

Sobre la patogenicidad de *Enterococcus* spp.

Sr. Director. Hemos leído con interés el artículo de Sánchez-Silos et al. sobre una serie de 169 aislamientos de *Enterococcus* spp¹. Debido a las características epidemiológicas de los pacientes en los que habitualmente se produce una infección por enterococos, tradicionalmente ha sido complicado atribuir a este microorganismo una clara patogenicidad, a excepción de la infección urinaria, la endocarditis y, aunque menos frecuentes, la meningitis y la neumonía enterocócica². En el estudio al que nos referimos se realiza un análisis retrospectivo de 169 pacientes en los que se aisló *Enterococcus* spp., si bien no se hace mención en la metodología del estudio a los criterios para distinguir si los aislamientos incluidos pueden todos considerarse infecciones o pudieran en parte corresponder a colonizaciones. Hasta en un 48% de ellos el aislamiento se realizó de partes blandas o intraabdominal, localizaciones en las que la patogenicidad no está aclarada. Además, en un 44% de aislamientos se acompañó de otro microorganismo, y la mayor parte procedía de las localizaciones previamente citadas. En 20 pacientes se produjo bacteriemia, sin confirmarse el foco de origen en 12 casos.

Creemos que el diseño del estudio no es el más adecuado para analizar los factores de riesgo para la adquisición de infecciones por enterococos (un estudio con controles hubiera aportado una información de mayor solidez). Por tanto, los datos epidemiológicos encontrados en el presente estudio deben ser tomados sólo con carácter descriptivo, y coincidimos con los autores en que son propios del contexto de hospitalización en el que suelen aparecer las infecciones enterocócicas, sin que de los resultados del trabajo se puedan identificar factores de riesgo específicos.

Los autores establecen que no existió diferencia ni en la tasa de curación ni en la de mortalidad en relación con la adecuación del tratamiento antimicrobiano. Así, indican que falleció el 27,5% (11 de 40) de aquellos con tratamiento inadecuado y el 21% (17 de 80) de los que recibieron un tratamiento adecuado, diferencias que no fueron significativas y que los autores encuadran en el contexto de la información contradictoria sobre la influencia del tratamiento adecuado en el pronóstico de la infección enterocócica. En nuestra opinión, dicha conclusión no puede extraerse de este estudio. En primer lugar se trata de

un estudio no aleatorizado y retrospectivo, en el cual no se obtuvo información sobre los puntos finales valorados en el 22,5% y 19% de los pacientes que recibieron tratamiento inadecuado y adecuado, respectivamente. Por otra parte, no se definió en el estudio cuáles eran las infecciones concretas de los pacientes en ambos grupos, si éstas eran o no polimicrobianas, y cuál era el porcentaje de bacteriemias en cada grupo. La importancia de estos problemas metodológicos es obvia. El ejemplo más demostrativo lo encontramos en el caso de las bacteriemias enterocócicas. Hasta finales de los 80 todas las series de bacteriemia enterocócica que analizaron la influencia del tratamiento antimicrobiano apropiado sobre la mortalidad indicaban la ausencia de diferencias de mortalidad entre los pacientes que eran tratados apropiadamente y aquéllos que no³⁻⁶. Ello estuvo motivado, en parte, por el hecho de que en estos estudios no se diferenciaba entre episodios clínicamente significativos y aquéllos transitorios o contaminantes. Con posterioridad, estudios con un diseño más adecuado sí han detectado una mortalidad superior en los pacientes con bacteriemia enterocócica y tratamiento antimicrobiano inapropiado^{7,8}.

remia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. Clin Infect Dis 1992; 15: 49-57.

Evaluación de tres métodos para el diagnóstico de la infección por *Clostridium difficile*

Sr. Director. El diagnóstico sistemático de la enfermedad asociada a *Clostridium difficile* (EACD) se basa en la detección de las toxinas del microorganismo en las heces del enfermo: enterotoxina A, principal responsable de los síntomas gastrointestinales, y la toxina B, que es una potente citotoxina. En esta carta presentamos los resultados que hemos obtenido al comparar un método inmunoenzimático o EIA que detecta la toxina A (Culturette Brand Toxin CD, Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland, USA), con un cultivo celular para la detección de la toxina B (prueba de citotoxicidad directa en heces). Ambas determinaciones se compararon a su vez con el cultivo selectivo de *C. difficile* en muestras de heces, en función de la capacidad de las cepas aisladas para producir (cultivo toxigénico) o no (cultivo no toxigénico) la toxina *in vitro*.

Durante el año 1997 se evaluaron 423 muestras de heces de pacientes con supuesta diarrea intrahospitalaria. Las muestras se sembraron en Columbia agar con 5% de sangre de carnero (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), después del tratamiento de las heces con etanol absoluto¹, y en medio selectivo de *C. difficile* (bioMérieux), incubándose en anaerobiosis a 37°C durante 48 horas. Los aislados de *C. difficile* fueron sembrados en un caldo BHI (*brain heart infusion*), y después de tres días de incubación se comprobó la producción de toxina en cultivo celular a partir de un filtrado del caldo. Para la prueba de la citotoxicidad directa se inocularon los filtrados de las heces en dos monocapas de células MRC-5 (bioMérieux), a una dilución final de las muestras en el cultivo de 1/20 y 1/100 respectivamente. Se consideró la prueba positiva para la toxina B si la observación de un efecto citopático a las 24 ó 48 horas era neutralizado por la antitoxina específica (TechLab, Blacksburg, VA, USA). La detección inmunoenzimática de la toxina A se realizó según las instrucciones del fabricante.

De las 423 muestras estudiadas 50 (11,8%) fueron positivas en alguno de los tres métodos descritos, siendo las tres pruebas positivas en 11 muestras (2,6%). El cultivo proporcionó 32

Bibliografía

1. Sánchez-Silos RM, Pérez-Giraldo C, Martín P, Carduño E, Blanco J, Gómez-García AC. Patogenicidad de *Enterococcus* spp. Características de 169 aislamientos hospitalarios. Enferm Infect Microbiol Clin 2000; 18: 165-169.
2. Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev 1990; 3: 46-65.
3. Malone DA, Wagner RA, Myers JP, Watanakunakorn C. Enterococcal bacteremia in two large community teaching hospital. Am J Med 1986; 81: 601-606.
4. Bryan CS, Reynolds KL, Brown JJ. Mortality associated with enterococcal bacteremia. Surg Gynecol Obstet 1985; 160: 557-561.
5. Garrison RN, Fry DE, Berberich S, Polk HC Jr. Enterococcal bacteremia: clinical implications and determinants of death. Ann Surg 1982; 196: 43-47.
6. Barrall DT, Kenney PR, Slotman GJ, Burchard KW. Enterococcal bacteremia in surgical patients. Arch Surg 1985; 120: 57-63.
7. Hoge CW, Adams J, Buchanan B, Sears SD. Enterococcal bacteremia: to treat or not to treat, a reappraisal. Rev Infect Dis 1991; 13: 600-605.
8. Graninger W, Ragette R. Nosocomial bacte-

aislamientos de *C. difficile* de los que 22 (68,8%) eran toxigénicos y 10 (31,3%) eran no-toxigénicos. Teniendo como referencia los resultados positivos obtenidos con cualquiera de estos métodos (tabla 1), observamos que el EIA tuvo una sensibilidad del 76%, muy por encima del 56% obtenido con la determinación de la toxicidad en cultivo celular. No obstante, esta última prueba, combinada o no con el cultivo toxigénico, es considerada como el método de referencia para evaluar cualquier otra técnica diagnóstica. Aplicando esta norma a nuestro caso, el EIA presentó una sensibilidad del 63,6% y un valor predictivo positivo (VPP) del 55,3%. Se observó, además, una notable discrepancia entre los resultados obtenidos por el EIA y los otros dos métodos: 17 muestras positivas por el EIA fueron negativas en cualquiera de los otros métodos, y 12 muestras negativas por dicha técnica fueron positivas por citotoxicidad y/o cultivo toxigénico. En este contexto resultaba más interesante evaluar los diferentes métodos ensayados en relación con la presencia de EACD, la cual se definió por los siguientes criterios²: a) emisión de al menos 6 deposiciones diarias en las 36 horas previas, b) tratamiento antimicrobiano en las 8 semanas previas al inicio de la diarrea, c) respuesta positiva al tratamiento con metronidazol o vancomicina, d) exclusión de otras causas de diarrea y e) detección de la toxina de *C. difficile* por alguno de los métodos descritos. Tras revisar

las historias clínicas se encontraron 22 casos de EACD. Observamos (tabla 1) que la mayor sensibilidad para su diagnóstico se obtuvo con la prueba de la citotoxicidad (95,5%). Un dato llamativo es el pobre rendimiento obtenido en la detección del cultivo toxigénico (68,2%), el cual es considerado por muchos como la técnica más sensible, aunque menos específica, para el diagnóstico de EACD³. La baja sensibilidad obtenida revela el fracaso del laboratorio a la hora de aislar *C. difficile* de las heces. En nuestro laboratorio no se realiza la prerreducción de los medios de cultivo en anaerobiosis antes de su uso, como se ha recomendado³, lo que posiblemente haya influido en la menor sensibilidad del cultivo toxigénico en comparación con lo descrito en la literatura. En nuestra experiencia, el aislamiento de *C. difficile* toxigénico de una muestra que haya sido a su vez negativa en la prueba de la citotoxicidad directa en heces tiene poca probabilidad de predecir EACD, ya que sólo tuvimos 5 muestras con estos resultados y ninguno de los pacientes cumplía los criterios clínicos de EACD (portadores sanos de cepas toxigénicas).

El dato más llamativo de nuestros resultados es el escaso VPP del EIA (44,7%) en relación al obtenido con la citotoxicidad directa (75%) para el diagnóstico de EACD. La conocida presencia de portadores sanos de cepas toxigénicas⁴ y la baja prevalencia del EACD en nuestro hospital

(incidencia de 0,63 casos / 1.000 ingresos en 1997) explicarían los discretos VPP y elevado valor predictivo negativo de los métodos evaluados. La elevada tasa de resultados falsos positivos del EIA para diagnosticar EACD (55,3%) en comparación con la citotoxicidad directa (25%) se explica por el hecho de que éste último detecta toxina biológicamente activa, mientras que aquél detecta toxina inmunológicamente activa, la cual puede ser o no funcional. El peor rendimiento del EIA también puede explicarse por causas técnicas, ya que si no se realizan adecuadamente los lavados de las muestras y del conjugado en los micropocillos es fácil que se produzcan resultados falsos positivos. En este sentido, se repitieron las pruebas en aquellas muestras con resultados discrepantes y, en efecto, 12 de las 17 muestras con EIA positivo y negativas al resto de las pruebas fueron en esta ocasión EIA negativo, no cumpliéndose en ningún caso los criterios de EACD. Con todo, el VPP del EIA después de la repetición del ensayo no superó el 65,4%. Se ha sugerido el uso del EIA como prueba rápida de screening, con posterior confirmación de los resultados positivos por otro método como la prueba de citotoxicidad. Sin embargo, la baja sensibilidad obtenida por nosotros con dicho método (77,3%), confirmada también en otros estudios⁵, cuestiona esta aplicación del EIA. Por otra parte, recientemente se han comunicado brotes nosocomiales de EACD

TABLA 1. Valoración de los 3 métodos diagnósticos de EACD, en comparación con diferentes métodos de referencia

Métodos de referencia	Método evaluado	Resultado del método de referencia		Parámetros (%)			
		Pos	Neg	Sen	Esp	VPP	VPN
Resultado positivo en alguno de los 3 métodos (50)	Citotoxicidad	Pos	28	0	56,0	—	—
		Neg	22	373			94,4
	Cultivo toxigénico	Pos	22	0	44,0	—	—
		Neg	28	373			93,0
	EIA	Pos	38	0	76,0	—	—
		Neg	12	373			96,9
	Citotoxicidad y/o cultivo toxigénico (33)	Citotoxicidad	Pos	28	0	84,8	—
			Neg	5	390	—	—
		Cultivo toxigénico	Pos	22	0	66,6	—
			Neg	11	390	—	—
		EIA	Pos	21	17	63,6	95,6
			Neg	12	373	55,3	96,9
Criterios de EACD (22)	Citotoxicidad	Pos	21	7	95,5	98,2	75,0
		Neg	1	394			99,7
	Cultivo toxigénico	Pos	15	7	68,2	98,2	68,2
		Neg	7	394			98,2
	EIA	Pos	17	21	77,3	94,8	44,7
		Neg	5	380			98,7
	Citotoxicidad y/o Cultivo toxigénico	Pos	21	12	95,5	97,0	63,6
		Neg	1	389			99,7

Sen: sensibilidad; Esp: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; EACD: enfermedad asociada a *Clostridium difficile*; EIA: enzimoinmunoanálisis; Pos: positivo; Neg: negativo

causados por cepas de *C. difficile* toxina A-negativo, toxina B-positivo, confirmado con técnicas moleculares que detectaron una delección del gen de la toxina A^{6,7}. Creemos, por tanto, que la combinación de la citotoxicidad directa en heces y el cultivo toxigénico siguen siendo la mejor opción para conseguir una mayor sensibilidad a la hora de detectar *C. difficile*, y además un resultado positivo en la prueba de citotoxicidad directa aumenta la probabilidad de que el cuadro diarreico esté causado por este microorganismo.

No obstante, en los últimos años se han comercializado con éxito nuevas técnicas inmunoenzimáticas que detectan las dos toxinas, A y B, del microorganismo, las cuales ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad que las obtenidas con los EIA que detectan sólamente la toxina A^{8,9}. La alta correlación obtenida además con el cultivo celular hace que dichas técnicas sean una alternativa a considerar, especialmente en aquellos centros en los que los métodos celulares no están disponibles, o en los casos en los que se requiera un diagnóstico rápido orientado a un tratamiento precoz de la infección.

Jorge Calvo^a, Roberto Zarzabeitia^b, Daniel García-Palomo^b, M. Carmen Fariñas^b y Jesús Agüero^a.

^aServicio de Microbiología. ^bUnidad de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

Bibliografía

1. Borrielo SP, Honour P. Simplified procedure for the routine isolation of *Clostridium difficile* from faeces. J Clin Pathol 1981; 34: 1.124-1.127.
2. Peterson LR, Olson MM, Shanholter CJ, Gering DN. Results of a prospective, 18-month clinical evaluation of culture, cytotoxin testing, and Culturette brand (CDT) latex testing in the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Diagn Microbiol Infect Dis 1988; 10: 85-91.
3. Brazier JS. Role of the laboratory in investigations of *Clostridium difficile* diarrhea. Clin Infect Dis 1993; 16: S228-S233.
4. McFarland LV, Surawicz CM, Stamm WE. Risk factors of *Clostridium difficile* carriage and *C. difficile* associated diarrhea in a cohort of hospitalized patients. J Infect Dis 1990; 162: 678-684.
5. Fedorko DP, Engler HD, O'Shaughnessy EM, Williams EC, Reichelderfer CJ, Smith WI Jr. Evaluation of two rapid assays for detection of *Clostridium difficile* toxin A in stool specimens. J Clin Microbiol 1999; 37: 3.044-3.047.
6. Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, Fritsche TR. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A- B+ strain of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2000; 38: 1.696-1.697.
7. Alfa MJ, Kabani A, Lyerly D, Monerief S, Neville LM, Al-Barak A, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. J Clin Microbiol 2000; 38: 2.706-2.714.
8. Lyerly DM, Neville LM, Evans DT, Fill J, Allen S, Greene W, et al. Multicenter evaluation of the *Clostridium difficile* TOX A/B TEST. J Clin Microbiol 1998; 36: 184-190.
9. Aldeen WE, Bingham M, Aiderzada A, Kucera J, Jense S, Carroll KC. Comparison of the TOX A/B test to a cell culture cytotoxicity assay for the detection of *Clostridium difficile* in stools. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 36: 211-213.

Meningitis por *Streptococcus suis*. A propósito de dos casos y revisión de la literatura

Sr. Director. *Streptococcus suis* es un microorganismo causante de meningitis y otras infecciones en el ganado porcino. En los animales adultos y en el hombre es el tipo 2 de esta bacteria el más frecuentemente

aislado, mientras que el tipo 1 se asocia con infecciones en cerdos menores de 6 meses y se aísla muy raramente en humanos^{1,2}. Desde los años 60 se han descrito casos de pacientes con infecciones por *S. suis* en Holanda y otros países del norte de Europa³⁻⁵, Hong Kong⁶, Singapur⁷ y otros países del extremo Oriente donde la cría de ganado porcino y el procesamiento de su carne constituyen una fuente de riqueza. Las infecciones por *S. suis* en humanos son muy variadas e incluyen neumonías, artritis, diarreas, endoftalmitis, bacteriemias, endocarditis e incluso púrpura fulminante y rabdomiolisis^{4,8}. Las infecciones del sistema nervioso central por *S. suis* son muy raras en el hombre, especialmente las meningitis, y hasta octubre de 2000 se han publicado solamente 107 casos en la literatura mundial^{4,6,7}, 30 de ellos en Holanda⁴ y únicamente un caso en nuestro país⁸.

En 1998 hemos diagnosticado en nuestro hospital dos casos de meningitis por *S. suis* tipo 2. Las características clínicas, microbiológicas, evolutivas y terapéuticas de ambos pacientes y las del paciente diagnosticado en Galicia en 1997⁸ se muestran en la tabla 1.

Caso 1. Varón de 50 años que ingresó por fiebre de 39 °C de 36 horas de evolución y somnolencia. Se dedica a la cría de ganado porcino para consumo propio y dos días antes del ingreso manipuló carne de cerdo produciéndose accidentalmente varios cortes en las manos. Refería hipoacusia bilateral de predominio derecho, de larga duración, achacada a traumatismo sonoro repetido. El paciente estaba consciente, aunque somnoliento y tenía rigidez de nuca. Mediante punción lumbar se obtuvo un líquido cefalorraquídeo (LCR) hipertenso y ligeramente turbio con 2.960 leucocitos/mm³, RBC 1.000/mm³ y proteinas 1.200 mg/dl. Se realizó hemocultivo y se aisló *S. suis* tipo 2. Se realizó tratamiento con penicilina G sódica 2MU/IV/2h/14 días y se obtuvo curación.

TABLA 1. Características clínicas, microbiológicas, evolutivas y terapéuticas de los pacientes con meningitis por *Streptococcus suis* tipo 2 comunicados en España

Caso	Año del diagnóstico	Edad/sexo	Ocupación	Rigidez de nuca/ LCR con > 1.500 leucocitos / mm ³	Lugar de aislamiento de <i>S. suis</i>	Tratamiento	Evolución	Hipoacusia residual	Fuente
1	1997	51/V	Criador de cerdos	Sí/Sí	Hemocultivos LCR	Penicilina G sódica 2MU/IV/2h/14 días	Curación	No	Juncal et al ⁸
2	1998	50/V	Criador de cerdos	Sí/Sí	Hemocultivos LCR	Cefotaxima 2g/IV/4h/18 días	Curación	Sí	Asensi et al
3	1998	47/V	Matarife	No/Sí	LCR	Penicilina G sódica 3MU/IV/4h/13 días	Curación	No	Asensi et al

V: varón; LCR: líquido cefalorraquídeo; IV : por vía intravenosa; MU: millones de unidades.