

Enterococcus en la Rutina del Trabajo Microbiológico

JOSÉ M. GUEVARA D.^{1,2,5}, JUAN C. GUEVARA G.³, ESTHER VALENCIA²,
HÉRCULES ALCALÁ¹, JOSÉ M. GUEVARA G.⁴

¹Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina - Hospital A. Loayza. ²Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión", UNMSM. ³Bachiller en Medicina. USMP. ⁴Residente de Patología Clínica. Hospital Daniel A. Carrión - Callao. ⁵Laboratorio Médico C.D.G.

RESUMEN

Objetivo.- *Enterococcus* ha surgido en los últimos años como una bacteria causante de infecciones intrahospitalarias de difícil tratamiento debido a la resistencia que presenta a los antimicrobianos, por esta razón se ha realizado el presente trabajo.

Metodología.- En la rutina del trabajo microbiológico se ha empleado medios selectivos para su aislamiento, métodos diferenciales para identificar la especie y su susceptibilidad a los antimicrobianos, empleando el método de disco-difusión estandarizado.

Resultados.- Entre Marzo y Noviembre de 1996 se aislaron 113 cepas de *Enterococcus*, procediendo el 65,4% de secreción vaginal y el resto de otras muestras tales como semen, orina, secreción faríngea, líquido ascítico, esputo, lesiones dérmicas, secreción prostática y secreción uretral. El 88,5% fueron *E. faecalis* y el resto *E. faecium*, *E. pseudoavium*, *E. avium*, *E. durans* y *E. raffinosus*. En el antibiograma se empleó 13 antimicrobianos y 2 combinaciones con inhibidores de betalactamasa y el 97,3% de los *Enterococcus* fueron sensibles a la ampicilina.

Conclusión.- Los *Enterococcus* aislados son hasta el presente poco resistentes a la ampicilina.

Palabras clave: Infección Hospitalaria, *Enterococcus*, Técnicas Microbiológicas, Ampicilina.

Enterococcus IN ROUTINARY MICROBIOLOGY WORK

SUMMARY

In the last years, importance of *Enterococcus* has been increasing because it is now known as causal agent of difficult-to-treat nosocomial infections, mainly due to their antimicrobial resistance.

We identified *Enterococcus* strains using selective media to isolate it, differential assays for strains identification, and standardized disk-diffusion methods to assess antimicrobial susceptibility.

Between march and november 1996, 113 strains of *Enterococcus* were isolated, 65,4% of which come from vaginal discharges, and the remainder from seminal fluid, urine specimens, faringeal secretions, ascitic fluid, sputum, skin wounds samples, prostatic fluid and uretral fluid. *E. faecalis* give a total of 88,5% of isolates, followed by *E. faecium*, *E. pseudoavium*, *E. avium*, *E. durans* y *E. raffinosus*. Antibiogram analysis using 13 antimicrobial single drugs and another 2 combined with betalactamase-inhibitors, showed that 97,3% of *Enterococcus* were ampicillin-sensitive.

We concluded that isolated *Enterococcus* strains show, up to now, a small resistance to ampicillin.

Key words: Cross Infection, *Enterococcus*, Microbiological Techniques, Ampicillin.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las especies de *Enterococcus* son miembros importantes de la flora normal del tracto gastrointestinal, en donde se encuentran a una concentración de más de 107 organismos por gramo de

heces (^{1,2,3}). También son considerados como miembros de la flora normal del tracto genital femenino (^{1,3}), relativamente avirulentos en individuos sanos y funcionan como oportunistas (^{2,4}).

Aunque muchos *Enterococcus* pueden colonizar a humanos, sólo han sido implicados en infecciones *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. raffinosus* y *E. casseliflavus* (⁴), en heridas operatorias (⁵), en recién nacidos (⁶), en transplantes de hígado (¹⁰), en semen (¹¹).

Enterococcus spp se han convertido en importantes patógenos nosocomiales (^{3,5}), los cuales se originarían en la flora endógena de los pacientes (^{1,2,6}). Ellos son intrínsecamente resistentes a la mayoría de antibióticos y posiblemente su emergencia como causantes de

Correspondencia:

Dr. José M. Guevara Duncan
Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión"
Apartado Postal N° 1546 Lima - Perú.

infecciones en pacientes hospitalizados, se debe al amplio uso de antibióticos en forma profiláctica, los cuales no actúan sobre *Enterococcus* (incluyendo cefalosporinas) (1,3,5,7). La terapia efectiva depende primariamente de la penicilina, ampicilina, vancomicina y aminoglucósidos (8).

La prevalencia de *Enterococcus* resistente a la vancomicina (VRE) se ha incrementado significativamente en los últimos años y es un problema en el mundo (2,12); son reconocidos como un importante patógeno nosocomial (1,5,6,13-17), habiéndose encontrado en una variedad de especies de *Enterococcus* (2) y ahora ocupa el 4° lugar entre los patógenos nosocomiales en EE.UU. (3).

Dada la importancia del *Enterococcus*, generada en los distintos años, decidimos poner énfasis en el aislamiento de esta bacteria en la rutina del trabajo microbiológico, sin buscar su significación clínica.

MATERIAL Y MÉTODOS

De marzo a noviembre de 1996 (8 meses), todos los especímenes (excepto heces) que llegaron para estudio microbiológico en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina en el Hospital A. Loayza, Laboratorio Médico C.D.G. y Laboratorio de Microbiología del Hospital Carrión, fueron cultivados para buscar *Enterococcus*.

Se tomó nota, además, del tipo de espécimen, de la edad y sexo del paciente.

Las muestras fueron sembradas en un caldo de enriquecimiento selectivo para *Streptococcus* y después de incubarse por 24 h a 37° C se resembró una asada en un caldo peptonado con 6,5% de NaCl, los cuales fueron incubados por 24 ó 48 horas a 37° C y se procedió a hacer una coloración de Gram; cuando se encontró la presencia de cocos ovalados Gram positivos en cadena se procedió a purificar la cepa en Agar sangre y sembrarlas en leche descremada para guardarlas y llevarlas al Instituto de Medicina Tropical "Daniel A. Carrión" en donde se realizó la diferenciación de especies y el antibiograma, utilizando el desarrollo en Agar soya tripticosa con 0,04% de telurito de potasio, metabolismo de arabinosa, manitol, rafinosa, sorbitol y el antibiograma por el método de discos-difusión estandarizado, en el cual se emplearon 13 antimicrobianos y 2 combinaciones: amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam. Para la lectura del antibiograma se empleó la tabla de la NCCLS del año 1995.

RESULTADOS

En los 8 meses de estudio se aislaron 113 cepas de *Enterococcus* de 11 diferentes tipos de muestras que podemos apreciar en la Tabla N° 1, en donde observamos que la mayoría, el 65,49%, procedieron de secreción vaginal, seguido de semen con 12,39%.

Seis diferentes especies de *Enterococcus* fueron identificadas, siendo *E. faecalis* la que más se aisló: según se observa en la Tabla N° 2.

La distribución de las especies de *Enterococcus* según el tipo de muestra del que fue aislado la apreciamos en la Tabla N° 3.

En la Tabla N° 4 podemos ver el resultado del antibiograma de las 113 cepas de *Enterococcus*, en donde observamos que sólo el 2,65% fueron resistentes a la ampicilina, pero uno de ellas fue sensible a las combinaciones de amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam.

El 15% fueron resistentes a la vancomicina y ningún *Enterococcus* fue resistente a la teicoplanina. El 7,96% fueron resistentes a la penicilina.

En el resultado del antibiograma de las 100 cepas de *E. faecalis* (Tabla N° 5) el 1% fue resistente a la ampicilina, el 6% resistente a la penicilina, y el 16% resistente a la vancomicina.

Las 5 cepas de *E. faecium* no fueron resistentes a ampicilina, penicilina y vancomicina (Tabla N° 6).

La cepa que resultó resistente a la ampicilina pero sensible a la combinación amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam fue *E. durans* aislada de secreción vaginal. Las otras dos cepas que fueron resistentes a la ampicilina y a sus combinaciones fueron un *E. faecalis* y un *E. raffinosus*.

Tabla N° 1.- Aislamiento de *Enterococcus* según tipo de muestra

Tipo de Muestra	N°	%
Secreción vaginal	74	65,49
Semen	14	12,39
Orina	12	10,62
Secreción faringea	05	4,46
Secreción uretral	01	0,88
Secreción prepucial	01	0,88
Secreción prostática	01	0,88
Líquido ascítico	01	0,88
Secreción vulvar	01	0,88
Espuito	01	0,88
Herida de piel de antebrazo	01	0,88
Secreción de herida de pene	01	0,88
Total	113	100,00

Tabla N° 2.- Especies de *Enterococcus* Identificados

Especie	N°	%
<i>E. faecalis</i>	100	88,50
<i>E. faecium</i>	5	4,42
<i>E. pseudoavium</i>	3	2,65
<i>E. durans</i>	2	1,77
<i>E. avium</i>	2	1,77
<i>E. raffinosus</i>	1	0,89
Total	113	100,0

Tabla N° 3.- Distribución de especies de *Enterococcus* por tipo de muestra del que fueron aislados

Origen	Especie	N°
Secreción vaginal	<i>E. faecalis</i>	65
	<i>E. faecium</i>	3
	<i>E. avium</i>	2
	<i>E. durans</i>	2
	<i>E. pseudoavium</i>	2
Semen	<i>E. faecalis</i>	12
	<i>E. faecium</i>	2
Orina	<i>E. faecalis</i>	11
	<i>E. raffinosus</i>	1
	<i>E. faecium</i>	5
Secreción faríngea	<i>E. faecalis</i>	1
Secreción uretral	<i>E. faecalis</i>	1
Secreción prepuccial	<i>E. faecalis</i>	1
Secreción prostática	<i>E. faecalis</i>	1
Secreción vulvar	<i>E. faecalis</i>	1
Espujo	<i>E. faecalis</i>	1
Herida de piel de antebrazo	<i>E. faecalis</i>	1
Líquido ascítico	<i>E. pseudoavium</i>	1

Tabla N° 4.- Resultado del antibiograma del *Enterococcus* sp. (número de cepas: 113)

	Sensibilidad			Porcentaje		
	Antimicrobiano resistente	inter-medio	sensible	resistente	inter-medio	sensible
Ampicilina	03	-	110	2,65	-	97,35
Amoxi-clavu	02	-	111	1,77	-	98,23
Ampi-sulbac	02	-	111	1,77	-	98,23
Penicilina	09	-	104	7,96	-	92,04
Teicoplanina	-	10	103	0,0	8,85	91,15
TMP-SMX*	23	26	64	20,35	23,01	56,64
Cloranfenicol	19	33	61	16,82	29,20	53,98
Vancomicina	17	47	49	15,05	41,59	43,36
Oxacilina	48	17	48	42,48	15,04	42,48
Nitrofurantoina	53	13	47	46,90	11,51	41,59
Rifampicina	52	16	45	46,02	14,16	39,82
Ciprofloxacina	26	47	40	23,01	41,59	35,40
Doxiciclina	63	14	36	55,75	12,39	31,86
Eritromicina	42	64	07	37,17	56,64	6,19
Lincomicina	86	21	06	76,11	18,58	5,31

* TMP-SMX = trimetoprim-sulfametoxazol

Tabla N°5.- Resultado del antibiograma del *E. faecalis* (número de cepas 100)

	Sensibilidad			Porcentaje		
	Antimicrobiano resistente	inter-medio	sensible	resistente	inter-medio	sensible
Ampicilina	01	—	99	1	—	99
Amoxi-clavu	01	—	99	1	—	99
Ampi-sulbac	01	—	99	1	—	99
Penicilina	06	—	94	6	—	94
Teicoplanina	—	09	91	—	9	91
TMP-SMX*	20	23	57	20	23	57
Cloranfenicol	14	33	53	14	33	53
Nitrofurantoina	42	12	46	42	12	46
Oxacilina	43	15	42	43	15	42
Vancomicina	16	43	41	16	43	41
Rifampicina	46	15	39	46	15	39
Ciprofloxacina	22	45	33	22	45	33
Doxiciclina	57	12	31	57	12	31
Eritromicina	37	57	06	37	57	6
Lincomicina	78	18	04	78	18	4

* TMP-SMX = trimetoprim-sulfametoxazol

Tabla N° 6.- Resultado del Antibiograma del *E. faecium* (número de cepas : 05)

	Sensibilidad			Porcentaje		
	Antimicrobiano resistente	inter-medio	sensible	resistente	inter-medio	sensible
Ampicilina	—	—	05	—	—	100
Amoxi-clavu	—	—	05	—	—	100
Ampi-sulbac	—	—	05	—	—	100
Penicilina	—	—	05	—	—	100
Teicoplanina	—	—	05	—	—	100
Vancomicina	—	01	04	—	20	80
Cloranfenicol	01	—	04	20	—	80
TMP-SMX*	01	01	03	20	20	60
Oxacilina	02	—	03	40	—	60
Doxiciclina	02	—	03	40	—	60
Ciprofloxacina	02	01	02	40	20	40
Rifampicina	02	01	02	40	20	40
Nitrofurantoina	04	—	01	80	—	20
Lincomicina	03	01	01	60	20	20
Eritromicina	01	04	—	20	80	0

* TMP-SMX = trimetoprim-sulfametoxazol



DISCUSIÓN

Enterococcus son miembros de la flora normal del tracto gastrointestinal y del tracto genital femenino (1,2,3); sobreviven en las manos del personal del hospital y en los fomites dentro del ambiente hospitalario (3). Se han convertido en importantes patógenos nosocomiales (3,4) y sus infecciones parecen originarse en la flora endógena de los pacientes (1,2,6).

En nuestro estudio la mayoría de los aislamientos se produjeron de secreción vaginal (65,45%), en donde es considerado como miembro de la flora normal, seguido de semen (12,39%) y luego la orina (10,62%). No tuvimos aislamientos de sangre, tal vez por ser poco solicitado el hemocultivo en nuestros laboratorios.

E. faecalis es la especie más aislada de muestras clínicas, la cual identificamos en el 88,50% de las cepas, igual que en Bélgica donde se reportan el 89,4% (18). *E. faecium* y otras especies completan el resto de porcentaje (18), así nosotros identificamos a *E. faecium* en el 4,42% de las cepas y otras especies en menor cuantía.

Enterococcus tiene la habilidad de adquirir genes de resistencia a través de intercambio de plasmidios o transposones de otras especies bacterianas. Además puede transmitir estos genes a otras especies, por lo que son unos patógenos importantes (19).

El fenotipo VanA induce a una alta resistencia a vancomicina y teicoplanina, y ha sido encontrado en *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* y *E. avium*. El fenotipo VanB es también inducible pero sólo confiere resistencia a vancomicina. Ambos fenotipos son codificados por cinco genes (vanH, vanA, vanX, vanR y vanS). Estos genes son transportados en un transposón de 10,9 Kb (Kilobase) denominado TN1546. Este transposón puede llevar la información genética del cromosoma al plasmidio, del plasmidio al cromosoma, de cromosoma a cromosoma o de plasmidio a plasmidio, y su origen es desconocido. Dos clases de plasmidios conjugativos ocurren comúnmente en *Enterococcus* y portan los genes vanA y vanB (1). El riesgo de transferir la resistencia a vancomicina al *Staphylococcus* es una real posibilidad y ya se ha conseguido en el laboratorio (13,20).

Enterococcus resistente a vancomicina (VRE) se ha convertido en un importante patógeno nosocomial. En nuestros estudios, el 15% fueron resistentes a vancomicina; dicho sea de paso que en la última tabla de la NCCLS del año 1995 han variado los halos de inhibición de la vancomicina para *Enterococcus*, considerándose 14 mm como resistente, lo que antes era sensible, y nosotros hemos empleado esta tabla. En cambio no ha habido variación en los halos de la teicoplanina para el *Enterococcus*, debido a que no es usada en los EE.UU., lo cual explica que en nuestros resultados para teicoplanina hubo 0% de resistencia.

Dentro de las especies de *Enterococcus*, *E. faecium* es el más resistente a la vancomicina (1,3); en nuestro estudio, *E. faecium* tuvo 0% de resistencia a vancomicina.

Las prácticas de control de las infecciones no son uniformemente exitosas en limitar brotes de VRE. Un cambio en el empleo del antibiótico parece tener un efecto significativo cuando fallan otras medidas (22).

Enterococcus, particularmente *E. faecium*, ha incrementado su resistencia a los agentes antimicrobianos (21,26).

La resistencia a las penicilinas puede ser debida a una sobreproducción de proteínas fijadoras de penicilina (las cuales tienen baja afi-

nidad por penicilinas) o a la producción de betaactamidasas (24).

Se ha observado un incremento de resistencia a la ampicilina en los *Enterococcus* (21), sobre todo *E. faecium* (25), mientras que nosotros hemos encontrado una resistencia de sólo el 2,65%. Otros investigadores no detectaron producción de betaactamidasas, pero para nosotros una cepa de *E. durans* fue resistente a la ampicilina por producción de betaactamasa ya que fue sensible a las combinaciones amoxicilina-ácido clavulánico y ampicilina-sulbactam.

Los bajos niveles de resistencia a los aminoglucósidos se atribuyen a que no penetran la pared celular del *Enterococcus* por lo que requieren de la presencia de un fármaco que actúe sobre ella, como ampicilina, penicilina o vancomicina (3). Altos niveles de resistencia a aminoglucósidos han sido encontrados en *Enterococcus* (18), nosotros no pudimos estudiar la resistencia a los aminoglucósidos porque en el método del disco-difusión se emplean discos de alta concentración que no pudimos conseguir.

Enterococcus es resistente a los niveles clínicos obtenibles de clindamicina, que para la bacteria es lo mismo que lincomicina, y también es resistente a la cloxacilina o a la dicloxacilina que son lo mismo que oxacilina (28). En nuestros resultados (Tabla N° 4), vemos que para oxacilina el 42,48% fueron sensibles y para lincomicina el 5,31%, debiendo recomendar que aunque la prueba in vitro dé como resultado sensibilidad a estos dos antibióticos, no deben usarse en el tratamiento de infecciones causadas por *Enterococcus*.

La susceptibilidad a trimetoprim-sulfametoxazol in vitro parece ser mejor de lo que previamente se pensaba, y tal vez debe considerarse esta combinación en el tratamiento de personas infectadas (28). El 56,64% de nuestros *Enterococcus* fueron sensibles a esta combinación, superando al cloranfenicol que tuvo 53,98% de cepas sensibles, el cual es escogido para el tratamiento de VRE (1).

En nuestro aislamiento sólo podemos dar significación clínica a los *Enterococcus* obtenidos de urocultivos, ya que en los otros especímenes podrían ser sólo colonizadores, pero que en determinadas circunstancias se pueden convertir en oportunistas, aunque su principal origen para ello es intestinal.

CONCLUSIÓN

Enterococcus se ha convertido en un importante patógeno nosocomial, por ser bacterias intrínsecamente resistentes a la mayoría de antibióticos, y están creando problemas en muchos países.

E. faecalis es la especie más frecuentemente aislada de materiales clínicos.

La resistencia de *Enterococcus* todavía no se aprecia entre nosotros, siendo la ampicilina el antibiótico de mejor acción in vitro.

Su presencia en la vagina no es considerada anormal, pero no se encuentra explicación de cómo es que llega a ella.

Sería interesante buscar *Enterococcus* en nuestras infecciones intrahospitalarias.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Davis JM y cols. Surgical Infection Society position on Vancomycin-Resistant *Enterococcus*. Arch Surg 1996; 131: 1061-1068.

- 2) Fraimow HS, Abrutyn E. Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology molecular mechanisms and clinical management. *Infect Dis Clin NA* 1995; 9(3): 497-529.
- 3) Wells CL y cols. Stool carriage, clinical isolation and mortality during and outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 45-50.
- 4) Singer DH, Jochimsen EM, Gielerak P, Jarris WR. Pseudo-outbreak of *Enterococcus durans* infections and colonization associated with introduction of an automated identification system software update. *J Clin Microbiol* 1996; 34(11): 2685-7.
- 5) Heath CH, Blackmore TK, Gordon DL. Emerging resistance in *Enterococcus spp.* *Med J Aust* 1996; 164(2): 116-20.
- 6) Palmer SM, Rybak MJ. Vancomycin-resistant enterococci. *Pharmacotherapy* 1996; 16(5): 819-29.
- 7) Thakor K, Glatt AE. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Pediatr Med Surg* 1996; 13(4): 661-9.
- 8) Dierssen T, Vicente P, Seco JL, Rodrigo Y, Delgado M. Risk factors associated with development of surgical wound infection in a general surgery service. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1996; 14(4): 240-4.
- 9) Mc Neeley DF, Saint-Louis F, Noel GJ. Neonatal enterococcal bacteremia an increasingly frequent event with potentially untreatable pathogens. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15(9): 800-5.
- 10) Patel, R. et al. Relevance and risk factors of enterococcal bacteremia following liver transplantation. *Transplantation*. 1996. 61(8): 1192-7.
- 11) Shalika S, Dugan K, Smith KD, Padilla SL. The effect of positive semen bacterial and Ureaplasma cultures on *in vitro* fertilization success. *Hum Reprod* 1996; 11(12): 2789-92.
- 12) Gin AS, Zhanel GG. Vancomycin-resistant enterococci. *Ann Pharmacother* 1996; 30(6): 615-24.
- 13) Strausbaugh LJ. Emerging infectious diseases: a challenge to all. *Am Fam Physician* 1997; 55(1) 111-7.
- 14) Washko R, Dow A, Henning KJ. A citywide survey of vancomycin-resistant *Enterococcus* - New York City. 1993. *Clin Infect Dis* 1996; 22(1) 136-7.
- 15) Hagman HM, Strausbaugh LJ. Vancomycin-resistant enterococci. The "superbug" scourge that's coming your way. *Postgrad Med* 1996; 99(5): 60-65, 69-71.
- 16) Edmond MB, Ober JF, Dawson JD, Weinbaum DL, Wenzel RP. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1996; 26(3): 1234-9.
- 17) Venditti M, Goglio A. Vancomycin susceptibility in enterococcal blood isolates in Italy: a multicenter retrospective analysis. *J Chemother* 1996; 8(1): 33-6.
- 18) Vandamme P y cols. Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10): 2572-6.
- 19) De Vera ME, Simmons RL. Antibiotic-resistant enterococci and the changing face of surgical infections. *Arch Surg* 1996; 131(3): 338-42.
- 20) Leclercq R. *Enterococci* acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis* 1997; 24(1): 580-4.
- 21) Thornsberry L. Emerging resistance in clinically important gram-positive cocci. *West J Med* 1996; 164(1): 28-32.
- 22) Jacoby GA. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. *Annu Rev Med* 1996; 47: 169-79.
- 23) Thompson J. *Enterococci*: increase in infection rate and antibiotic resistance. *Med Tijdschr Geneeskd* 1996; 140(3): 130-3.
- 24) Hanberger H, Nilsson LE. Increased antibiotic resistance of intestinal bacteria. *Lakartidningen* 1996; 93(3): 148-54.
- 25) Sifuentes-Osorio J y cols. Antimicrobial susceptibility patterns and high-level gentamicin resistance among enterococci isolated in a Mexican tertiary care center. *Rev Invest Clin* 1996; 48(2): 91-6.
- 26) Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol* 1996; 4(10): 401-7.
- 27) Quale J, Landman D, Saurina G, Atwood E, Djire V, Patel K. Manipulation of a hospital antimicrobial formulary to control an outbreak of Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 1996; 23(5): 1021-5.
- 28) Mandel, Douglas, Bennett, eds. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*. 3ª edición. Editorial Médica "Panamericana". 1990. p. 1637-40.