

Caracterización molecular de un brote por *Enterococcus faecalis* resistente a los glucopéptidos en una unidad de cuidados intensivos

María Dolores Maciá^a, Carlos Juan^a, Antonio Oliver^a, Olga Hidalgo^b y José Luis Pérez^a

Servicios de ^aMicrobiología y ^bMedicina Preventiva. Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca. España.

INTRODUCCIÓN. Entre enero y agosto de 2003 se aisló *Enterococcus faecalis* resistente a glucopéptidos en 8 pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI).

MÉTODOS. La sensibilidad antibiótica se determinó por difusión con discos y Etest, la relación clonal por electroforesis de campo pulsado (PFGE) y la presencia del gen *vanA* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

RESULTADOS Y CONCLUSIONES. Todos los aislados fueron *vanA*+ y presentaron idéntico patrón de PFGE, lo cual puso de manifiesto un brote epidémico en la UCI.

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*. Resistencia a los glucopéptidos. Epidemiología molecular.

Molecular characterization of a glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* outbreak in an intensive care unit

INTRODUCTION. Between January and August 2003 glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* was isolated from eight patients admitted to the intensive care unit (ICU).

METHODS. Antibiotic susceptibility testing was performed by disk diffusion and the Etest, clonal relatedness of the isolates was studied by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and the presence of *vanA* was investigated by PCR.

RESULTS AND CONCLUSIONS. All the isolates were *vanA*-positive and had an identical PFGE pattern, showing that an outbreak had occurred in our ICU.

Key words: *Enterococcus faecalis*. Glycopeptide resistance. Molecular epidemiology.

Introducción

Los enterococos son uno de los principales patógenos nosocomiales. Aunque forman parte de la flora intestinal de los individuos sanos y no se les atribuye una elevada virulencia, en el ámbito hospitalario constituyen una de las causas más importantes de endocarditis, bacteriemia, infección urinaria e infección de herida¹. Las especies aisladas con más frecuencia son *Enterococcus faecalis* (80-90%) y *Enterococcus faecium* (5-10%). Al creciente protagonismo de los enterococos en este ámbito ha contribuido su resistencia intrínseca a un amplio número de antibióticos y su gran capacidad para adquirir nuevas resistencias. Además, su tolerancia a la actividad bactericida de los betalactámicos y glucopéptidos hace necesaria la combinación con aminoglucósidos en infecciones graves como meningitis o endocarditis².

En este contexto, la resistencia a glucopéptidos plantea un serio problema para el tratamiento de la infección enterocócica, especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI), debido a la escasez de alternativas terapéuticas. La resistencia a la glucopéptidos en *Enterococcus* es, principalmente, adquirida. El fenotipo más frecuente, tanto en *E. faecalis* como en *E. faecium*, es el VanA, cuyos determinantes genéticos de localización plasmídica³ se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel tanto a la vancomicina como a la teicoplanina. La reciente documentación de la transferencia del fenotipo VanA desde *E. faecalis* a *Staphylococcus aureus*⁴ acentúa aún más el riesgo potencial que implica la diseminación de este mecanismo de resistencia.

En este trabajo se presenta la caracterización molecular de un brote de 8 casos de infección/colonización por *E. faecalis* resistente a glucopéptidos producido en la UCI del Hospital Universitario Son Dureta (que engloba tres unidades adyacentes: general [UCI-G], traumatología [UCI-T] y coronarias [UCI-C]), entre enero y agosto de 2003.

Métodos

La identificación de las cepas de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos en muestras clínicas procedentes de la UCI se realizó mediante el sistema Rapid ID 32 Strep (BioMérieux, MarcyL'Etoile, Francia). El perfil de sensibilidad antibiótica (ampicilina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, cotrimoxazol, ciprofloxacino, tetraciclina y linezolid) se determinó usando la técnica de difusión con discos. Posteriormente se verificó la resistencia a los glucopéptidos mediante la estimación de la concen-

Correspondencia: Dra. M.D. Maciá.

Servicio de Microbiología.

Hospital Universitario Son Dureta.

Andrea Doria, 55. 07014 Palma de Mallorca. España.

Correo electrónico: mmaciaromero@hotmail.com

Manuscrito recibido el 2-12-2004; aceptado el 18-2-2005.

tración inhibitoria mínima para vancomicina y teicoplanina por Etest® (AB Biodisk, Solna, Suecia).

Los estudios de colonización intestinal por *E. faecalis* resistente a glucopéptidos se llevaron a cabo mediante la siembra de torundas rectales en placas selectivas con 10 µg/ml de vancomicina (Agar Campylosel, BioMérieux, MarcyL'Etoile, Francia), procediendo a la identificación y evaluación de la sensibilidad antibiótica de los aislados positivos como anteriormente se ha descrito.

La determinación de la clonalidad de los aislados de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos se realizó utilizando la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE)⁵. Tras la lisis del ADN cromosómico embebido en los bloques de agarosa, se procedió a su restricción con *Sma*I y posterior electroforesis (Chef DRIII System, Bio-Rad, La Jolla, California) con las siguientes condiciones: pulso inicial, 1 s; pulso final, 20 s; tiempo total de electroforesis, 20 h a 6 V/cm². Los patrones de macrorrestricción se interpretaron siguiendo los criterios de Tenover et al⁶.

La presencia del gen *vanA* en las cepas de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos fue confirmada por amplificación de un fragmento de 766 pb del gen *vanA* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos previamente descritos⁷, VANAF (5'-GCTATTCACTGTACTC-3') y VANAR (5'-CAGCGGCCATCATACGG-3'). Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C 12 min (94 °C 1 min-56 °C 1 min-72 °C 1 min) 35 ciclos, 72 °C 10 min.

Resultados

En la figura 1 y en la tabla 1 se muestra el período de ingreso en UCI, la unidad y la cama ocupada, así como la fecha y el tipo de muestra del primer aislado de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos de cada uno de los casos que formaron parte del brote.

Como ilustra la figura 1, entre enero y abril de 2003 se detectaron 4 casos de infección por *E. faecalis* resistente a glucopéptidos en pacientes ingresados en dicho servicio. Los casos 1 y 3 se encontraban en camas contiguas. Posteriormente, como consecuencia de la realización de un estudio de colonización a los 6 pacientes que se hallaban en la UCI en ese momento, se detectaron dos portadores intestinales, 5 y 6, en camas adyacentes a la del cuarto caso. El caso 6, en concreto, había estado ingresado previamente en la cama que pocos días antes había ocupado el tercer infectado, conectando así los casos de la unidad de traumatología con los de la unidad de general.

A pesar de las medidas de control establecidas (aislamiento de los portadores e infectados, limpieza y desinfección de las áreas implicadas, personal exclusivo para cada paciente y uso de instrumental desecharable) en agosto se

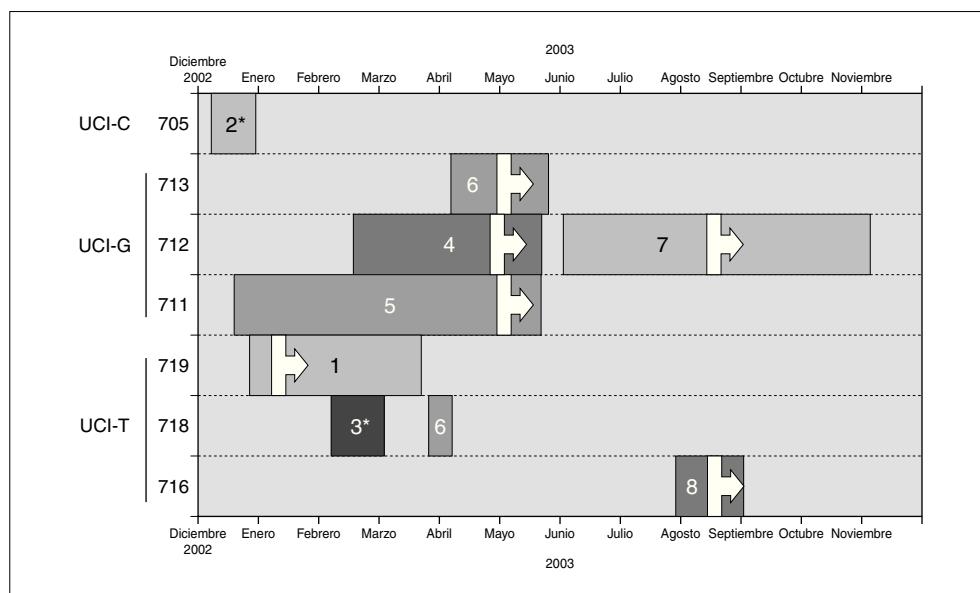


Figura 1. Distribución de pacientes infectados y portadores de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos. A cada paciente se le ha asignado un número del 1 al 8, siguiendo el orden cronológico del aislado. El eje de abscisas muestra el tiempo de ingreso en UCI y el de ordenadas la unidad y la cama ocupada. La fecha del primer aislado se representa con una flecha en el interior de los rectángulos. En los pacientes 2 y 3 (marcados con un asterisco) se aisló después de ser trasladados a planta, el 4-3-2003 (Medicina Interna) y el 5-4-2003 (Traumatología), respectivamente.

TABLA 1. Datos de los pacientes infectados o colonizados por *E. faecalis* resistente a glucopéptidos

Paciente	Fecha de aislado del EFRG	Muestra	Estancia en UCI			
			Desde	Hasta	Unidad	Cama*
1	8-1-2003	Hemocultivo	31-12-2002	13-03-2003	UCI-Traumatología	719
2	4-3-2003	Herida quirúrgica	14-12-2002	20-12-2002	UCI-Coronarias	705
3	5-4-2003	Úlcera sacra	10-2-2003	4-3-2003	UCI-Traumatología	718
4	20-4-2003	Hemocultivo	13-2-2003	10-5-2003	UCI-General	712
5	23-4-2003	Exudado rectal	29-12-2002	23-05-2003	UCI-General	711
6	23-4-2003	Exudado rectal	28-3-2003	2-4-2003	UCI-Traumatología	718
			2-4-2003	23-5-2003	UCI-General	713
7	12-8-2003	Úlcera de decúbito	2-6-2003	4-11-2003	UCI-General	712
8	18-8-2003	Exudado rectal	29-7-2003	30-8-2003	UCI-Traumatología	716

*En los pacientes 2 y 3 el *E. faecalis* resistente a glucopéptidos se aisló después de su traslado a planta, el 4-3-2003 (Medicina Interna) y el 5-4-2003 (Traumatología), respectivamente.

EFRG: *E. faecalis* resistente a glucopéptidos; UCI: unidad de cuidados intensivos.

volvió a aislar *E. faecalis* resistente a glucopéptidos en un paciente que había pasado a ocupar la misma cama del cuarto infectado. Se realizó un segundo estudio de colonización a los 11 pacientes ingresados en la UCI en ese momento, y se detectó un nuevo portador rectal.

Todos los aislados fueron sensibles a ampicilina, tetraciclina y linezolid y presentaron resistencia de alto nivel a gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, cotrimoxazol y ciprofloxacino. La concentración inhibitoria mínima (CIM) a vancomicina fue superior a 256 µg/ml y la CIM a teicoplanina fue de 32-64 µg/ml. Esta resistencia de alto nivel a los glucopéptidos caracterizó a los aislados como fenotipo VanA. La PCR fue positiva en todos los aislados para el gen *vanA*.

Mediante la técnica de PFGE se evidenció que los aislados de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos correspondientes a los 8 pacientes presentaban el mismo patrón de bandas, demostrando que constituyan un único clon (fig. 2).

Discusión

La codificación plasmídica de la resistencia a glucopéptidos en *E. faecalis* resistente a glucopéptidos, convierte a este patógeno oportunista en uno de los más peligrosos en el ambiente hospitalario. La presión selectiva ejercida por el frecuente uso de antibióticos de amplio espectro, la capacidad de los enterococos para sobrevivir en los objetos inanimados y ser transmitidos a través de las manos del personal sanitario, así como la presencia de pacientes con colonización intestinal favorecen su persistencia y diseminación en dicho entorno.

En Estados Unidos, la resistencia a la vancomicina en los enterococos es ya una situación endémica en muchos hospitales, y alcanza el 17,7% de cepas resistentes en

2002⁸. En Europa, sin embargo, la prevalencia de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos en el ámbito nosocomial es menor, situándose por debajo del 3% en términos generales y en torno al 0,8% en España según estudios recientes⁹. No obstante, en España hay constancia hasta la fecha de dos brotes: el primero, descrito por Peset et al¹⁰ implicó a un total de 16 pacientes entre 1994 y 1995 y el segundo, recientemente publicado, afectó a 6 pacientes en un hospital de Galicia¹¹. En otro trabajo se ha detectado el mismo clon de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos en hospitales de tres regiones españolas distintas¹² y recientemente también se ha documentado el aislado de un clon de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos en tres hospitales de ciudades distintas de Portugal¹³. Estos datos, sumados al nuevo brote descrito en este trabajo, advierten del grave problema epidemiológico que se avecina si estas situaciones no se controlan debidamente.

Aunque es muy difícil establecer exactamente cuáles son los elementos de dispersión, en nuestro brote hay una clara coincidencia temporoespacial, prácticamente entre todos los pacientes. La figura 1 sugiere al paciente 6 como el que propagó *E. faecalis* resistente a glucopéptidos desde UCI-T a UCI-G. La persistencia del patógeno durante más de 3 meses en el medio (entre los casos 6 y 7) pone de manifiesto la difícil erradicación del mismo a pesar de las medidas adoptadas.

Medidas de prevención imprescindibles son el uso de bata y guantes, junto al lavado de manos por parte del personal sanitario. Asimismo el control sobre la limpieza y desinfección de superficies, mobiliario e instrumental médico debe ser estricto.

Cuando se detecta un caso de infección o colonización por *E. faecalis* resistente a glucopéptidos, el paciente debe ser aislado del resto en una habitación privada y, obviamente, deben ser observadas al máximo todas las medidas anteriormente mencionadas. En nuestro caso, además, se dispuso de personal exclusivo para atender a los pacientes implicados en el brote, se emplearon uniformes desechables y material de un único uso o en su defecto, autoclavable. Otra medida que se debe adoptar es la realización de estudios de colonización gastrointestinal por *E. faecalis* resistente a glucopéptidos a los pacientes con los que haya compartido habitación e incluso, en ocasiones, a todos los que se encuentren en la misma unidad donde se ha detectado el caso. Realizados como estudios transversales periódicos son, a su vez, útiles para evaluar la situación epidemiológica en la que se encuentra el hospital. En este sentido, como se ha comentado, se realizaron dos estudios de colonización intestinal, los portadores detectados fueron aislados, y se tomaron muestras rectales semanalmente, manteniéndose el aislamiento hasta la documentación de tres muestras negativas consecutivas, coincidiendo con las medidas propuestas por Ridwan et al¹⁴. Asimismo, las técnicas de epidemiología molecular resultan de gran utilidad para la detección, el seguimiento y el control de los brotes, pudiendo identificar en cada caso el elemento de diseminación, ya sea la propagación de un mismo clon, o la transmisión de elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones. Por último, la correcta información y preparación del personal medicosanitario, así como el uso racional de los antibióticos son también factores cruciales que contribuyen a evitar que este importante problema epidemiológico, aún potencial, se convierta en una alarma real.

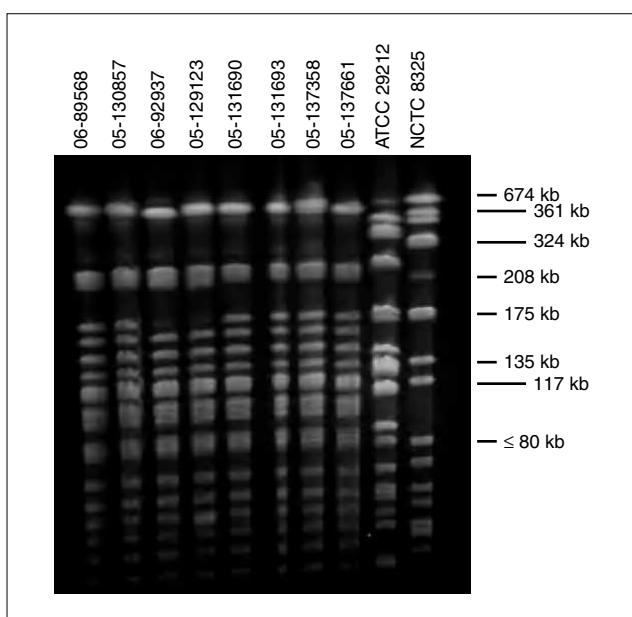


Figura 2. Patrón de macrorrestricción de los aislados (uno por paciente) de *E. faecalis* resistente a glucopéptidos. La cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 se utilizó como control y la cepa de *S. aureus* NCTC 8325 como marcador de peso molecular.

Bibliografía

1. Lewis CM, Zervos MJ. Clinical manifestations of enterococcal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1990;9:111-7.
2. Moellering RC. Antimicrobial susceptibility of enterococci: in vitro studies of the action of the antibiotics alone or in combination. In: Bismo L, editor. *Treatment of infective endocarditis.* New York: Grune and Stratton; 1981. p. 81-96.
3. Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:1563-71.
4. González-Zorrí B, Courvalin P. *VanA*-mediated high level glycopeptide resistance in MRSA. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:67-8.
5. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med.* 1998; 15:17-31.
6. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-9.
7. Sahm DF, Free L, Handwerger S. Inducible and constitutive expression of *vanC-1*- encoded resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1480-4.
8. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparison among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2002. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;50:59-69.
9. Goossens H, Jubes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant enterococci in at-risk hospital wards and in vitro susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:S3:5-12.
10. Pesez V, Tallon P, Sola C, Sánchez E, Sarrión A, Pérez-Belles C, et al. Epidemiological, microbiological, clinical, and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:742-9.
11. Velasco D, Pérez S, Domínguez MA, Villanueva R, Bou G. Description of a nosocomial outbreak of infection caused by a *vanA*-containing strain of *Enterococcus faecalis* in La Coruña, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2004;5: 892-3.
12. Del Campo R, Tenorio C, Zarazaga M, Gómez-Lus R, Baquero F, Torres C. Detection of a single *vanA*-containing *Enterococcus faecalis* clone in hospitals in different regions in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:746-7.
13. Novais C, Coque TM, Sousa JC, Baquero F, Peixe L. Portuguese Resistance Study Group. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:3613-7.
14. Ridwan B, Mascini E, Van Der Reijden N, Verhoef J, Bonten M. What action should be taken to prevent spread of vancomycin resistant enterococci in European hospitals? *BMJ.* 2002;324:666-8.