Pacientes colonizados con *Enterococcus faecalis* VanB, internalizados en el Hospital Universitario "Luis Razetti", Barcelona, Venezuela

Lorena Abadía-Patiño, Annie Tineo

Laboratorio de Resistencia Bacteriana del Dpto. de Biomedicina del IIBCAUDO, Cumaná, Edo. Sucre, Venezuela

RESUMEN

Durante los meses de febrero a julio de 2007, se muestrearon 57 pacientes hospitalizados en los servicios de UCI (Unidad cuidados Intensivos) y HD (Hemodiálisis), en la búsqueda de colonizados para *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos. Veintiuno (14 de UCI y 7 de HD) hidrolizaron la esculina y crecieron en presencia de 6 µg/mL de vancomicina. Las principales especies de *Enterococcus* aisladas fueron: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* y *E. faecalis*. Las CMI de vancomicina estuvieron en un rango entre 2 y 16 mg/L y la CMI modal de las cepas estudiadas fue 8 mg/L. Hubo una prevalencia de 7 % de *E. faecalis vanB*.

Palabras clave: *Enterococcus*, glucopéptidos, hospital, infecciones.

SUMMARY

During February and July of 2007, 57 inpatients of Intensive Care Unit and Hemodialyze were swabbed searching glycopeptides-resistant *Enterococcus* colonized. Twenty one (14 of ICU and 7 of HD) hydrolyzed sculin and grew on vancomycin 6 µg/ml. Main species were *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. faecalis*. Vancomycin MICs were between 2 and 16 mg/l and MIC modal was 8 mg/l. Prevalence of *vanB E. faecalis* was 7 %.

Key words: *Enterococcus*, glycopeptides, hospital, infections.

INTRODUCCIÓN

Aunque *Enterococcus* spp. no se considera como patógeno, este se ha convertido en una de las principales causas de infecciones intrahospitalarias más importantes debido a su resistencia intrínseca a muchos antibióticos (bajo nivel de resistencia a betalactámicos y vancomicina, fluoroquinolonas y aminoglucósidos) y adquirida (alto nivel de resistencia a glucopéptidos y alta carga de aminoglucósidos) [1]. Los humanos son el reservorio más importante de *Enterococcus* spp. a nivel del tracto gastrointestinal. *E. faecalis* se aísla en 80 % de los pacientes hospitalizados y *E. faecium* en 30 %; las otras especies de este género rara vez están implicadas en patologías infecciosas humanas [2]. Otros sitios anatómicos, incluyendo heridas y úlceras crónicas por decúbito, actúan como reservorio de *Enterococcus* spp. en pacientes hospitalizados, las mujeres pueden estar colonizadas a nivel vaginal de manera asintomática y 60 % de los hombres hospitalizados son portadores de *Enterococcus* spp. en el área perineal y en el meato urinario [3].

Este microorganismo sobrevive en las superficies del medio ambiente; y se han aislado cepas resistentes del medio que rodea a los pacientes infectados, incluyendo termómetros, tensiómetros, batas, ropa de cama de pacientes, barandas de cama, mesas y piso [4]. Los trabajadores de la salud también pueden colonizarse con cepas de enterococos resistentes, aislándoseles de las manos o el tracto gastrointestinal [3]. La colonización rectal por parte de estos microorganismos se ha encontrado en 100 % de los pacientes con bacteriemia debida a *Enterococcus* spp. vancomicino resistentes (EVR); pueden colonizar la piel de 86 % de los pacientes con bacteriemia por EVR (5). La colonización persistente del tracto gastrointestinal es el impacto clínico más común de EVR [3].

Las infecciones enterocócicas fueron consideradas de origen endógeno; se ha demostrado también la transmisión cruzada de cepas dentro de un hospital, así como la transmisión interhospitalaria [2]. La resistencia de *Enterococcus* spp. a los glucopéptidos apareció, por vez primera,

en Francia en 1986 [6]. En los siguientes años, EVR se convirtió en causa importante de infecciones nosocomiales, especialmente, en Estados Unidos y Europa [2]. Existen diferencias marcadas entre dichos continentes en cuanto a la aparición de EVR, se ha reportado que en hospitales europeos, se introdujo a través de la colonización de pacientes con EVR endémicos, pero no resultan claras las condiciones bajo las cuales sucedió su introducción en hospitales estadounidenses [7].

En Venezuela, se han reportado casos en todo el territorio nacional, de pacientes infectados por EVR [8-10]. No obstante, estudios sobre la colonización de los pacientes tanto en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), como hemodiálisis (HD), no se han realizado. El objetivo de este trabajo fue detectar los pacientes que estuviesen colonizados por cepas de EVR, para evitar una infección endógena en los servicios antes descritos y su diseminación entre los pacientes de la misma sala.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población

Se tomaron en cuenta todos los pacientes hospitalizados en UCI y HD en un período de seis meses a partir de febrero a julio de 2007, en el Hospital Universitario "Luis Razetti", en Barcelona, Estado Anzoátegui (HULR). Los criterios de inclusión fueron: pacientes diabéticos, cancerosos, con insuficiencia renal, trasplantados, con tratamientos antibióticos, independientemente de la edad. En los criterios de exclusión, se contemplaron pacientes provenientes de cualquier otro servicio hospitalario, así como aquellos pacientes que no dieran su consentimiento.

Obtención de muestras

El proyecto fue evaluado por la Comisión de Bioética del HULR, el cual dio el visto bueno para iniciar el trabajo en el hospital. Los pacientes o un testigo, firmaron el consentimiento informado. Se tomaron hisopados rectales en los pacientes de UCI y muestras de heces en los de HD; tres muestras a intervalos semanales. Todas las muestras se tomaron con hisopos estériles colocados en tubos con el medio de transporte Cary-Blair hasta su siembra e identificación [11].

Procesamiento de las muestras e identificación de especies

Todas las muestras se sembraron en agar bilis esculina azida (BEA), en presencia y ausencia de 6 $\mu g.ml^{-1}$ de vancomicina e incubadas de 24-72 h/35 °C, con el objeto de favorecer el crecimiento de cepas resistentes a glicopéptidos. Las cepas que crecieron en presencia de 6 $\mu g.ml^{-1}$ vancomicina, fueron recuperadas y almacenadas a -80 ºC en caldo infusión cerebro corazón (BHI) más glicerol al 2 %. Las especies fueron determinadas por PCR múltiple [12].

Patrón de susceptibilidad a los antibióticos

Los patrones de susceptibilidad de *Enterococcus* spp. a los antibióticos fueron obtenidos mediante la realización de antibiogramas, los cuales se llevaron a cabo por el método de difusión según pruebas estandarizadas [13]. Los antibióticos probados fueron, vancomicina 30 µg; teicoplanina 30 µg; ciprofloxacina 5 µg; estreptomicina 300 µg; gentamicina 120 µg y ampicilina 10 µg. La CMI fue determinada por el método de dilución en agar Muëller-Hinton. Las placas de agar contenían diferentes concentraciones de vancomicina (0,5 a 128 $\mu g.mL^{-1}$). La cepa control negativo fue *E. faecalis* ATCC 29212 y la cepa control positivo fue *E. faecalis* V583 [13].

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 la PCR múltiple; se colocó en cada tubo 100 ng de ADN, siguiendo la metodología descrita anteriormente [12], en un volumen final de 50 µl. La cepa control positivo para el gen *vanB* fue *E. faecalis* V583 y para el gen *vanC* fue *E. gallinarum* BM4174.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 57 pacientes muestreados tanto de UCI como de HD, 21 hidrolizaron la esculina y crecieron en presencia de 6 µg/mL de vancomicina. De las 21 cepas, 14 provenían de pacientes de UCI y 7 de HD. Las principales especies de *Enterococcus* identificadas por PCR en este trabajo fueron: *E. gallinarum* (21 %), *E. casseliflavus* (9 %) y *E. faecalis* (7 %) (Tabla 1). A pesar de haber crecido una gran parte de las cepas en BEA suplementado con vancomicina, en el antibiograma, ninguna de las cepas presentó fenotipo de resistencia a vancomicina. Una sola cepa fue resistente a alto nivel a estreptomicina y la mayoría presentó resistencia de alto nivel a ciprofloxacina (Tabla 2).

Como se observó en este estudio, la especie predominante es *E. gallinarum*, razón por la cual, se puede esperar en cualquier momento que aparezcan cepas como las de Italia [14], causando brotes en el hospital Luis Razetti.

Tabla 1. Principales especies aisladas, sus fenotipos y genotipos de resistencia y el nivel de resistencia a los glicopéptidos, según el origen del paciente en el Hospital Universitario "Luis Razetti" en Barcelona, Estado Anzoátegui.

Código	Servicio	Fenotipo	Genotipo	Especie	CMI (mg/L)
2C4	HD	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	8
2C5	HD	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	4
2C6	HD	VanC	vanC2	*E. casseliflavus*	8
2C7	HD	VanC	vanC2	*E. casseliflavus*	8
2C8	HD	VanC	vanC2	*E. casseliflavus*	8
2D2	HD	VanC	vanC2	*E. casseliflavus*	8
2D3	UCI	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	8
2D4	UCI	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	8
2D5	HD	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	2
2D8	UCI	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	8
2G8	UCI	VanC	vanC2	*E. casseliflavus*	8
2G9	UCI	VanB	vanB	*E. faecalis*	8
2H1	UCI	VanB	vanB	*E. faecalis*	16
2H2	UCI	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	16
2H3	UCI	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	4
2H4	UCI	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	8
2H7	UCI	VanC	vanB	*E. faecalis*	8
2H8	UCI	VanB	vanB	*E. faecalis*	8
2H9	UCI	VanC	vanC1	E. gallinarum	8
2H10	UCI	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	16
2I1	UCI	VanC	vanC1	*E. gallinarum*	16

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria. HD: Hemodiálisis. UCI: Unidad de cuidados intensivos

Tabla 2. Antibiotipos de 21 cepas de Enterococcus spp. aisladas de muestras provenientes de pacientes de hemodiálisis y unidad de cuidados intensivos del hospital universitario "Luis Razetti" en Barcelona, Estado Anzoátegui.

N°de cepas	VAN	TEC	STR	AMP	GEN	CIP
3	I	S	S	S	S	I
1	I	S	R	S	S	S
1	I	S	S	S	S	R
1	I	S	S	S	S	I
7	S	S	S	S	S	R
5	S	S	S	S	S	I
2	S	S	S	S	S	S
1	S	S	S	S	S	R

S: Sensible. R: Resistente. I: Intermedio. VAN: Vancomicina. TEC: Teicoplanina. STR: Estreptomicina. Amp: Ampicilina. GEN: Gentamicina. CIP: Ciprofloxacina.

Este porcentaje de colonización de los pacientes de UCI, debe generar la aplicación de medidas estrictas de control de infecciones, para evitar que se diseminen los determinantes de resistencia a otras bacterias, que se trasporten en las manos del personal de salud estas bacterias, que se restrinja el uso de vancomicina, cefalosporinas de tercera generación en estos pacientes [15].

Las CMI de vancomicina estuvieron en un rango entre 2 y 16 mg/L y la CMI modal de las cepas estudiadas fue 8 mg/L. Tres cepas sensibles a vancomicina (CMI 2-4 mg/L) y 18 con susceptibilidad intermedia (CMI 6-16 mg/L). El genotipo con mayor prevalencia en los servicios de HD y UCI del HULR fue *vanC$_1$*. Hubo una prevalencia de 7 % de *E. faecalis vanB* (Tabla 1). La detección de la Resistencia a los glucopéptidos por métodos fenotípicos no es confiable; se debe confirmar por biología molecular que no existen operones de resistencia a glucopéptidos, ya que existen cepas con bajo nivel de expresión en el antibiograma, pero los tratamientos con glucopéptidos fracasan, sobre todo con vancomicina, que es el antibiótico más utilizado de esta familia. Esto ha sido demostrado en la literatura internacional, como es el caso de cepas de *E. faecium*, que crecieron en el cribado en agar BEA 6 µg.mL^{-1}, CMI ≤ 4 µg.mL^{-1} y genotipo *vanB* [16], como lo observado en este trabajo con cepas de *E. faecalis*.

Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, la transferencia de este operón, a especies del género *Enterococcus*, con lo cual aumenta la probabilidad de brotes masivos de bacterias capaces de resistir el tratamiento con vancomicina [17]. Tener una colonización intestinal con cepas *vanB* es una bomba de tiempo, ya que la mayoría de las cepas son enterococos móviles y se ha evidenciado la transferencia de los elementos genéticos móviles a estas especies. En el año 2005, en Italia, se reportaron aislamientos de cepas de *E. gallinarum* a partir de muestras de carne de ganado destinadas al consumo humano, con

CMI de 1 a 64 µg.mL^{-1}; en dicho estudio se aisló una cepa de *E. gallinarum, vanB*, además de su operón intrínseco *vanC$_1$* [14].

Este es el primer estudio realizado en Venezuela con el objeto de detectar portadores de cepas de *Enterococcus* con operones de resistencia a glucopéptidos. Durante el estudio no se registró ningún caso de infección por *Enterococcus* en los pacientes colonizados muestreados. Sin embargo, se han reportado en diferentes hospitales a nivel nacional, fallecimientos de pacientes de UCI a causa de infecciones por cepas de *E. faecium* VanB con resistencia a vancomicina [8-10]. Dichos estudios no refieren haber determinado si los pacientes estaban colonizados por estas bacterias, ni el origen de la infección. Las bacterias fueron aisladas de secreciones traqueobronquiales, puntas de catéter, secreciones abdominales, heridas y otros líquidos, con 7 % de prevalencia de EVR [8], siendo la misma tasa de prevalencia encontrada en este estudio pero en portadores.

Conclusiones

En el Hospital Universitario "Luis Razetti", en Barcelona, Estado Anzoátegui, existe una prevalencia de 7 % de portadores de EVR en los pacientes en terapia intensiva y hemodiálisis. Los pacientes están colonizados principalmente por *E. gallinarum*. Razón por la cual se debe implementar un programa de control de antibióticos, para evitar la diseminación del determinante de resistencia *vanB* hacia otras bacterias patógenas en diferentes servicios.

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 glucopéptidos, aislados en pacientes hospitalizados en los cinco hospitales de referencia de la región nor-oriental.

REFERENCIAS

1. Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, Shinabarger D, Millichap J, Peterson LR, et al. Resistance to linezolid: Characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. Antimicrob. Agents Chemother. 2001;45(7):2154-2156.
2. Murray B. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev. 1990;3:46-65.
3. Acosta-Gnass S. *Enterococcus.* Grupo Asesor en Control de Infecciones y Epidemiología (CODEINEP). 2005.
4. Malani P, Thal L. Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* from Michigan hospitals during a 10 year period. J Antimicrob Chemother. 2002;49:841-843.
5. Elting L, Rubenstein E, Rolston k, Bodey G. Outcomes of bacteremia in patients with cancer and neutropenia: Observations from two decades of epidemiological and clinical trials. Clin Infect Dis. 1997;25(2):247-259.
6. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium.* N Engl J Med. 1998;319:151–161.
7. Casadewall B, Courvalin P. Characterization of the *vanD* glycopeptides resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. J Bacteriol. 1999;181:3644-3648.
8. Mejías F, Montilla N, Payares D, Ojeda X, Paraqueimo M. Resistencia bacteriana a los antibióticos en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital "Dr. Domingo Luciani" Laboratorio de Bacteriología. Enero-Julio 2001. Bol Venezol Infectol. 2003;14(1):20.
9. Pineda M, Perozo-Mena A, Lleras A, Bonilla X, Méndez A, González M, Villalobos H. Primer reporte de *Enterococcus* resistente a vancomicina en el Estado Zulia. Centro de referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela. Jornadas Nacionales de Infectología "Homenaje al posgrado de Infectología pediátrica. Hospital JM de los Ríos". Abstract BA-16. Bol Venezol Infectol. 2007;18(2):54.
10. Ruiz N, Velásquez de Azocar Y, Gayoso E, Moy F, Spadola E, Guzmán M, et al. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, reporte del primer caso en el hospital militar "Dr. Carlos Arvelo" y revisión de la literatura. Bol Venezol Infectol. 2007;18(2):54.
11. Drews S, Johnson G, Gharabaghi F, Roscoe M, Matlow A, Tellier R, et al. A 24-Hour Screening Protocols for Identification of Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium.* J Clin Microbiol. 2006;44:1578-1580.
12. 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;42:5857-5860.
13. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 17ª edición. 2007;27(1). Approved standard M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
14. Mammina C, Di Noto A, Costa A, Nastasi A. VanB-VanC1 *Enterococcus gallinarum*, Italy. Emerg Infect Dis. 2005;11(9):1491-1492.
15. Ostrowsky BE, Trick WE, Sohn AH, Quirk S, Holt S, Carson L, et al. Control of vancomycin resistant *Enterococcus* in health care facilities in a region. N Engl J Med. 2001;344:1427-1433.
16. Grabsch EA, Chua k, Xie S, Byrne J, Ballard SA, Ward PB, et al. Improved detection of *vanB2*-containing *Enterococcus faecium* with vancomycin susceptibility by Etest using Oxgall supplementation. J Clin Microbiol. 2008;46(6):1961-1964.
17. Launay A, Ballard SA, Johnson PDR, Grayson ML, Lambert T. Transfer of vancomycin resistance transposon Tn*1549* from *Clostridium symbiosum* to *Enterococcus* spp. in the gut of gnotobiotic mice. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(3):1054-1062.