

# Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos

Carmen Torres

Área de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Rioja. Logroño. España.

**El mecanismo de resistencia a betalactámicos más importante en *Staphylococcus* es la resistencia a meticilina, relacionada con el gen *mecA*, que implica resistencia a todos los betalactámicos. Los puntos de corte para interpretación de este mecanismo varían de *S. aureus* a las especies coagulasa negativa. En cuanto a macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B, lo más habitual entre las cepas resistentes es la expresión de metilasas (genes *erm*). Las alteraciones en las topoisomerasas por mutaciones puntuales y la expresión de la bomba de expulsión NorA causan resistencia a quinolonas, pero hay notables diferencias sobre la actividad de diferentes compuestos, lo cual dificulta el análisis interpretado. Recientemente se han descrito cepas de *S. aureus* con sensibilidad intermedia a glucopéptidos (cepas GISA). En España existe un elevado porcentaje de cepas de *S. pneumoniae* intermedias o resistentes a penicilina y un bajo porcentaje de cepas intermedias o resistentes a cefalosporinas de tercera generación, por alteraciones en los genes que codifican proteínas fijadoras de penicilinas. El fenotipo de resistencia más frecuente en esta especie para macrólidos-lincosamidas-estreptograminas B es también la producción de metilasas. La resistencia a quinolonas, aún poco frecuente, se relaciona con los mecanismos antes indicados para *Staphylococcus*, pero la interpretación clínica de los resultados es aún más compleja. No se han descrito aún cepas de *S. pyogenes* resistentes a penicilina. En España, el fenotipo de resistencia a macrólidos en *S. pyogenes* más frecuente está causado por bombas de expulsión activa (genes *mef*) que afectan a macrólidos de 14 y 15 átomos. *Enterococcus faecalis* suele ser sensible a ampicilina, a diferencia de lo observado en *E. faecium*. Los enterococos tienen resistencia intrínseca a aminoglucósidos, pero son sensibles a la combinación de estos compuestos con agentes activos en la pared. Las cepas que expresan distintas enzimas modificantes de aminoglucósidos se hacen resistentes también a la citada combinación. En España son raras las cepas de enterococo resistentes a glucopéptidos, pero en otras regiones se han descrito diferentes fenotipos de los que el más relevante es *vanA*.**

---

Correspondencia: Dra. C. Torres.  
Área de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de La Rioja.  
Madre de Dios, 51. 26006 Logroño. España.  
Correo electrónico: carmen.torres@daa.unirioja.es

Manuscrito recibido el 06-05-2002; aceptado el 10-06-2002.

354 Enferm Infect Microbiol Clin 2002;20(7):354-64

**Palabras clave:** *Staphylococcus. Streptococcus. Enterococcus. Antibiograma.*

Interpretative reading of the antibiogram in gram-positive cocci

**Resistance to methicillin in *Staphylococcus* is related to expression of the gene *mecA*, and implies resistance to all beta-lactams. Breakpoints for interpretation of this mechanism differ in *S. aureus* and in coagulase-negative species. In relation to macrolides-lincosamides-streptogramins<sub>B</sub>, the most frequent mechanism among resistant strains is expression of methylases (*erm* genes). Topoisomerase changes caused by point mutations and expression of the efflux pump NorA determine resistance to quinolones, but there are great differences on the activity of different compounds, which makes interpretative reading difficult. Strains of *S. aureus* with intermediate susceptibility to glycopeptides (GISA strains) have been recently described. In Spain, there is a high percentage of *S. pneumoniae* strains intermediate or resistant to penicillin, and a low percentage of strains intermediate or resistant to third generation cephalosporins, because of mutations in genes encoding penicillin-binding proteins. The most frequent phenotype of resistance to macrolides in this species is caused by methylase production. Resistance to quinolones is still uncommon, and is related to the mechanisms previously indicated for *Staphylococcus*, but clinical interpretation of the antibiogram for this organism is even more complex. No strains of *S. pyogenes* resistant to penicillin have yet been described. In Spain the most common phenotype of resistance to macrolides in *S. pyogenes* is determined by efflux pumps (*mef* genes), affecting 14- and 15-membered macrolides. *E. faecalis* is usually susceptible to ampicillin, in contrast to *E. faecium*. Enterococci show intrinsic resistance to aminoglycosides, but still remain susceptible to the combination of these antimicrobials and cell-wall active agents. Strains expressing different aminoglycoside-modifying enzymes became resistant to the combination. Glycopeptide-resistant strains of enterococci are uncommon in our country, but several genotypes, of which *vanA* is the most relevant from a clinical point of view, have been described in other regions.**

**Key words:** *Staphylococcus. Streptococcus. Enterococcus. Antibiogram.*

## Introducción

En este artículo se analizan los resultados del antibiograma de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus* en función de los fenotipos de resistencia a antibióticos betalactámicos, macrólidos-lincosamidas-estreptograminas, aminoglucósidos, quinolonas y glucopéptidos. Se analizarán, asimismo, los métodos más adecuados para la detección de la resistencia en algunos casos concretos. Los criterios de definición de resistencia para los antibióticos y microorganismos, considerados en este artículo los puntos críticos de resistencia, se basan en los del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>1</sup> y la Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA)<sup>2</sup>.

## Género *Staphylococcus*

### Betalactámicos

Un porcentaje reducido de cepas de *Staphylococcus* son sensibles, en la actualidad, a la penicilina. El fenotipo más frecuente en este género incluye resistencia a penicilina y a ampicilina por producción de penicilinasa. Esta betalactamasa es inhibida por el ácido clavulánico, por lo que estas cepas son sensibles a la asociación de amoxicilina-ácido clavulánico. La hiperproducción de esta enzima puede ocasionar, de forma excepcional, un incremento de concentración inhibitoria mínima (CIM) a la oxacilina (1-8 µg/ml); este tipo de cepas son muy poco frecuentes, no presentan resistencia cruzada con otros betalactámicos y la resistencia no está asociada con multirresistencia a otros antibióticos no betalactámicos (tabla 1).

Es relativamente frecuente la detección de cepas de *Staphylococcus* con resistencia a meticilina (y a oxacilina) por la adquisición del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina (PBP) PBP2a, que no posee afinidad por betalactámicos. La expresión fenotípica de la resistencia a meticilina puede ser heterogénea (CIM a oxacilina: 1-16 µg/ml) u homogénea (CIM > 16 µg/ml)<sup>3,4</sup>. Las cepas con expresión heterogénea se caracterizan porque sólo una pequeña proporción de la población ( $\leq 0,1\%$ ) sobrevive con concentraciones de oxacilina superiores a 10 µg/ml, mientras que la mayor parte de la población muere con bajas concentraciones del antibiótico. Estas cepas se caracterizan porque presentan gran heterogeneidad en el tamaño de las colonias cuando crecen en agar. En las cepas con expresión homogénea, la mayor parte de la población expresa la resistencia y el tamaño de las colonias es también homogéneo. Se ha demostrado que es posible la transformación de una expresión heterogénea en una expresión homogénea de la resistencia a meticilina, y se ha observado que esto se encuentra asociado a la selección de mutaciones cromosómicas y de reorganizaciones genéticas o a un incremento en la producción de la PBP2a<sup>5</sup>. Las cepas con resistencia a meticilina (homogénea o heterogénea) relacionada con el gen *mecA* presentan resistencia cruzada al resto de betalactámicos y generalmente se relaciona con multirresistencia a antibióticos no betalactámicos (aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas

y tetraciclina, entre otros). La observación de multirresistencia debe hacer sospechar en la posibilidad de resistencia a meticilina. En ocasiones, las cepas con resistencia heterogénea se manifiestan como resistentes a oxacilina pero sensibles a otros antibióticos betalactámicos. Sin embargo, debido a la resistencia cruzada con otros betalactámicos, estas cepas deben considerarse e informarse como resistentes a todos ellos.

El NCCLS establece un punto de corte de resistencia diferente para *S. aureus* (CIM  $\geq 4$  µg/ml) y para *Staphylococcus* coagulasa-negativo (SCN, CIM  $\geq 0,5$  µg/ml). Esta diferencia se estableció porque la CIM de oxacilina frente a algunas cepas de SCN con el gen *mecA* era inferior a 2 µg/ml<sup>6</sup>. Esta aproximación presenta el inconveniente de que para algunas especies (*S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, etc.) que carecen de *mecA*, se pueden informar falsas resistencias a meticilina.

El NCCLS recomienda el siguiente método de cribado para la detección de cepas de *S. aureus* con resistencia a meticilina: se preparan placas de MHA con 4% de cloruro sódico y 6 µg/ml de oxacilina (o 10 µg/ml de meticilina). Se inocula la placa con una suspensión del microorganismo a una concentración equivalente a 0,5 McFarland. Se incuba la placa a 35 °C durante 24 h y se observan después las placas con cuidado usando luz transmitida. La observación del crecimiento de más de 1 colonia o bien de un crecimiento neto o débil es indicativa de resistencia.

### Macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS)

Los antibióticos del grupo MLS presentan diferencias estructurales, pero poseen mecanismos de acción y de resistencia muy relacionados. En bacterias grampositivas, en general, se han descrito 4 mecanismos de resistencia a antibióticos MLS<sup>7</sup>:

1. Modificación de la diana (ARNr 23S) por la acción de metilasas codificadas por genes *erm*.
2. Expulsión activa del antibiótico relacionado con diferentes genes [*mef*(A), *mef*(E), *msr*(A), *msr*(B), *erp*(B)].
3. Inactivación del antibiótico (genes *lnu*, *vat*, *vgb*).
4. Modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o proteínas ribosomales.

La presencia de genes *erm* generalmente confiere un fenotipo de resistencia denominado MLS<sub>B</sub> (resistencia a macrólidos de 14, 15 y 16 átomos, lincosamidas y estreptograminas del grupo B) y este fenotipo puede ser de expresión constitutiva o inducible (cMLS<sub>B</sub> o iMLS<sub>B</sub>). En las cepas con fenotipo iMLS<sub>B</sub>, la eritromicina induce la expresión del mecanismo de resistencia. Por ello, si se estudia la sensibilidad de estas cepas a macrólidos de 16 átomos, clindamicina y estreptograminas del grupo B en ausencia de eritromicina, se manifestarán como sensibles a estos antibióticos, pero algunos autores consideran que deberían informarse como resistentes, porque poseen el mecanismo de resistencia.

El fenotipo de resistencia a macrólidos más frecuente en *Staphylococcus* es el iMLS<sub>B</sub>, y en algunas ocasiones también se detecta el fenotipo cMLS<sub>B</sub>, cuyos perfiles de resistencia son similares a los que se describen en *Streptococcus* (v. más adelante). El fenotipo MLS<sub>B</sub> en *Staphylococcus* está relacionado con la expresión del gen *erm*(A), aunque también se han descrito cepas con fenotipo

MLS<sub>B</sub> portadoras del gen *erm(C)* y del recientemente descrito *erm(Y)*<sup>8</sup>. Otros fenotipos que se pueden detectar, pero que son infrecuentes son: los fenotipos M (afecta a macrólidos de 14 y 15 átomos), y MS (macrólidos de 14 y 15 átomos y a estreptograminas) debido a un mecanismo de expulsión activa del antibiótico [genes *msr(A)*, *msr(B)*, *erp(A)*]; y los fenotipos L, S<sub>A</sub> y S<sub>B</sub> (afectan a lincosamidas y estreptograminas del grupo A y B, respectivamente) por mecanismos de inactivación y de expulsión activa del antibiótico (tabla 1).

### Aminoglucósidos

En *Staphylococcus*, a diferencia de lo que se observa en *Enterococcus*, no existe de forma natural un mecanismo intrínseco de resistencia de bajo nivel. El fenotipo sensible es el más frecuente. Los fenotipos de resistencia coinciden bastante bien con los fenotipos que posteriormente se comentarán al considerar la resistencia de alto nivel en *Enterococcus*, aunque en *Staphylococcus* no se han detectado las enzimas APH(2'')-Ib, Ic y Id (tabla 1).

### Quinolonas

Se han descrito varios mecanismos de resistencia a quinolonas en *Staphylococcus*: mutaciones en los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican la ADN-girasa (topoisomerasa

II), mutaciones en los genes *parC* y *parE*, que codifican la topoisomerasa IV, y mutaciones en el gen *norA*, responsable de un mecanismo de eliminación activa<sup>9,10</sup>. Las cepas clínicas de *Staphylococcus* sensibles a quinolonas no suelen tener mutaciones en estos genes, pero se han descrito aislamientos con mutaciones para los que la CIM de una o más quinolonas corresponde a la categoría de sensible establecida por el NCCLS y otros comités equivalentes. Existen importantes diferencias en la actividad de las distintas fluoroquinolonas frente a *Staphylococcus*. No todos los compuestos tienen la misma potencia frente a la ADN-girasa y la topoisomerasa IV. Las mutaciones responsables de la resistencia suelen ocurrir habitualmente primero en los genes que codifican la diana primaria de *Staphylococcus* (para la mayoría de compuestos la topoisomerasa IV) y a continuación la diana secundaria (habitualmente la ADN-girasa), contribuyendo estas últimas a incrementar el nivel de resistencia.

Probablemente, entre las fluoroquinolonas disponibles las menos activas son norfloxacino y ciprofloxacino, seguidas de ofloxacino, levofloxacino y esparfloxacino, y de moxifloxacino y gemifloxacino. A pesar de toda esta información en la actualidad resulta muy complejo realizar una lectura interpretada del antibiograma de quinolonas en *Staphylococcus*.

TABLA 1. Fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus*

Antibiótico						Mecanismo de resistencia	Fenotipo	Incidencia
<i>Betalactámicos</i>								
PEN	OXA	AMP	AMC	CEF				
R	S	R	S	S		Penicilinasa		Alta
R*	R	R*	R*	R*		PBP2a (gen <i>mecA</i> )		Muy variable
S	S	S	S	S		Ninguno		Baja
R	S	R	R	R				No descrito
<i>Macrólidos-lincosamidas-estreptograminas</i>								
ERI	AZI	SPI	CLD	STR <sub>B</sub>	STR <sub>A</sub>			
S	S	S	S	S	S	Ninguno		
R	R	R	R	R	S	Metilasa ARNr 23S [ <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> ]	Sensible	Alta
R	R	S/R	S/R	S/R	S	Metilasa ARNr 23S [ <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> ]	cMLS <sub>B</sub> **	Moderada
I/R	I/R	S	S	S/R		Bomba de expulsión [ <i>msr(A)</i> , <i>msr(B)</i> , <i>erp(A)</i> ]	M, MS	Baja
S	S	S	s	S	S	Inactivación [ <i>Inu(A)</i> ]	L	Baja
S	S	S	S	S	R	Inactivación [ <i>vat(A)</i> , <i>vat(B)</i> , <i>vat(C)</i> ]	LS	Rara
S	S	S	S	R	S	Bomba de expulsión [ <i>vga(A)</i> , <i>vga(B)</i> ]		Rara
S	S	S	S	R	S	Inactivación [ <i>vgb(A)</i> , <i>vgb(B)</i> ]		
<i>Aminoglucósidos</i>								
STR	GEN	TOB	AMK	KAN	NET			
S	S	S	S	S	S	Ninguno		Alta
S	R	R	R	R	R	Inactivación enzimática [AAC(6')-APH(2'')]		Moderada
R	S	S	S	S	S	Inactivación enzimática ANT(6)		Baja
S	S	S	S/R	R	S	Inactivación enzimática [APH(3')-III]		Baja
R	S	S	S/R	R	S	Inactivación enzimática [ANT(6') + AP(3')-III]		Baja
S	S	R	S/R	R		Inactivación enzimática [ANT(4')(4'')]		Baja
<i>Glucopéptidos</i>								
VAN	TEI						Especie	
S	S						<i>S. aureus</i> , SCN	Alta
S	I/R						SCN***	Baja
I	S/I						<i>S. aureus</i> , SCN	Rara
I/R	I/R						SCN	Rara

S, sensible; I, intermedio; R, resistente; s, sensibilidad disminuida. *Betalactámicos*: AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; AMP, ampicilina; CEF, cefazolina; CTX, cefotaxima; OXA, oxacilina; PEN, penicilina.

\*En algunos casos el mecanismo de resistencia a la oxacilina puede no afectar sustancialmente al resto de los betalactámicos. Con independencia de este hecho, las cepas de estafilococo resistentes a la oxacilina deben considerarse siempre resistentes a todos los betalactámicos.

*Macrólidos-lincosamidas-estreptograminas*: ERI, eritromicina; AZI, azitromicina; SPI, spiramicina; CLD, clindamicina; STR<sub>B</sub>, estreptogramina del grupo B; STR, estreptogramina (A + B).

\*\*En los aislamientos con el fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible, la eritromicina induce el mecanismo de resistencia ocasionando entonces la resistencia a todos los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub>. Estas cepas deberían considerarse resistentes a los antibióticos MLS<sub>B</sub>.

*Aminoglucósidos*: AMK, amikacina; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; NET, netilmicina; STR, estreptomicina; TOB, tobramicina.

*Glucopéptidos*: TEI, teicoplanina; VAN, vancomicina.

\*\*\*Este fenotipo se ha detectado fundamentalmente *Staphylococcus* coagulasa-negativo (SCN) de las especies *S. haemolyticus* y *S. epidermidis*.

TABLA 2. Fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos en *Streptococcus pneumoniae*

Antibiótico					Mecanismo de resistencia	Fenotipo	Incidencia
<i>Betalactámicos</i>							
PEN	CTX	OXA					
S	S	S			Ninguno		Alta
I	S	R			Alteraciones PBP 1A, 2X y 2B		Moderada-Alta
R	R	R			Alteraciones PBP 1A, 2X y 2B		Baja
S	R	I/R			Alteración PBP2x		Rara
I	I/R	R			Alteración en PBP1A y 2X		Rara
<i>Macrólidos-lincosamidas-estreptograminas</i>							
ERI	AZI	SPI	CLD	STR <sub>B</sub>	STR		
S	S	S	S	S	S	Ninguno	Sensible
R	R	R	R	R	S	Metilasa ARNr 23S [erm(B)]*	cMLS <sub>B</sub>
R	R	S/R	S/R	R/S	S	Metilasa ARNr 23S [erm(B)]*	iMLS <sub>B</sub> **
I/R	I/R	S	S	S	S	Bomba expulsión [mef(E)]***	M

\*El gen *erm* (TR) también se ha detectado ocasionalmente en cepas de *S. pneumoniae*.

\*\*En los aislamientos con el fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible, la eritromicina induce el mecanismo de resistencia ocasionando entonces la resistencia a todos los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub>. Estas cepas deberían ser consideradas como resistentes a los antibióticos MLS<sub>B</sub>.

\*\*\*El gen *mef(A)* también se ha detectado ocasionalmente en *S. pneumoniae*.

Para abreviaturas véase tabla 1.

## Glucopéptidos

Las cepas de *Staphylococcus* han mantenido en general una elevada sensibilidad a los glucopéptidos, de manera que lo más frecuente es detectar cepas sensibles a vancomicina y a teicoplanina. Sin embargo, en 1997 se describió la detección en Japón de cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina (CIM en el rango 4-8 µg/ml)<sup>11</sup> y este tipo de cepas han sido aisladas posteriormente en otros lugares geográficos (Estados Unidos, Europa, Hong Kong, Corea y España)<sup>12</sup>. Estas cepas se denominaron VISA (*vancomycin intermediate Staphylococcus aureus*). Muchas de las cepas VISA presentan también sensibilidad disminuida o resistencia a la teicoplanina, por lo que hoy en día suele utilizarse el término de GISA (*glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus*). Las cepas GISA se aíslan con una frecuencia muy baja y generalmente después de un tratamiento prolongado con glucopéptidos<sup>13</sup>. Se han observado dos tipos de expresión de la resistencia a glucopéptidos en *Staphylococcus*: a) expresión homogénea (CIM a vancomicina 8-16 µg/ml), y b) expresión heterogénea (CIM 1-4 µg/ml). Con los puntos de corte establecidos para la detección de la resistencia, algunas de estas cepas quedarían clasificadas como sensibles a glucopéptidos y, a lo sumo, como intermedias a vancomicina y a teicoplanina. Las cepas hetero-GISA son más frecuentes que las que poseen una expresión homogénea. Se ha documentado la escasa estabilidad del fenotipo GISA en ausencia de glucopéptidos, de manera que, con frecuencia, las cepas GISA revierten al fenotipo sensible tras sucesivos pases en placas no supplementadas con glucopéptidos<sup>14</sup>. En la tabla 1 se observan los fenotipos de resistencia a glucopéptidos en *Staphylococcus* y la frecuencia con la cual se detectan. El mecanismo de resistencia en las cepas GISA no está relacionado con el gen *vanA* de *Enterococcus*. En estas cepas resistentes se produce una alteración de la estructura del peptidoglicano que determina un secuestro del glucopéptido, impidiendo su unión sobre los restos de D-alanina-D-alanina, diana de actuación de este grupo de antibióticos. Asimismo, se ha observado que los aislamientos GISA presentan un aumento de la expresión de PBP2 y/o PBP2a.

Se han propuesto diferentes métodos para la detección de las cepas GISA en el laboratorio entre los cuales merece la pena destacar los siguientes:

1. Estudios poblacionales (PAP) para la detección de las subpoblaciones resistentes en cepas con fenotipo hetero-GISA.
2. Estudios de sensibilidad convencional con inóculos elevados.
3. Placas de cribado de BHI agar con 6 µg/ml de vancomicina.
4. Placas de cribado de MH agar con 5 µg/ml de vancomicina.
5. Placas con gradiente de concentración de vancomicina.
6. Curvas de muerte con vancomicina ± betalactámico.
7. Difusión con discos o tiras de E-test de betalactámicos en placas de BHI con vancomicina (2-4 µg/ml).

## Género *Streptococcus*

### *Streptococcus pneumoniae* (tabla 2)

#### Betalactámicos

Con respecto a los betalactámicos, los fenotipos más frecuentes en *S. pneumoniae* son los siguientes (tabla 2): a) sensibilidad a todos los antibióticos betalactámicos, en cuyo caso no existe ningún mecanismo de resistencia; b) sensibilidad disminuida a penicilina (CIM 0,12-1 µg/ml, categoría intermedia) y sensibilidad a cefotaxima (CIM ≤ 1 µg/ml), y c) resistencia a penicilina (CIM ≥ 2 µg/ml) y sensibilidad disminuida o resistencia a cefotaxima (CIM ≥ 2 µg/ml). Muy raramente se han descrito cepas que son sensibles a penicilina y resistentes a cefotaxima. La sensibilidad disminuida y la resistencia a betalactámicos están relacionadas con la alteración de diferentes PBP (1A, 2x y 2B)<sup>15</sup>. En un estudio multicéntrico realizado recientemente en España, el 22% de las cepas de *S. pneumoniae* presentaron resistencia a penicilina<sup>16</sup>. El 49% de las 9.243 cepas remitidas al centro de referencia de neumococos en el período comprendido entre 1990 y 1996 presentaron un fenotipo intermedio

o resistente para la penicilina (39% en el caso de cepas invasivas). Los datos de resistencia respecto a cefotaxima fueron de 21,7% para el total de las cepas y 18,6% para las invasivas<sup>17</sup>. Las cepas con resistencia a penicilina generalmente estaban asociadas a los serotipos 9, 14, 19, 6 y 23.

### MLS

Los fenotipos de resistencia más frecuentes en *Streptococcus pneumoniae* se deben a modificación de la diana (genes *erm*, que causan los fenotipos iMLS<sub>B</sub> o cMLS<sub>B</sub>) y en menor medida a sistemas de expulsión activa del antibiótico (genes *mef*). Los 3 fenotipos de resistencia (cMLS<sub>B</sub>, iMLS<sub>B</sub> y M) se detectan muy bien por el sistema disco-placa colocando los discos de eritromicina y clindamicina enfrentados y separados una distancia aproximada de 12 mm.

La presencia de un sistema de expulsión mediado por genes *mef* confiere un fenotipo de resistencia denominado M que afecta sólo a macrólidos de 14 o 15 átomos (eritromicina y azitromicina), pero no a macrólidos de 16 átomos (espiramicina, josamicina entre otros), lincosamidas o estreptograminas.

En general, las cepas con fenotipo MLS<sub>B</sub> (expresión de *erm* metilasas) presentan valores más elevados de CIM para la eritromicina que las cepas con fenotipo M (mecanismo de expulsión activa).

Las distintas especies de *Streptococcus* presentan diferencias en cuanto a la frecuencia de los fenotipos MLS<sub>B</sub> y M y también en cuanto a los genes de resistencia relacionados con estos fenotipos. En España, el fenotipo de resistencia más frecuente en *S. pneumoniae* es el MLS<sub>B</sub>, asociado por lo general (aunque existen excepciones) a los genes *erm*(B). En un estudio publicado recientemente en el que se ha analizado una amplia serie de cepas de *S. pneumoniae* de toda España, el 35% de las cepas fueron resistentes a eritromicina y sólo el 5% de estas cepas resistentes expresaron el fenotipo M. En Estados Unidos, la situación es diferente, ya que en ese país, un porcentaje relativamente elevado de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a eritromicina presentan el fenotipo de resistencia M<sup>18</sup>.

### Quinolonas

En *S. pneumoniae*, varios estudios han demostrado que la resistencia a quinolonas se asocia a mutaciones en los genes que codifican la topoisomerasa IV y la ADN-girasa (ver anteriormente, *Staphylococcus*)<sup>10,19</sup>. Además, en esta especie se han descrito también bombas de expulsión

activa, cuya expresión afecta de manera más significativa a las quinolonas hidrófilas.

La resistencia a quinolonas en cepas clínicas de *S. pneumoniae* se relaciona con mutaciones en estos genes, aunque el significado clínico de las mutaciones en *parE* es mal conocido por el momento. Las mutaciones aisladas en un solo gen parecen tener un impacto menor en la sensibilidad a las quinolonas.

La interpretación clínica del antibiograma en las cepas que presentan algún grado de resistencia a las fluoroquinolonas más antiguas es muy compleja, en especial por la falta de datos clínicos.

### *Streptococcus pyogenes* (tabla 3)

Hasta la fecha no se ha descrito ninguna cepa de *S. pyogenes* con resistencia a penicilina. Por lo tanto, si se detecta una cepa resistente, debe confirmarse el resultado y, en caso positivo, remitirla a un centro de referencia.

Los fenotipos de resistencia en *S. pyogenes* para MLS son similares a los descritos para *S. pneumoniae*. En España, el fenotipo de resistencia más frecuente entre las cepas de *S. pyogenes* es el M [asociado generalmente al gen *mef*(A)], siendo el fenotipo MLS<sub>B</sub> mucho menos frecuente<sup>20</sup>. En el estudio nacional anteriormente indicado, el 20% de las cepas de *S. pyogenes* fueron resistentes a eritromicina y el 90% de éstas presentaron el fenotipo M<sup>16</sup>. De este hecho, puede deducirse que muchas cepas de *S. pyogenes* resistentes a eritromicina serían sensibles a macrólidos de 16 átomos y a clindamicina. Esta situación es, pues, completamente diferente de la señalada para *S. pneumoniae*, y también difiere de la correspondiente a *Streptococcus* de los grupos B, C y G en las cuales el fenotipo más frecuente es el MLS<sub>B</sub>, asociado por lo general al gen *erm*(TR)<sup>21</sup>.

### Otros *Streptococcus*

El fenotipo más frecuente con respecto a betalactámicos en los estreptococos del grupo *viridans* es el de sensibilidad a todos ellos. Otros fenotipos, también frecuentes, se detallan en la tabla 4.

Se han descrito cepas de *S. agalactiae* y *S. viridans* con resistencia de alto nivel a estreptomicina (ver más adelante). Asimismo, se han descrito cepas de *Streptococcus* betahemolítico del grupo G con RAN a todos los aminoglucósidos de interés clínico; en estas cepas se han detectado los genes de las enzimas ANT(6), AAC(6')-APH(2'') y APH(3')-III<sup>22</sup>.

TABLA 3. Fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos en *Streptococcus pyogenes*

Antibiótico						Mecanismo de resistencia	Fenotipo	Incidencia
<i>Betalactámicos</i>								
PEN								
S						Ninguno		
R								Alta No descrito
<i>Macrólidos-lincosamidas-estreptograminas</i>								
ERI	AZI	SPI	CLD	STR <sub>B</sub>	STR			
S	S	S	S	S	S	Ninguno		
I/R	I/R	S	S	S	S	Bomba expulsión [ <i>mef</i> (A)]	Sensible	Alta
R	R	R	R	R	S	Metilasa ARNr 23S [ <i>erm</i> (B)]	M	Moderada
R	R	S/R	S/R	S/R	S	Metilasa ARNr 23S [ <i>erm</i> (B)]	cMLS <sub>B</sub>	Baja
							iMLS <sub>B</sub> *	Baja

\*En los aislamientos con el fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible, la eritromicina induce el mecanismo de resistencia ocasionando entonces la resistencia a todos los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub>. Estas cepas deberían ser consideradas resistentes a los antibióticos MLS<sub>B</sub>. Para abreviaturas véase tabla 1.

TABLA 4. Fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos en otros *Streptococcus*

Antibiótico						Mecanismo de resistencia	Fenotipo	Incidencia
<b><i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i></b>								
<i>Betalactámicos</i>								
PEN	CTX		OXA			Ninguno		
S	S	S	S					Alta
S	S	S/I	S/I			Alteraciones en PBP 2x		Moderada
I/R	I/S/R	R	R			Alteraciones en 5 PBPs		Moderada
<i>Aminoglucósidos</i>								
STR	GEN					Ninguno		
S	S							Alta
R	S							Baja
<b><i>Streptococcus</i> betahemolíticos de los grupos B, C y G</b>								
<i>Macrólidos-lincosamidas-estreptograminas</i>								
ERI	AZI	SPI	CLD	STR <sub>B</sub>	STR			
S	S	S	S	S	S	Ninguno	Sensible	Alta
R	R	R	R	R	S	Metilasa ARNr 23S [erm(TR)]	cMLS <sub>B</sub>	Moderada
I/R	I/R	S	S	S	S	Bomba expulsión [mef]	M	Baja
R	R	S/R	S/R	S/R	S	Metilasa ARNr 23S [erm(TR)]	iMLS <sub>B</sub> *	Baja

\*En los aislamientos con el fenotipo MLS<sub>B</sub> inducible, la eritromicina induce el mecanismo de resistencia ocasionando entonces la resistencia a todos los antibióticos del grupo MLS<sub>B</sub>. Estas cepas deberían considerarse resistentes a los antibióticos MLS<sub>B</sub>. Para abreviaturas véase tabla 1.

## Género *Enterococcus*

### Betalatámicos

El fenotipo más frecuente, tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium* incluye sensibilidad a penicilina y a ampicilina. Sin embargo, en *E. faecium* es relativamente frecuente también encontrar cepas resistentes a penicilina, ampicilina y amoxicilina-ácido clavulánico<sup>23</sup> por alteración de la PBP(5'), siendo este mecanismo de resistencia muy poco frecuente en *E. faecalis*<sup>24</sup>. En Estados Unidos se han descrito cepas de *E. faecalis* resistentes a ampicilina por producción de betalactamasa<sup>25</sup>, pero este tipo de cepas no se han aislado por el momento en España. Se han detectado de manera casi excepcional cepas de *E. faecium* productoras de betalactamasa<sup>26</sup>. Las cepas productoras de betalactamasas se caracterizan por ser resistentes a penicilinas y sensibles a las asociaciones con inhibidores de betalactamasas y carbapenemas.

La ampicilina tiene generalmente mayor actividad intrínseca que la penicilina, observándose con frecuencia una dilución menor en los valores de CIM de ampicilina respecto a penicilina. En aquellos aislamientos en los que se demuestre una disminución de la sensibilidad de la ampicilina o bien cierta actividad de los inhibidores de betalactamasa, se debe descartar la producción de betalactamasa. Para ello, debe incrementarse el inóculo en las pruebas de sensibilidad (10<sup>7</sup> UFC/ml). Para los aislamientos procedentes de sangre y del LCR debe realizarse la prueba de la nitrocefina, a fin de detectar la posible presencia de betalactamasa.

Teniendo en cuenta los fenotipos de resistencia a betalatámicos más frecuentes en *Enterococcus* en nuestro país, si se detecta en el laboratorio una cepa de *E. faecalis* resistente a ampicilina, deberíamos:

1. Reconfirmar la identificación a nivel de especie, ya que a veces se trata de una cepa de *E. faecium* mal identificada.
2. Estudiar la producción betalactamasa utilizando un alto inóculo del microorganismo. Si se tratase de una cepa

de *E. faecalis* productora de betalactamasa, debería ser informada y remitida rápidamente a un centro de referencia.

### MLS

En *Enterococcus* es frecuente detectar cepas sensibles a eritromicina, pero también es muy frecuente detectar cepas resistentes, con el fenotipo MLS<sub>B</sub>. El mecanismo de resistencia en estas cepas es la modificación de la diana en el ribosoma, por expresión del gen *erm*(B) [en algunas ocasiones también se han detectado los genes *erm*(A) y *erm*(C)]<sup>27</sup>. De forma muy esporádica se han referido cepas con fenotipo de resistencia M por expresión de bombas de expulsión activa (genes *mef*) (tabla 5).

### Aminoglucósidos

El género *Enterococcus* presenta de forma intrínseca un mecanismo de resistencia de bajo nivel (RBN) a aminoglucósidos por un transporte deficiente del aminoglucósido al interior de la bacteria. Se caracteriza por presentar valores de CIM que oscilan entre 4 y 64 µg/ml para la gentamicina y entre 16 y 256 µg/ml para la estreptomicina. Cuando se asocia un aminoglucósido con otro antibiótico que actúe a nivel de la pared celular, se produce un efecto sinérgico con esta asociación, por lo que la misma se utiliza en el tratamiento de infecciones graves por este microorganismo (p. ej., endocarditis). Sin embargo, el género *Enterococcus* puede presentar un mecanismo de resistencia adquirida a los aminoglucósidos, que suele asociarse a la producción de enzimas modificantes (acetiltransferasas [AAC], nucleotidiltransferasas [ANT] o fosfotransferasas [APH]), que produce una resistencia de alto nivel (RAN), perdiéndose el efecto sinérgico en asociación con agentes activos en la pared celular.

En la tabla 5 se presentan los distintos fenotipos de RAN a aminoglucósidos que se pueden detectar en *Enterococcus*, los mecanismos de resistencia asociados y la frecuencia con la que se producen. Los fenotipos de RAN más frecuentes en *Enterococcus* son<sup>28,29</sup>:

1. Resistencia a estreptomicina (STR<sup>R</sup>).

TABLA 5. Fenotipos y mecanismos de resistencia a antibióticos en *Enterococcus*

Antibiótico						Mecanismo	Fenotipo	Incidencia
<i>Betalactámicos</i>								
PEN	AMP	AMC						
S	S	S				Ninguno		
R	R	R				Alteración PBP(5')		
R	R	S <sup>a</sup>				Betalactamasa		
<i>Macrólidos-lincosamidas-estreptograminas</i>								
ERI	AZI	SPI	CLD	STR <sub>B</sub>	STR			
S	S	S	S	S	S	Ninguno	Sensible	Alta
R	R	R	R	R	S	Metilasa ARNr 23S [erm(B)] <sup>b</sup>	MLS <sub>B</sub>	Moderada
I/R	I/R	S	S	S	S	Bomba expulsión [mef]	M	Rara
<i>Aminoglucósidos<sup>c</sup></i>								
STR	GEN	TOB	AMK	KAN	NET			
S	S	S	S	S	S	Resistencia bajo nivel		Alta
R	S	S	S	S	S	Inactivación enzimática [ANT(6), ANT(3'')] o mutación ribosomal		
S	S	S	S/R <sup>d</sup>	R	S	Inactivación enzimática [APH(3')-III]		Moderada
R	S	S	S/R <sup>d</sup>	R	S	Inactivación enzimática [ANT(6') + [AP(3')-III]		Moderada
S	R	R	S/R <sup>d</sup>	R	R	Inactivación enzimática [AAC(6')-APH(2'')]		Moderada
R	R	R	S/R <sup>d</sup>	R	R	Varias enzimas		Moderada
S	S	R	S	R	R	Inactivación enzimática [AAC(6')-Ii]	Intrínseca de <i>E. faecium</i> <sup>e</sup>	
S	S	R	S/R <sup>d</sup>	R	S	Inactivación enzimática [ANT(4')(4'')]		Baja
S	R	R	S	R	R	Inactivación enzimática [APH(2'')-Ib, APH(2'')-Id]		Rara
S	MR	R	S	R	S	Inactivación enzimática [APH(2'')-Ic]		Rara

<sup>a</sup>La confirmación de este fenotipo requiere la detección de la betalactamasa mediante ensayo con nitrocefén. Este tipo de cepas resistentes se han detectado en EE.UU. pero no han sido detectados en España.

<sup>b</sup>El gen *erm(A)* también se ha detectado en este género.

<sup>c</sup>Se valorá la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos.

<sup>d</sup>Las cepas con este mecanismo de resistencia pueden presentar o no RAN a AMK. Sin embargo, serán resistentes al efecto sinérgico de la asociación de penicilina con amikacina.

<sup>e</sup>Las cepas de *E. faecium* poseen de forma intrínseca el gen *aac(6')-Ii* que codifica una enzima acetiltransferasa de baja expresión que modifica la tobramicina, kanamicina y netilmicina.

Para abreviaturas véase tabla 1. MR: resistencia moderada.

## 2. Resistencia a kanamicina y a amikacina (KAN<sup>R</sup>-AMK<sup>R</sup>).

3. Resistencia a gentamicina, tobramicina, kanamicina, amikacina y netilmicina (GEN<sup>R</sup>-TOB<sup>R</sup>-KAN<sup>R</sup>-AMK<sup>R</sup>-NET<sup>R</sup>).

4. Resistencia a estreptomicina, gentamicina, tobramicina, kanamicina, amikacina y netilmicina (STR<sup>R</sup>-GEN<sup>R</sup>-TOB<sup>R</sup>-KAN<sup>R</sup>-AMK<sup>R</sup>-NET<sup>R</sup>).

Estos fenotipos de resistencia están relacionados con la actividad de diferentes enzimas modificantes de aminoglucósidos:

1. ANT(6) y ANT(3'') que modifican STR (también se han descrito cepas con RAN a STR por mutación a nivel del ribosoma).

2. APH(3')-III que modifica KAN y AMK.

3. AAC(6')-APH(2'') que modifica GEN, TOB, AMK, KAN, NET.

4. Con cierta frecuencia estas enzimas están asociadas pudiéndose detectar RAN frente a todos los aminoglucósidos de interés clínico.

La especie *E. faecium* posee un gen intrínseco *aac(6')-Ii* que codifica la enzima AAC(6')-Ii, que se expresa débilmente y que modifica TOB y KAN, provocando la ausencia de efecto sinérgico de estos aminoglucósidos con betalactámicos (a pesar de que a veces se manifiestan con ausencia de RAN a estos aminoglucósidos).

Existen otros fenotipos de resistencia, poco frecuentes por el momento pero que son muy interesantes<sup>30</sup>. En primer lugar, se detectan cepas con el fenotipo

TOB<sup>R</sup>-AMK<sup>R</sup>-KAN<sup>R</sup> debido a la expresión de la enzima ANT(4')(4''). En segundo lugar, se han descrito recientemente<sup>31-33</sup> tres nuevas enzimas [APH(2'')-Ib, APH(2'')-Ic, y APH(2'')-Id] que modifican GEN pero no AMK. Las enzimas APH(2'')-Ib y APH(2'')-Id están relacionadas con RAN a GEN, TOB, KAN y NET, por lo cual habría efecto sinérgico de un betalactámico con AMK y con STR, pero no con el resto de los aminoglucósidos. Por último, la enzima APH(2'')-Ic se caracteriza por determinar un nivel "intermedio" de sensibilidad a la gentamicina (256 µg/ml); esta enzima confiere resistencia a la sinergia de GEN, TOB, y KAN con betalactámicos, pero no afecta a AMK, NET y STR.

Con todo lo anterior pueden obtenerse las siguientes conclusiones:

1. La RAN a la estreptomicina está causada por un mecanismo independiente al resto de los aminoglucósidos, por lo que no existen resistencias cruzadas.

2. Cuando una cepa presenta RAN a gentamicina, esto suele asociarse con frecuencia a RAN al resto de los aminoglucósidos (excepto la estreptomicina) y en definitiva con resistencia a la sinergia con betalactámicos. Sin embargo, existen excepciones. Se han descrito nuevas enzimas (por el momento poco frecuentes), que modifican GEN, pero que no confieren resistencia a la sinergia betalactámico-AMK y, en algún caso, también permiten la sinergia betalactámico-NET. Hay que ser capaces de detectar este tipo de cepas, ya que a pesar de la resistencia a GEN pueden existir otras alternativas terapéuticas.

TABLA 6. Detección de la resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en *Enterococcus*

Método	Medio	Inóculo	Incubación	Resultados
Cribado en agar	BHI agar + GEN (500 µg/ml)* BHI agar + STR (2.000 µg/ml)	Depositar 10 µl de 0,5 McFarland en la placa	35 °C, 24 h para GEN y 24-48 h para STR	Más de 1 colonia: resistente a la sinergia
Cribado en medio líquido	BHI caldo + GEN (500 µg/ml)* BHI caldo + STR (1.000 µg/ml)	5 10 <sup>5</sup> UFC/ml	35 °C, 24 h para GEN y 24-48 h para STR	Cualquier crecimiento: resistente a la sinergia
Disco-placa	Agar Mueller-Hinton STR (300 µg), GEN, KAN, TOB NET (120 µg)	Suspensión 0,5 McFarland	35 °C, 24 h	Halo de inhibición en milímetros ≥ 10 (sensible a la sinergia) 7-9 (indeterminado). Realizar otra técnica) 6 (resistente a la sinergia)

\*Para la detección de la enzima APH(2'')-Ic se requeriría una concentración menor de gentamicina (128 µg/ml). Para abreviaturas véase tabla 1.

TABLA 7. Fenotipos de resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus*

VAN	TEI	Mecanismo	Especie	Frecuencia
<i>Enterococcus</i>				
S	S	Ninguno	Todas las especies	Alta
R	R	<i>vanA</i>	Todas las especies	Baja*
I/R	S	<i>vanB</i> **, <i>vanD</i> , <i>vanE</i> , <i>vanG</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	Raro
S/L/R	S	<i>vanC-1</i> ***	<i>E. gallinarum</i>	Intrínseco en <i>E. gallinarum</i>
S/L/R	S	<i>vanC-2</i> ***	<i>E. casseliflavus</i>	Intrínseco en <i>E. casseliflavus</i>
S/L/R	S	<i>vanC-3</i> ***	<i>E. flavescentis</i>	Intrínseco en <i>E. flavescentis</i>
S	R			No descrito

\*Este tipo de aislamientos son frecuentes en Estados Unidos en pacientes de UCI. En Europa es poco frecuente en hospitales, pero se han aislado con cierta frecuencia en muestras intestinales de animales y humanos sanos, en alimentos y en aguas residuales.

\*\*Las cepas de *Enterococcus vanB* son sensibles a teicoplanina, pero se ha documentado el desarrollo de resistencia a este antibiótico tanto *in vivo* como *in vitro*.

\*\*\*Cepas con estos genes de resistencia presentan en ocasiones valores de CIM a vancomicina bajos, por lo que serían informadas como sensibles si no se realiza una buena identificación (detección del gen *vanC* o identificación microbiológica).

Para abreviaturas véase tabla 1.

3. Los métodos de detección actualmente aceptados para la RAN a la GEN pueden no detectar ciertas cepas con la enzima APH(2'')-Ic, que puede determinar CIM de GEN del orden de 256 µg/ml. Para detectar estas cepas habría que reducir el contenido de GEN de las placas de cribado, o bien detectar el gen *aph*(2'')-Ic (por reacción en cadena de la polimerasa [PCR] o hibridación) o bien realizar curvas de muerte betalactámico-GEN. Es posible que en un futuro se revisen y modifiquen los puntos de corte para la RAN a GEN.

Las curvas de letalidad se consideran el método de referencia para el estudio de la sinergia entre betalactámicos y aminoglucósidos. Su realización rutinaria no es práctica por lo que se recurre a otros métodos más sencillos. En la tabla 6 se señalan los métodos recomendados por la NCCLS para detectar RAN a STR y GEN en *Enterococcus*.

### Glucopéptidos

En el año 1989 se describió por primera vez la resistencia a vancomicina en *Enterococcus*, y desde entonces, se ha observado un aumento importante de este tipo de cepas resistentes entre los aislados clínicos, principalmente en Estados Unidos y, sobre todo, en pacientes de unidades de cuidados intensivos (UCI)<sup>34</sup>. El porcentaje de enterococos resistentes a vancomicina entre los aislados clínicos es bajo en Europa (entre el 1-2%)<sup>35</sup>; sin embargo, este tipo de cepas se ha detectado con frecuencia

en muestras intestinales de animales y de humanos sanos, en alimentos y en aguas residuales<sup>36</sup>.

En las tablas 7 y 8 se presentan los fenotipos de resistencia a glucopéptidos que se pueden detectar en *Enterococcus* y sus características diferenciales. Hay 2 tipos de resistencia:

1. *Adquirida*. Fenotipos VanA, VanB, VanD, VanE, y VanG mediados por los genes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG*, respectivamente (tabla 8).

2. *Intrínseca*. Ligada a las especies *E. gallinarum* (gen *vanC-1*), *E. casseliflavus* (gen *vanC-2*) y *E. flavescentis* (*vanC-3*)<sup>37-39</sup>.

El fenotipo VanA está asociado a elevados niveles de resistencia a vancomicina y a teicoplanina, y es el más frecuente entre los aislados clínicos de *Enterococcus* resistentes a vancomicina. Los otros fenotipos (VanB, VanC, VanD, VanE y VanG) se caracterizan por conferir bajos niveles de resistencia a vancomicina (en algunos casos la cepa incluso presenta valores de CIM a la vancomicina que se encuentran en el rango de sensibilidad con los puntos de corte actualmente aceptados) y sensibilidad a la teicoplanina. Se ha descrito la selección de resistencia a teicoplanina en cepas de *Enterococcus* con el mecanismo *vanB* en el curso de tratamiento con glucopéptidos<sup>40</sup>. En el laboratorio se detecta bastante bien el fenotipo VanA; sin embargo, existen algunos problemas para la detección de los otros fenotipos de resistencia<sup>41</sup>.

Los métodos que pueden utilizarse para detectar la resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus* incluyen:

TABLA 8. Características de los fenotipos de resistencia a los glucopéptidos en *Enterococcus* spp.

Fenotipo	Resistencia adquirida <sup>a</sup>					Resistencia intrínseca
	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanC
CIM vancomicina ( $\mu$ g/ml)	64- > 1024	4-1024	16-64	16	16	2-32
CIM teicoplanina ( $\mu$ g/ml)	16-512	0,25-2*	2-4	0,5	0,5	0,12-2
Expresión de la resistencia	Inducible	Inducible	Constitutiva	Inducible	ND	Constitutiva
Resistencia transferible	Sí	Sí	No	No	ND	No
Gen responsable de la resistencia (ligasa)	<i>vanA</i>	<i>VanB</i>	<i>VanD</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG</i>	<i>vanC-1, vanC-2, vanC-3</i>
Especies en las que se ha detectado	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> ( <i>vanC-1</i> ) <i>E. casseliflavus</i> ( <i>vanC-2</i> ) <i>E. flavescent</i> ( <i>vanC-3</i> )

\*La mayor parte de los aislamientos de *Enterococcus vanB* son sensibles a teicoplanina cuando se analizan, pero se ha documentado el desarrollo de resistencia tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>40</sup>.

CIM: concentración inhibitoria mínima; ND: no determinado.

1. *Difusión con discos.* Este método tiene un bajo poder discriminatorio, sobre todo con los valores de CIM intermedios (8-16  $\mu$ g/ml). La lectura de la placa ha de hacerse a las 24 h de incubación y debe usarse luz transmitida. En caso de duda debe realizarse la determinación de las CIM.

2. *Microdilución y dilución en agar.* Se utilizará MH suplementado en cationes, inóculo estándar e incubación de 24 h a 35 °C.

3. *Método de cribado.* El NCCLS recomienda el uso de una placa de agar BHI suplementada con 6 ( $\mu$ g/ml de vancomicina, un inóculo de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> UFC/depósito y una incubación de 24 h a 35 °C. La detección de más de 1 colonia, o ligero o claro crecimiento son indicativos de resistencia a vancomicina.

## Bibliografía

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 4<sup>th</sup> ed. Wayne: Approved Standard M7-A5. NCCLS, 2002.
- Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos (MENSURA). Rev Esp Quimioter 2000;13:73-86.
- Tomasz A, Nachman S, Leaf H. Stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:124-29.
- De Lencastre H, Sa Figueiredo AM, Urban C, Rahal J, Tomasz A. Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:632-9.
- Finan JE, Rosato AE, Dickinson TM, Ko D, Archer GL. Conversion of oxacillin-resistance staphylococci from heterotypic to homotypic resistance expression. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:24-30.
- McDonald CL, Maher WE, Faa RJ. Revised interpretation of oxacillin MICs for *Staphylococcus epidermidis* based on *mecA* detection. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:982-4.
- Weisblum B. Resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramins antibiotics. En: Fischetti et al, editor. Gram positive pathogens. Washington: 2000 ASM.
- Matsuoka M, Inoue M, Nakajima Y, Endo Y. New *erm* gene in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:211-5.
- Schmitz FJ, Hofmann B, Hansen B, Scheuring S, Luckefahr M, Klootwijk M, et al. Relationship between ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin (BAY 12-8039) MICs and mutations in *grlA*, *grlB*, *gyrA* and *gyrB* in 116 unrelated clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 1998;41:481-4.
- Hooper DC. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis 2001;7:337-41.
- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997;350:1670-3.
- Ariza J, Pujol M, Cabo J, Pena C, Fernandez N, Linares J, et al. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. Lancet 1999;353:1587-8.
- Liñares J. The VISA/GISA problem: Therapeutic implications. Clin Microbiol Infect 2001;(Suppl):4-15.
- Boyle-Vavra S, Berke SK, Lee JC, Daum RS. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:272-7.
- Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ, Spratt BG. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2X genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:1938-44.
- Perez-Trallero E, Fernandez-Mazarrasa C, Garcia-Rey C, Bouza E, Aguilar L, Garcia de Lomas J, et al, and the Spanish surveillance group for respiratory pathogens. Antimicrobial susceptibility of 1684 *Streptococcus pneumoniae* and 2039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationship. Results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:3334-0.
- Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Perez A, Casal J. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). J Clin Microbiol 1998;36:3447-54.
- Doern GV, Heilmann KP, Huynh HK, Rhomberg PR, Coffman SL, Brueggemann AB. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States during 1999-2000, including a comparison of resistance rates since 1994-1995. Antimicrob Agents Chemother 2001;45: 1721-9.
- Jones ME, Sahm DF, Martin N, Scheuring S, Heisig P, Thornsberry C, et al. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different during the 1997-1998 respiratory season. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:462-6.
- Alos JI, Aracil B, Oteo J, Torres C, Gomez-Garces JL, and the Spanish group for the study of infection in the primary health care setting. J Antimicrob Chemother 2000;45:605-9.
- Portillo A, Lantero M, Olarte I, Ruiz-Larrea F, Torres C. MLS resistance phenotypes in β-haemolytic group B, C and G *Streptococcus* isolates in La Rioja, Spain. J Antimicrob Chemother 2001;47:115-6.
- Galimand M, Lambert T, Gerbaud G, Courvalin P. High-level aminoglycoside resistance in the beta-hemolytic group B *Streptococcus* isolate BM2721. Antimicrob Agents Chemother 43:3008-10.

23. Torres C, Tenorio C, Lantero M, Gastañares MJ, Baquero F. High-level penicillin resistance and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemoter* 1993;37:2427-31.
24. Cercenado E, García-Leoni ME, Rodeño P, Rodriguez-Creixems M. Ampicillin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;28:829.
25. Tomayko JF, Zscheck KK, Singh KV, Murray BE. Comparison of the beta-lactamase gene cluster in clonally distinct strains of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1170-4.
26. Coudron PE, Markowitz SM, Wong ES. Isolation of a beta-lactamase producing strain of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36: 1125-6.
27. Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martínez JL, Torres C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:967-71.
28. Kobayashi N, Alam M, Nishimoto Y, Urasawa S, Uehara N, Watanabe N. Distribution of aminoglycoside resistance genes in recent clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus avium*. *Epidemiol Infect* 2001;126:197-204.
29. Del Campo R, Tenorio C, Rubio C, Castillo J, Torres C, Gómez-Lus R. Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant *Enterococcus* spp. in Spain. *Intern J Antimicrob Agents* 2000;15: 221-6.
30. Chow JW. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis* 2001;31: 586-9.
31. Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD, et al. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:511-4.
32. Kao SJ, You I, Clewell DB, Donabedian SM, Zervos MJ, Petrin J, et al. Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene *aph(2'')-Ib* in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2876-9.
33. Tsai SF, Zervos MJ, Clewell DB, Donabedian SM, Sahm DF, Chow JW. A new high-level gentamicin resistance gene, *aph(2'')-Id*, in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1229-32.
34. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med* 2000;342:710-21.
35. Vandamme P, Vercauteren E, Lammens C, Pensart M, Ieven M, Pot B, et al. Survey of enterococcal susceptibility pattern in Belgium. *J Clin Microbiol* 1996;34:2572-6.
36. Robredo B, Singh KV, Baquero F, Murray B, Torres C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int J Food*

#### ANEXO 1. Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos

1. ¿Qué actitud cree más adecuada con respecto a una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a oxacilina y resistente a penicilina, ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, gentamicina, eritromicina y ciprofloxacina?
  - a) Considerar que es un error de identificación y que muy probablemente se trata de *S. epidermidis*.
  - b) Dudar del resultado y reevaluar la resistencia a oxacilina con un método de referencia.
  - c) Asumir que es un fenotipo habitual e informarlo como tal.
  - d) Determinar la producción de betalactamasa; si el resultado fuese positivo informar del resultado del antibiograma.
  - e) Enviar la cepa a un centro de referencia, para estudiar la estructura de la pared de esta bacteria.
2. En una cepa de *Enterococcus faecalis* aislada de un paciente con endocarditis resistente a ampicilina, la actitud más adecuada es:
  - a) Informar inmediatamente del resultado, para no retrasar el tratamiento antimicrobiano correcto.
  - b) Se trata de un fenotipo imposible, porque todas las cepas de *E. faecalis* son siempre sensibles a ampicilina.
  - c) Comprobar la identificación del aislamiento y realizar una prueba de betalactamasa usando un inóculo elevado.
  - d) Tratar al paciente con penicilina, que es más activa que ampicilina frente a *E. faecalis*.
  - e) No usar ampicilina para el tratamiento del paciente, sino gentamicina en altas dosis, para suplir la falta de sinergia con el betalactámico.
3. En un paciente alérgico a la penicilina se ha aislado una cepa de *Streptococcus pyogenes* con una CIM a eritromicina de 8 µg/ml. Con este dato ¿qué asumiría?
  - a) Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas, ya que existe resistencia cruzada entre todos ellos.
  - b) Se trata de un fenotipo imposible, este tipo de cepas no se han descrito en *S. pyogenes*.
  - c) Que la cepa puede ser sensible a otros macrólidos de 14 y 15 carbonos, excluyendo la eritromicina.
  - d) Es posible que esta cepa tenga el denominado fenotipo M, con lo que sería sensible a macrólidos de 16 átomos y lincosamidas.
  - e) Repetiría el estudio de sensibilidad a la eritromicina empleando un medio con bajo pH.
4. Una cepa de *Streptococcus pneumoniae* resistente a eritromicina pero sensible a clindamicina, miocamicina, josamicina, espiramicina y estreptograminas (previa inducción con eritromicina):
  - a) Es relativamente poco frecuente en España, pero es posible su detección y este patrón habría que informarlo como tal. Correspondría al fenotipo de resistencia M.
  - b) Se trata de un fenotipo de resistencia imposible.
  - c) Debe considerarse que la cepa es resistente a eritromicina, y no deben informarse el resto de antimicrobianos.
  - d) Debe ser también resistente a penicilina y a cefalosporinas de tercera generación.
  - e) Está mal identificada; el microorganismo probablemente sea *Streptococcus mitis*.
5. Las CIM de vancomicina y teicoplanina para una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina aislada a partir de un paciente tratado con teicoplanina son de 4 y 16 µg/ml, respectivamente. ¿Qué pensaría?
  - a) En un fenotipo es imposible.
  - b) Puede tratarse de una cepa GISA y lo comprobaría con alguno de los métodos recomendados en la bibliografía.
  - c) Realizaría una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para descartar que se trate de un aislamiento con el genotipo *vanA*.
  - d) Puesto que las CIM de vancomicina y de teicoplanina son inferiores al punto de corte de resistencia del NCCLS para estos antibióticos en *Staphylococcus*, informaría esta cepa como sensible a glucopéptidos.
  - e) Pensaría que se trata de un cultivo contaminado y repetiría las pruebas de sensibilidad.
6. Para una cepa de *Enterococcus faecium* los valores de CIM (µg/ml) obtenidos son: penicilina (4), estreptomicina (> 2.000), gentamicina (256), vancomicina (2). ¿Qué actitud debe tomarse?
  - a) Fenotipo imposible. Reevaluar identificación y antibiograma
  - b) Informar la cepa como sensible a penicilina y vancomicina y con resistencia de alto nivel a estreptomicina y a gentamicina.
  - c) Dado que la cepa que no presenta resistencia de alto nivel a gentamicina, tampoco presenta resistencia de alto nivel a tobramicina, netilmicina y amikacina.
  - d) La cepa puede poseer una de las nuevas enzimas modificantes de aminoglucósidos descritas [APH(2'')-Ic] que ocasionaría resistencia al efecto sinérgico betalactámico-gentamicina. Estudiaría esta posibilidad, sobre todo si la gentamicina es alternativa terapéutica.
  - e) Este fenotipo es muy frecuente y lo informaría como tal.

Continúa

ANEXO 1. Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos (Continuación)

---

7. **Cómo debe interpretarse el antibiograma de una cepa de *S. aureus* que presenta el siguiente fenotipo: resistencia a gentamicina, kanamicina y netilmicina y sensibilidad a tobramicina:**
- a) Es un fenotipo frecuente y lo informaría como tal.
  - b) Este fenotipo no se ha descrito en *Staphylococcus*, ya que la resistencia a gentamicina está siempre asociada en este género a resistencia a todos los aminoglucósidos anteriormente citados.
  - c) Es un fenotipo raro en *S. aureus*, pero muy frecuente en *S. lugdunensis*, por lo que repetiría la identificación.
  - d) No es posible detectar cepas de *Staphylococcus* resistentes a kanamicina y sensibles a tobramicina, por lo cual repetiría los estudios de sensibilidad.
  - e) Informaría sensibilidad a netilmicina con independencia de los estudios de sensibilidad.
8. **En una cepa de *Enterococcus faecalis* se han detectado los siguientes valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ): estreptomicina (128), gentamicina (1.024), tobramicina (2.048), kanamicina ( $> 2.048$ ) y amikacina (512). ¿Qué conclusiones podría obtener de estos datos?**
- a) Esta cepa probablemente tenga las enzimas AAC(6')-APH(2'')  $\pm$  APH(3').
  - b) Este fenotipo no es posible, ya que si la cepa tiene la enzima AAC(6')-APH(2''), como cabe esperar, no podría tener un valor de CIM tan bajo para la amikacina.
  - c) Si la cepa presenta resistencia de alto nivel a gentamicina, esto implica resistencia de alto nivel a todos los aminoglucósidos, incluidos estreptomicina y amikacina.
  - d) Este fenotipo es posible, pero hasta ahora sólo se ha descrito en Lejano Oriente.
  - e) Este fenotipo es el más frecuente entre los aislados clínicos de *E. faecalis*.
9. **En una cepa de *Enterococcus faecium* para la que la CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) de vancomicina es 16 y la de teicoplanina es 2, la lectura interpretada correcta aconseja:**
- a) No es posible tener una cepa con este perfil, por ello informaría de los otros antibióticos, pero no los glucopéptidos.
  - b) Comprobar la identificación descartando especies de *Enterococcus* con resistencia intrínseca a vancomicina. Esta cepa podría tener el mecanismo *vanB* e indicaría de la posibilidad de selección de resistencia a teicoplanina durante el tratamiento si se usa este glucopéptido.
  - c) Informar que la cepa tiene sensibilidad disminuida a vancomicina pero es sensible a teicoplanina.
  - d) Realizar una prueba de inducción de resistencia a teicoplanina en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica como tetraciclina o cloranfenicol.
  - e) Informar la cepa como sensible a glucopéptidos.
10. **Para una cepa de *Staphylococcus epidermidis* se obtienen los siguientes valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ): penicilina (16); oxacilina (1); cefazolina (2). ¿Qué deduciría de este fenotipo?**
- a) Se trata de una cepa clásica, productora de betalactamasa que afectaría a penicilina pero no a oxacilina o al resto de betalactámicos.
  - b) Este fenotipo no es posible y por tanto repetiría el estudio de sensibilidad.
  - c) La cepa aislada debe considerarse como resistente a oxacilina y por tanto a todos los antibióticos betalactámicos.
  - d) Se informaría la cepa como resistente a penicilina y a oxacilina pero sensible a cefazolina.
  - e) Comprobar la resistencia a penicilina mediante la prueba de betalactamasa con alto inóculo.

---

Véanse respuestas a las preguntas de formación continuada en pág. 371.