

# Determinación de cepas de *Enterococcus* resistentes a antibióticos glicopéptidos en pacientes hospitalizados en el Hospital “Santos Aníbal Dominicci”, Carúpano, Estado Sucre

Lorena Abadía-Patiño<sup>1\*</sup>, Elia Sánchez<sup>2</sup>, Yamilet Boada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Resistencia Bacteriana, Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Vicerrectorado Académico, Universidad de Oriente. <sup>2</sup>Hospital “Santos Aníbal Dominicci”, Carúpano, Edo. Sucre. <sup>3</sup>Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente

## RESUMEN

**Introducción:** El impacto clínico de infecciones causadas por cepas de enterococos resistentes a glicopéptidos, es encontrar la terapia adecuada para salvar la vida de ese paciente, además de la transferencia horizontal de determinantes de resistencia. Es un reto determinar el origen de la cepa productora del cuadro infeccioso (endógeno o exógeno). **Metodología:** Se estudiaron 111 hisopados rectales y muestras de heces de pacientes en hemodiálisis y Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital “Santos Aníbal Dominicci” (HSAD) de Carúpano, Venezuela, durante el período de febrero–julio 2007, con el objeto de determinar pacientes portadores de cepas de *Enterococcus* resistentes a los glicopéptidos. El aislamiento de *Enterococcus* se realizó en agar bilis esculina azida con y sin vancomicina (6 mg/mL); a las cepas crecidas en cribado se les determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). La detección de la ligasa de resistencia se hizo por PCR múltiple. **Resultados:** La CMI de vancomicina estaba entre 8 y 16 mg/L, para 5 y 19 cepas respectivamente. Las cepas son intrínsecamente resistentes, tienen el genotipo *vanC* en 24 aislamientos: 15 *vanC1* (815-bp) y 9 *vanC2* (827-bp). **Conclusiones:** Es necesario mantener un sistema de vigilancia mediante cultivos para identificar pacientes colonizados con cepas con alto nivel de resistencia a vancomicina.

**Palabras clave:** *Enterococcus*, resistencia, glicopéptidos.

## SUMMARY

**Introduction:** The clinical impact of infections caused by strains of enterococci resistant to glycopeptides is to find the appropriate therapy to save the life of the patient, in addition to the horizontal transfer of resistance determinants. It is a challenge to determine the origin of the infectious (endogenous or exogenous) disease producing strain. **Methodology:** One hundred and ten rectal swabs and stool samples from patients in the hemodialysis unit and Intensive Care Unit of hospital “Santos Anibal Dominicci” (HSAD) in Carupano, Sucre state, Venezuela, were studied during February–July 2007 in order to determine which patients carried glycopeptide-resistant *Enterococcus* strains. Isolation of *Enterococcus* was made via Bile Esculin Azide Agar with and without vancomycin (6 µg/mL). To the strains grown in screening were determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Detection of resistant ligases was done by multiplex PCR. **Results:** Minimum Inhibitory Concentration (MIC) levels were 8 mg/L and 16 mg/L for 5, and 19 strains, respectively. The strains are inherently resistant, have the *vanC* genotype in 24 isolates: 15 *vanC1* (815-bp), and 9 *vanC2* (827-bp). **Conclusions:** It could be helpful to create a surveillance system with a vancomycin screening to detect colonized patients with high level of glycopeptides resistant strains.

**Key words:** *Enterococcus*, resistance, glycopeptides.

## INTRODUCCIÓN

Está descrito que las infecciones por *Enterococcus* resistente a vancomicina (VRE) están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad como una de las primeras causas de infección en los centros de salud <sup>(1)</sup>. *Enterococcus* forma parte de la microbiota intestinal de individuos sanos y no se le atribuye una elevada virulencia, pero en el ámbito hospitalario constituye una de las causas más

\*Autor de correspondencia: labadia@udo.edu.ve

importantes de infección urinaria, endocarditis, bacteriemia, e infección de heridas. Las especies aisladas con más frecuencia son de 80 %–90 % *Enterococcus faecalis*<sup>(2)</sup> y 5 %–10 % *Enterococcus faecium*<sup>(3)</sup>. En este contexto, la resistencia a glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) plantea un serio problema para el tratamiento de la infección enterocócica, especialmente en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) debido a la escasez de alternativas terapéuticas<sup>(4)</sup>.

Entre los factores que favorecen la selección y la diseminación de genes que confieren resistencia, cabe mencionar el uso indiscriminado de antibióticos y el aumento en la población de pacientes cuyo sistema inmune se encuentra deprimido (enfermos con SIDA, pacientes que han recibido trasplantes de órganos y pacientes bajo quimioterapia). Estas condiciones favorecen la aparición de infecciones llamadas oportunistas, que deben ser tratadas mediante el suministro prolongado de antibióticos y en dosis altas; por último, el uso de antibióticos como factores de crecimiento suministrados en alimentación de animales y el desarrollo de los medios de transporte permiten la rápida diseminación de cepas resistentes<sup>(2)</sup>.

Después de la aparición de *Enterococcus* resistentes a los antibióticos betalactámicos y a altas concentraciones de aminoglucósidos en los años 80, la vancomicina representó el último antibiótico disponible para infecciones debido a *E. faecium*<sup>(5)</sup>. El primer caso de VRE descrito en 1986, fue publicado en Europa en 1988. En el mismo año, los investigadores franceses describieron que el mecanismo genético para la resistencia a vancomicina está situado en un plásmido<sup>(6)</sup>. Cinco años más tarde, identificaron un pequeño elemento genético móvil, el cual se conoce como transposón, denominado Tn1546, como la base genética para el alto nivel de resistencia a vancomicina<sup>(7)</sup>.

El peligro de tener pacientes portadores de VRE en servicios de alto riesgo, como UCI y hemodiálisis, es que pueden ser autoinfectados por su microbiota comensal. En Venezuela, solo se han reportado seis casos de infección por VRE, en Caracas, Maracaibo y Valencia. Desde la aparición del primer caso en un servicio hospitalario, es importante establecer un sistema de vigilancia, para evitar su diseminación en todo el hospital y que se perpetúe en el servicio. Es por ello que se planteó detectar la presencia temprana de VRE procedentes de pacientes portadores del HSAD, en Carúpano, Estado Sucre para evitar que se infecten y fallezcan.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de las muestras

Se tomaron tres muestras de heces e hisopados rectales (a intervalos de una semana) durante un período de seis meses (febrero-julio de 2007), en pacientes hospitalizados en los servicios de Cuidados Intensivos y hemodiálisis del Hospital Santos Aníbal Dominicci (HSAD), en Carúpano, Estado Sucre. Por carecer de comité de Bioética el hospital, el Director autorizó el estudio. Cada paciente, o un familiar (en caso de no poder tomar la decisión el mismo paciente), firmó el consentimiento previa información. Las muestras fueron colocadas en tubos con el medio Stuart hasta su procesamiento.

### Procesamiento de las muestras

Las muestras obtenidas fueron sembradas en agar Bilis Esculina Azida (BEA), en presencia y ausencia de 6 µg/mL de vancomicina e incubadas de 24 a 72 horas a 37 °C. En este trabajo se utilizaron placas de agar bilis esculina azida con y sin 6 µg/mL de vancomicina. Las colonias negras características de *Enterococcus* fueron almacenadas en BHI + glicerol al 20 % para su posterior estudio de susceptibilidad antibiótica y molecular<sup>(8)</sup>.

### Perfil de susceptibilidad a los antibióticos

El perfil de susceptibilidad a los antibióticos de todas las cepas almacenadas en el cribado fue obtenido por el método de difusión en agar con un inóculo 0,5 McFarland. Los antibióticos probados fueron: vancomicina 30 µg, teicoplanina 30 µg, gentamicina 120 µg, estreptomina 300 µg, ciprofloxacina 5 µg y ampicilina 10 µg. Los resultados se leyeron según normas establecidas por el Manual M100-S17 del Instituto de Control y Estándares de Laboratorio<sup>(9)</sup>. La cepa control fue *S. aureus* ATCC 25923. La CMI fue determinada por el método de dilución en agar Mueller-Hinton según el manual M100-S17. Las concentraciones iban de 0,5 a 128 µg/mL de vancomicina. La cepa control negativo empleada fue *E. faecalis* ATCC 29212 y la cepa control positivo fue *E. faecalis* V583<sup>(9)</sup>.

### Caracterización molecular de los genotipos de resistencia a los glicopéptidos

La detección de los diferentes genes de las ligasas de resistencia se llevó a cabo por medio de una PCR múltiple; colocando en cada tubo 100 ng de ADN, siguiendo el protocolo previamente descrito, en un volumen final de 50 µL<sup>(10)</sup>. Las cepas de *E. faecium* VanA 77903, *E. faecalis*

VanB V583 y *E. gallinarum* VanC 77905 fueron incluidas como controles.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante un período de seis meses, 110 muestras de heces e hisopados rectales fueron evaluadas. Veintinueve cepas VRE fueron recuperadas de esas 110 muestras notándose un color negro (posible VRE) luego del período de incubación en las placas con 6 µg/mL de vancomicina; se recuperó un total de 25 aislamientos positivos, posibles *Enterococcus*. La PCR se realizó tres veces para confirmar los amplificadores obtenidos. De las 24 cepas, 15 fueron positivas para el gen *vanC1* (815 pb), lo que es indicativo de la especie *E. gallinarum* y 9 como *vanC2* (827 pb), para *E. casseliflavus*.

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de los 24 aislamientos de las cepas de *Enterococcus* se determinó en agar Mueller-Hinton. Todos los aislamientos fueron sensibles a los antibióticos probados según el Manual del CLSI, excepto 7 cepas que fueron intermedias a vancomicina; 5 cepas mostraron una CMI de 8 µg/mL, 19 tenían CMI de 16 mg/L.

Los resultados de la PCR para 24 cepas *vanC*, se correlacionaron con los resultados de las CMI. El análisis de la PCR produjo un amplificado de 815-pb para *vanC1* y 827-pb para *vanC2*, confirmando el fenotipo VanC. Quince cepas con genotipo *vanC-1* y 9 cepas con genotipo *vanC-2*; los genes *vanC*, confieren bajo nivel de resistencia a vancomicina son nativos en enterococos móviles como *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* y transportan los operones *vanC1*, *vanC2* y *vanC3*, respectivamente<sup>(14-16)</sup>. Algunos autores, afirman que las especies móviles presentan resistencia intrínseca, bien sea constitutiva o inducible, de bajo nivel únicamente a vancomicina (CMI 2–32 µg/mL), como lo aquí observado<sup>(14,17)</sup>.

Existen pocos reportes dirigidos al significado clínico y epidemiológico de enterococos VanC; la poca prevalencia reportada para esas especies pudiera ser debido a su real baja frecuencia como patógenos. Sin embargo, hay algunos aislamientos clínicos esporádicos altamente resistentes a vancomicina de cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* transportando genes *vanA* y *vanB*<sup>(15, 16)</sup>.

A pesar de las altas tasas de colonización intestinal de cepas VanC, no se han identificado los factores de riesgo para su colonización y es importante establecer la relación entre su presencia en pacientes con riesgo de desarrollar infecciones por esta bacteria. En Brasil, se

detectaron 23 % de pacientes (previamente tratados con betalactámicos en UCI), colonizados por cepas *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*<sup>(18)</sup>. Aunque la relevancia clínica de estas cepas es incierta, son patógenos oportunistas y pueden ser potenciales reservorios de genes de resistencia<sup>(19)</sup>.

Las CMI de esas cepas van de 2–32 µg/mL, conduciendo a fracasos terapéuticos si se tratan con vancomicina, el antibiótico de elección en el medio hospitalario para el tratamiento de infecciones nosocomiales graves por cocos Gram positivos<sup>(20)</sup>. El uso y abuso de los antibióticos seleccionan bacterias multirresistentes, sobre todo en pacientes de servicios críticos como UCI y hemodiálisis<sup>(21)</sup>. Apareciendo en el intestino de estos pacientes cepas de *E. gallinarum* con alto nivel de resistencia a glicopéptidos, portadoras del operón *vanA*<sup>(22-23)</sup>. En Korea, se registraron 56 casos de bacteriemias causadas por *E. gallinarum* o *E. casseliflavus*, en pacientes con enfermedades del tracto biliar, con problemas de resistencia a los antibióticos en 30 % de las cepas de *E. gallinarum*<sup>(19)</sup>. Es por ello, que en este estudio se llama a la reflexión de un uso adecuado de los antibióticos para evitar que bacterias que colonizan el tracto gastrointestinal de los pacientes, se conviertan en patógenos oportunistas luego. En Arabia Saudi, se registró la presencia de cepas *E. gallinarum* con CMI a vancomicina de 8 µg/mL y a teicoplanina de 0,8 µg/mL, con los genotipos de resistencia *vanA/vanC*<sup>(24)</sup>.

En general, las recomendaciones actuales para el control de infecciones hospitalarias, incluyen cultivos de pesquisa para detectar portadores sanos de esta bacteria. Las técnicas de amplificación de ADN para la identificación de VRE en muestras de heces están ganando aceptación, no obstante, los laboratorios clínicos públicos venezolanos, no cuentan con técnicas moleculares. El Laboratorio de Resistencia Bacteriana del IIBCAUDO, recomienda el cribado con vancomicina para el aislamiento efectivo de VRE.

## CONCLUSIONES

Para el momento del estudio, no había reportes de infecciones por *Enterococcus* resistentes a glicopéptidos, no obstante es necesario hacer la pesquisa de portadores de estos enterococos en los servicios de Hemodiálisis y UCI, para evitar brotes por bacterias multirresistentes en el futuro. Por ahora, no es necesario aplicar medidas de control de infecciones por VRE en HSAD, ya que no se aislaron cepas con altos niveles de resistencia.

## AGRADECIMIENTOS

Al consejo de Investigación de la Universidad de Oriente (CI-2-040400-1254/05), así como a la Dirección de Planificación de la Universidad de Oriente (POA 2.4), por el financiamiento al Proyecto Estudio epidemiológico de cepas de *Enterococcus* resistentes a los glicopéptidos, aislados en pacientes hospitalizados en los cinco hospitales de referencia de la región nor-oriental.

## REFERENCIAS

- Vergis EN, Hayden MK, Chow JW, Snyderman DR, Zervos MJ, Linden PK, et al. Determinants of vancomycin resistance and mortality rates in enterococcal bacteremia. A prospective multicenter study. *Ann Intern Med.* 2001;135:484e492.
- Woodford N, Johnson A, Morrison D, Speller D. Current Perspectives on Glycopeptide Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):585-615.
- Patterson J, Sweeney A, Simms M, Carley N, Mangi R, Sabetta J, et al. An analysis of 110 serious enterococcal infections. Epidemiology, antibiotic susceptibility, and outcome. *Medicine.* 1995;74:191-200.
- Maciá M, Juan C, Oliver A, Hidalgo O, Pérez J. Caracterización molecular de un brote por *Enterococcus faecalis* resistente a los glicopéptidos en una unidad de cuidados intensivos. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2005;23(08):460-463.
- Grayson M, Eliopoulos G, Wennersten C. Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: A 22-year review at one institution. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:2180-2184.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988;319:157-161.
- Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 1993;37:1563-15.
- McFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 2ª edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1990.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17ª edición. Approved standard M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. 2007;27(1).
- Depardieu F, Périchon B, Courvalin P. Detection of the van alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5857-5860.
- Billot-Klein D, Gutmann L, Sablé S, Guittet E, Van Heijenoort J. Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin-resistant VANB-type *Enterococcus* D366 and of the naturally glycopeptide-resistant species *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, and *Enterococcus gallinarum*. *J Bacteriol.* 1994;176:2398-2405.
- Uttley A, Collins C, Naidoo J, George R. Vancomycin resistant enterococci. *Lancet Infect Dis.* 1988;i:57-58.
- Quintiliani R, EVERS S, Courvalin P. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin in enterococci. *J Infect Dis.* 1993;167:1220-1223.
- Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *J Antimicrob Chemother.* 1994;38:1788-1793.
- Toye B, Shymanski J, Bobrowska M., Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiologic significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the *vanC* genotype). *J Clin Microbiol.* 1997;35:1637-1640.
- Reid KC, Cockerill III FR, Patel R. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: A report of 20 cases. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1540-1506.
- Leclercq S, Dutka-Malen S, Duval J., Courvalin P. Vancomycin resistance determinant *vanC* is specific of *Enterococcus gallinarum*. *J Antimicrob Chemother.* 1992;36:2005-2008.
- da Fonseca DW, Gontijo-Filho PP, Conceição N, Gonçalves A, Marques R. Risk factors for vancomycin-resistant enterococci colonisation in critically ill patients. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* 2012;107:57-63.
- Choi SH, Lee SO, Kim TH, Chung JW, Choo EJ, Kwak YG, et al. Clinical features and outcomes of bacteraemia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: Analysis of 56 cases. *Clin Infect Dis.* 2004;38:53-61.
- Courvalin P. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *Inter J Med Microbiol.* 2005;294:479-486.
- Neves FP, Ribeiro RL, Duarte RS, Teixeira LM, Merquior VL. Emergence of the *vanA* genotype among *Enterococcus gallinarum* isolates colonizing the intestinal tract of patients in a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;33:211-215.
- Camargo IL, Barth AL, Pilger K, Seligman BG, Machado AR, Darini AL. *Enterococcus gallinarum* carrying the *vanA* gene cluster: First report in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:1669-1671.
- Merquior VLC, Neves FPG, Ribeiro RL, Duarte RS, Marques EA, Teixeira LM. Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the *vanA* and *vanC1* genes. *J Med Microbiol.* 2008;57:244-245.
- Somily AM, Al-Mohizea MM, Absar MM, Fatani AJ, Ridha AM, Al-Ahdal MN, et al. Molecular epidemiology of vancomycin resistant enterococci in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Microbial Pathogenesis.* 2016;97:79-83.