



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Tesis de maestría

“Influencia de la concentración inhibitoria mínima de penicilina y aminoglucósidos sobre la actividad sinérgica de sus combinaciones frente a estreptococos del grupo viridans”.

Autora: Bioq. Laura Vigliarolo

Director: Prof. Dr. Horacio Lopardo

Lugar de realización:

• Servicio de Microbiología del Hospital Garrahan de la Ciudad de Buenos Aires.

• Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Ciudad de Buenos Aires.

Año 2004

*TESIS
Nº 1073*

A mis padres



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

TESIS
N.º 1073

DEPOSICION.....
A.....
Fecha 07-04-05.....
27290

Agradecimientos

A mis padres, por enseñarme que el esfuerzo, la dedicación y el espíritu de superación son el único camino para alcanzar y merecer cualquier logro.

A mi esposo e hijos por aceptar con comprensión y cariño las horas de ausencia.

Al Dr. Horacio Lopardo, por transmitirme con absoluta generosidad toda su experiencia y conocimientos, por enseñarme a transitar con serenidad y determinación el difícil camino de la investigación.

A la Dra. Daniela Centrón, por brindarme todos los elementos, asesoramiento y apoyo incondicional, para que fuera posible completar este estudio a nivel molecular.

A la bioquímica María Soledad Ramírez y al Biólogo Juan Ignacio Túnez por su ayuda en la realización de todos los métodos moleculares.

A la técnica Alejandra Mastroianni por facilitarme todo el material necesario para trabajar en el área de bacteriología.

A la Licenciada Apesteguía por su asesoramiento en el uso de los métodos estadísticos.

A la Licenciada Ana María Martínez y a todo el equipo de trabajo de la Biblioteca de Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires por su apoyo constante.

Finalmente a la Dra. Nilda Fink y a esta entrañable Facultad de Ciencias Exactas de La Universidad Nacional de La Plata , que mediante la "Maestría en Ciencias del Laboratorio Clínico", me permitieron acceder al conocimiento y manejo de numerosas técnicas y métodos de investigación clínica con los que nunca antes había tenido contacto.

Índice

Introducción	página
1.1 Estreptococos del grupo viridans: taxonomía y características principales.	1
1.2. Identificación.	4
1.3. Hábitat natural.	5
1.4. Importancia clínica.	7
1.5 Comportamiento frente a los antibióticos.	
1.5.1. Penicilina. Mecanismo de acción en gram positivos.	
1.5.2. Resistencia a la penicilina.	8
1.5.3. Aminoglucósidos. Mecanismo de acción.	12
1.5.4. Resistencia a los aminoglucósidos.	13
1.5.5. Otros antibióticos. Mecanismo de acción y resistencia.	15
1.5.6. Combinación de antibióticos.	16
2. Objetivos	18
3. Materiales y Métodos	
3.1. Microorganismos. Identificación.	20
3.2. Pruebas de sensibilidad.	
3.2.1. Pruebas de sensibilidad por el método de difusión.	23
3.2.2. Pruebas de sensibilidad por el método de Etest.	
3.2.3. Pruebas de sensibilidad por dilución en medio líquido.	
3.2.3.a Medio de cultivo.	
3.2.3.b Preparación del inóculo.	

3.2.3.c Dilución del inóculo.	24
3.2.3.d Preparación de las diluciones de los antibióticos.	25
3.2.3.f Incubación.	
3.2.3.g Lectura.	
3.2.4. Curvas de muerte.	
3.2.4.a Medio de cultivo.	26
3.2.4.b Preparación del inóculo.	
3.2.4.c Preparación de las diluciones de los antibióticos.	
3.2.4.d Incubación.	27
3.2.4.e Lectura.	
3.2.4.f Representación de los resultados.	
3.3 Enzimas modificadoras de aminoglucósidos.	
3.3.1 Extracción del ADN.	28
3.3.2 Cuantificación del ADN.	29
3.3.3 Determinación de los genes de resistencia a los aminoglucósidos.	30
3.3.4 Electroforesis en geles de agarosa.	31
4. Resultados y Discusión	
Capítulo 1. Identificación de los aislamientos.	32
Capítulo 2. Distribución de la resistencia a penicilina.	34
Capítulo 3. Distribución de la resistencia a gentamicina y correlación de las pruebas de difusión con discos con el método de Etest.	40
Capítulo 4. Influencia de la CIM de penicilina y de distintos aminoglucósidos sobre la actividad sinérgica de sus combinaciones.	46

Capítulo 5. Determinación de la existencia de los genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos.	65
5. Conclusiones	69
6. Bibliografía	72

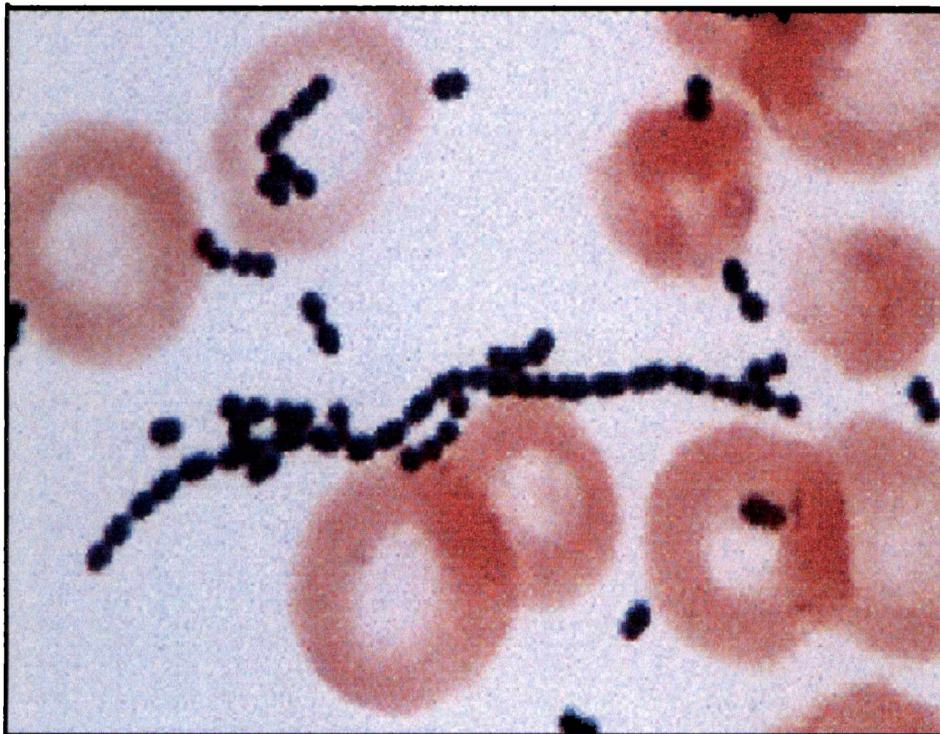
INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCION

1.1 ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO VIRIDANS: TAXONOMIA Y CARACTERISTICAS PRINCIPALES

Los estreptococos del grupo viridans (EGV) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que ha sufrido numerosos cambios en su clasificación en virtud de la variabilidad de su comportamiento frente a las reacciones bioquímicas. Son cocos gram positivos, catalasa negativos y anaerobios facultativos, de menos de 2 μm de diámetro que se disponen en pares y en cadenas (Figura 1).

Figura 1. Estreptococos del grupo viridans en un caldo de hemocultivo. Obsérvese la disposición en pares y cadenas. Coloración de Gram (objetivo de 100X)



Presentan requerimientos variables pero normalmente crecen en medios enriquecidos con

sangre o suero, formando colonias de diversos tamaños, lisas o rugosas, que pueden presentarse como alfa- o gamma-hemolíticas. Algunas cepas requieren la presencia de 5% de dióxido de carbono para crecer, otras son nutricionalmente deficientes.

Poseen un metabolismo fermentativo para los hidratos de carbono y producen ácido láctico como producto final. Al ser homofermentativos, no son generadores de gas a partir de la glucosa.

Los EGV dan positiva la prueba de leucinaminopeptidasa (LAP), dan negativa la de pirrolidonilarilamidasa (PYR), no crecen en caldo con 6,5% de cloruro de sodio y son sensibles a la vancomicina (Tabla 1) (Ruoff, 2003).

Tabla 1. Identificación de cocos gram positivos catalasa-negativos a nivel de género (Modificada de Ruoff, 2003)

a) Disposición en tétradas o racimos

Género	PYR	LAP	NaCl 6,5%	Bilis esculina	Vancomicina
<i>Aerococcus</i>	+/-	+/-	+	+/-	S
<i>Dolosigranulum</i>	+	+	+	ND	S
<i>Facklamia languida</i>	+	+	+	ND	S
<i>Gemella haemolysans</i>	+	+	-	-	S
<i>Helcococcus</i>	+	-	+	-	S
<i>Pediococcus</i>	+	-	V	-	R
<i>Tetragenococcus</i>	-	+	+	+	S

S = sensible

R = resistente

ND = No determinado

V = variable

b) Disposición en cadenas

Género	PYR	LAP	NaCl 6,5%	Bilis esculina	Vancomicina
<i>Abiotrophia</i>	+	+	-	-	S
<i>Dolosicoccus</i>	+	-	-	ND	S
<i>Enterococcus</i>	+	+	+	+	S/R
<i>Facklamia</i> excepto <i>F. languida</i>	+	+	+	-	S
<i>Gemella</i> excepto <i>G. haemolysans</i>	+	+	-	-	S
<i>Globicatella</i>	+	-	+	V	S
<i>Granulicatella</i>	+	+	-	-	S
<i>Ignavigranum</i>	+	+	+	-	S
<i>Lactococcus</i>	V	+	V	+	S
<i>Leuconostoc</i>	-	-	+	V	R
<i>Streptococcus</i>	V(EGV -)	+	-	V	S
<i>Vagococcus</i>	+	+	V	+	S

Actualmente son treinta especies que fueron incluidas como grupo "viridans" dentro del género *Streptococcus* formando a su vez los grupos: mutans, bovis, mitis, sanguinis, anginosus y salivarius (Facklam, 2002) (Tabla 2)

Ruoff hizo una simplificación de gran utilidad clínica al unir los grupos sanguinis y mitis en uno solo que denominó mitis (Ruoff, 2003).

Tabla 2. (modificada de Facklam, 2002)

ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO VIRIDANS: GRUPOS DE ESPECIES
• Mutans: <i>S.mutans, S.sobrinus, S.ratti, S.cricetus, S.ferus, S.macacae, S.downei, S.hyovaginalis.</i>
• Mitis: <i>S.mitis, S.oralis,, S.cristatus, S.infantis, S.peroris, S.orisratti.</i>
• Sanguinis (ubicado dentro del grupo Mitis según Ruoff, 2003): <i>S.sanguinis, S.parasanguinis, S.gordonii.</i>
• Salivarius: <i>S.salivarius, S.vestibularis, S.infantarius (S. bovis II.1), S.alactolyticus, S.hyointestinalis, S.thermophilus</i>
• Bovis: <i>S.equinus, S.gallolyticus (S. bovisI), S.pasteurianus (S.bovis II.2), S.lutetiensis.</i>
• Anginosus: <i>S.anginosus, S.constellatus, S.intermedius</i>

1.2 IDENTIFICACION

Al margen de las controversias surgidas en la década del '70 entre Parker y Ball (1975) y Facklam (1977) derivadas de la utilización de las pruebas clásicas de fermentación de azúcares, actualmente es notoria la dificultad que implica la identificación a nivel de especie. Los métodos miniaturizados y automatizados, por su lectura rápida no permiten la inducción de algunas enzimas por la presencia de su sustrato específico. Como agravante, la continua revisión de la clasificación por métodos moleculares, hace que sus bases de datos estén constantemente desactualizadas. Aún los métodos moleculares que utilizan la secuencia de la subunidad 16S de RNA ribosomal, fallan en la identificación de estos

microorganismos y se debe apelar a otros marcadores genéticos para mejorar la eficiencia (Kiratisin, 2003).

Como se dijo antes la identificación a nivel de grupos de especies aporta datos muy significativos clínicamente y puede realizarse con bastante eficiencia aún utilizando métodos manuales (tablas 2 y 3).

La identificación a nivel de grupos de especies se basa en ciertas características bioquímicas tales como la producción de acetoina en medio de Clark y Lubs (Voges-Proskauer), la hidrólisis de esculina, la producción de arginina dihidrolasa, la producción de ureasa, y la acidificación de medios con manitol y sorbitol (ver Materiales y Métodos).

Tabla 3

Aislamiento a partir de hemocultivos.(grupo)	Patología asociada
Mutans	Endocarditis infecciosa
Mitis	Endocarditis infecciosa Bacteriemia en neutropénico febril
Salivarius	Contaminante o bacteriemia transitoria Endocarditis infecciosa, patología hepatobiliar
Bovis	Endocarditis infecciosa, Cáncer de colon
Anginosus	Abscesos, colecciones purulentas en general (absceso cerebral, absceso pulmonar, absceso hepático)

1.3 HABITAT NATURAL

Estos microorganismos comprenden entre un 30 y un 60% de la flora normal orofaríngea. Se los suele llamar estreptococos orales por su amplia distribución en la cavidad bucal (Donnelly, 1993). Las distintas especies tienen preferencia por determinados sitios dentro de la misma (Tabla 4).

Tabla 4

Sitio de la cavidad oral	Especies
Mucosa bucal	<i>S.sanguinis, S.mitis</i>
Superficie dentaria	<i>S.oralis</i>
Mucosa supragingival	<i>S.gordonii</i>
Dorso de la lengua	<i>S.mitis</i>
Mucosa faríngea	<i>S.salivarius</i>
Mucosa subgingival	<i>S.anginosus</i>

Algunas cepas producen proteasa de IgA, la que les permitiría evitar la inmunidad local durante la colonización.

Por otra parte, estas bacterias presentan la característica de crecer formando un biofilm en el cual se hallan unidas unas a otras (Vosbeck y Mett, 1983) y producen un glicocálix de variada complejidad que las protege del medio hostil que las rodea. El glicocálix les permite adherirse fuertemente entre sí y a la superficie colonizada y se halla muy hidratado, de modo que las sustancias disueltas en el agua les son fácilmente alcanzables. Además, desde el biofilm liberan al medio acuoso enzimas que degradan los sustratos necesarios para su crecimiento. La producción de dextranos les permite adherirse a fibrina, lo que explicaría el alto porcentaje de cepas productoras de dextranos que causan endocarditis bacteriana (Parker y Ball, 1975), como *S sanguinis* y *S mitis* en menor proporción (Brennan y Durack, 1984).

Los EGV también se hallan en las mucosas gastrointestinal y urogenital (Gallis, 1991).

1.4 IMPORTANCIA CLINICA

A pesar de ser considerados poco virulentos, los EGV se hallan involucrados en diversas infecciones severas. Estos microorganismos causan entre un 30% y un 40% de las endocarditis bacterianas (EI) subagudas, tanto en válvula nativa como en pacientes con prótesis valvulares (Koneman y col.,1999). También son capaces de causar bacteriemia en pacientes neutropénicos con cáncer, especialmente con malignidad hematológica (Elting y col.,1992; Bochud y col.,1994; Carratalá y col.,1995; Paganini y col., 2003). En estos pacientes las complicaciones más frecuentemente asociadas a las bacteriemias son, además de la EI, los abscesos, el síndrome de dificultad respiratoria y el shock (Shenep, 2000). En todos los casos la puerta de entrada suele ser la mucosa bucal dañada por enfermedad periodontal, por procedimientos odontológicos o por la quimioterapia citotóxica (Sotiropoulos y col, 1989; Donnelly y col.,1995). Se han aislado EGV de infecciones en recién nacidos de madres con corioamnionitis, ruptura prematura de membrana o infección urinaria al momento del parto (Koneman y col.,1999) . También se los ha hallado en otras infecciones graves como meningitis (Binardi e Issacs, 1989; Cunney y col., 1993) y neumonía (Marriet, 1993), especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

Por otra parte, no se debe desconocer que los EGV son los principales agentes etiológicos de las caries dentales, las infecciones más frecuentes del ser humano.

1.5 COMPORTAMIENTO FRENTE A LOS ANTIBIÓTICOS.

1.5.1 PENICILINA. MECANISMO DE ACCION EN GRAM POSITIVOS.

Los antibióticos beta-lactámicos ejercen su efecto bactericida por provocar la acción de las autolisinas e interferir en la formación de su gruesa pared celular. Esta pared bacteriana se compone de un péptidoglicano formado por subunidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Las subunidades de ácido N-acetilmurámico se hallan unidas a cadenas peptídicas y muchas de éstas se encuentran interconectadas. La biosíntesis del péptidoglicano impone la ruptura de uniones covalentes para insertar nuevas subunidades de aminoazúcares, de modo que son necesarias enzimas autolíticas (mureinohidrolasas con actividad glicosilasa, glucosaminidasa y amidasa) y enzimas de síntesis (glucosil transferasas, transpeptidasas y carboxipeptidasas).

Los beta-lactámicos son estructuralmente semejantes a la porción d-alanil-d-alanina carboxiterminal de los péptidos presentes en los entrecruzamientos del peptidoglicano. Se unen en forma estable a las transpeptidasas formando un acilenzima sin actividad catalítica. Estas transpeptidasas se hallan unidas a la pared celular de la bacteria y pertenecen a la familia de las llamadas proteínas ligadoras de penicilina (PBP).

La inhibición de la síntesis de la pared desencadena en la bacteria una actividad autolítica suicida (Kernodle, 2000).

1.5.2 RESISTENCIA A LA PENICILINA

Se conocen varios mecanismos de resistencia a beta-lactámicos:

- Permeabilidad. Este mecanismo se debe a la presencia de la bicapa lipídica que compone la membrana externa de los microorganismos gram negativos, que actúa como barrera al ingreso de ciertos antibióticos. La porción externa de la bicapa lipídica está compuesta principalmente de lipopolisacárido formado por moléculas hidrocarbonadas unidas fuertemente que impiden el ingreso de antibióticos hidrofílicos. Sin embargo existen unas proteínas llamadas porinas que poseen canales por los que pueden ingresar moléculas hidrofílicas pequeñas. Del número de porinas y de las dimensiones de esos canales depende el paso de estas moléculas. Es así que, en algunas bacterias, puede estar limitado el acceso a ciertos antibióticos.

Este mecanismo es privativo de las bacterias gram negativas. Está ausente en cocos gram positivos puesto que estos microorganismos carecen de membrana externa.

-Eflujo de droga. Se trata de un mecanismo activo (dependiente de energía) de bombeo de droga al exterior. No estaría implicado en la resistencia a antibióticos beta-lactámicos en gram positivos a pesar de que otras bombas de eflujo operan frecuentemente en ellos.

-Betalactamasas. Las beta-lactamasas inactivan a los beta-lactámicos por unión covalente mediante una reacción idéntica a la que se verifica con las PBP. La diferencia está en que luego se produce la hidrólisis de la unión, de la que también resulta el antibiótico inactivado, pero la beta-lactamasa se regenera.

La producción de beta-lactamasas es bien conocida en cepas resistentes a penicilina, tanto en gram negativos como en gram positivos, pero hasta el momento no fue detectada en los EGV.

- Proteínas ligadoras de penicilina (PBP). La resistencia a los antibióticos beta-lactámicos mediante alteración de las PBP, puede deberse a mutaciones puntuales que las hacen menos

afines al antibiótico, sobreexpresión de PBP de baja afinidad o adquisición de genes que codifican para nuevas PBP provenientes de otras bacterias (Kernodle 2000).

La eficacia antibacteriana de los distintos beta-lactámicos depende de la afinidad con que se unen a las PBP y es la disminución de esta afinidad la que justifica la resistencia de los EGV a la penicilina.

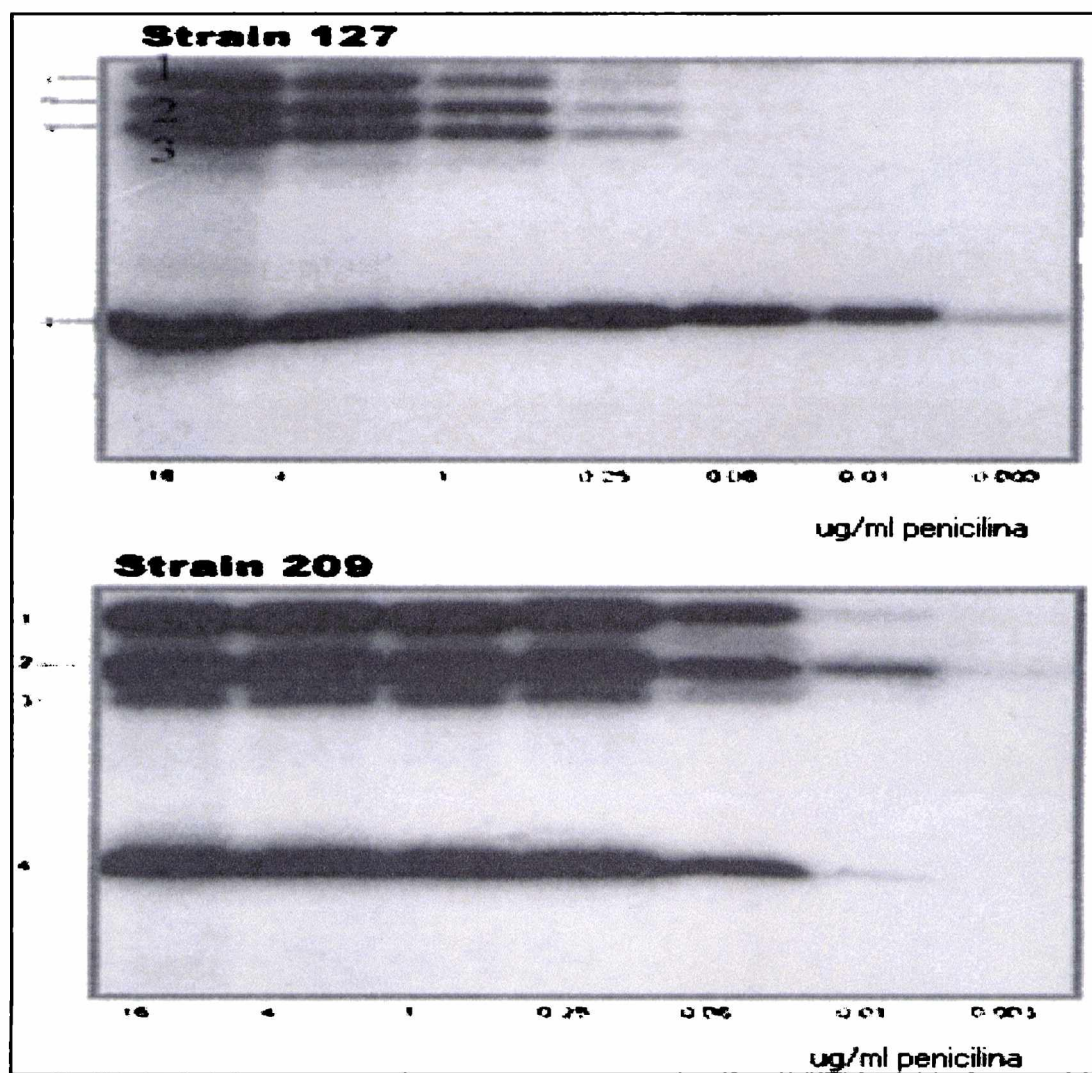
Estos microorganismos eran casi uniformemente sensibles a este antibiótico hasta que entre 1977 y 1978 se hallaron cepas de EGV resistentes a penicilina. Estas cepas fueron aisladas de exudados nasofaríngeos de niños sudafricanos, en la misma época y zona geográfica en que se produjo el primer gran brote de infecciones producidas por neumococos también resistentes a penicilina (Potgieter y col., 1992). No obstante, en los experimentos preliminares de Fleming, previos al uso masivo de la penicilina, ya se observaban diferencias sustanciales en la sensibilidad de diferentes cepas de EGV (Brock, 1996).

En 1983 se estudiaron las PBP de las cepas resistentes de Sudáfrica y de otras sensibles, mediante tratamiento con bencilpenicilina tritiada y separación en geles de poliacrilamida, hallándose importantes diferencias en las PBP de las cepas resistentes. También se han hallado PBP de baja afinidad en aislamientos de EGV resistentes a penicilina en otros países (Quinn y col., 1988; Malouin y Bryan, 1986). Es decir que tanto en los neumococos como en los EGV la resistencia a penicilina se debe a alteraciones de varias PBP que les confieren baja afinidad para este antibiótico (Figura 2) (Coffey y col., 1995; Amoroso y col., 2001).

La diseminación de esta resistencia está relacionada con mutaciones de los genes que codifican para las PBP y su transferencia entre especies relacionadas (Farber y col., 1983). Estos procesos, sumados a la presión de selección por el uso de penicilina como profilaxis

en pacientes neutropénicos con cáncer, han sido los responsables de la aparición y distribución de la resistencia a penicilina entre los EGV (Kóning, 1998; Amoroso y col., 2001).

Figura 2. Estudio de afinidad de PBP por penicilina en una cepa de EGV del grupo mitis resistente a dicho antibiótico #127 (CIM = 16 $\mu\text{g/ml}$) y en otra sensible #209 (CIM = 0,003 $\mu\text{g/ml}$). Nótese la falta de afinidad de todas las PBP de alto peso molecular en la cepa #127 (Amoroso y col. 2001)



Venditti y col. (1989) hallaron un 22 % de aislamientos resistentes o con sensibilidad intermedia entre 63 cepas de EGV estudiadas, aunque ninguna de ellas superaba la CIM de 4 µg/ml (Tabla 5).

En un estudio realizado en España, uno de los lugares de mayor incidencia de neumococos resistentes a penicilina, sobre 410 EGV aislados de sangre, se halló un 33.6% de cepas no sensibles (Tabla 5) (Alcaide y col., 1995).

En Estados Unidos se estudiaron 352 EGV aislados de sangre en los años 1993 y 1994, de las cuales 56% no fueron sensibles. Este porcentaje, mayor al de otros estudios, pudo deberse a que la mayoría de los aislamientos eran estreptococos del grupo “mitis”, que en todos los estudios se muestra como el de mayor nivel de resistencia (Tabla 5) (Doern y col., 1996). En Argentina, en un hospital pediátrico de alta complejidad, se registraron cifras de hasta 66,3%, similares a las halladas por Doern (Lopardo y col., 2000a). Estos resultados demuestran que la resistencia a la penicilina en EGV no sólo existe sino que su prevalencia es significativa.

La resistencia a penicilina compromete también la actividad de otros beta-lactámicos. En este contexto, imipenem parece ser el beta-lactámico más activo frente a estos microorganismos en términos de CIM (Tuohy y Washington, 1997).

1.5.3 AMINOGLUCOSIDOS. MECANISMO DE ACCION

Los aminoglucósidos tienen la capacidad de unirse a los ribosomas de la célula bacteriana. Esta interacción se produce en uno o más sitios a nivel de la interfase entre las dos unidades ribosomales, lo cual lleva a la inhibición de la síntesis proteica y

Tabla 5. RESISTENCIA A PENICILINA

Referencia	N	% I + R
• <i>Bourgault y col.</i> 1979	63	20.6*
• <i>Venditti y col.</i> 1989	63	22.0
• <i>Alcaide y col.</i> 1995	410	33.6
• <i>Doern y col.</i> 1996	352	66.3
• <i>Tuohy y Washington.</i> 1997	68	34.0
• <i>Traub y Leonhard.</i> 1997	278	20.1
• <i>Marrón y col.</i> 2001	88	39.8

* Todos con sensibilidad intermedia (CIM entre 0.25 y 2 µg/ml).

fundamentalmente, a la falta de fidelidad en la lectura del código genético. Como resultado se sintetizan proteínas anómalas.

Es muy importante el transporte de los aminoglucósidos al interior de la bacteria, proceso que requiere energía, la cual depende de un gradiente electroquímico de protones generado durante la respiración o por hidrólisis de ATP. La ineficiencia en el transporte impide la acción letal de estos antimicrobianos (Koneman y col., 1999).

1.5.4 RESISTENCIA A LOS AMINOGLUCOSIDOS

Existen mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos de naturaleza intrínseca y adquirida. La resistencia intrínseca consiste en el ingreso disminuido de la droga, mutaciones puntuales del RNA ribosomal o de las proteínas ribosomales, o por la presencia de enzimas que metilan el RNA ribosomal blanco. Se han hallado cepas de enterococos con

resistencia a altísimos niveles de estreptomina por mutación de su sitio de unión en el ribosoma (Eliopoulos y col,1984).

La resistencia adquirida se manifiesta por modificación covalente del aminoglucósido y es el mecanismo de resistencia más frecuente. Consiste en la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos que impiden su unión al ribosoma. Existen tres tipos: acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (o nucleotidiltransferasas) (ADE ó ANT) y fosfotransferasas (APH) que acetilan o adenilan los grupos hidroxilo o fosforilan los grupos amino de los aminoglucósidos, respectivamente. En los cocos gram positivos, las enzimas modificadoras de aminoglucósidos más comunes son la llamada enzima bifuncional AAC(6`)-APH(2`), la ANT(6)-Ia y la APH(3`)-IIIa (Shaw, 2000).

En los enterococos se han descrito varios genes de resistencia a los aminoglucósidos que codifican para enzimas modificadoras. Entre ellos están :

- los que codifican enzimas modificadoras con actividad acetiltransferasa:

aac(6`)-II: confiere resistencia a amikacina (Costa y col., 1993).

- los que codifican enzimas modificadoras con actividad adeniltransferasa:

aadE o ant(6): confiere resistencia a estreptomina (Ounissi y col.,1990).

aad(9) o ant(9)-I : confiere resistencia a espectinomicina (Leblanc y col.,1991).

aadA o ant(3`)(9): confiere altos niveles de resistencia a estreptomina y espectinomicina (Clark y col., 1999).

- los que codifican enzimas modificadoras con actividad fosfotransferasa:

aph(3`)-IIIa: confiere resistencia a kanamicina (Shaw y col., 1993).

aph(2`)-Ib: confiere alto nivel de resistencia a gentamicina (Kao y col.,2000).

aph(2`)-Ic: confiere resistencia a gentamicina (Chow y col., 1997).

aph(2'')-ld: confiere alto nivel de resistencia a gentamicina (Tsai y col., 1998).

En los EGV se ha reconocido la enzima bifuncional **aac(6')-aph(2'')** con actividad 6'-acetiltransferasa y 2''-fosfotransferasa, codificada en un gen integrado al cromosoma. Este gen se halla alojado en un transposón, lo cual le confiere la posibilidad de diseminar la resistencia entre especies relacionadas (Kaufhold y Potgieter, 1993). No obstante, éste es un fenómeno poco estudiado en EGV.

1.5.5 OTROS ANTIBIÓTICOS. MECANISMO Y RESISTENCIA

Como alternativa para pacientes alérgicos a la penicilina, en el tratamiento de infecciones por EGV se emplean vancomicina y eritromicina (Tuohy y Washington, 1997). La vancomicina actúa a nivel de la pared bacteriana y sólo se ha descrito resistencia a este glucopéptido en alguna cepa de EGV. (Poyart y col., 1997).

La eritromicina forma parte de la familia de los macrólidos, que ejercen su efecto antibacteriano por inhibición de la biosíntesis de proteínas a nivel de la traducción. Se unen a la subunidad 50S inhibiendo la síntesis proteica al inducir la disociación entre la molécula del peptidil-ARNt y el ribosoma, durante la elongación de la cadena peptídica (Goldman y col., 1990; Mazzei y col., 1993). En los EGV se conocen dos fenotipos de resistencia. Uno de ellos confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B (fenotipo MLS_B) y consiste en la metilación del ARNr 23S por una adenil-N⁶ metiltransferasa, codificada por el gen *erm* (eritromicina ribosoma metilasa). Este fenotipo puede ser inducible (fenotipo iMLS_B) o constitutivo (fenotipo cMLS_B). El otro fenotipo de resistencia es el llamado fenotipo M, codificado por el gen *mef* (macrólido eflujo), que consiste en un sistema activo de eflujo de droga y que ya ha sido descrito en EGV (Lopardo y col., 2000a). En neumococos, recientemente se describió la mutación puntual en

genes que codifican para proteínas ribosomales, como mecanismo alternativo (Tait-Kamradt y col., 2000).

1.5.6 COMBINACION DE ANTIBIOTICOS

A pesar de la disponibilidad de nuevos y potentes antibióticos, avances técnicos y quirúrgicos, la EI aún está asociada a altas tasas de morbilidad y mortalidad: 4% a 6% para EGV, 25% - 47% para estafilococos y 15-25% para enterococos (Le y Bayer, 2003). El uso de combinaciones sinérgicas ha dado muestras de efectividad en el tratamiento de dicha patología.

Cuando los niveles de concentración inhibitoria mínima de penicilina superan los 0.1 µg/ml se recomienda el uso combinado de penicilina con un aminoglucósido, dado que normalmente presentan un marcado sinergismo bactericida (aumento en el índice de actividad bactericida) (Sande e Irvin, 1974). Este efecto, en enterococos, se debería a que la ruptura de la pared bacteriana provocada por el beta-lactámico, facilitaría el ingreso del aminoglucósido al citoplasma (Moellering y col., 1971).

En EGV, el mecanismo sinérgico no está aún bien dilucidado y parecería no depender de la facilidad de entrada del aminoglucósido a la célula bacteriana en presencia del beta-lactámico (Miller y col., 1986).

La resistencia enzimática a los aminoglucósidos condiciona la actividad bactericida de sus combinaciones con beta-lactámicos. En EGV, al igual que en enterococos, se han detectado algunos aislamientos de EGV con elevada resistencia a estreptomycinina y a gentamicina, lo cual en este caso también anula el efecto sinérgico (Potgieter y col., 1992; Farber y col., 1983).

La resistencia a los antibióticos en los EGV, tanto a los beta-lactámicos como con menor frecuencia a los aminoglucósidos, se ha convertido en un problema para el tratamiento de algunos casos de endocarditis infecciosa, en los que inexorablemente se requiere de la actividad bactericida de los antibióticos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El NCCLS delimitó puntos de corte para determinar la sensibilidad o resistencia de los EGV a penicilina por el método de dilución (NCCLS, 2002b). Es de gran importancia conocer el porcentaje de cepas resistentes o con sensibilidad intermedia en cada lugar geográfico para elaborar estrategias terapéuticas empíricas.

El NCCLS propuso el uso de discos de gentamicina de alta carga para predecir resistencia a altos niveles de este antibiótico en los enterococos (NCCLS, 2002a). Sin embargo nada se estipuló para el caso de los EGV. Si fuera posible utilizar esta estrategia para el caso de los EGV, se dispondría de un método de *screening* sencillo y fácilmente accesible para determinar la falta de sensibilidad a gentamicina. No obstante, existen algunos indicios de que la presencia de enzimas inactivantes de gentamicina podrían producir aumentos no tan notables de las CIM como pueden apreciarse en enterococos (Potgieter y col., 1992). Es por eso que se propuso:

- 2.1 **Estudiar la sensibilidad a penicilina y aminoglucósidos de un grupo de aislamientos clínicamente significativos de EGV.**
- 2.2 **Comprobar la efectividad del método de difusión, no recomendado por el NCCLS, para predecir la falta de sensibilidad a penicilina**
- 2.3 **Determinar la correlación entre las pruebas de sensibilidad por difusión con discos de distintas cargas de aminoglucósidos y las CIM obtenidas por dilución o Etest para esos antimicrobianos.**

El éxito de la terapéutica antibiótica está determinado por interacciones complejas entre una o más drogas administradas, el huésped y el agente infectante. En la situación clínica, la complejidad de esas interacciones se refleja habitualmente en la gran variabilidad que existe en la relación dosis-respuesta.

El gran desafío de los métodos *in vitro* es poder predecir el éxito o el fracaso de una terapéutica. Existen varios modelos con los que se ha intentado reproducir las condiciones que se dan *in vivo*. No obstante, todos ellos tienen alguna falencia.

Para establecer relaciones sinérgicas, antagónicas o de indiferencia se han desarrollado modelos estáticos, basados en la concentración inhibitoria mínima (CIM), como el del tablero de ajedrez. Estos normalmente fracasan a la hora de producir resultados confiables. Sin llegar a los modelos complejos de concentraciones variables, la curva de muerte es un modelo dinámico que permite establecer la actividad bactericida o no de los antibióticos o sus combinaciones (Mueller y col., 2004). Su realización es tediosa, costosa y requiere de tiempos que a veces no se pueden esperar en la clínica, por eso pensamos que podría ser de utilidad:

2.4 Determinar cómo las distintas concentraciones inhibitorias mínimas de penicilina y aminoglucósidos, afectan la actividad sinérgica (por curva de muerte) de sus combinaciones.

Como ya se ha mencionado, el mecanismo más frecuente de resistencia a los aminoglucósidos en cocos gram positivos, es la producción de enzimas modificadoras (Shaw y Wright, 2000). Por esta razón se pretendió:

2.5 Investigar la relación entre la resistencia a los aminoglucósidos de las cepas de EGV en estudio y la presencia o ausencia de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos por identificación de los genes responsables.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MICROORGANISMOS

Se estudió la sensibilidad de 28 cepas de EGV aislados de muestras clínicas del Hospital Garrahan de la Ciudad de Buenos Aires (tabla 6). Para el control de las pruebas de sensibilidad se usaron las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 y *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

IDENTIFICACION

Para la identificación de los estreptococos se siguieron las pautas recomendadas en el Manual de Microbiología Clínica de la American Society for Microbiology (Ruoff, 2003). Básicamente se recurrió a un método inicial de seis pruebas para el reconocimiento del género *Streptococcus* : pruebas de pirrolidónilamidasa (PYR), leucinaminopeptidasa (LAP), bilis esculina (BE), desarrollo en CINa al 6,5% (CINa), formación de cadenas en caldo tioglicolato (cadenas) y sensibilidad a vancomicina (VAN) (ver tabla 1).

Para la identificación a nivel de grupos de especies se siguió el esquema de Ruoff modificado (Ruoff, 2002; Facklam, 2002). Este consistió en la utilización de las siguientes pruebas bioquímicas: esculina (ESC), manitol (MAN), sorbitol (SOR), arginina (ARG), Voges-Proskauer con revelado según Coblenz (VP) y urea de Christensen (UREA) (Tabla 7). Se complementó con el uso de métodos miniaturizados: API 20 Strep o Rapid ID 32 Strep (bio Mérieux, Marcy l'Etoile, Francia) según disponibilidad de uno u otro, los que se emplearon siguiendo las pautas del fabricante pero realizando la interpretación final según tablas.

**Tabla 6. Aislamientos de estreptococos del grupo viridans
provenientes del Hospital Garrahan de la Ciudad de Buenos Aires.**

Número	N° de aislamiento	Muestra clínica	Patología de base/ Enfermedad actual
1	4245	Hemocultivo	Endocarditis
2	647	Tej. necrótico	ND ¹
3	648	Hemocultivo	Neutropénico febril (LLA ²)
4	657	Hemocultivo	LMA ³
5	661	Hemocultivo	LLA
6	683	hemocultivo	Síndrome Febril (Cardiopatía)
7	687	Hemocultivo	ND
8	688	Hemocultivo	Neutropénico febril (LLA)
9	690	Hemocultivo	Aplasia medular
10	738	Hemocultivo	Diálisis
11	743	Hemocultivo	Síndrome de Turner
12	744	Hemocultivo	Neutropénico (LLA)
13	769	Hemocultivo	Cardiopatía
14	772	Urocultivo	IU ⁴
15	764	Urocultivo	IU
16	876	Urocultivo	IU
17	933-2	Urocultivo	IU
18	1039	Urocultivo	IU
19	43-2	Urocultivo	IU
20	763	Urocultivo	IU
21	141	Hemocultivo	Endocarditis
22	SR12	Biopsia hepática	LMA
23	SR65	Hemocultivo	Endocarditis
24	SR30	Cápsula peroné	Osteomielitis
25	SR74	Material purulento de maxilar	Hipoplasia maxilar con prótesis
26	139	Hemocultivo	ND
27	110	Partes blandas	Absceso cerebral
28	Br-1	Hemocultivo	ND

¹No determinada

²Leucemia linfoide aguda

³Leucemia mieloide aguda

⁴Infección urinaria

Tabla 7 (modificada de Ruoff, 2002 y Facklam, 2002). Especies y grupos de especies que conforman el grupo “viridans”

Especie	ARG	ESC	VP	MAN	SOR	UREA	Origen*
<i>GRUPO MUTANS</i>							
<i>S.mutans</i> **	-	+	+	+	+	-	H
<i>S.sobrinus</i>	-	+	+	+	+	-	H,R
<i>S.cricetus</i>	-	+	+	+	+	-	R,H
<i>S.downei</i>	-	+	+	+	+	-	M
<i>S.ferus</i>	-	+	+	+	+	-	R
<i>S.macaccae</i>	-	+	+	+	+	-	M
<i>S.ratti</i>	+	+	+	+	+	-	R,H
<i>S.hyovaginalis</i>	-	-	+	+	+	-	C
<i>GRUPO SALIVARIUS</i>							
<i>S.salivarius</i>	-	+	+	-	-	V	H
<i>S.vestibularis</i>	-	V	V	-	-	+	H
<i>S.infantarius</i>	-	V	+	-	-	-	H
<i>S.alactolyticus</i>	-	+	+	-	-	-	C,A
<i>S.hyointestinalis</i>	-	-	+	-	-	-	C
<i>S.thermophilus</i>	-	-	+	-	-	-	L
<i>GRUPO ANGINOSUS</i>							
<i>S.anginosus</i>	+	+	+	-	-	-	H
<i>S.constellatus</i>	+	+	+	-	-	-	H
<i>S.intermedius</i>	+	+	+	-	-	-	H
<i>GRUPO MITIS</i>							
<i>S.mitis</i>	-	-	-	-	V	-	H
<i>S.oralis</i>	-	V	-	-	-	-	H
<i>S.cristatus</i>	+	-	-	-	-	-	H
<i>S.infantis</i>	-	-	-	-	-	-	H
<i>S.peroris</i>	-	-	-	-	-	-	H
<i>S.orisratti</i>	-	+	-	-	-	-	R
<i>S.sanguinus</i>	+	+	-	-	V	-	H
<i>S.parasanguinus</i>	+	V	-	-	-	-	H
<i>S.gordonii</i>	+	+	-	-	V	-	H
<i>GRUPO BOVIS</i>							
<i>S.bovis</i>	-	+	+	-	-	-	B
<i>S.equinus</i>	-	+	+	-	-	-	E
<i>S.gallolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	H,K,B
<i>S.pasteurianus</i>	-	+	+	-	-	-	H,B
<i>S.lutetiensis</i>	-	+	+	-	-	-	H,B

*H = humano, R = rata, C = cerdo, L = lácteos, A = aves, B = bovino, E = equino, K = koala

** En negrita se destacan las especies que han sido aisladas a partir de infecciones en seres humanos.

3.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

3.2.1 PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR EL METODO DE DIFUSION

Se determinó la sensibilidad a penicilina, gentamicina, estreptomicina y kanamicina por el método de difusión en medio sólido según las normas del NCCLS (NCCLS 2000), utilizando agar Mueller-Hinton (Britania) con agregado de 5% de sangre ovina (Laboratorio Alfredo Gutiérrez SRL, Bs. As.). Los inóculos se realizaron a partir de cultivos en medio sólido de 24 hs de incubación, resuspendiendo colonias en caldo Mueller- Hinton . La concentración bacteriana se ajustó de modo de obtener una turbiedad equivalente a la del tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland. Las placas se incubaron 24 hs. a 35° C.

Se utilizaron discos comerciales de penicilina de 10µg, kanamicina de 120µg, estreptomicina de 300µg, gentamicina de 10 µg (Laboratorios Britania, Buenos Aires) y discos de gentamicina de 30µg, 60µg y 120µg preparados especialmente por Laboratorios Britania.

La interpretación de los resultados de las pruebas de penicilina se hizo utilizando el criterio de *screening* propuesto por Lopardo y col. (2000 b), quienes consideraron resistencia o sensibilidad intermedia para los halos menores de 28 mm, con discos de penicilina de 10 µg para EGV. Para kanamicina se usaron los puntos de corte propuestos para enterococos por Sahm y Torres (1988): sensibilidad para halos mayores de 10 mm y resistencia para halos de 6 mm. Para las pruebas con discos de estreptomicina de 300µg y de gentamicina de 120 µg se tomaron como guía las recomendaciones que el NCCLS propusiera para enterococos, es decir sensibilidad para halos mayores de 10 mm, sensibilidad intermedia para halos de 7 mm a 9 mm y resistencia para halos de 6 mm (NCCLS, 2002a).

3.2.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD POR EL METODO DE E-TEST

Las pruebas de Etest se realizaron según las indicaciones del fabricante, en agar Mueller-Hinton (Britania) con agregado de 5% de sangre ovina (Laboratorio Alfredo Gutiérrez SRL, Bs.As.). Los inóculos se realizaron a partir de cultivos en medio sólido de 18-24 hs de incubación, por resuspensión de las colonias en caldo Mueller-Hinton. La concentración bacteriana se ajustó de modo de obtener una turbiedad equivalente a la del tubo N° 0.5 de la escala de Mc Farland. Las placas se incubaron 24 hs. a 35 °C. Se usaron tiras de Etest (AB Biodisk, Solna, Suecia) para penicilina (0.006-32 µg/ml), estreptomicina (0.064-1024 µg/ml), amikacina (0.016-256 µg/ml) y gentamicina (0.016-256 µg/ml).

La lectura se efectuó estrictamente a las 24 horas y con la ayuda de una lupa para poder detectar colonias dentro de los halos de inhibición.

3.2.3 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD POR DILUCIÓN EN MEDIO LIQUIDO

3.2.3.a. MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó caldo Mueller-Hinton adicionado de 2% de sangre equina desfibrinada y estéril lisada por congelamiento y descongelamiento.

3.2.3.b PREPARACION DEL INOCULO:

A partir de un desarrollo en medio sólido de no más de 24 horas se preparó una suspensión en caldo Mueller Hinton con un número discreto de colonias, equiparando su turbiedad con la del patrón N° 0.5 de la escala de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml.).

3.2.3.c DILUCION DEL INOCULO

El inóculo bacteriano se diluyó 1/200 de modo que la concentración final en caldo Mueller-Hinton fuera de aproximadamente 5×10^5 ufc/ml.

Para controlar que la concentración del inóculo fuera la prevista, se efectuaron otras dos diluciones en solución fisiológica (primero 1/100 y luego 1/10), se tomaron alícuotas de 0,05 ml de ambos tubos y se depositaron en la superficie de placas de agar sangre. Luego se diseminaron con la ayuda de una espátula de Drigalski. A las 48 horas de incubación a 35°C, se efectuó el recuento de colonias crecidas en estas placas y se multiplicó por la inversa de la dilución efectuada. Los recuentos fueron valorados según las siguientes pautas: de los recuentos obtenidos en ambas placas se eligió aquél que diera valores intermedios entre 50 y 200 ufc por placa porque:

- si fuera menor de 50 el error estadístico sería considerable ya que $E = 2/\sqrt{n} \times 100$, donde n es el número de colonias contadas.
- si fuera mayor de 200 el error sistemático sería considerable (mayor dificultad en el recuento y superposición de colonias).

3.2.3.d PREPARACION DE LAS DILUCIONES DE LOS ANTIBIOTICOS

Se pesaron 16 mg de antibiótico, se disolvieron en 1 ml de solvente apropiado (agua para nuestros antibióticos) y se diluyeron para obtener una concentración de 16 µg/ml. Para obtener las diluciones deseadas en la batería de tubos se tomaron 10 tubos de vidrio estériles, se distribuyeron 0,5 ml del medio de cultivo en todos menos en el primero y se efectuaron diluciones a la mitad. Uno de los tubos (sin antibiótico) fue destinado a controlar la viabilidad del inóculo bacteriano y otro, que contenía sólo caldo, fue utilizado como control de esterilidad. El inóculo se agregó en cantidad equivalente al volumen de las diluciones que quedaron en los tubos (0,5 ml), comenzando desde el tubo control y continuando desde los tubos que contenían las concentraciones menores hacia los de mayor concentración del antibiótico. De este modo se evitó el arrastre de antibiótico hacia tubos de menor concentración.

3.2.3.f INCUBACION

La incubación se efectuó a 35° C , en atmósfera normal y durante 24 horas.

3.2.3.g LECTURA

La lectura se efectuó a ojo desnudo reconociendo la turbiedad de los tubos y determinando la concentración inhibitoria mínima (CIM), que se definió como la menor concentración de antibiótico que fue capaz de impedir el enturbiamiento del caldo. Se utilizaron los puntos de corte propuestos por el NCCLS para estreptococos diferentes de *Streptococcus pneumoniae* (NCCLS, 2002b):

Para penicilina: CIM \leq 0.12 $\mu\text{g/ml}$ sensibilidad, CIM entre 0.25 $\mu\text{g/ml}$ y 2.0 $\mu\text{g/ml}$ sensibilidad intermedia y CIM \geq 4 $\mu\text{g/ml}$ resistencia.

En el caso de los aminoglucósidos, sólo se registraron los valores de CIM sin efectuar ningún tipo de interpretación por cuanto no existen puntos de corte definidos para EGV

3.2.4 CURVAS DE MUERTE

La curva de muerte es un método apto para determinar la velocidad de muerte de un cultivo bacteriano en presencia de un antibiótico o de combinaciones de antibióticos. Este procedimiento ha sido pautado por el NCCLS en 1999 (NCCLS, 1999) .

3.2.4.a MEDIO DE CULTIVO

Para la determinación de las curvas de muerte como medio de cultivo se utilizó caldo Mueller-Hinton adicionado de 2% de sangre equina lisada por congelamiento y descongelamiento.

3.2.4.b PREPARACION DEL INÓCULO

El inóculo bacteriano se preparó a partir de un desarrollo en medio sólido de no más de 24 horas. La suspensión se efectuó en caldo Mueller-Hinton, ajustando la turbiedad a la del tubo 0.5 de la escala de Mc Farland. La concentración de bacterias colocada en los tubos fue controlada por recuento de colonias (aproximadamente 1×10^6 ufc/ ml.).

3.2.4.c PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LOS ANTIBIOTICOS

Para preparar las soluciones de los antimicrobianos se pesó una cantidad de droga sólida de modo de obtener una concentración 100 veces mayor que la que se deseaba utilizar, disolviéndola en 2 ml de agua. Luego se hizo una dilución 1:100, colocando 0.05 ml sobre 5 ml de cada uno de los tubos con caldo del ensayo. Se probaron los antibióticos a ensayar en las concentraciones deseadas por separado frente a la cepa en estudio y combinaciones de los mismos en las mismas concentraciones que por separado. La concentración utilizada del aminoglucósido fue dos o más veces menor que el valor de su CIM por tratarse de antibióticos de alto poder bactericida generalmente administrados en defecto, mientras que la penicilina se probó en concentraciones superiores e inferiores a su CIM.

Así en cada prueba se tuvieron al menos seis tubos: dos tubos con diferentes concentraciones de penicilina, un tubo con aminoglucósido, dos tubos con penicilina más aminoglucósido y un tubo para el control de crecimiento que sólo contenía inóculo bacteriano.

En cada tubo de ensayo con 5 ml de caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre equina lisada se agregaron las soluciones de los antibióticos y luego 0.05 ml del inóculo.

3.2.4.d INCUBACION

Los tubos se incubaron a 35 °C en atmósfera normal durante 24 horas.

3.2.4.e LECTURA

A las 0, 4 y 24 horas o bien a las 0, 3, 6 y 24 horas de incubación se tomaron muestras de cada uno de los tubos y se diluyeron 1/10, 1/100, 1/1000, etc.

De estos tubos se tomaron alícuotas de 0,05 ml y se depositaron en la superficie de placas de agar sangre. Luego se diseminaron con ayuda de una espátula de Drigalski. A las 48 horas de incubación a 35° en atmósfera al 5% de CO₂, se efectuó el recuento de colonias y se multiplicó por la dilución efectuada. Los recuentos obtenidos se valoraron de acuerdo a las pautas fijadas en el apartado 3.2.3.c.

3.2.4.f REPRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de las determinaciones de tiempo de muerte se volcaron en un gráfico de log ufc/ml vs. tiempo. El efecto sinérgico de la combinación de drogas se definió como la disminución en 2 log de ufc/ml respecto de la lograda por su componente más activo a las 24 horas y a la vez del inóculo original (tubo control a t = 0) (Moellering y col., 1979).

3.3 ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCOSIDOS

3.3.1 EXTRACCION DEL ADN

Para la extracción del ADN bacteriano por el método del isotiocianato de guanidinio se partió de un cultivo de 24hs en caldo cerebro corazón con agregado de 5% de sangre ovina. Se colocó 1.5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se agregó el resto del cultivo y se centrifugó nuevamente por 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 100 µl de buffer Tris-EDTA con vórtex. Se agregaron 10 µl de lisozima 50 mg/ml (concentración final 5 mg/ml) y 2 µl de mutanolisina (10U). Se dejó incubar 30 minutos en estufa a 37 °C y se agregaron 500 µl de isotiocianato de

guanidinio, incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Se colocó el tubo Eppendorf en hielo y se agregaron 250 μ l de acetato de amonio 7.5M, mezclando por inversión. Se dejó incubar 10 minutos sobre hielo. Se agregaron 500 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se mezcló por inversión hasta la desaparición de las dos fases. Se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm a 4° C. Se transfirieron aproximadamente 750 μ l del sobrenadante (fase acuosa) a otro tubo Eppendorf , cuidando de no tomar la fase inferior ni la interfase. Se agregaron 0.54 volúmenes de isopropanol y se mezcló por inversión. Se vio precipitar el ADN. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante, evitando remover el sedimento. Se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm durante 2 minutos a 4° C y se aspiró el resto de isopropanol.. Se agregaron 500 μ l de etanol al 70% mezclando por inversión y se centrifugó 2 minutos a 14.000 rpm a 4° C. Se descartó el sobrenadante evitando remover el sedimento. Se centrifugó nuevamente y se retiró el resto de etanol. Se dejó secar en estufa a 37° C para que se evaporara el etanol. Se resuspendió en 100 μ l de agua destilada estéril y se guardó en *freezer* a -20°C hasta su lectura.

3.3.2 CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Se realizaron diluciones 1:40 del DNA extraído y mediante un espectrofotómetro UV (Hitachi UV200) se leyó la densidad óptica (D.O.) a 260 nm y se determinó la pureza del DNA por la relación de densidades ópticas a 260nm y a 280nm (260/280). Para cuantificar el DNA se utilizó la siguiente fórmula:

$$D.O \times 1/40 \times 50$$

donde D.O. es la densidad óptica a 260nm, 1/40 es la dilución y 50 es la concentración en μ g/ml equivalente a 1 D.O. de DNA de doble cadena.

3.3.3 DETERMINACIÓN DE LOS GENES DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLUCÓSIDOS

La presencia de los genes *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* y *ant(6)-Ia*, fue determinada mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores de la región interna de la secuencia de los genes de resistencia (Shaw y col., 1993; Clark y col., 1999) (tabla 8). La amplificación se realizó en un ciclador Mastercycler/ Mastercycler gradiente Eppendorf, en un volumen final de 50µl que contenía 10µl de ADN (100ng/ml), 20 µl de cada cebador (10 pmol/µl), 5µl de cada desoxinucléotido trifosfato (200µM) (dNTPs) y 2.5 µl de enzima Taq (1.25U) DNA polimerasa en solución tampón (*buffer*) de amplificación 1X (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂). El protocolo de PCR consistió en un paso de desnaturalización de 2 minutos a 94°C seguidos por 35 ciclos de amplificación de un minuto a 94° C, 30 segundos a 55° C y 1 minuto de extensión a las 72° C. Esto fue seguido por un paso de extensión final de 10 minutos a 72° C.

Tabla 8 Determinantes de resistencia a los aminoglucósidos analizados y cebadores utilizados

Nombre del gen	Confiere resistencia a:	Secuencia 5'→3' de los cebadores	Tamaño del producto esperado	Nº de acceso al GenBank o referencia
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	gentamicina kanamicina tobramicina netilmicina amikacina	F:5'-CCAAGAGCAATAAGGGCATA-3' R:5'-CACTATTATAACCACTACCG-3'	220pb	M18086 Van de Klundert, 1993
<i>aph(3')-IIIa</i>	kanamicina	F:5'-GCCGATGTGGATTGCGAAAA-3' R:5'-GCTTGATCCCCAGTAAGTCA-3'	292pb	AF061336 Van de Klundert, 1993
<i>Ant(6)-Ia</i>	estreptomici na	F:5'-ACTGGCTTAATCAATTTG-3' R:5'-GCCTTTCGCCACCTCACCG-3'	597pb	AF330699 Clark, 1999

3.3.4 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para observar los productos de PCR obtenidos, se prepararon geles de agarosa al 1.2% en TBE 1X. Se disolvió la agarosa en un horno de microondas, se dejó enfriar hasta una temperatura de 55°C, se le agregó 20µl de bromuro de etidio (1mg/µl) y se vertió en un molde que contenía el peine. Una vez solidificado, se colocó dentro de una cuba de electroforesis Gibco BRL modelo H5 con fuente de poder EC 105, que contenía TBE 1X. Las muestras se prepararon con azul de bromofenol en una proporción 5:1 y se sembraron en las calles del gel junto con el marcador de peso molecular, 100pb (Gibco, BRL). Las condiciones de la corrida electroforética fueron de 5V/cm durante 40 minutos, hasta que el azul de bromofenol presente en las muestras alcanzara los 2/3 del gel. Las bandas de ADN fueron visualizadas y fotografiadas con luz UV, en un UVP Laborato EPI-CHEMI DARKROOM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Capítulo I. IDENTIFICACION DE LOS AISLAMIENTOS

Los aislamientos fueron identificados a nivel de grupo de especies empleando el método manual de seis pruebas, en algunos casos complementado con tiras de API, como se dijera en Materiales y Métodos (Tabla 9).

Tabla 9. Identificación a nivel de grupo de especies de los 28 aislamientos de EGV

Número	Nº de aislamiento	Grupo de especies
1	4245	mitis
2	647	mitis
3	648	mitis
4	657	mitis
5	661	mitis
6	683	mitis
7	687	mitis
8	688	mitis
9	690	mitis
10	738	mitis
11	743	mitis
12	744	mitis
13	769	mutans
14	772	anginosus
15	764	mitis
16	876	ND*
17	933-2	ND*
18	1039	anginosus
19	43-2	mitis
20	763	mitis
21	141	mitis
22	SR12	bovis
23	SR65	salivarius
24	SR30	mitis
25	SR74	anginosus
26	139	ND*
27	110	anginosus
28	Br-1	ND*

*ND = especie no determinada

En cuatro casos se arribó a resultados ambiguos, por lo que en la tabla se los indicó con la sigla ND (no determinado). El resto se consideró presumiblemente pertenecientes a uno u otro grupo por no haberse registrado ningún resultado discrepante en relación a la tabla (ver Materiales y Métodos).

Por tratarse del grupo de especies más frecuente y con mayor grado de resistencia antibiótica, este trabajo fue focalizado especialmente hacia aislamientos del grupo mitis.

Capítulo 2. DISTRIBUCION DE LA RESISTENCIA A PENICILINA

Introducción

Ya Alexander Fleming en sus primeros experimentos con la penicilina había observado un comportamiento dispar entre distintas cepas de estreptococos viridans cuando las enfrentaba con el antibiótico (Brock , 1996). Posteriormente, la eficacia de la penicilina en el tratamiento de las endocarditis infecciosas hizo perder el interés por investigar las relaciones entre los EGV y los antimicrobianos, hasta que a fines de la década del '70 se comenzaron a notar fallas terapéuticas debidas a CIMs de penicilina moderadamente elevadas (Parrillo,1979). Bourgault y col.(1979) advirtieron sobre la presencia de porcentajes anormalmente elevados de cepas no sensibles y más tarde otros investigadores se encargaron de corroborar aumentos no sólo en porcentaje sino también en niveles de CIM (Tabla 5) (Venditti y col.,1989; Doren y col. 1996; Lopardo y col., 2000).

En esta sección analizamos la sensibilidad a penicilina de la población bacteriana estudiada y verificamos el posible valor de las pruebas de difusión en la predicción de sensibilidad a penicilina en EGV, a pesar de que el número de aislamientos estudiados no nos permitiera extraer resultados estadísticamente significativos.

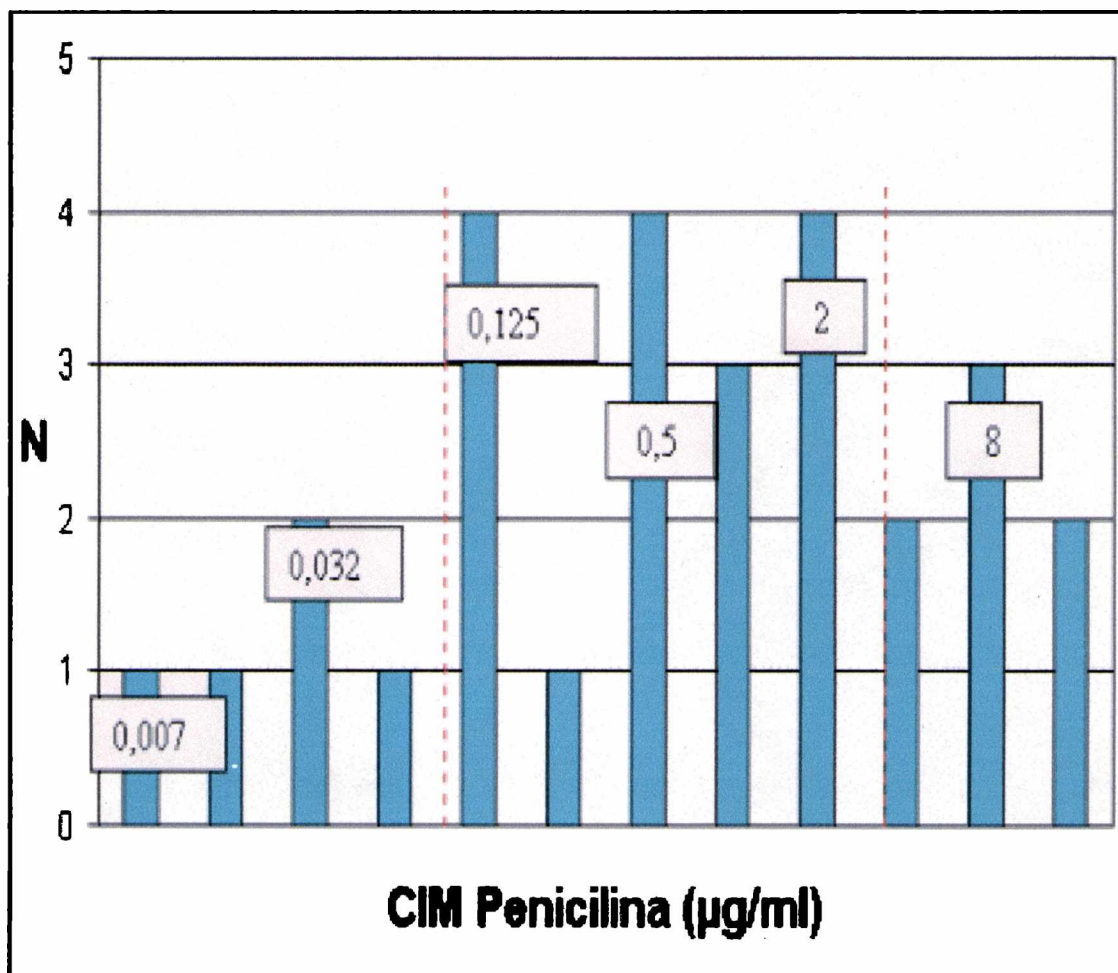
Resultados y Discusión

Se estudiaron 28 aislamientos no consecutivos de EGV previamente obtenidos, entre 1995 y 2002, a partir de muestras clínicas procesadas en el Servicio de Microbiología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" de Buenos Aires. Doce de ellos (42,8 %) presentaron sensibilidad intermedia a penicilina (CIM entre 0,25 y 2 µg/ml). Nueve aislamientos pertenecían al grupo mitis, uno al grupo anginosus y dos eran de grupo

indeterminado. Siete EGV (25,0 %) fueron resistentes [CIM $\geq 4 \mu\text{g/ml}$]; cuatro eran del grupo mitis, uno del grupo salivarius, uno del grupo bovis y el otro indeterminado. De los nueve (32,2%) sensibles [CIM $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$] cuatro eran del grupo mitis, tres del grupo anginosus, uno del grupo mutans y uno indeterminado . Todo esto suma un porcentaje de 67,8% de falta de sensibilidad frente a este antibiótico. (Tabla 10. Figura 3).

Este resultado es algo superior al obtenido por Doern y col. (1996) en Estados Unidos. Tanto en el caso de Doern como en nuestro trabajo, la mayoría de los aislamientos en estudio pertenecían al grupo “mitis” que, como se dijo anteriormente, es el grupo que presenta mayor tendencia a adquirir resistencia a la penicilina. En nuestro caso, además, es necesario destacar que nuestras cepas provenían de muestras clínicas obtenidas en un hospital que posee una alta población de pacientes oncológicos. Estos pacientes se hallan sometidos no sólo a quimioterapia sino a tratamientos reiterados con antibióticos, lo cual los pone en riesgo de adquirir infecciones por bacterias resistentes.

Figura 3. Curva de distribución de la sensibilidad a penicilina en 28 aislamientos de estreptococos del grupo viridans.



En ordenadas se grafica el número de aislamientos (N) que presentó cada una de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) indicadas en abscisas. Las líneas punteadas señalan los puntos de corte para sensibilidad ($CIM \leq 0,125 \mu\text{g/ml}$) y resistencia ($CIM \geq 4 \mu\text{g/ml}$) establecidos para estreptococos distintos de *Streptococcus pneumoniae* por el NCCLS (2000)

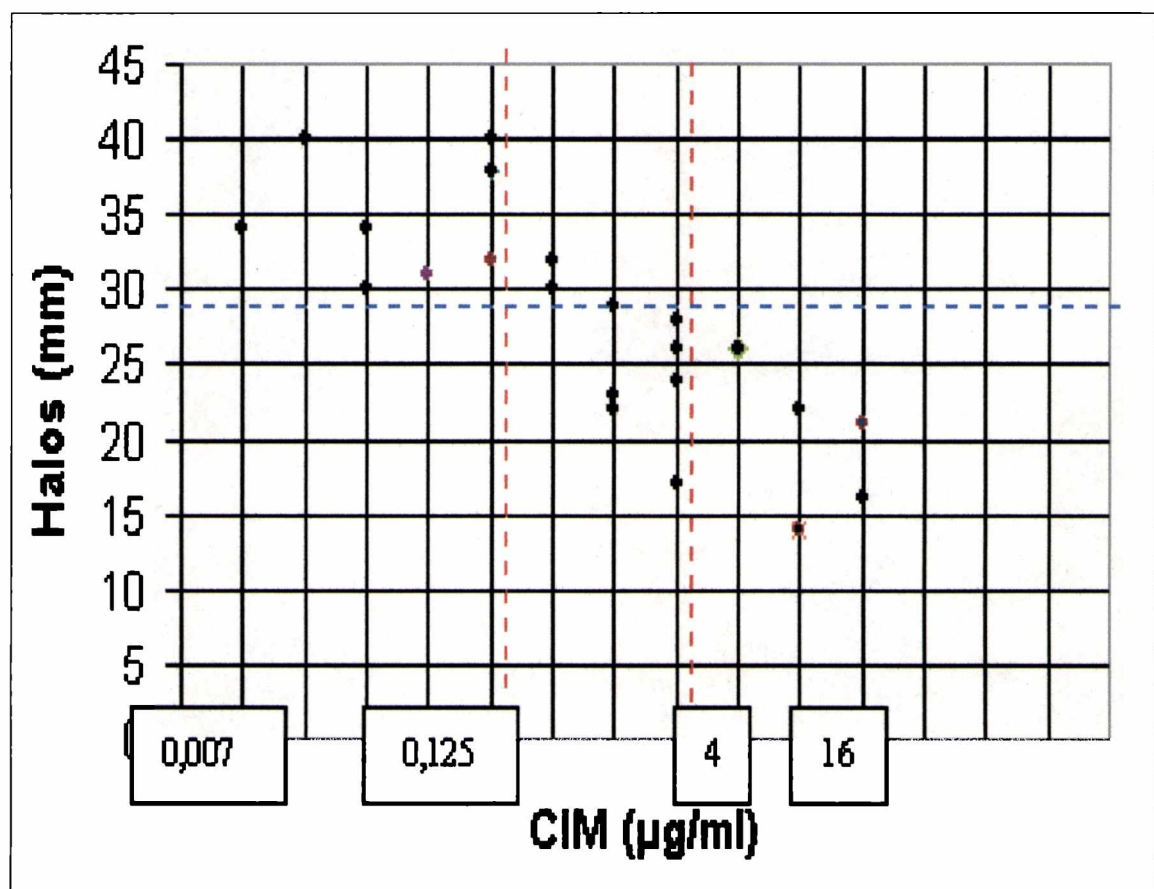
Tabla 10 . Valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) y diámetros de halos de inhibición (mm) obtenidos para penicilina con los 28 aislamientos de EGV por los métodos de Etest y difusión con discos.

Cepa	Método de difusión con Discos de penicilina de $10\mu\text{g}$ (halos de inhibición en mm)	Métodos de Etest y/o dilución CIM de penicilina en $\mu\text{g/ml}$
657	34	0.007
769	40	0.016
1039	30	0.024
772	34	0.03
43-2	31	0.064
764	35	0.094
SR74	32	0.094
139	40	0.094
4245	38	0.125
763	38	0.25
933-2	30	0.38
141	32	0.5
647	14	0.5
648	24	0.5
683	23	0.75
687	22	0.75
661	29	1.0
SR30	24	1.5
Br-1	17	1.5
744	28	2.0
110	26	2.0
743	26	3.0
SR65	26	3.0
688	22	6.0
738	14	6.0
690	14	8.0
876	16	16
SR12	21	16

En la Tabla 10 se pueden ver los valores pareados de sensibilidad a penicilina obtenidos por Etest y/o dilución, y por el método de difusión para los 28 aislamientos. El diagrama de

dispersión resultante (Figura 4) muestra gráficamente la correlación entre los dos métodos (cc: -0.785 por el método no paramétrico de Spearman con $p < 0.01$).

Figura 4. Diagrama de dispersión de valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) de penicilina obtenidos por Etest (en abcisas) y diámetros de los halos de inhibición obtenidos por difusión con discos (en ordenadas), para 28 aislamientos clínicos de estreptococos del grupo viridans.



Nota: Las líneas punteadas verticales señalan los puntos de corte de NCCLS (2002) para pruebas de dilución. La línea punteada horizontal es la que mejor discrimina, por el método de difusión, entre aislamientos sensibles y no sensibles a penicilina.

Dicho diagrama mostró que la mayoría de las cepas de EGV resistentes o con sensibilidad intermedia presentaba halos de inhibición menores a 28 mm. Este resultado coincide con el hallado por Lopardo y col. (2000 b). Ensayado con un mayor número de cepas podría permitir establecer algún punto de corte para la prueba de difusión que pudiera ser de utilidad para recomendar o no el uso de penicilina como tratamiento de infecciones causadas por EGV .

Capítulo 3. DISTRIBUCION DE LA RESISTENCIA A GENTAMICINA Y CORRELACION DE LAS PRUEBAS DE DIFUSION CON DISCOS CON EL METODO DE ETEST.

Introducción

La combinación de penicilina, ampicilina o vancomicina con aminoglucósidos es el tratamiento de elección para las endocarditis enterocócicas y el tratamiento recomendado para las endocarditis producidas por EGV con sensibilidad intermedia o resistencia a penicilina (Graham y Gould, 2002). La resistencia a altos niveles de aminoglucósidos en enterococos es un tema preocupante por su magnitud y por ello suficientemente estudiado (Murray, 1990). En EGV existen muy pocos trabajos que mencionen la falta de sinergia entre penicilina y aminoglucósidos por resistencia enzimática a estos últimos (Farber y col. 1983, Potgieter y col. 1992)

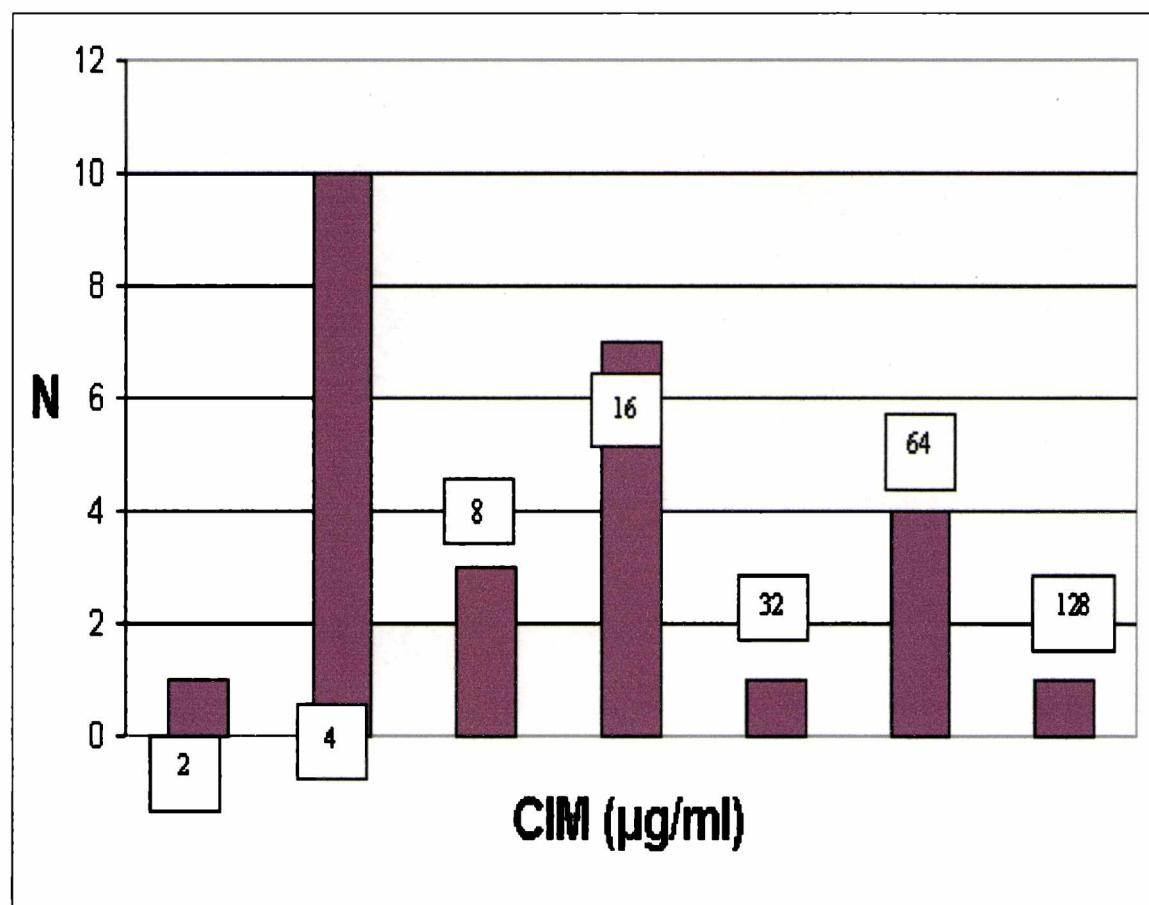
En este trabajo buscamos la presencia de resistencia de alto nivel a aminoglucósidos y además, teniendo en cuenta los resultados de Potgieter y col (1992), seleccionamos aquellas cepas que presentaban mayores valores de CIM para observar (1) la posible falta de sinergia por curvas de muerte y (2) la presencia de enzimas inactivantes de aminoglucósidos.

Resultados y discusión

Se determinó la CIM de gentamicina para los 28 aislamientos por Etest. En el gráfico de distribución de estos resultados (Figura 5) puede observarse un comportamiento trimodal que nos llevó a seleccionar aislamientos con $CIM > 16\mu\text{g/ml}$ como prioritarios para

efectuar un estudio que pusiera en evidencia las enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

Figura 5. Distribución de la resistencia a gentamicina en 28 aislamientos de estreptococos del grupo viridans.



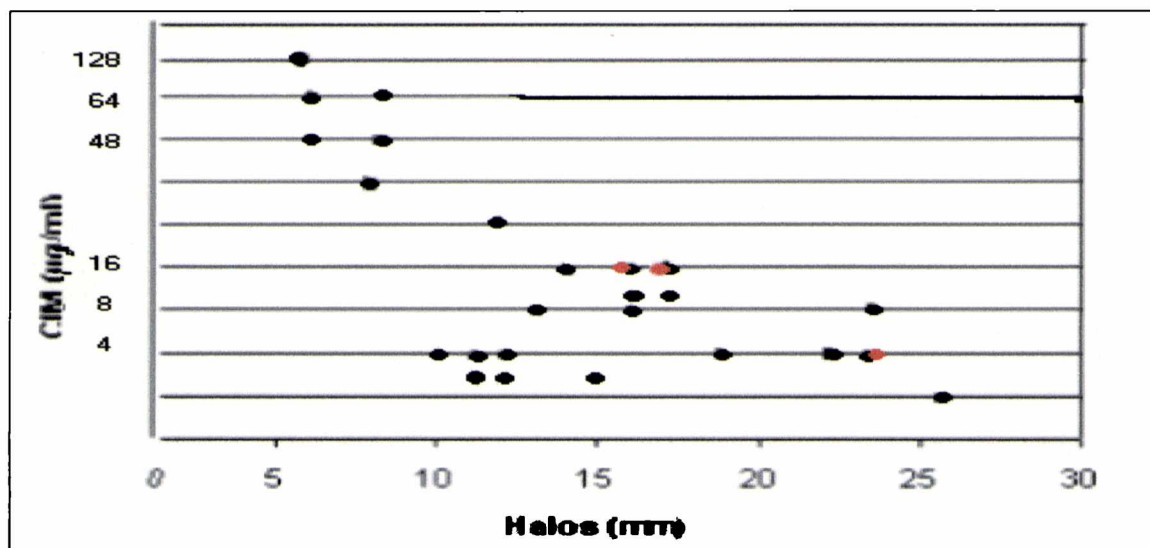
El NCCLS (2002a) propuso considerar que la resistencia de alto nivel a gentamicina para enterococos podía ser detectada con el método de difusión utilizando discos de gentamicina de 120 µg, cuando presentaran halos de inhibición iguales a 6 mm, pero no hizo ninguna consideración respecto de los EGV. En el presente trabajo se estudió la correlación entre las

pruebas de sensibilidad por difusión con discos de 10, 30, 60 y 120 μg de gentamicina y la CIM obtenida por Etest para ese antibiótico (Tabla 11 y Figuras 6-9).

Tabla 11. Correlación entre los métodos de Etest y difusión con discos de 10, 30, 60 y 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina (GEN)

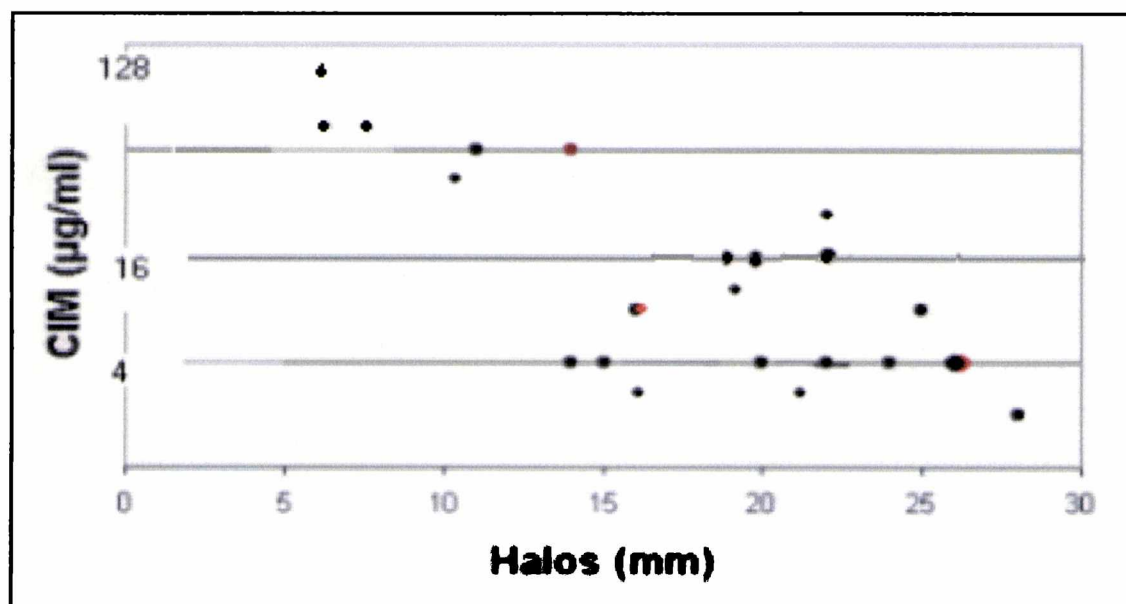
Nº de aislamiento	GEN 10 μg (mm)	GEN 30 μg (mm)	GEN 60 μg (mm)	GEN 120 μg (mm)	CIM GEN ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
SR12	12	22	25	29	24
SR30	17	19	26	30	12
SR65	12	16	25	30	3
SR74	13	21	23	32	3
BR	15	17	19	21	3
110	2	24	26	28	4
139	13	16	17	22	8
141	6	6	6	6	128
43-2	14	17	18	21	16
647	26	28	35	37	2
657	23	26	28	30	4
661	11	14	21	26	4
683	16	21	22	24	16
688	8	14	18	20	48
690	12	15	18	22	4
738	8	7	8	16	64
743	16	20	23	25	16
744	6	6	19	13	64
763	6	11	8	16	48
764	16	16	20	22	8
769	16	17	20	24	12
772	10	20	22	25	4
876	9	10	12	16	32
933-2	17	19	21	23	16
1039	23	26	26	29	4
687	18	22	24	28	4
4245	17	22	30	32	16
648	23	25	27	31	8

Figura 6. Correlación entre los métodos de Etest y difusión con discos de 10 µg/ml de gentamicina



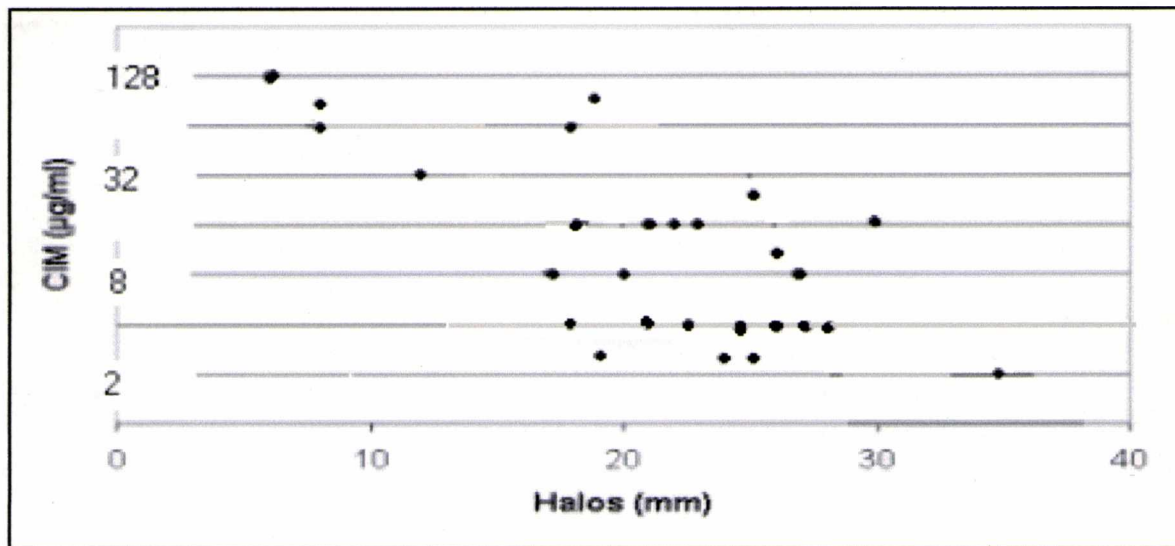
coeficiente de correlación: - 0.531

Figura 7. Correlación entre los métodos de Etest y difusión con discos de 30 µg/ml de gentamicina



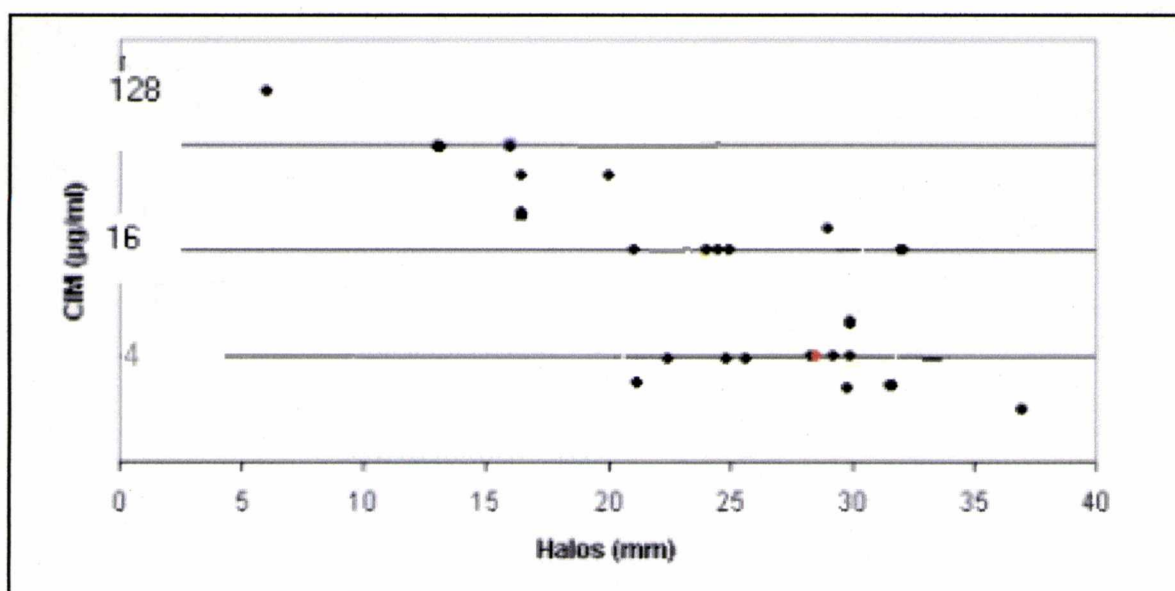
coeficiente de correlación: - 0.542

Figura 8. Correlación entre los métodos de Etest y difusión con discos de 60 µg/ml de gentamicina .



coeficiente de correlación: - 0.541

Figura 9. Correlación entre los métodos de Etest y difusión con discos de 120 µg/ml de gentamicina



coeficiente de correlación: - 0.640

En todos los casos existió una buena correlación entre los métodos. No obstante, con el uso de los discos de gentamicina de 120 μg se encontró la mejor correlación por el método no paramétrico de Spearman ($r_s = -0.640$) con una $p < 0.01$ (Figura 9). En la observación de la distribución, se destacó el mayor valor de CIM de gentamicina (128 $\mu\text{g/ml}$), para el cual correspondía un diámetro de halo de inhibición de 6 mm (cepa 141). Probablemente habríamos observado el mismo resultado para la cepa 43-2 si no hubiera presentado tan marcado comportamiento autolítico, como se explicará más adelante.

Capítulo 4. INFLUENCIA DE LA CIM DE PENICILINA Y DE DISTINTOS AMINOGLUCÓSIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD SINERGICA DE SUS COMBINACIONES.

Introducción

En enterococos quedó claramente establecido que la resistencia a altos niveles de aminoglucósidos y la utilización de penicilina en concentraciones inferiores a su CIM impiden la actividad sinérgica de estos antibióticos (Lopardo.1995). La sinergia en enterococos estaría condicionada por la facilitación del ingreso de los aminoglucósidos a la célula bacteriana por la desestabilización de la integridad de la pared celular mediada por la penicilina u otros inhibidores de la síntesis de la misma (Moellering, 1971) Se observaron diferencias en este aspecto en estudios realizados con EGV que harían pensar que el comportamiento de estas bacterias podría llegar a diferir respecto de lo observado en enterococos. Por eso se ensayaron por el método de curva de muerte algunas cepas seleccionadas por sus características diferenciales de sensibilidad, en distintas condiciones de trabajo.

Resultados y discusión

Se seleccionaron siete aislamientos (seis del grupo mitis y uno, el 876, de grupo indeterminado) cuyas características se describen en la tabla 12. Los resultados de CIM previamente obtenidos por Etest fueron confirmados por el método de dilución en medio líquido.

Tabla 12. Sensibilidad a penicilina y aminoglucósidos (CIM en $\mu\text{g/ml}$ y halos de inhibición en mm) de siete aislamientos de EGV seleccionados para ensayos de sinergia

Cepa	Dilución P ¹ ($\mu\text{g/ml}$)	Disco P (mm)	Ettest G ² ($\mu\text{g/ml}$)	Disco G 10 μg (mm)	Disco G 30 μg (mm)	Disco G 60 μg (mm)	Disco G 120 μg (mm)	Disco S ³ 300 μg (mm)	Disco K ⁴ 120 μg (mm)
141	0.5	32	128	6	6	6	6	6	6
688	8	22	48	8	14	18	20	24	10
738	8	14	64	8	7	8	16	21	13
744	2	28	64	6	6	19	13	21	10
763	0.25	38	48	6	11	8	16	26	10
43-2	0.064	31	16	14	17	18	22	21	17
876	16	16	32	9	10	12	16	16	14

¹P: penicilina

²G: gentamicina

³S: estreptomina

⁴K: kanamicina

Frente a estas cepas se probaron combinaciones de los antibióticos penicilina y gentamicina, con concentraciones de penicilina superiores e inferiores a sus CIM.

En ningún caso se observó sinergia cuando se utilizaron concentraciones de penicilina por debajo del valor de su CIM.

Al usar concentraciones de penicilina superiores a la CIM se observó sinergia de la combinación penicilina + gentamicina frente a las cepas 688, 876, 744, 763 y 738 (figuras 10-19) pero no para las cepas 43-2 y 141.

Frente a la cepa 43-2 la combinación de penicilina más gentamicina no mostró sinergia a pesar de presentar valores bajos de CIM tanto de penicilina (0,0064 $\mu\text{g/ml}$) como de gentamicina (16 $\mu\text{g/ml}$) (Figuras 20 y 21).

La cepa 141 presentó una resistencia moderada a gentamicina (CIM = 128 $\mu\text{g/ml}$), a kanamicina (CIM = 256 $\mu\text{g/ml}$), y a amikacina (CIM = 32 $\mu\text{g/ml}$) y una resistencia de altísimo nivel a estreptomocina (CIM > 20.000 $\mu\text{g/ml}$, por el método de dilución en medio líquido). Frente a esta cepa ninguna de las combinaciones penicilina + aminoglucósido fue sinérgica (figuras 22-24).

Entre las 5 cepas restantes de EGV seleccionadas para realizar curvas de muerte había una cepa sensible (CIM < 0.25 $\mu\text{g/ml}$), una con sensibilidad intermedia (CIM 0.25-2.0 $\mu\text{g/ml}$) y tres resistentes (CIM > 4 $\mu\text{g/ml}$) a penicilina. Estos aislamientos presentaron CIM de gentamicina entre 32 y 64 $\mu\text{g/ml}$. En estas cinco cepas se observó sinergia de la combinación penicilina + gentamicina cuando la concentración utilizada de penicilina fue igual o mayor a la CIM. Esta sinergia desapareció cuando se usaron concentraciones de penicilina inferiores a la CIM.

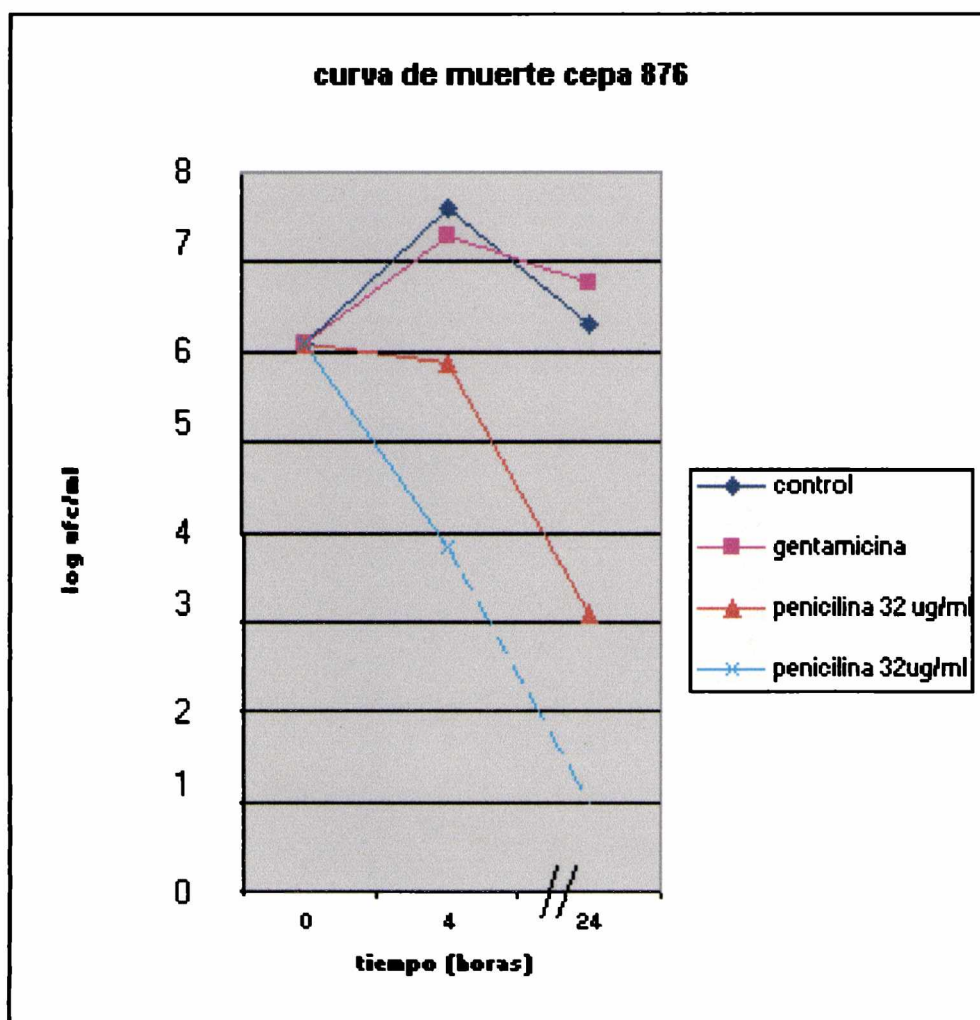
Estos resultados coinciden con los obtenidos por Moellering y col. (1979) y por Lopardo y col. (1995) para enterococos.

Los casos particulares de la falta de sinergia en las cepas 43-2 y 141 se explican por la presencia de enzimas inactivantes de aminoglucósidos (ver capítulo 5) y de una posible modificación del sitio de acción de estreptomocina en el caso de la 141. En esta cepa, que presentó una CIM de 128 $\mu\text{g/ml}$ a gentamicina, no se verificó sinergia con la combinación de antibióticos, ni siquiera utilizando una concentración de penicilina superior a su CIM. De hecho, esta cepa fue la causa de EI en un paciente que falleció por falla del tratamiento

con la combinación penicilina-gentamicina. El mismo fenómeno encontraron Farber y col. (1983) y Potgieter y col. (1992) trabajando también con EGV.

Como ya se dijo, frente a la cepa 43-2 no se observó sinergia de la combinación a pesar de presentar una CIM de gentamicina de $16\mu\text{g/ml}$ y de ser sensible a penicilina (CIM: $0.064\mu\text{g/ml}$). Sin embargo se detectó la enzima bifuncional activa frente a gentamicina (ver capítulo 5) hecho que justificó la falta de sinergia. Cabe destacar que, como puede apreciarse en las curvas de muerte, la cepa 43-2 presentó un marcado comportamiento autolítico que podría justificar sus bajos valores de CIM.

Figura 10. Curva de muerte de la cepa 876 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



Nota: la línea punteada se debe a que no fue posible hacer el recuento de colonias a las 24 horas para el caso de la combinación penicilina más gentamicina por hallarse por debajo del nivel de detección (10^2 ufc/ml)

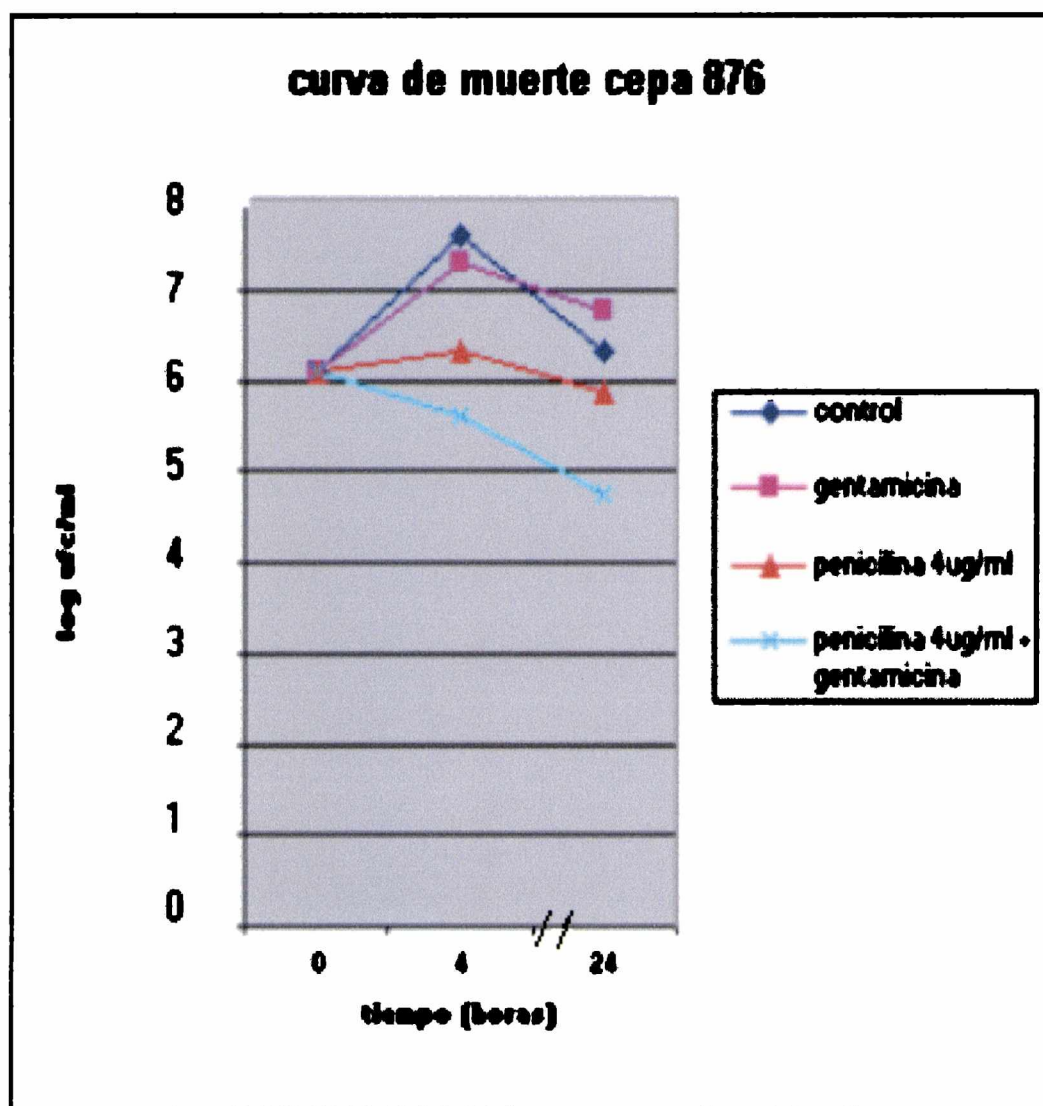
CIM penicilina: 16 $\mu\text{g/ml}$

CIM gentamicina: 32 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de penicilina utilizada: 32 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de gentamicina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Figura 11. Curva de muerte de la cepa 876 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina inferior a la CIM.



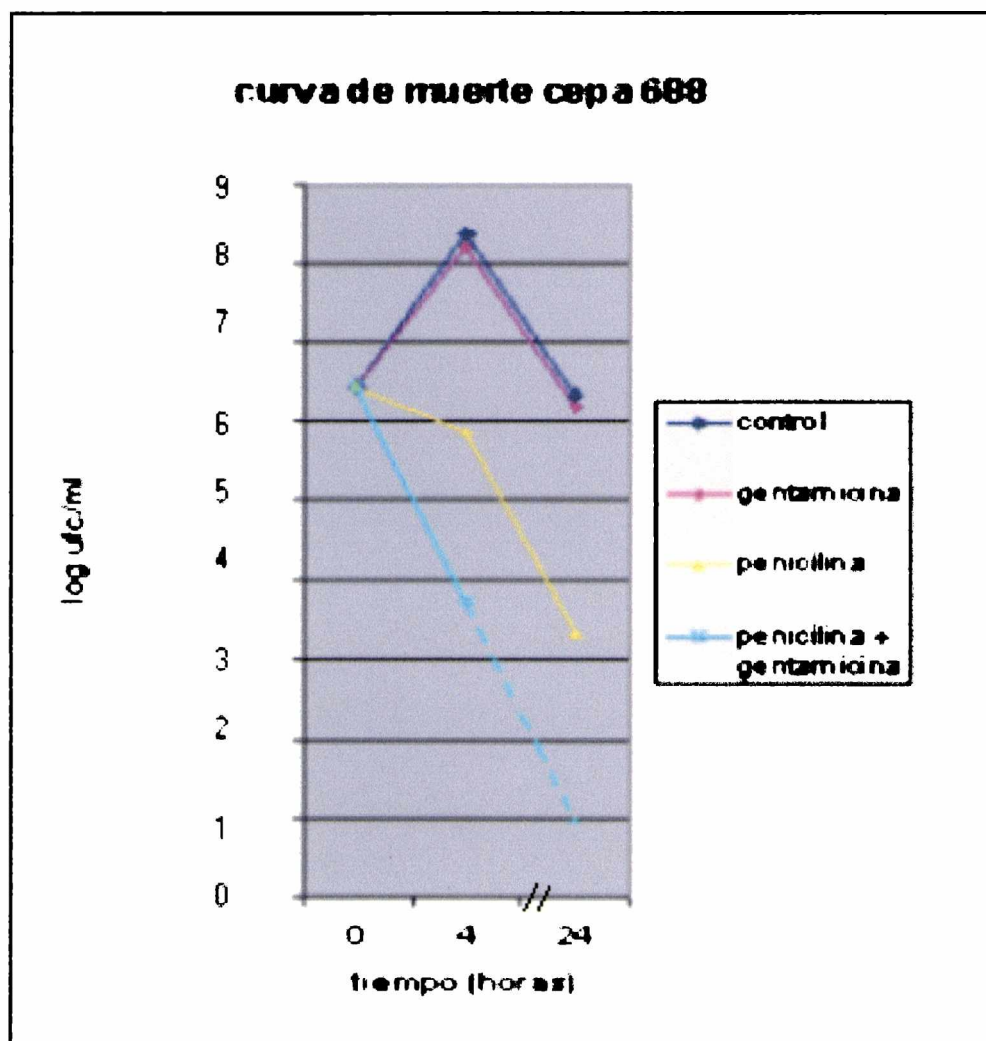
CIM penicilina: 16 $\mu\text{g/ml}$

CIM gentamicina: 32 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de penicilina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de gentamicina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Figura 12. Curva de muerte de la cepa 688 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



Nota: la línea punteada se debe a que no fue posible hacer el recuento de colonias a las 24 horas para el caso de la combinación penicilina más gentamicina por hallarse por debajo del nivel de detección (10^2 ufc/ml)

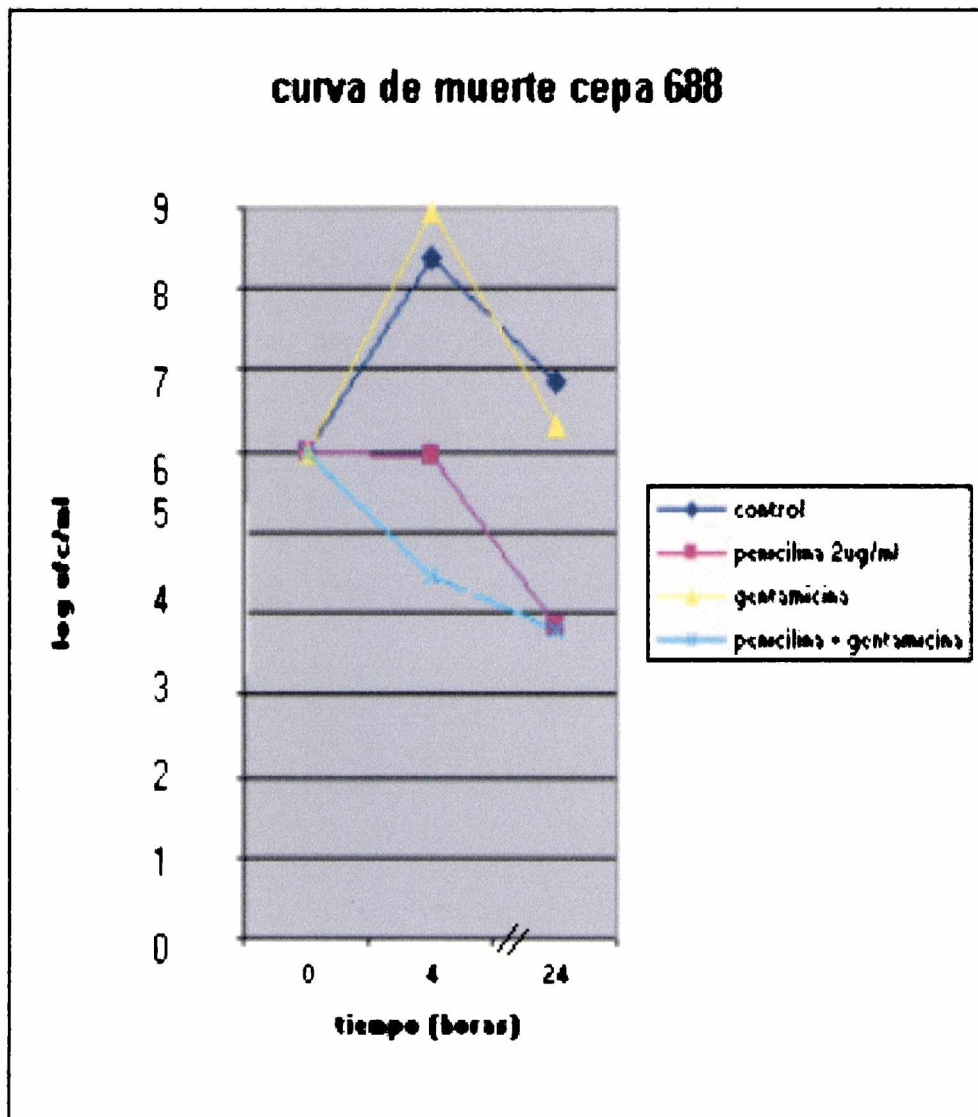
CIM penicilina: 6 μ g/ml

CIM gentamicina: 48 μ g/ml

Concentración de penicilina utilizada: 16 μ g/ml

Concentración de gentamicina utilizada: 5 μ g/ml

Figura 13. Curva de muerte de la cepa 688 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina inferior a la CIM.



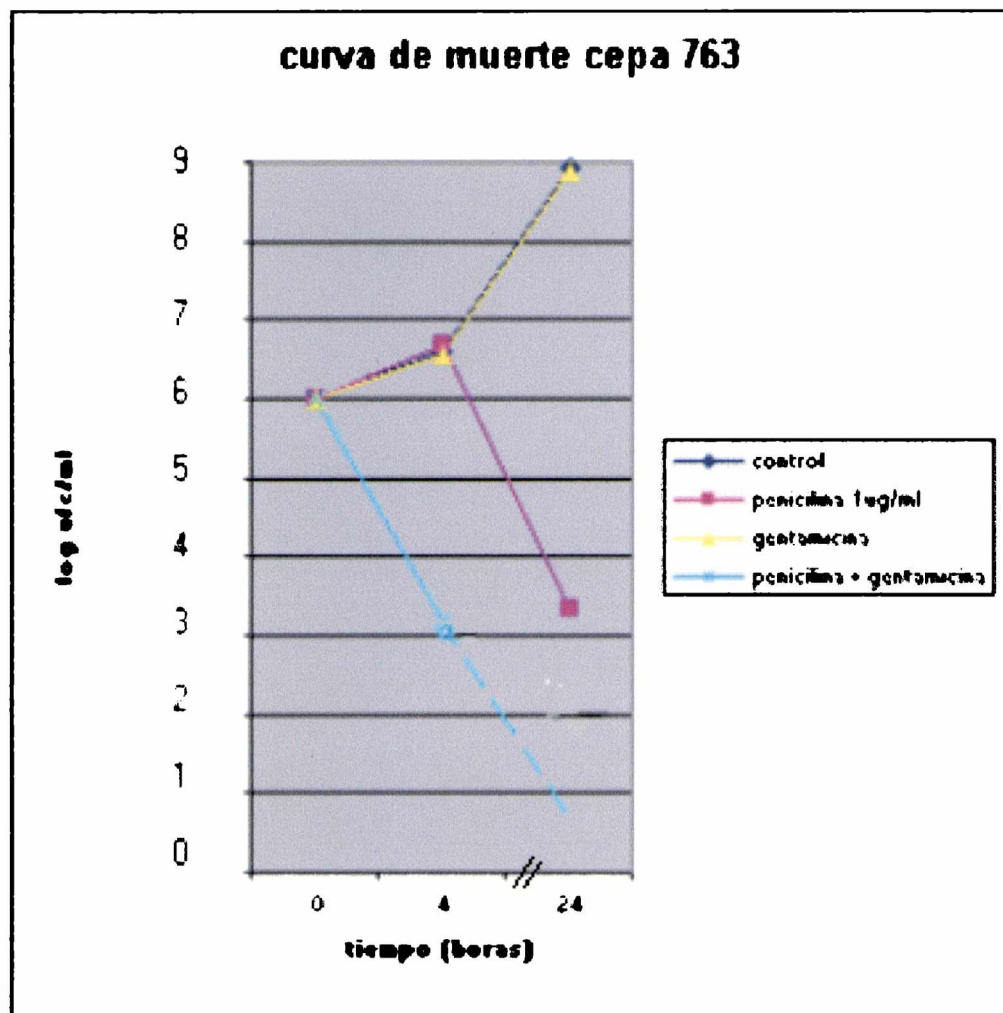
CIM penicilina: 6 µg/ml

CIM gentamicina: 48 µg/ml

Concentración de penicilina utilizada: 2 µg/ml

Concentración de gentamicina utilizada: 5 µg/ml

Figura 14. Curva de muerte de la cepa 763 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



Nota: la línea punteada se debe a que no fue posible hacer el recuento de colonias a las 24 horas para el caso de la combinación penicilina más gentamicina por hallarse por debajo del nivel de detección (10^2 ufc/ml)

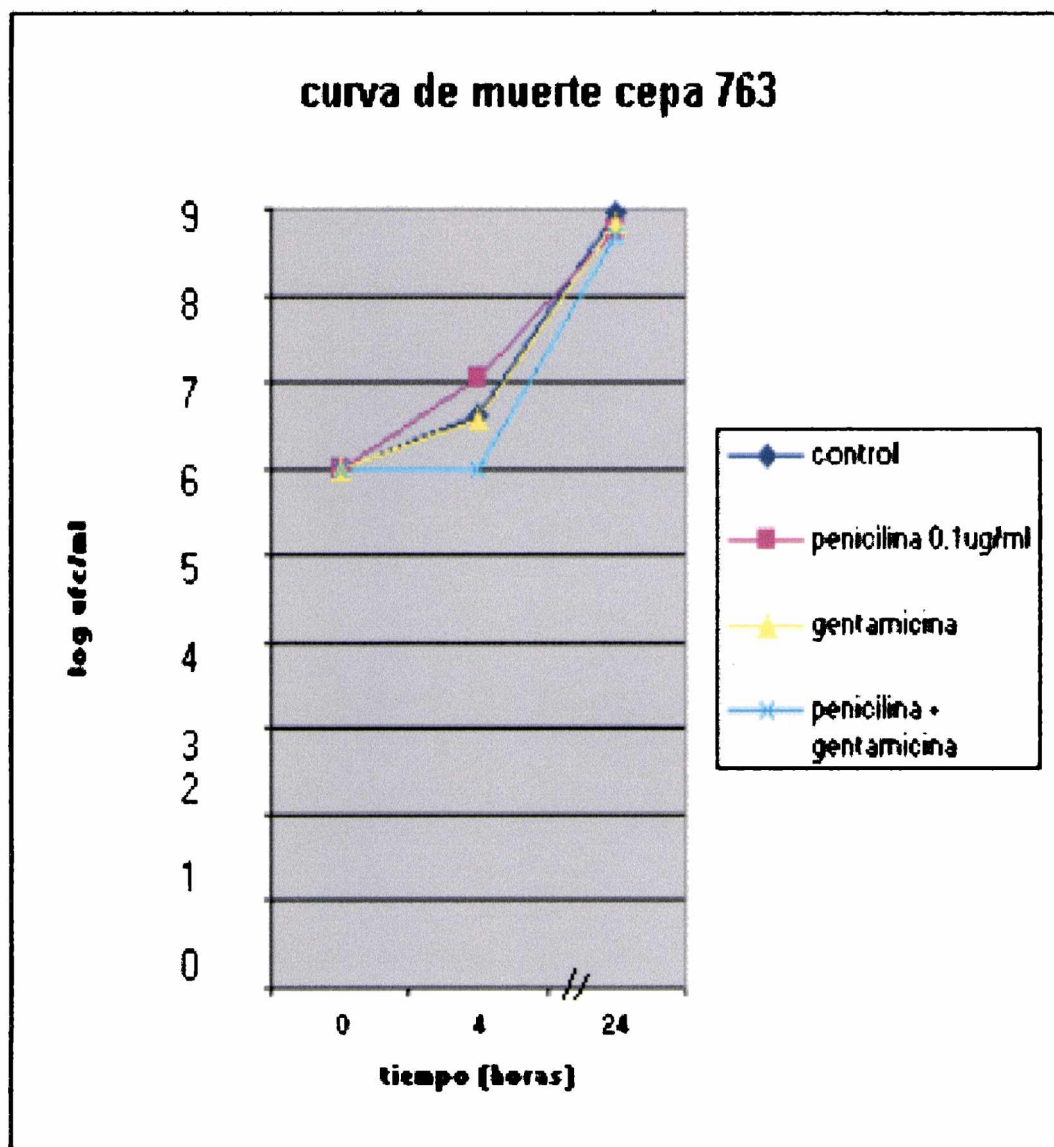
CIM penicilina: 0.25 µg/ml

CIM gentamicina: 48 µg/ml

Concentración de penicilina utilizada: 1 µg/ml

Concentración de gentamicina utilizada: 4 µg/ml

Figura 15. Curva de muerte de la cepa 763 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina inferior a la CIM.



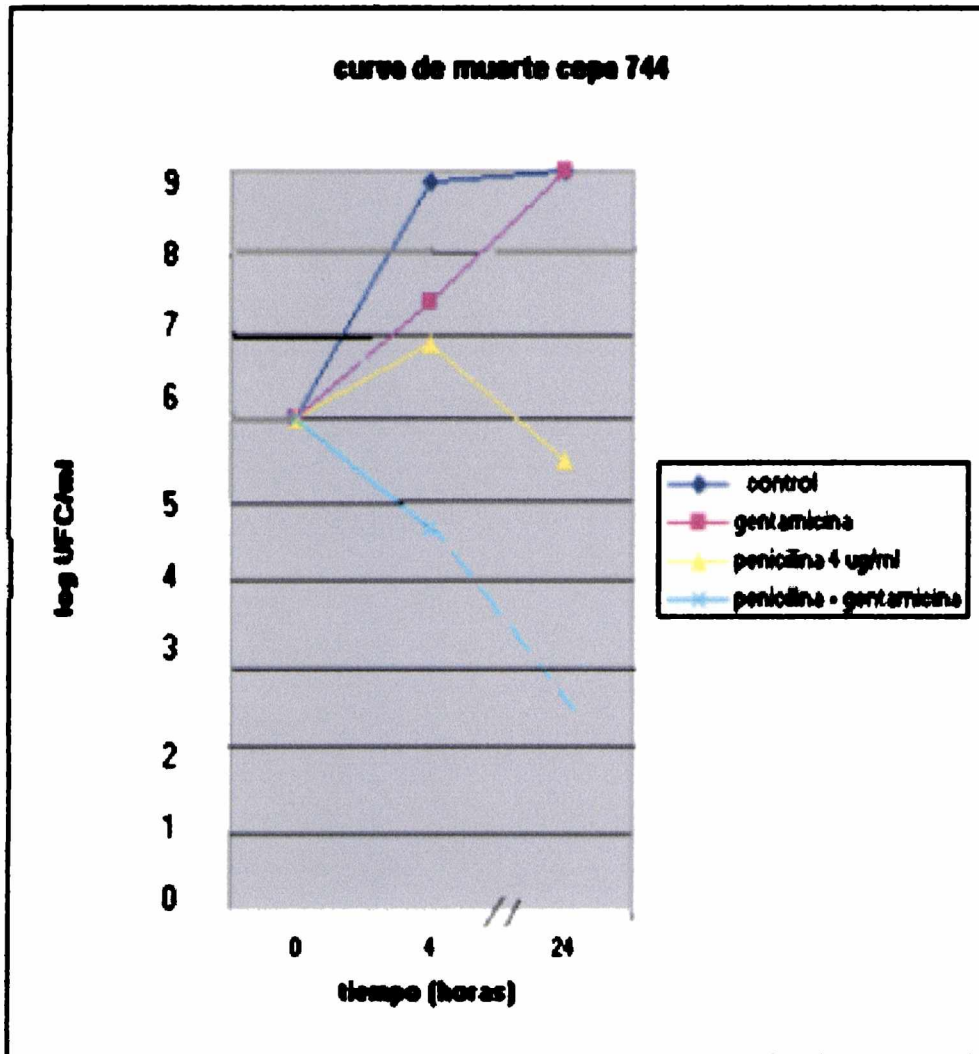
CIM penicilina: 0.25 µg/ml

CIM gentamicina: 48 µg/ml

Concentración de penicilina utilizada: 0.1 µg/ml

Concentración de gentamicina utilizada: 4 µg/ml

Figura 16. Curva de muerte de la cepa 744 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



Nota: la línea punteada se debe a que no fue posible hacer el recuento de colonias a las 24 horas para el caso de la combinación penicilina más gentamicina por hallarse por debajo del nivel de detección (10² ufc/ml)

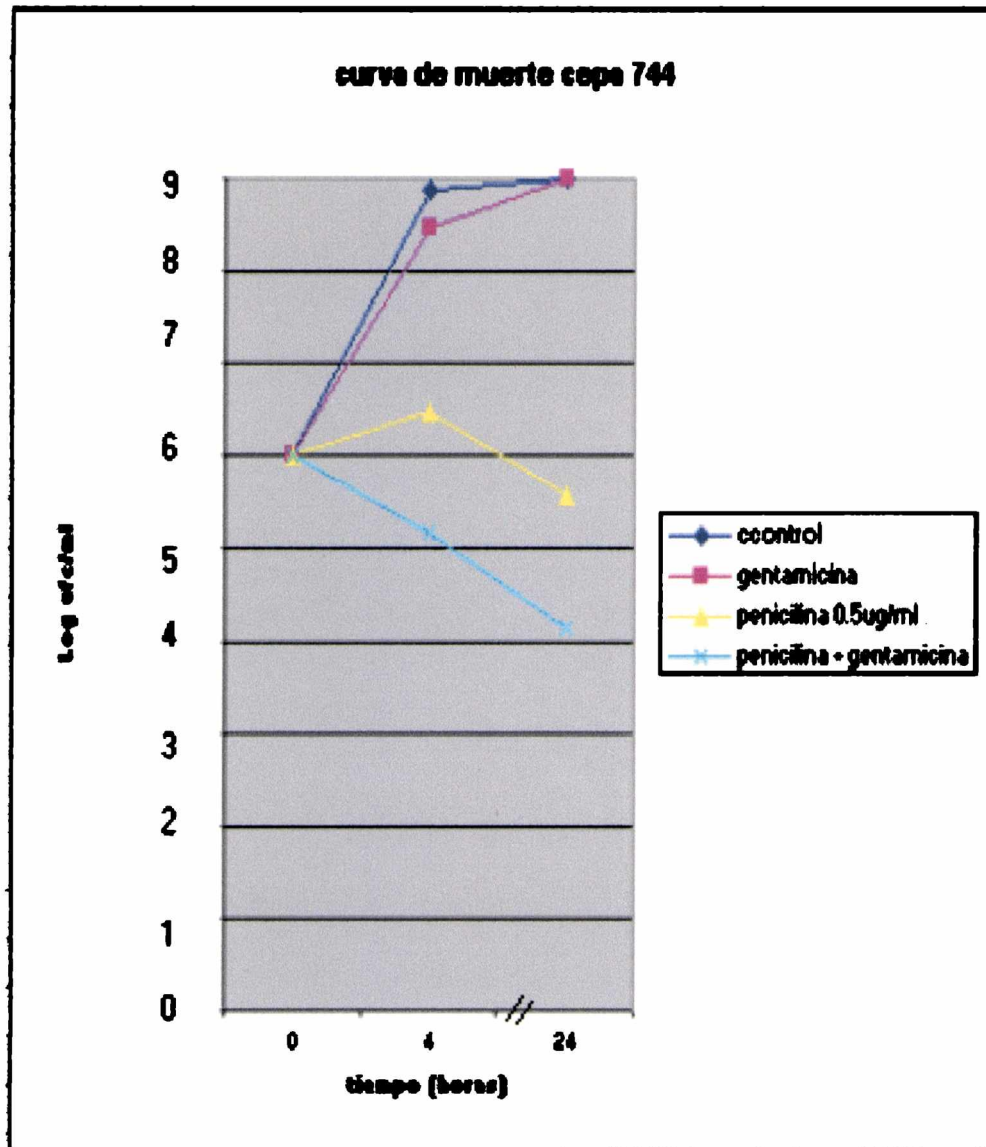
CIM penicilina: 2 µg/ml

CIM gentamicina: 64 µg/ml

Concentración de penicilina utilizada: 4 µg/ml

Concentración de gentamicina utilizada: 4 µg/ml

Figura 17. Curva de muerte de la cepa 744 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina inferior a la CIM.



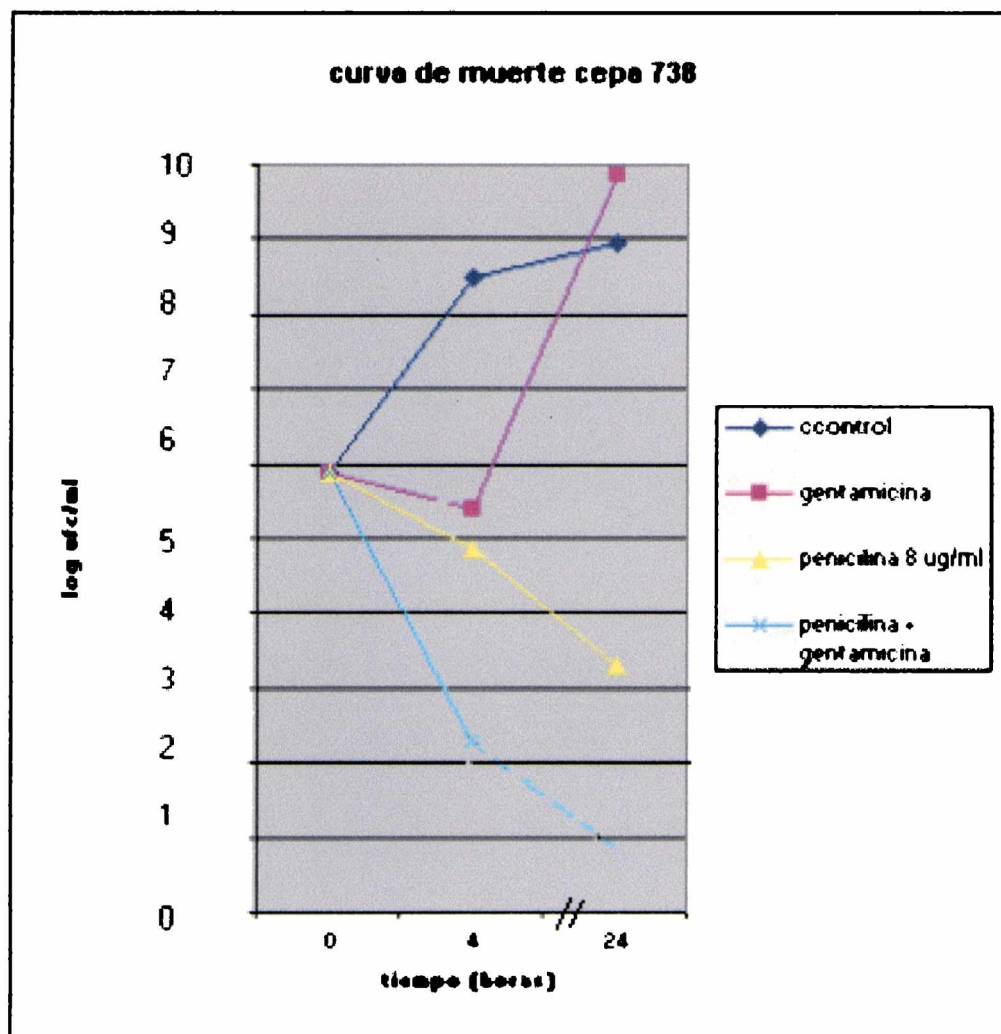
CIM penicilina: 2 µg/ml

CIM gentamicina: 64 µg/ml

Concentración de penicilina utilizada: 0.5 µg/ml

Concentración de gentamicina utilizada: 4 µg/ml

Figura 18. Curva de muerte de la cepa 738 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



Nota: la línea punteada se debe a que no fue posible hacer el recuento de colonias a las 24 horas para el caso de la combinación penicilina más gentamicina por hallarse por debajo del nivel de detección (10^2 ufc/ml)

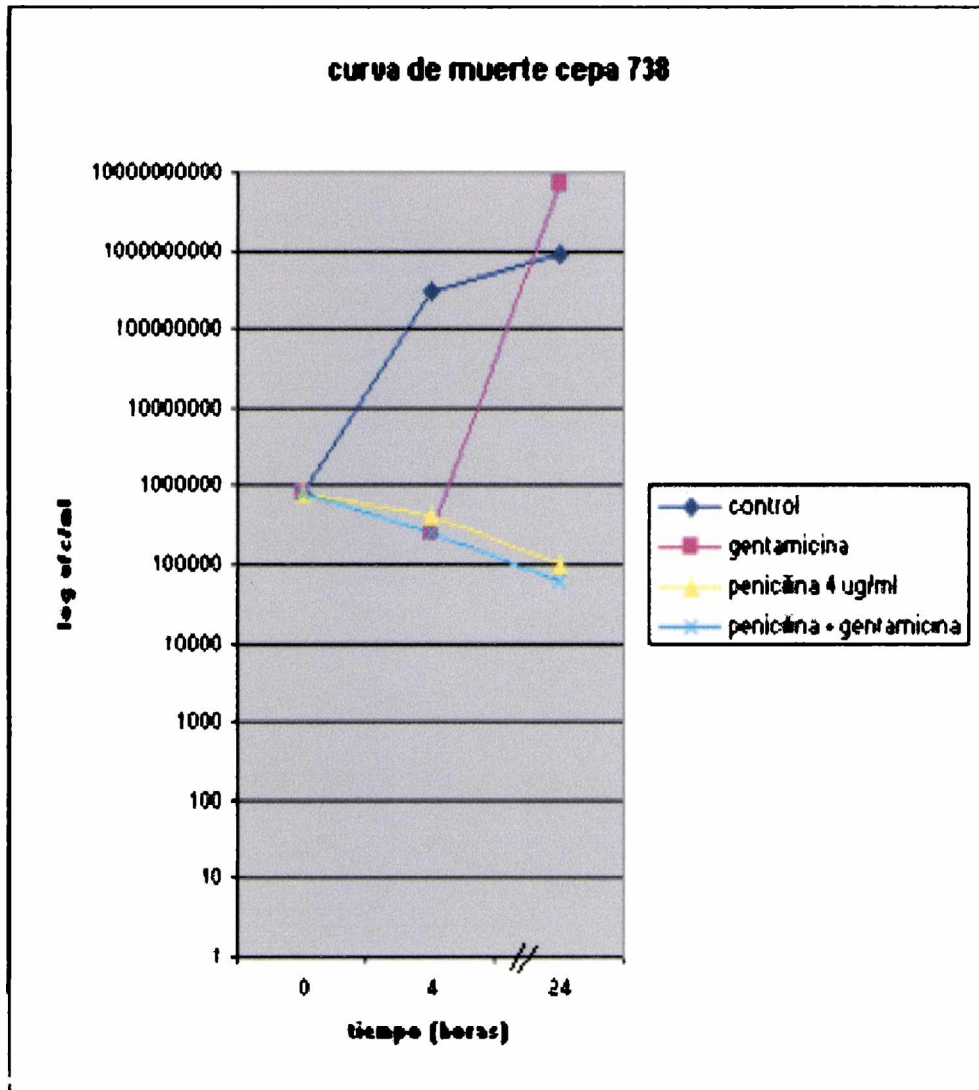
CIM penicilina: 6 μ g/ml

CIM gentamicina: 64 μ g/ml

Concentración de penicilina utilizada: 8 μ g/ml

Concentración de gentamicina utilizada: 4 μ g/ml

Figura 19. Curva de muerte de la cepa 738 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina inferior a la CIM.



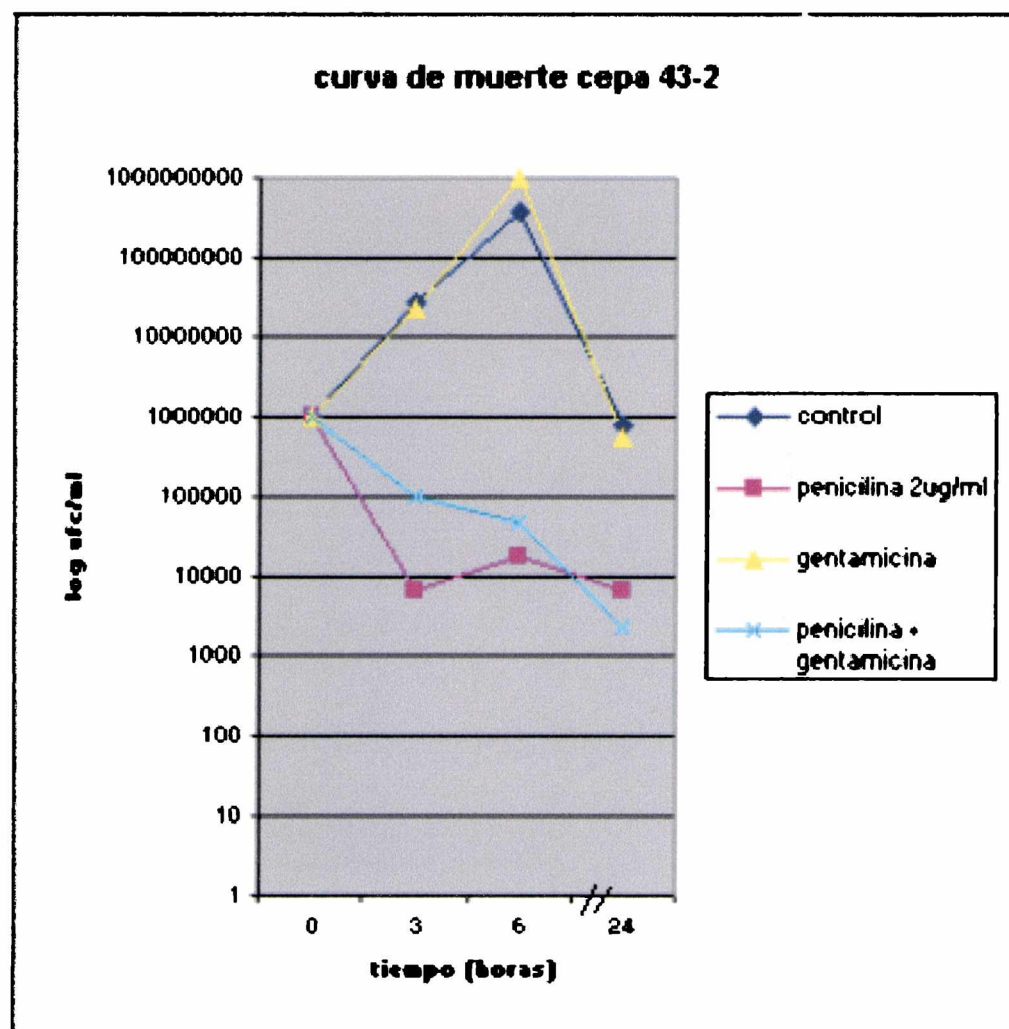
CIM penicilina: 6 $\mu\text{g/ml}$

CIM gentamicina: 64 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de penicilina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de gentamicina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Figura 20. Curva de muerte de la cepa 43-2 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



Nota: La curva fue realizada por triplicado y se hicieron los recuentos de colonias a las 0, 3, 6 y 24 horas, debido a su marcada tendencia a autolisar.

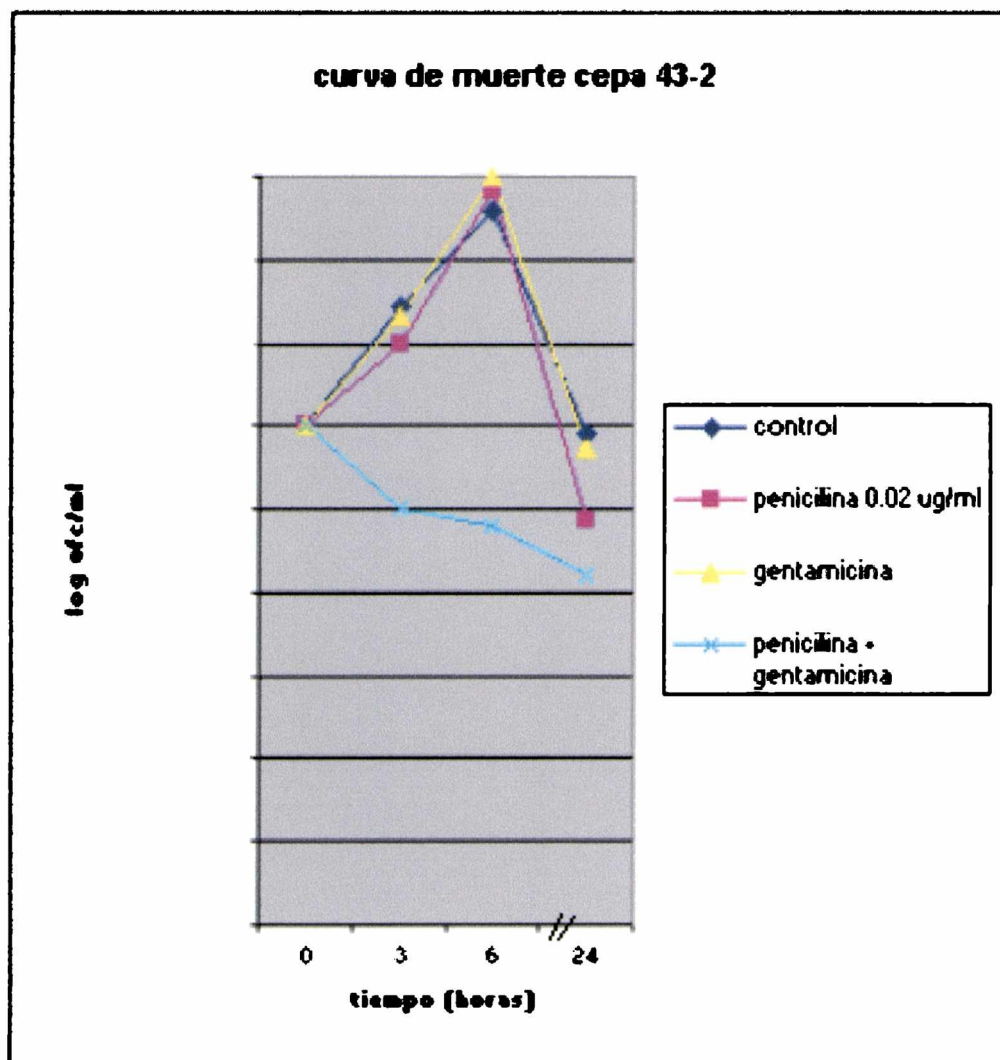
CIM penicilina: 0.064 $\mu\text{g/ml}$

CIM gentamicina: 16 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de penicilina utilizada: 2 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de gentamicina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Figura 21. Curva de muerte de la cepa 43-2 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



Nota: La curva fue realizada por triplicado y se hicieron los recuentos de colonias a las 0, 3, 6 y 24 horas, debido a su marcada tendencia a autolisar.

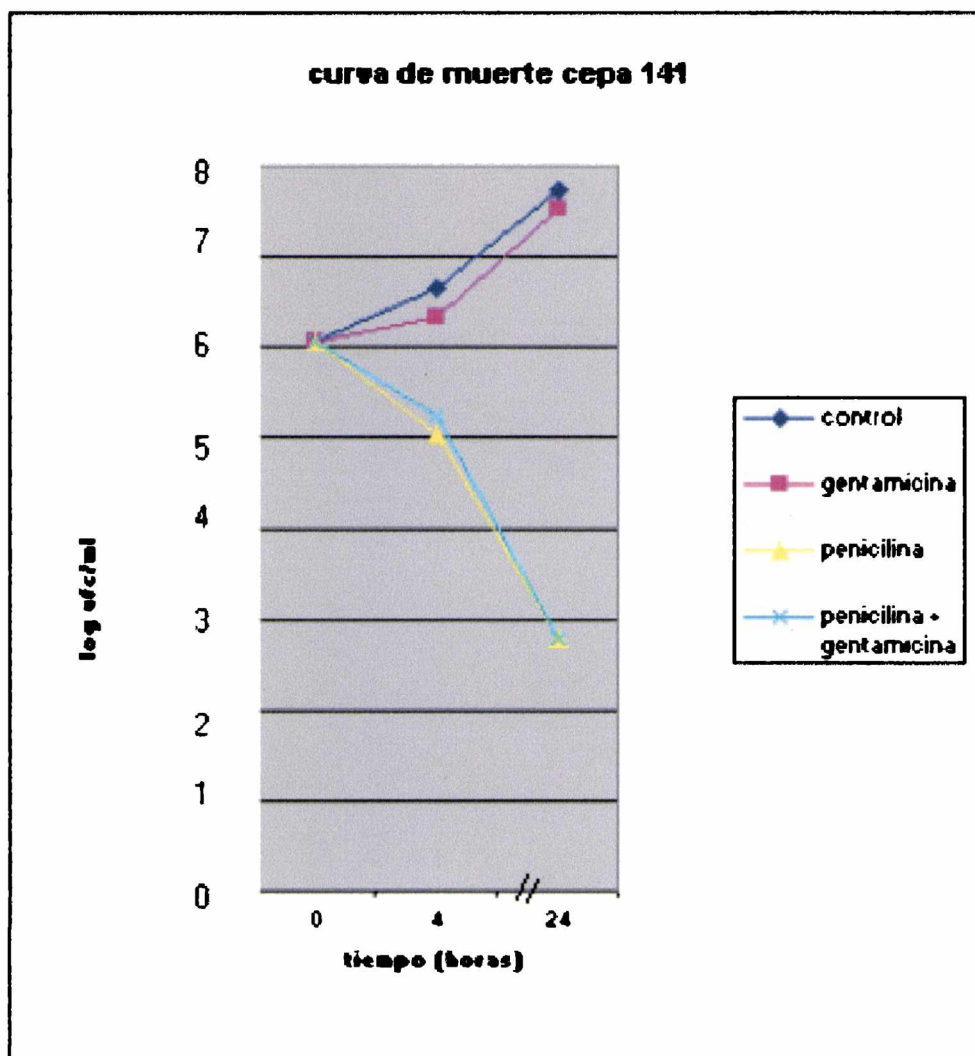
CIM penicilina: 0.064 $\mu\text{g/ml}$

CIM gentamicina: 16 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de penicilina utilizada: 0.02 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de gentamicina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Figura 22. Curva de muerte de la cepa 141 frente a penicilina, gentamicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



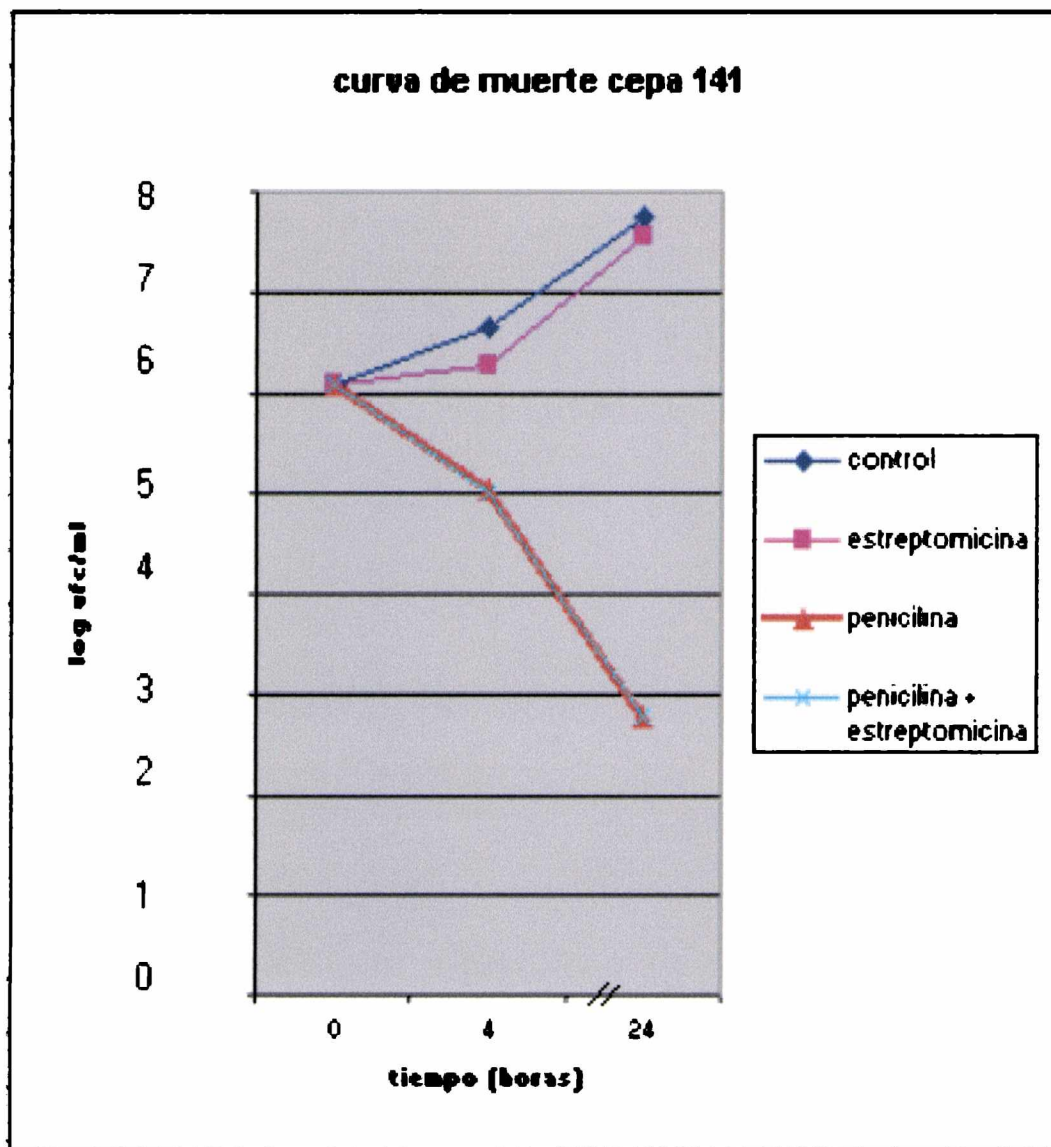
CIM penicilina: 0.5 $\mu\text{g/ml}$

CIM gentamicina: 128 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de penicilina utilizada: 5 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de gentamicina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Figura 23. Curva de muerte de la cepa 141 frente a penicilina, estreptomicina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



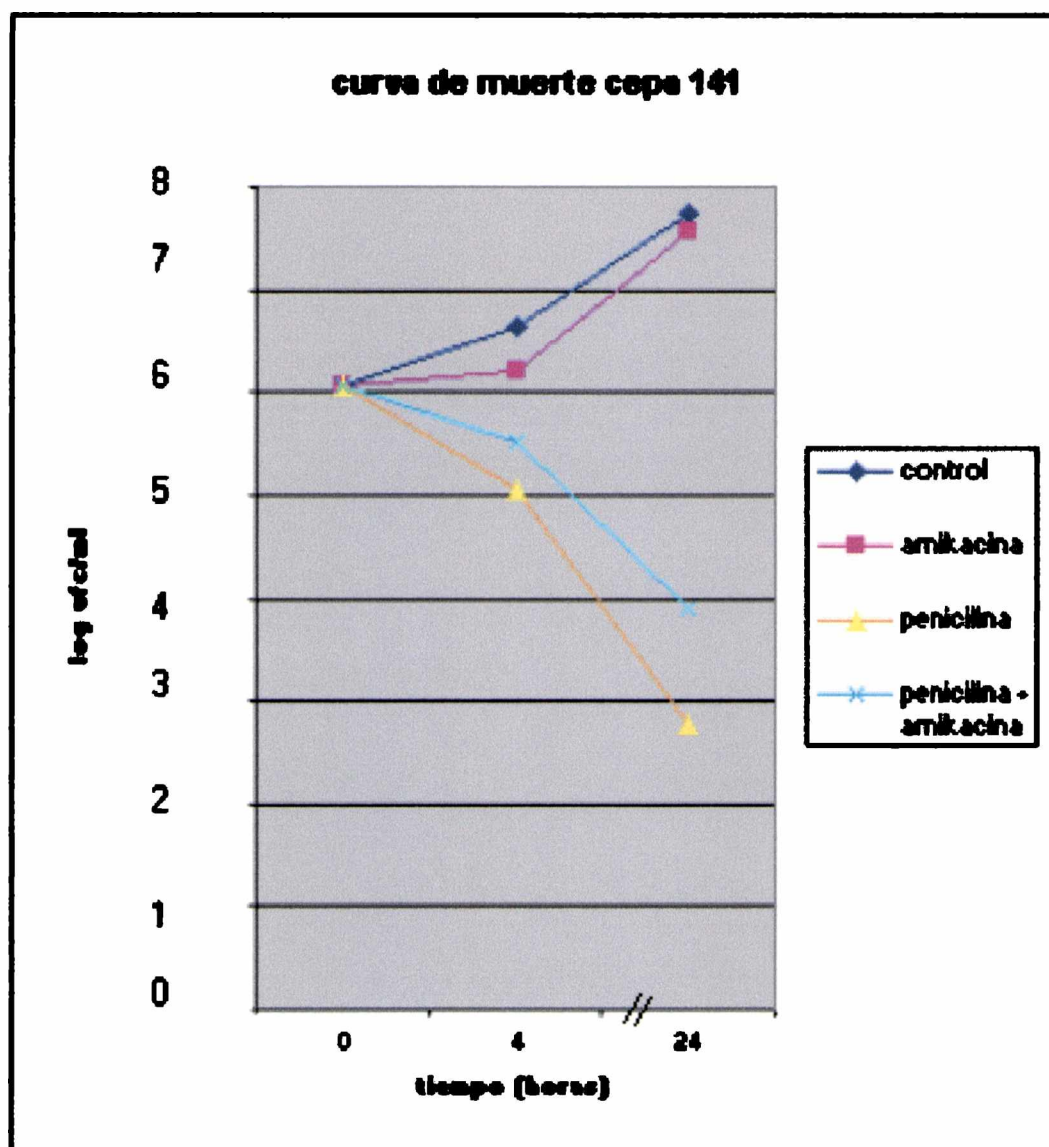
CIM penicilina: 0.5 $\mu\text{g/ml}$

CIM estreptomicina: > 20.000 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de penicilina utilizada: 5 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de estreptomicina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Figura 24. Curva de muerte de la cepa 141 frente a penicilina, amikacina y a la combinación, utilizando una concentración de penicilina superior a la CIM.



CIM penicilina: 0.5 $\mu\text{g/ml}$

CIM amikacina: 32 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de penicilina utilizada: 5 $\mu\text{g/ml}$

Concentración de amikacina utilizada: 4 $\mu\text{g/ml}$

Capítulo 5. DETERMINACIÓN DE LA EXISTENCIA DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLUCÓSIDOS.

Introducción

La sinergia penicilina + aminoglucósido en enterococos puede estar impedida por la presencia de enzimas inactivantes de estos últimos que condicionan una resistencia a altos niveles ($> 500 \mu\text{g/ml}$). En EGV se observó el caso de una cepa que resistía a la actividad bactericida de la combinación penicilina + gentamicina a pesar de presentar una CIM de gentamicina de $128 \mu\text{g/ml}$ (Potgieter y col. 1989).

En el presente estudio quisimos comprobar la presencia o ausencia de enzimas inactivantes de aminoglucósidos en algunos aislamientos que seleccionamos por su comportamiento frente a los antibióticos.

Resultados y Discusión

Se investigó la presencia de los genes *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa* y *ant(6)-Ia* que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos en el grupo seleccionado de cepas de EGV.

El gen *aac(6a')-aph(2'')*, que codifica para la enzima bifuncional, fue hallado en las cepas 141 y 43-2. Este hallazgo justifica la resistencia a la acción sinérgica de penicilina con gentamicina, amikacina y kanamicina.

La cepa 43-2 presentó además el gen *aph(3')-IIIa*, que confiere resistencia a kanamicina (figuras 25 y 26).

No se halló el gen *ant(6)-Ia*, que codifica para la enzima modificadora de estreptomicina, con lo cual quedaría sin explicación la resistencia a este antibiótico para la cepa 141. Sin embargo el altísimo valor de CIM para estreptomicina obtenido con esta cepa (CIM >20.000 µg/ml) sugeriría la presencia de una mutación del sitio de unión al aminoglucósido en el ribosoma, tal como fuera hallado por Eliopoulos y col. (1984) en cepas de enterococos..

Inesperadamente la cepa 43-2 demostró poseer los genes *aac(6')-aph(2'')* y *aph(3')-IIIa*, a pesar de sus bajos valores de CIM para gentamicina, amikacina y kanamicina. Esto podría deberse a su fuerte tendencia a autolizar sólo evidenciada en la curva de muerte. La presencia de estas enzimas explica la ausencia de sinergia penicilina + gentamicina en esta cepa.

Igualmente sorprendente fue la ausencia del gen *ant(6)-Ia* en la cepa 43-2 dado que estuvo presente el gen *aph(3')-IIIa*. Este resultado sugiere que ambos genes no se hallaría en el mismo transposón *5004*, contrariamente a lo publicado por Ousini y col. (1990) para especies de estafilococo y enterococo, y por Jeric (2002) para 85 especies de cocos gram positivos distintos de EGV.

Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la presencia del gen *aac(6')*-*aph(2'')* en las cepas 43-2 y 141.

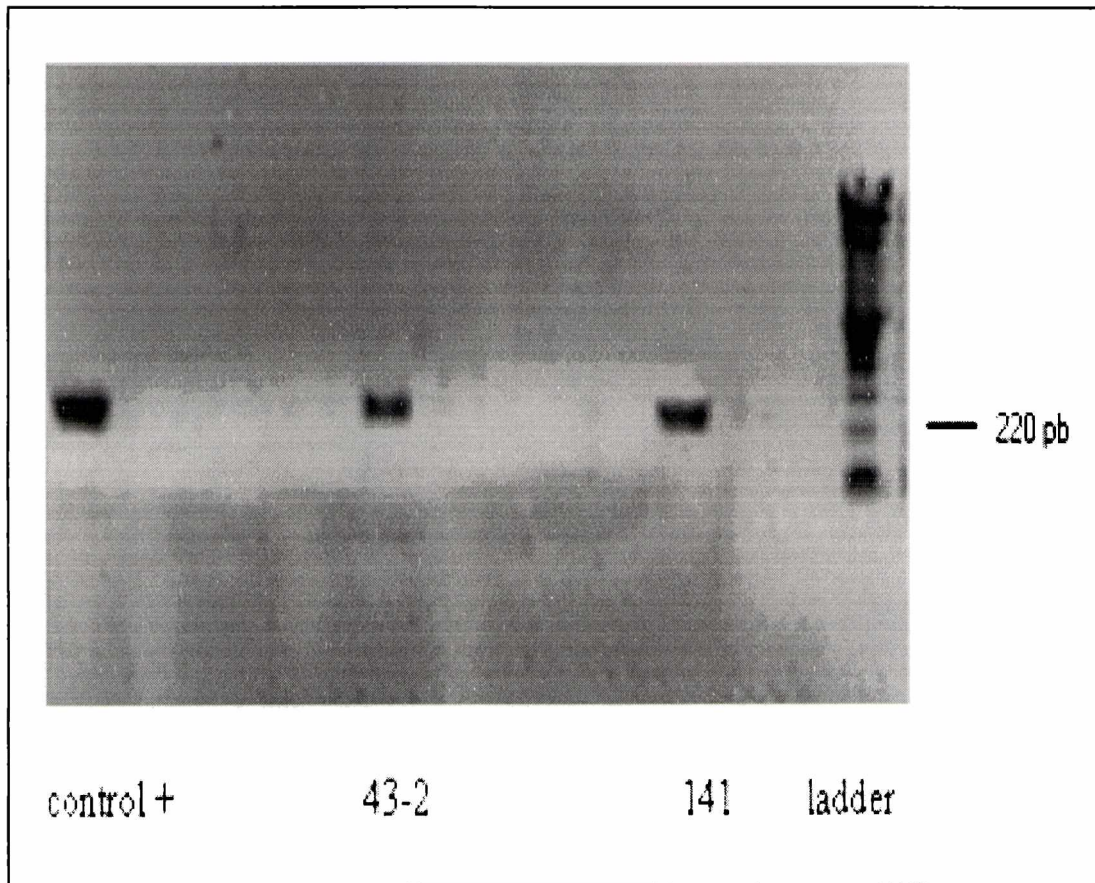
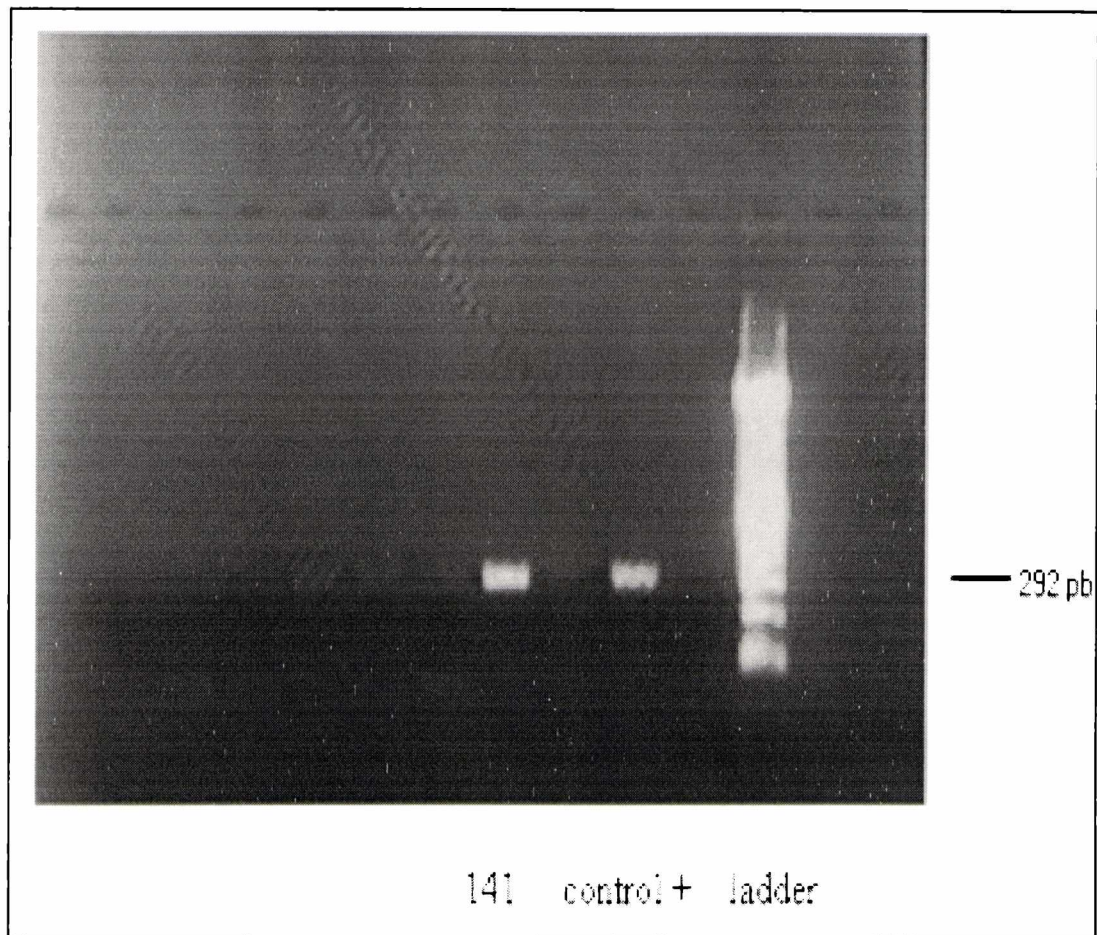


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la presencia del gen *aph(3')-IIIa* en la cepa 141.



CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los EGV son parte importante de la flora colonizante en los seres humanos y han dejado de considerarse bacterias de baja patogenicidad por cuanto se los halla involucrados en diversas infecciones severas.

Durante muchos años la penicilina fue el agente antimicrobiano de elección para el tratamiento de dichas infecciones pero numerosas publicaciones demostraron la emergencia de cepas resistentes con significativa frecuencia, especialmente entre pacientes oncológicos sometidos a quimioterapia y/o profilaxis con antibióticos. El uso de combinaciones de penicilina con un aminoglucósido demostró un comportamiento sinérgico frente a estas bacterias, aunque la aparición de casos de resistencia a los aminoglucósidos impone un seguimiento permanente de su comportamiento frente a los antibióticos.

En primer lugar quisimos probar algunas formas sencillas para efectuar un tamizaje precoz de las cepas no sensibles a penicilina o que fueran capaces de resistir a su acción sinérgica con aminoglucósidos.

De los 28 aislamientos estudiados 17 pertenecían al grupo mitis. Casi un 70% (67,8%) eran resistentes o moderadamente sensibles a la penicilina.

El uso del método de difusión con discos de penicilina de 10 μ g, no recomendado por el NCCLS para la detección de cepas de EGV resistentes o con sensibilidad intermedia a penicilina fue nuevamente evaluado por nosotros, aunque con un número no significativo de aislamientos. Sumando nuestra experiencia a la de otros trabajos estamos en condiciones

de decir que utilizándolo como un *screening* inicial, nos permitiría predecir la falta de sensibilidad a penicilina en EGV cuando se observen halos de inhibición menores a 28 mm. Sin embargo, como el NCCLS, nosotros pensamos que en casos de endocarditis es esencial contar con los datos de las CIM de gentamicina o estreptomina y penicilina, y más aún creemos que es de gran utilidad efectuar las correspondientes curvas de muerte.

Se observó una mejor correlación entre los ensayos de Etest para gentamicina y las pruebas de difusión cuando se utilizaron discos de 120 µg. No obstante, la posibilidad de que existan cepas como la 43-2 que presenten un marcado efecto autolítico no nos permite recomendar la difusión ni la dilución como métodos seguros para predecir el efecto sinérgico. Sólo las curvas de muerte son capaces de detectar estos fenómenos en todos los casos.

Al menos en los casos estudiados por nosotros, los EGV tuvieron el mismo comportamiento que los enterococos cuando fueron enfrentados a combinaciones de penicilina + aminoglucósido: fue posible obtener sinergia penicilina + gentamicina sólo en los casos en que el beta-lactámico se encontraba en concentraciones superiores a su CIM.

La resistencia a los aminoglucósidos relacionada con la presencia de los genes que codifican para sus enzimas modificadoras ha sido muy poco estudiada en EGV. En este trabajo se describieron 2/28 aislamientos portadores de enzimas inactivantes con CIM de gentamicina <256µg/ml. También se detectó un mecanismo desconocido que le confería a una de esas cepas una CIM > 20.000µg/ml para estreptomina. Por ésto decimos que:

- (1) No debe creerse que la falta de sinergia por mecanismo enzimático necesariamente deba estar asociada a una resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos en EGV y
- (2) No deben desestimarse otros mecanismos menos frecuentes como mutaciones de los sitios de unión del ribosoma al antibiótico como parece ocurrir en la cepa 141.

Hasta donde nosotros conocemos, ésta es la primera vez que se describe una resistencia a la combinación con tan bajos valores de CIM para gentamicina (cepa 43-2) probablemente ligada a su autólisis. Será necesario efectuar estudios de curva de muerte en presencia de etanolamina o colina, inhibidores de la autólisis en *Streptococcus pneumoniae*. (Tomasz y Fischer, 2000).

También es la primera vez que se describe una resistencia no enzimática, de altísimo nivel a estreptomina, en EGV. Estudios posteriores de secuenciación de los genes que codifican para proteínas ribosomales serán necesarios para poder comprobar si en verdad se trata de una mutación en el sitio de acción.

Finalmente, resulta significativa la ausencia del gen *ant(6)-Ia* en una cepa portadora del gen *aph(3')-IIIa*. Esto podría indicar un comportamiento anómalo de esta cepa de EGV relativo al transposón 5405, que en otros cocos gram positivos alberga ambos genes. Futuros estudios moleculares nos permitirán develar esta cuestión.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Alcaide F, Liñares J, Pallares R, Carratalá J, Benítez MA, Gudiol F, Martín R.

(1995). In vitro activities of 22 β -lactam antibiotics against penicillin-resistant and penicillin-susceptible viridans group streptococci isolated from blood. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2243-2247.

Amoroso A, Demares D, Mollerach M, Gutkind G, Coyette J. (2001). All detectable high molecular-mass penicillin-binding proteins are modified in high-level beta lactam resistant clinical isolate of *Streptococcus mitis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 2075-2081.

Binardi GE, Issacs D. (1989) Neonatal meningitis due to *Streptococcus mitis*. *Rev Infect Dis* 11: 86-88.

Bohud PY, Eggiman PH, Calandra TH, van Melle G, Saghafi L, Francioli P.

(1994). Bacteremia due to viridans streptococcus in neutropenic patients with cancer: clinical spectrum and risk factors. *Clin Infect Dis* 18: 25-31.

Brennan RO, y Durack DDT. (1984). The viridans streptococci in perspective. En : *Current clinical topics in infectious diseases*. Remington JR and Swartz MN (ed.) Mc Graw- Hill International Co: New York, EEUU, p 253-289.

Brock TD. (1996). *Milestones in Microbiology*. ASM Press Washington DC, EEUU.

Carratalá J, Alcaide F, Fernandez-Sevilla A, Corbella X, Liñares J, Gudiol

F.(1995). Bacteremia due to viridans streptococci that are highly resistant to penicillin: increase among neutropenic patients with cancer. *Clin Infect Dis* 20: 1169-1173.

Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD, Tsai S,

- Clark NC, Olssvik O, Swenson J, Spiegel C, Tenover F. (1999).** Detection of streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 43:157-160.
- Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, Spratt BG.(1995).** Genetics and molecular biology of β - lactam resistant pneumococci. *Microb Drug Resist* 1: 29-34.
- Costa Y, Galiman M, Leclerc R, Duval J, Courvalin P. (1993).** Characterization of chromosomal *aac(6')*-li gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1896-1903.
- Cunney RJ, Fenton S, Fielding JF.(1993).** *Streptococcus mitis* meningitis in an adult. *J Infect* 27:96-97.
- Doern GV, Ferraro MJ, Brueggemann AB, Ruoff KL.(1996).** Emergence of High rates of antimicrobial resistance among viridans group streptococci in United States. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 891-894.
- Donnelly JP. (1993).** Viridans streptococci and allogeneic bone marrow transplant recipients. Tesis. Universidad de Nijmegen, Holanda.
- Donnelly JP, Dompeling EC, Meis JF. 1995.** Bacteremia due to oral viridans streptococci in neutropenic patients with cancer: cytostatics are a more important risk factor than antibacterial prophylaxis. *Clin Infect Dis*; 20: 469-470.
- Eliopoulos GM, Farber BF, Murray BE, Wennersten C, Moellering RC. (1984).** Ribosomal resistance of clinical enterococcal isolates to streptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 25: 398 - 399.
- Elting LS, Bodey GP,Keefe BH. (1992).** Septicemia and shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. *Clin Infect Dis*; 14:

1201-1207.

Facklam RR. (1977). Physiological differentiation of viridans streptococci. *J Clin Microbiol* 5:184 – 201.

Facklam RR. (2002) What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15: 613-630

Farber BF, Eliopoulos GM, Ward JI, Ruoff K, Moellering R. (1983). Resistance to penicillin-streptomycin synergy among clinical isolates of viridans streptococci. *Antimicrob Agents Chemoter.*24: 871-875.

Farber BF, Eliopoulos GM, Ward JI, Ruoff K, Syriopoulou V, Moellering JR. (1983). Multiply resistant antibiotics and comparison of penicillin-binding protein patterns. *Antimicrob Agents Chemother* 24: 702-705.

Gallis HA. (1991) *Streptococcus viridans* y β -hemolíticos. En: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (ed). *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*. 3ra. ed., p. 1654. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.

Goldman EC, Fesik SW, Doran CC. (1990). Role of protonated and neutral forms of macrolides in binding to ribosomes from gram positives and gram negatives bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 34: 426-431.

Graham JC, Gould FK. (2002). Role of aminoglycosides in the treatment of bacterial endocarditis. *J Antimicrob Chemother* 49: 437-444.

Kao SJ, You I, Clewell DB, Donabedian SM, Zervos MJ, Petrin J, Shaw KJ, Chow JW. (2000). Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene *aph(2'')-Ib* in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2876-2879.

- Kaufhold A, Potgieter E. (1993).** Chromosomally mediated high-level gentamicin resistance in *Streptococcus mitis* Antimicrob Agents Chemother 37: 2740-2742.
- Kernodle DS. (2003).** Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. En: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JJ. Gram- positive pathogens. p 609-620. ASM Press, Washington DC.
- Kiratisin P. (2003).** The role of gene analysis for species determination of viridans streptococci. Clin Microbiol Newsl 25: 169-173.
- Koneman EW, Allen SD, Janda,WM, Schreckenberger PC, Winn WC (1999).** Diagnóstico Microbiológico. 5ta ed. p 579. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Kóning A, Reinert R, Hakenbeck R. (1998).** *Streptococcus mitis* with unusually high-level resistance to β - lactam antibiotics. Microb Drug Resist 4: 45-49.
- Le T, Bayer AS.(2003).** Combination antibiotic therapy for infective endocarditis. Clin Infect Dis 36: 615-621.
- Leblanc DJ, Lee LN, Inamine JM. (1991)** Cloning and nucleotide base sequence analysis of spectinomycin adenytransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother 35:1804-1810.
- Lopardo H, Venuta ME, Rubeglio EA (1995).** Penicillin-resistance and aminoglycoside-penicillin synergy in enterococci. Chemotherapy 41:165-171.
- Lopardo H, Moviglia AM, Bottero D, Viegas Caetano J. (2000a)** Resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas en estreptococos del grupo viridans aislados de infecciones clínicamente significativas. Infect & Microbiol Clin 12: 62-65.

Lopardo H, Vidal P, Bottero D, Moviglia AM, Gobet LM. (2000b). Is the difusión method appropriate to determine the susceptibility to penicillin of viridans group streptococci? Rev. Esp. Quimioter 13 (Supl. 2): 104.

Malouin F, Bryan LE. (1986). Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of β -lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother. 30:1-5.

Marriet TJ.(1993). Bacteremic community-acquired pneumonia due to viridans group streptococci. Clin Invest Med; 16: 38-44.

Mazzei T, Mini E, Novelli A.(1993). Chemistry and mode of action of macrolides. . J Antimicrob Chemother 31 (suppl C): 1-9.

Miller MH, El-Sokkary MA, Feinstein SA, Lowy FD.(1986). Penicillin-induced effects on streptomycin uptake and early bactericidal activity differ in viridans group and enterococcal streptococci. Antimicrob. Agents Chemother; 30: 763-768.

Moellering RC Jr, Wennersten C, Weinberg AN. (1971). Studies on antibiotic synergism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of C₁₄-labelled streptomycin by enterococci. J Clin Invest 50: 2580- 2584.

Moellering RR Jr, Korzeniowski OM, Sande MA, Wennersten CB. 1979. Species-specific resistanse to antimicrobial synergism in *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis*. J Infect Dis 141: 203-206.

Mueller M, de la Peña A, Derendorf H. (2004). Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. Antimicrob Agents Chemother 48: 369-377.

Murray BE (1990). The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev 3: 46-65.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline. Vol. 19, N°18, NCCLS Document M26-A, NCCLS, Wayne. PA.EEUU.

National Committee for Clinical Laboratory Standards.(2000a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-7th edition. Vol 20 N° 1 M2-A7, NCCLS, Wayne. PA.EEUU.

National Committee for Clinical Laboratory Standards.(2000b). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Fifth edition. Vol 20 N° 2 M7-A5, NCCLS, Wayne. PA.EEUU.

National Committee for Clinical Laboratory Standards.(2002a). Disk Diffusion. Twelfth edition. Vol 22 N° 1. M100-S12. NCCLS, Wayne. PA. EEUU.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002b). MIC Testing. Twelfth edition. Vol 22 N° 1. M100-S12. NCCLS, Wayne. PA.EEUU.

Ounissi H, Derlot E, Carlier C, Courvalin P. (1990). Gene homogeneity for aminoglycoside modifying enzymes in gram-positive cocci. Antimicrob Agents Chemother 34: 2164-8.

Paganini H, Staffolani V, Zubizarreta P, Casimir L, Lopardo H, Luppino V.(2003). Viridans streptococci bacteremia in children with fever and neutropenia: a case-control study of predisposing factors. Eur J Cancer 39: 1284-1289.

Parker MT y Ball LC.(1975). Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. J. Med. Microbiol; 9: 275- 302.

Parrillo JE, Borst GC, Mazur MH, Iannini P, Klempner MS, Moellering RC, Anderson E. (1979). Endocarditis due to resistant viridans streptococci during oral

penicillin chemoprophylaxis. N Engl J Med 300: 296-300.

Potgieter E, Carmichael M, Koornhof HJ, Chalkey LJ. (1992). In vitro antimicrobial susceptibility of viridans streptococci isolated from blood cultures. Eur Clin Microbiol Infect Dis: 11: 543-546.

Poyart C, Pierre C, Quesne G, Pron B, Berche P, Trieu- Cuot. 1997. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*; characterization of a vanB transferable determinant in *Streptococcus bovis*. Antimicrob. Agents Chemother. 41: 24-29.

Quinn P, DiVicenzo C, Lucks D, Luskin L, Shatzer K, Lerner S.(1988). Serious infections due to penicillin-resistant strains of viridans streptococci with altered penicillin-binding proteins. J Infect Dis 157: 764-768.

Ruoff KL. (2002). Miscellaneous catalase-negative, gram-positive cocci emerging opportunists. J.Clin.Microbiol 40: 1129-1133.

Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D.(2003). *Streptococcus*. En Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed., p. 405-421, ASM Press, Washington DC, EEUU.

Sahm, DF, Torres C.(1988). Effects of medium and inoculum variations on screening for high-level aminoglycoside resistance against *Enterococcus faecalis*. J Clin Microbiol 26:257-60.

Sande MA, Irvin RG.1974. Penicillin-aminoglycoside synergy in experimental *Streptococcus viridans* endocarditis. J Infect Dis 129: 572.

Santander C, Lopardo H, Vidal P, Ruboglio E.(1994). Viridans streptococci vs antibiotics used for the treatment of febrile neutropenic patients. 94th General Meeting of American Society for Microbiology. Las Vegas. EEUU.

- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. (1993).** Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev* 57:138-163.
- Shaw KJ, Clewell DB. (1997).** A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 511-514.
- Shaw KJ and Wright GD.(2000).** Aminoglycosides resistance in gram-positive bacteria. En: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI. *Gram-positive pathogens*. p 635 – 646. ASM Press Washington DC,EEUU.
- Shenep JL. (2000).**Viridans-group streptococcal infections in immunocompromised hosts. *Int J Antimicrob Agents* 14:129-135.
- Sotiropoulos SV, Jackson MA, Woods GM, Hicks RA, Cullen J, Freeman AI. (1989).** Alpha-streptococcal septicemia in leukemic children treated with continuous or large dosage intermittent cytosine arabinose. *Pediatr Infect Dis J* 8: 755-758.
- Tait- Kamradt A, Davies T, Cronan M, Jacobs MR, Appellbaun PC, Sutcliffe J. (2000a).** Mutations on 23 S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2118-2125.
- Tait- Kamradt A, Davies T, Appelbaun PC, Depardieu F, Courvalin P, Petitpas J, Wondrack L, Walker A, Jacobs MR, Sutcliffe J.(2000b).** Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3395-3401.
- Tomasz A, Fischer W. (2000)** The cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. En: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Potnoy DA, Rodd JI (ed.) *Gram positive pathogens*. ASM

Press, Washington DC, EEUU.p 191-200.

Tsai SF, Zervos MJ, Clewell DB, Donabedian SM, Sahm DF, Chow JW.(1998). A new high-level gentamicin resistance gene, *aph(2'')-Id*, in *Enterococcus spp.* Antimicrob Agents Chemother 42:1229-1232.

Tuohy M, Washington JA.(1997). Antimicrobial susceptibility of viridans group streptococci. Diagn Microbiol Infect Dis 29: 277-280.

Van de Klundert JAM, Vliegthart (1993). PCR detection of genes coding for aminoglycoside modifying enzymes, p. 547-552. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC and White (ed.), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications, ASM Press, Washington, DC, EEUU.

Venditti M, Baiocchi P, Santini C, Braandimarte C, Serra P, Gentile G, Girmenia C, Martino P.(1989). Antimicrobial susceptibility of streptococcus species that cause septicemia in neutropenic patients. Antimicrob Agents Chemother 33:580-582.

Vosbeck K y Mett H.(1983). Bacterial adhesión: influence of drugs. En:Medical Microbiology. p 21- 62 , Academic Press Inc: London.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

ORACION.....
 Fecha 07-04-05
 Inv. #..... Inv. #..... S7399