup>. En esta revisión comentaremos sólo sugerencias adicionales al método de difusión por disco y, debido al aumento de laboratorios clínicos que están usando la determinación de CIM, hemos decidido agregar además sugerencias para realizar esta CIM, así como también los puntos de corte para nuevos antibióticos.

Es importante tener en cuenta que los enterococos son intrínsecamente resistentes a varios grupos de agentes antimicrobianos los que, por lo tanto, no deben ser probados o informados porque pueden aparecer susceptibles *in vitro* siendo clínicamente resistentes. (Tabla 2).

Las condiciones requeridas para los diferentes métodos se encuentran delineadas en la Tabla 3. Los antimicrobianos a estudiar ya fueron discutidos en la revisión anterior.

En enterococos aislados de orina, sólo es necesario estudiar la susceptibilidad a ampicilina ya que la mayoría de las infecciones urinarias causadas por este organismo responden a la terapia con ampicilina<sup>5</sup>. Han sido descritos enterococos resistentes a ampicilina, lo que puede ser debido a modificaciones en las PBP's o la producción de  $\beta$ -lactamasas. Durante los años 1997 y 1998 estudiamos en la Universidad Ca-

tólica de Chile la producción de  $\beta$ -lactamasas en todas las cepas de enterococos aisladas de muestras clínicas. Aunque aislamos algunas cepas resistentes a ampicilina, ninguna de ellas producía  $\beta$ -lactamasa. Aunque el método de difusión por disco no detecta la resistencia a ampicilina en cepas que producen  $\beta$ -lactamasa, la presencia de estas cepas no parece ser un problema en la mayoría de los hospitales chilenos y, por lo tanto, hasta este momento el uso de difusión por disco es todavía una buena alternativa para el estudio de susceptibilidad a ampicilina.

El estudio de susceptibilidad para enterococos aislados de orina puede incluir también varias quinolonas: ciprofloxacina, levofloxacina y gatifloxacina, aunque las tasas de resistencia pueden ser altas en algunos hospitales. Los puntos de corte para ciprofloxacina y levofloxacina fueron descritos previamente. Los nuevos puntos de corte para el estudio por difusión usando un disco de 5  $\mu$ g de gatifloxacina son los siguientes: *susceptible*  $\geq$  a 18 mm, *intermedio* de 15 a 16 mm y *resistente*  $\leq$  14 mm de diámetro. Los puntos de corte para CIM son: *susceptible*  $\leq$  2  $\mu$ g/ml, *intermedio* 4  $\mu$ g/ml y *resistente*  $\geq$  8  $\mu$ g/ml. Estos puntos de corte para gatifloxacina son sólo aplicables a enterococos aislados de orina<sup>5</sup>.

Los enterococos aislados de sitios estériles deben ser evaluados en su susceptibilidad a ampicilina o a penicilina, a vancomicina y a aminoglucósidos (alta concentración). Como lo mencionáramos con anterioridad, los enterococos son intrínsecamente resistentes a bajas concentraciones de aminoglucósidos; por lo tanto, para el método de difusión en agar, los discos deben tener concentraciones de gentamicina de 120  $\mu$ g/ml y de estreptomina de 300  $\mu$ g/ml. Las concentraciones a probar en los métodos de dilución en caldo o en agar son de 500  $\mu$ g/ml y 2.000  $\mu$ g/ml para gentamicina y estreptomina respectivamente. Debido a que la resistencia a gentamicina y a estreptomina ocurre por diferentes mecanismos, parece ser importante estudiar estos dos agentes. Gentamicina es un buen predictor de la susceptibilidad a otros aminoglucósidos (tobramicina, amikacina y kanamicina) y por lo tanto, éstos no necesitan ser estudiados en forma separada<sup>5</sup>.

**Tabla 2. Agentes antimicrobianos contra los cuales los enterococos son intrínsecamente resistentes\***

- Cefalosporinas
- Aminoglucósidos (excepto altas concentraciones)
- Clindamicina
- Cotrimoxazol

\* Estos antimicrobianos no deben ser incluidos en el informe de susceptibilidad de enterococos.

**Tabla 3. Condiciones estandarizadas para realizar el estudio de susceptibilidad en enterococos por diferentes métodos**

---

**Difusión en agar**

Medio:	agar de Mueller-Hinton
Inóculo:	cultivo o suspensión directa de colonias
Incubación:	35° C en aire ambiental durante 16 a 18 horas. Incubación durante 24 horas para vancomicina.
Control:	<i>S. aureus</i> ATCC 25923

**Dilución en caldo o en agar**

Medio:	caldo de Mueller-Hinton con cationes agar de Mueller-Hinton
Inóculo:	cultivo o suspensión directa de colonias
Incubación:	35° C en aire ambiental durante 16 a 20 horas. Incubación durante 24 horas para vancomicina.
Control:	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212

**Epsilometría (E test®)**

Medio:	Agar de Mueller-Hinton Caldo cerebro corazón para detectar VRE
Inóculo:	suspensión con una turbidez de 0,5 McFarland para VRE: 0,2 ml en una placa de 90 mm
Incubación:	35° C en aire ambiental durante 24 horas - 24 a 48 horas para VRE.
Control:	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212

---

Nota: son necesarias otras cepas de control para el estudio de aminoglucósidos.

Debido a la falta de alternativas para tratar infecciones producidas por cepas de VREs, en el caso de aislar una de ellas, el NCCLS aconseja evaluar además la susceptibilidad a cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina (o doxiciclina o minociclina) y rifampicina<sup>5</sup>. De los nuevos agentes disponibles para tratar infecciones causadas por VREs, sólo existen puntos de corte para quinupristin/dalfopristin (Synercid®). Los puntos de corte para quinupristin/dalfopristin con el método de difusión –se emplea un disco de 15 µg/ml- son: *susceptible*  $\geq 19$  mm, *intermedio* 16 a 18 mm y *resistente*  $\leq 15$  mm. Los puntos de corte para determinar la CIM son: *susceptible*  $\leq 1$  µg/ml, *intermedio* 2 µg/ml y *resistente*  $\geq 4$  µg/ml.

En algunos países se encuentra disponible la fosfomicina para infecciones con *E. faecalis*. El único método para evaluar este agente es la

dilución en agar. El agar debe contener 25 µg/ml de glucosa-6-fosfato. No deben emplearse otros métodos ya que no han sido estandarizados. Los puntos de cortes son: *susceptible*:  $\leq 64$  µg/ml, *intermedio* 128 µg/ml y *resistente*  $\geq 256$  µg/ml.

Como ya lo hemos analizado, para detectar cepas resistentes a vancomicina, es necesario incubar las placas durante 24 horas antes de leerlas, y observar cuidadosamente la presencia de colonias pequeñas en el caso de usar difusión por disco. Los métodos de CIM también necesitan incubación durante 24 horas. Algunos de los métodos automatizados como el Vitek GPS-TA® y el MicroScan Rapid® han mostrado problemas en la detección de cepas que tienen resistencia a vancomicina mediada por el gene *van B*, pero los fabricantes han hecho cambios en sus respectivos paneles para evitar estos problemas<sup>6</sup>. En general, todos los

métodos tienen dificultades para detectar la resistencia a vancomicina mediada por el gen *van C*, excepto por la placa de *screening* y el E-test®. Hasta este momento, la placa de *screening* para detectar resistencia a vancomicina es el método más confiable para detectar resistencia mediada por los genes *van A*, *van B* y *van C*<sup>2</sup>.

En el último tiempo se han descrito cepas de enterococos que son “dependientes de la vancomicina”. Estas cepas sólo crecen en presencia de vancomicina<sup>2</sup>. En el University Hospitals of Cleveland hemos detectado dos cepas de enterococos dependientes de vancomicina en los últimos dos años. Ambas cepas fueron aisladas de hemocultivos de pacientes que estaban siendo tratados con vancomicina por un largo tiempo. Estas cepas no crecen en placas de agar sangre, pero sí crecen bien en la placa de *screening* que contiene vancomicina o sólo crecen alrededor del disco de vancomicina si uno usa difusión por disco. Estas cepas revierten a su patrón original de resistencia (VRE) una vez que se ha suspendido la terapia con vancomicina.

Se encuentran en estudio nuevos agentes antimicrobianos para tratar infecciones causadas por enterococos resistentes. Los puntos de corte todavía no están disponibles debido a la falta de información sobre su correlación clínica. Es importante destacar que sólo pueden ser

informados aquellos antimicrobianos para los cuales existe un método estandarizado de estudio y que presentan puntos de corte.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- PALAVECINO E y Comité de Resistencia Antimicrobiana. Puesta al día en aspectos microbiológicos de enterococos. Rev Chil Infect 1999; 16: 55-8.
- 2.- CETINKAYA Y, FALK P, MAYHALL C G. Vancomycin-resistant Enterococci. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 686-707.
- 3.- HANSON K L, CARTWRIGHT C P. Comparison of simple and rapid methods for identifying enterococci intrinsically resistant to vancomycin. J Clin Microbiol 1999; 37: 815-7. (Erratum, 37: 2391.)
- 4.- CARVALHO M G, TEIXEIRA L M, FACKLAM R R. Use of tests for acidification of methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside and susceptibility to efrotomycin for differentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera. J Clin Microbiol 1998; 36: 1584-7.
- 5.- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eleventh Informational Supplement. NCCLS Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2001.
- 6.- GARCIA-GARROTE F, CERCENADO E, BOUZA E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. J Clin Microbiol 2000; 38: 2108-11.

Correspondencia a:  
Elizabeth Palavecino R.  
E-mail: epalavecino@hotmail.com