

Original

Sensibilidad del género *Enterococcus* a nuevos antimicrobianos

M.I. Sánchez-Molina¹, D. Martín¹, C. Valladares¹, M.J. Gastañares², C. Torres³ y L. Borque¹

¹Laboratorio de Análisis Clínicos, ²Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro, Logroño, La Rioja; ³Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de La Rioja, Logroño

RESUMEN

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la prevalencia de resistencia a diferentes antibióticos en 109 cepas clínicas de *Enterococcus* aisladas consecutivamente en un periodo de cuatro meses en el año 2002. Los aislamientos fueron identificados en cuanto a especie por el sistema semiautomático Microscan® walk away 40 (Dade Behring) y por el sistema API20 STREP (BioMerieux). Para el estudio de sensibilidad se utilizaron tres métodos distintos: Sensititre®, E-test® y el método de difusión disco-placa. El porcentaje de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aislados fue del 92% y el 8%, respectivamente. Los porcentajes de resistencia detectados en *E. faecalis* fueron del 53% para eritromicina, 36% para telitromicina, 2% para penicilina, 1% para ampicilina, 0% para vancomicina, teicoplanina y linezolid, y resistencia de alto grado a estreptomycin (51%) y gentamicina (32%). En *E. faecium* se detectó una mayor proporción de cepas resistentes a penicilina y ampicilina (6 de 9 cepas). Destacan en las dos especies la alta sensibilidad al linezolid y los glucopéptidos.

Palabras clave: *Enterococcus* spp. - Resistencia a antibióticos - Estreptograminas - Cetólidos - Oxazolidinonas

Susceptibility of *Enterococcus* genus to new antimicrobial agents

SUMMARY

The aim of this study was to determine the prevalence of resistance to different antibiotics in 109 clinical strains of *Enterococcus* isolated consecutively in hospital over a four-month period in 2002. The strains were identified by species using the semiautomatic system Microscan® walk away 40 (Dade Behring) and the API20 STREP system (Biomérieux). Three different methods for the susceptibility study were used: Sensititre®, E-test® and disc diffusion. The percentage of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated was 92% and 8%, respectively. The following resistance to *Enterococcus faecalis* was detected: erythromycin (53%), telithromycin (36%), penicillin (2%), ampicillin (1%), vancomycin, teicoplanin and linezolid (0%), high level resistance to streptomycin (51%) and gentamicin (32%). A high percentage of strains resistant to penicillin and ampicillin was detected in *E. faecium* (six of nine strains). For two species, high susceptibility to linezolid and glycopeptides was found.

Key words: *Enterococcus* spp. - Antibiotic resistance - Streptogramin - Ketolide - Oxazolidinone

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos pertenecientes al género *Enterococcus* constituyen en la actualidad la tercera causa de infección nosocomial, siendo *Enterococcus faecalis* la especie predominante, seguida de *Enterococcus faecium* (1).

Los enterococos presentan resistencia intrínseca a diferentes antibióticos, como los aminoglucósidos (resistencia de bajo grado), las cefalosporinas y la clindamicina (2). Además, el género *Enterococcus* se caracteriza por su gran facilidad para la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia, que incluyen, entre otras, la resistencia a los betalactámicos (por alteración de las proteínas fijadoras de penicilina [PBP] o por producción de betalactamasas) (3-6), los glucopéptidos y los macrólidos, o la resistencia de alto grado a los aminoglucósidos (por la producción de enzimas modificantes de aminoglucósidos) (7-12).

Esta nueva situación limita de forma considerable las opciones de que se dispone para el tratamiento de las infecciones por *Enterococcus*, haciendo necesaria la búsqueda de nuevos antibióticos con bajo potencial de promover o inducir resistencia cruzada a otros antimicrobianos. Así, los fármacos de la familia de las estreptograminas, cetólidos y oxazolidinonas pueden ser una buena alternativa en estos casos (13, 14).

El objetivo de este estudio ha sido realizar una evaluación del estado actual de la sensibilidad de las dos especies de enterococos aisladas con mayor frecuencia en nuestra comunidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamientos bacterianos

En este estudio se han incluido todos los aislamientos de *Enterococcus* (n = 109) recibidos en el Laboratorio de Microbiología del Hospital San Millán-San Pedro de La Rioja durante los meses de mayo a agosto de 2002. Se aceptaron todas las muestras con independencia de la procedencia, edad y sexo del paciente; se excluyeron solamente las procedentes del mismo paciente.

Los aislamientos fueron identificados por el sistema semiautomático *Microscan*[®] *walk away 40* (Dade Behring) o por el sistema bioquímico *API20 STREP* (BioMérieux), o por ambos.

Pruebas de sensibilidad

Se determinó la sensibilidad a los antibióticos utilizando distintos métodos, en función de los antimicrobianos analizados.

- Sistema automático de microdilución *Sensititre*[®] (AcudMed, Westlake, Ohio): se utilizó el panel para microorganismos grampositivos (STRHAE1) y se usó caldo Mueller-Hinton como medio de cultivo. La incubación se realizó a 37 °C en ambiente aerobio durante 20 a 24 horas. Los antibióticos estudiados fueron penicilina, ampicilina, eritromicina, josamicina, azitromicina, clindamicina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina (500 mg/l), estreptomina (1000 mg/l) y quinupristina-dalfopristina.
- Método de difusión disco-placa Kirby-Bauer para telitromicina y linezolid: el medio empleado fue agar Mueller-Hinton (BioMérieux) y las placas se incubaron toda la noche a 37 °C en ambiente aerobio.
- *E-test*[®] (Ab Biodisk, Solna, Suecia) para linezolid: se utilizó agar Mueller-Hinton (BioMérieux), incubándose a 37 °C en ambiente aerobio durante 20 a 24 horas.

En todos los métodos se utilizó un inóculo equivalente al 0,5 de McFarland.

En el estudio de sensibilidad se utilizaron como cepas control *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecium* ATCC 19434.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI se determinó como la concentración más baja de antimicrobiano que inhibió completamente el crecimiento bacteriano. Los criterios de sensibilidad o resistencia utilizados fueron los recomendados por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (15). En el caso de la telitromicina se utilizaron los criterios establecidos por otros autores (16).

RESULTADOS

De los 109 aislamientos de *Enterococcus* recogidos en el Hospital San Millán durante los cuatro meses del estudio, cien fueron identificados como *E. faecalis* (92%) y nueve como *E. faecium* (8%). Se procedió a determinar la sensibilidad a diferentes antibióticos y en la Tabla 1 se exponen los resultados obtenidos en las dos especies de enterococos con los distintos métodos utilizados.

En el caso de *E. faecalis*, el 53% de los aislamientos presentó resistencia a la eritromicina, el 88% a la azitromicina y el 36% a la telitromicina. Valores similares de resistencia a estos tres antibióticos se detectaron en *E. faecium* (56%, 78% y 33% para eritromicina, azitromicina y telitromicina, respectivamente). La mayor parte de los aislamientos

Tabla 1. Resultados de los estudios de sensibilidad a antibióticos de cien *E. faecalis* y nueve *E. faecium* en nuestro hospital.

Método y antibiótico	<i>E. faecalis</i> (%)			<i>E. faecium</i> (%)		
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Sensititre</i> [®]						
Penicilina	98	0	2	33	0	67
Ampicilina	99	0	1	33	0	67
Eritromicina	9	38	53	22	22	56
Josamicina	0	3	97	11	22	67
Azitromicina	0	12	88	22	0	78
Clindamicina	4	0	96	33	0	67
Vancomicina	100	0	0	100	0	0
Teicoplanina	99	1	0	100	0	0
Gentamicina*	68	0	32	100	0	0
Estreptomina*	49	0	51	67	0	33
Quinupristina-dalfopristina	0	3	97	34	22	44
Discos						
Telitromicina	56	8	36	56	11	33
Linezolid	93	7	0	100	0	0
<i>E-test</i> [®]						
Linezolid	99	1	0	100	0	0

*La resistencia se considera de alto grado.

tos de *E. faecalis* presentó resistencia a quinupristina-dalfopristina (97%), siendo el porcentaje menor en *E. faecium* (44%).

En ninguno de los aislamientos de *Enterococcus* estudiados (tanto de *E. faecalis* como de *E. faecium*) se observó resistencia a la vancomicina. El 57% de los aislamientos de *Enterococcus* presentó una CMI de 1 mg/l y el 43% una CMI de 2 mg/l para la vancomicina. En lo que respecta a la teicoplanina, tampoco se observaron aislamientos resistentes, mostrando todos una CMI para este antibiótico $\leq 0,25$ mg/l, con una sola excepción con CMI de 0,5 mg/l.

Al utilizar el método de difusión disco-placa con telitromicina y linezolid, los rangos de los halos de inhibición fueron de 12-32 mm para telitromicina y de 22-32 mm para linezolid. Por este método, el 93% de los aislamientos de *E. faecalis* y las nueve cepas de *E. faecium* fueron sensibles al linezolid; siete aislamientos de *E. faecalis* quedaron en la categoría intermedia (Tabla 1). La sensibilidad al linezolid también fue analizada por *E-test*[®], sin encontrar diferencias significativas entre los dos métodos. No obstante, seis cepas que presentaron resistencia intermedia por el método de Kirby-Bauer fueron sensibles por *E-test*[®], alcanzado así el 99% de sensibilidad. El rango de CMI de linezolid detectado en este 99% de los aislamientos de *E. faecalis* sensibles fue de 0,5 a 2 mg/l. En el caso de *E. faecium*, el rango de CMI detectado en los nueve aislamientos estudiados fue de 0,75 a 1,5 mg/l.

En lo que respecta al grupo de los aminoglucósidos, se detectó resistencia de alto grado a la gentamicina en el 32% de las cepas de *E. faecalis*, pero no se detectó esta resistencia en ninguno de los *E. faecium* analizados. Por otro lado, se encontró resistencia de alto grado a la estreptomina en el 51% de los aislamientos de *E. faecalis* y en tres de los nueve de *E. faecium*.

Por último, cabe destacar la elevada frecuencia de detección de resistencia a los antibióticos betalactámicos penicilina y ampicilina en *E. faecium* (seis de nueve aislamientos), a diferencia de *E. faecalis*, especie en la cual raramente se detectaron cepas resistentes (1% a 2%).

DISCUSIÓN

La distribución global de especies coincide con la mayoría de las series consultadas (17, 18), siendo *E. faecalis* la predominante en nuestro centro hospitalario (92%), seguida de *E. faecium* (8%).

El estudio de sensibilidad puso de manifiesto que los aislamientos de *E. faecalis* son mayoritariamente sensibles a los betalactámicos, cosa que no ocurre en *E. faecium*, especie en la cual dos tercera partes de los aislamientos estudiados presentaron resistencia a la penicilina y la ampicilina. En los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia a los betalactámicos de *E. faecium*, que gene-

ralmente se debe a una alteración de la PBP(5'), siendo este mecanismo de resistencia muy poco frecuente en *E. faecalis* (3, 4). En Estados Unidos se han descrito cepas de *E. faecalis*, y excepcionalmente de *E. faecium*, productoras de betalactamasas (5, 6), pero en Europa no se ha detectado, por el momento, este tipo de cepas. En nuestra colección de *Enterococcus* hemos encontrado una alta proporción de aislamientos con resistencia a los macrólidos (>50% tanto para *E. faecalis* como para *E. faecium*). El mecanismo de resistencia a los macrólidos más frecuente en *Enterococcus* es por modificación de la diana del antibiótico en el ribosoma por expresión del gen *erm(B)*, que confiere el fenotipo de resistencia denominado MLS_B, que implica la resistencia conjunta a macrólidos-lincosamidas y estreptograminas del grupo B (8).

La mayor parte de los aislamientos de *E. faecalis* presentó resistencia a quinupristina-dalfopristina (97%, con CMI \geq 4 mg/l). Este alto porcentaje se debe a la resistencia intrínseca que presenta *E. faecalis* a la estreptogramina del grupo A, uno de los dos componentes de quinupristina-dalfopristina. Por ello, este antibiótico no es útil frente a esta especie bacteriana. En el caso de *E. faecium*, el 34% de los aislamientos fue sensible a este antibiótico, siendo este porcentaje inferior que el referido en otros estudios (19). Tal diferencia podría deberse al bajo número de muestras analizadas.

La resistencia de alto grado a la gentamicina en *E. faecalis* fue del 32%. Estos datos concuerdan con lo descrito en otros hospitales, tanto nacionales como extranjeros, donde se refieren porcentajes de resistencia que oscilan entre el 20% y el 40% (9-11). No se detectó, sin embargo, resistencia de alto grado a la gentamicina en nuestra corta serie de aislamientos de *E. faecium*. No obstante, en un estudio reciente realizado en 27 países europeos se refiere un 23% de resistencia a la gentamicina en esta especie de *Enterococcus* (12).

Por otra parte, la tasa de resistencia a la estreptomina fue del 51% y el 33% para *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente, similar a la encontrada por otros autores, siendo *E. faecalis* la especie con más alta tasa de resistencia (20).

En España, la incidencia de *Enterococcus* resistentes a los glucopéptidos es baja, generalmente inferior al 2% (7, 21), y lo mismo ocurre en otros países europeos. Esta situación es distinta en Estados Unidos, donde el porcentaje de resistencias es elevado, sobre todo en cepas procedentes de pacientes de la UCI (22, 23). En nuestra serie de *Enterococcus* no se han detectado aislamientos resistentes a este grupo de antibióticos.

Los aislamientos de *Enterococcus* fueron sensibles al linezolid (excepto una cepa de *E. faecalis* que se clasificó en

la categoría intermedia), con un rango de CMI muy estrecho (0,5 a 3 mg/l), aunque Johnson y cols. (24) describen cepas con CMI >4 mg/l. Este antibiótico podría considerarse como una alternativa en el tratamiento de las infecciones por enterococos resistentes a otros fármacos (25).

CONCLUSIÓN

Nuestros aislamientos presentan con cierta frecuencia resistencia a los antimicrobianos de primera elección, y por ello es necesario conocer la sensibilidad a otros fármacos que de forma aislada o combinada pueden actuar sobre el foco de infección. Es de destacar la elevada sensibilidad de *E. faecalis* y *E. faecium* al linezolid y los glucopéptidos.

Correspondencia: M.J. Gastañares, Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro, Autonomía de la Rioja s/n, 26004 Logroño, La Rioja. Tel.: 941-29 45 00 (Ext. 552). Fax: 941-29 45 23. E-mail: mjgastanares@hotmail.com

BIBLIOGRAFÍA

- Cormican, M.G., Jones, R.N. *Emerging resistance to antimicrobial agents in grampositive bacteria*. *Drugs* 1996; 51: 6-12.
- Torres, C., Zarazaga, M., Tenorio, C. y cols. *In vitro activity of the new ketolide HMR 3647 in comparison with those of macrolides and pristinamycins against Enterococcus spp.* *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 3279-3281.
- Torres, C., Tenorio, C., Lantero, M., Gastañares, M.J., Baquero, F. *High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2427-2431.
- Cercenado, E., García-Leoni, M.E., Rodeño, P., Rodríguez-Creixems, M. *Ampicillin-resistant enterococci*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 28: 829.
- Tomayko, J.F., Zscheck, K.K., Singh, K.V., Murray, B.E. *Comparison of the beta-lactamase gene cluster in clonally distinct strains of Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 1170-1174.
- Coudron, P.E., Markowitz, S.M., Wong, E.S. *Isolation of a beta-lactamase producing strain of Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1125-1126.
- Peset, V., Ubeda, P., Sarrión, A. y cols. *Evolución de las resistencias del género Enterococcus en cepas aisladas en sangre*. *Rev Esp Quimioterap* 1998; 11: 322-326.
- Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martínez, J.L., Torres, C. *Macrolide resistance genes in Enterococcus spp.* *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 967-971.
- Balas, D., Alós, J.I., Carvajal, R., Gómez-Garcés, J.L. *Enterococos aislados en sangre (1989-1993): Evolución de la susceptibilidad a los antibióticos*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13: 445-459.
- Balas, D., Perea, B., Wilhelmi, Y., Romanyl, J., Alós, J.I., Gómez-Garcés, J.L. *Prevalencia de resistencia antimicrobiana en enteroco-*

- cos aislados en sangre en Madrid (1994-1995)*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 15: 22-23.
11. Watanakunakorn, C. *Rapid increase in the prevalence of high-level aminoglycoside resistance among enterococci isolated from blood cultures during 1989-1991*. *J Antimicrob Chemother* 1992; 30: 289-293.
 12. Schouten, M.A., Voss, A., Hoogkamp-Korstanje, J.A. *Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. The European VRE Study Group*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2542-2546.
 13. Barry, A.L., Fuchs, P.C., Brown, S.D. *Interpretative criteria and quality control parameters for telithromycin disc diffusion susceptibility tests*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 121-125.
 14. Birmingham, M.C., Rayner, C.R., Meagher, A.K., Flavin, S.M., Batts, D.H. *Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: Experience from a compassionate-use program*. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 159-168.
 15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 12th Informational, Suppl. M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA 2002.
 16. Leroy, B., Rangaraju, M. *High in vitro susceptibility of the ketolide telithromycin (HMR 3647) in clinical isolates of key respiratory pathogens*. 40th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Canada 2000.
 17. Ruoff, K.L., Maza, L., Murtagh, M.J., Spargo, J.D., Ferrano, M.J. *Species identity of enterococci isolated from clinical species*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 435-437.
 18. Jones, R.M., Marshall, S.A., Pfaller, M.A., Wilke, W.W., Hollis, R.J., Erwin, M.E. *Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE program: Antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results, and laboratory testing accuracy*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 29: 95-102.
 19. Jones, R.N., Hare, R.S., Sabatelli, F.J., Ziracin Susceptibility Testing Group. *In vitro gram-positive antimicrobial activity of evernimicin (SCM 27899), a novel oligosaccharide, compared with other antimicrobial: A multicentre international trial*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 15-25.
 20. Hällgren, A., Abednazari, H., Ekdahl, C. y cols., Swedish ICU Study Group. *Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care unit in Sweden evaluated by different MIC breakpoints systems*. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 53-62.
 21. Cisterna, R., Ibarra, K., Morca, A. y cols., Grupo Español de Estudio y Vigilancia de Resistencias. *Estudio multicéntrico de resistencias en enterococos. Papel de la teicoplanina*. *Rev Esp Quimioterap* 1999; 12: 237-243.
 22. Goossens, H. *Spread of vancomycin-resistant enterococci: Differences between the United States and Europe*. *Inf Control Hosp Epidem* 1998; 19: 546-551.
 23. Landman, D., Quale, J.M. *Management of infections due to resistant enterococci. A review of therapeutic options*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 161-170.
 24. Jhonson, A.P., Warner, M., Livermore, D.M. *Activity of linezolid against multi-resistant grampositive bacteria from diverse hospital in the United Kingdom*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 225-230.
 25. Miyazaki, S., Fujikawa, T., Kobayashi, I., Matsumoto, T., Tateda, K., Yamaguchi, K. *The in vitro and in vivo antibacterial characterization of vancomycin and linezolid against vancomycin-susceptible and -resistant enterococci*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 971-974.