

ARTÍCULO ORIGINAL

## *Aislamiento de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina con genotipo *vanB* en el Hospital Clínico Regional de Concepción*

SERGIO MELLA M.<sup>1,2</sup>, B.Q. MARCELA SEPÚLVEDA A.<sup>1</sup>, PAMELA ACOSTA V.<sup>2</sup>,  
B.Q. HELIA BELLO T.<sup>1</sup>, B.Q. MARIANA DOMÍNGUEZ Y.<sup>1</sup>, GERARDO GONZÁLEZ R.<sup>1</sup>,  
Q.F. RAÚL ZEMELMAN Z.<sup>3</sup> y OMAR COFRÉ C.<sup>4</sup>

### ISOLATION OF VANCOMYCIN RESISTANT *Enterococcus faecium* WITH GENOTYPE *vanB* AT THE HOSPITAL CLINICO REGIONAL DE CONCEPCIÓN

*The antibiotic resistance among bacteria has increased during the last decades. Of particular importance was the report of vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates (VRE), recently described in our country. In this work we report the isolation of two strains of *E. faecium* resistant to vancomycin from colonized patients admitted to the Hospital Regional de Concepción. The phenotyping and genotyping studies gave positive results for VanB type of vancomycin resistance. Both strains showed genetic similarity when were molecular typed by rep-PCR. Interestingly, the isolation of this strains was previous to the isolation of VRE according to the protocols delineated by the Health Ministry. This difference may be explained by the risk factors exhibited by the colonized patients.*

**Key words:** *Enterococcus faecium*, Vancomycin resistance.

### INTRODUCCIÓN

El desafío más importante al que se ha enfrentado la quimioterapia antimicrobiana moderna ha sido el desarrollo de resistencia bacteriana.<sup>1</sup> Este fenómeno ha adquirido una importancia insospechada, particularmente durante las últimas décadas, por la descripción de bacterias resistentes a prácticamente todos los

antimicrobianos disponibles, siendo la descripción de aislamientos de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (EVR-*Enterococcus Vancomycin Resistant*) y posteriormente cepas de *Staphylococcus aureus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina (*Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus* o *Glycopeptide intermediate Staphylococcus aureus*) los ejemplos más importantes en cocáceas Gram

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina, Universidad San Sebastián, Concepción.

<sup>4</sup> Unidad de Infección Intrahospitalaria, Hospital Clínico Regional de Concepción

positivas, sin considerar el aislamiento progresivo de bacilos Gram negativos resistentes a carbapenémicos.<sup>2-4</sup>

Dado el impacto mundial causado por el aislamiento de este tipo de cepas y las consideraciones microbiológicas, epidemiológicas y clínicas derivadas, su estudio en nuestro medio ha adquirido una importancia creciente. Así, desde la primera descripción de EVR el año 2000,<sup>5</sup> se ha incrementado la pesquisa tanto de muestras procedentes de colonización del tracto digestivo como de sitios estériles. En este contexto, comunicamos el aislamiento de dos cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina de pacientes colonizados por este microorganismo en el Hospital Clínico Regional de Concepción.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionó a dos pacientes con factores de riesgo de colonización digestiva por EVR,<sup>6</sup> uno de ellos portador de linfoma de Hodgkin, que recibió quimioterapia antineoplásica y que evolucionó con cuadros sépticos severos, por lo que requirió uso prolongado de antimicrobianos de amplio espectro, presentó además diarrea asociada a su uso y necesidad de nutrición parenteral total (cepa EVR-1). La otra paciente fue sometida a cirugía por neoplasia digestiva y evolucionó con una peritonitis postoperatoria, requirió reexploración quirúrgica, terapia antimicrobiana prolongada, estadía en UCI, y apoyo nutricional, reingresando poco tiempo después de su alta por un cuadro de diarrea asociada a uso de antimicrobianos (cepa EVR-2). De ambos pacientes se obtuvo, durante la última etapa de su hospitalización (diciembre de 2000) y previo consentimiento informado, una muestra de hisopado rectal, que fue sembrada en placas con agar azida-bilis esculina suplementado con vancomicina (8 µg/ml).<sup>7</sup>

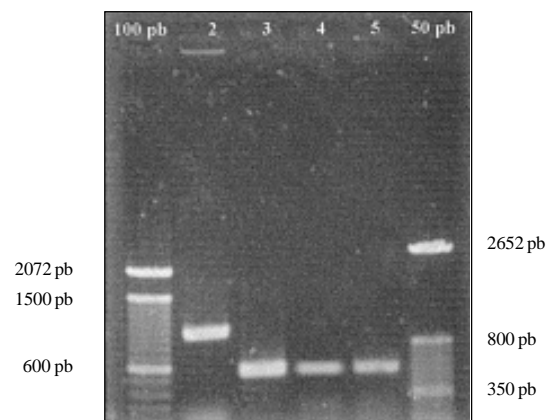
La identificación fenotípica de género se realizó según lo establecido por Facklam et al<sup>8</sup> y la especie de acuerdo al esquema propuesto por Carvalho et al.<sup>9</sup> El estudio de susceptibilidad, se realizó según las normas del NCCLS.<sup>10</sup>

La identificación de especie se confirmó por reacción de la polimerasa en cadena- multiplex (PCR-multiplex) con partidores específicos para

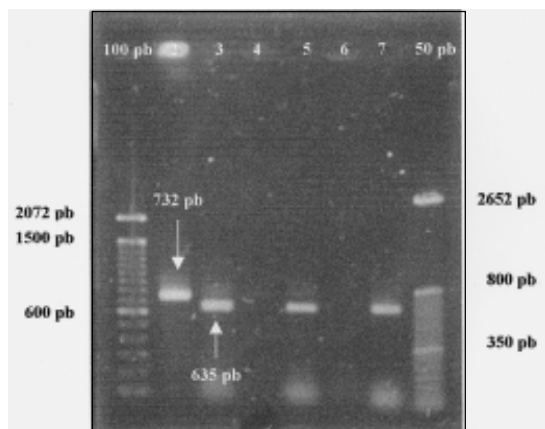
*E. faecium*, *E. faecalis* y utilizando como cepas controles *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecium* C-68.<sup>11,12</sup> El genotipo de resistencia fue determinado por amplificación por RPC con partidores específicos para *vanA* y *vanB* y utilizando como cepas control *E. faecalis* CDC 106 (*vanA*) y *E. faecium* ATCC 51299 (*vanB*) de acuerdo a los protocolos recomendados por Dutka-Malen et al.<sup>11,12</sup> Por último, el estudio de clonalidad de los aislamientos se realizó por rep-PCR de acuerdo a la metodología propuesta por Ridley.<sup>13</sup> Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1,5%) y se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se visualizaron en un transiluminador UV.

## RESULTADOS

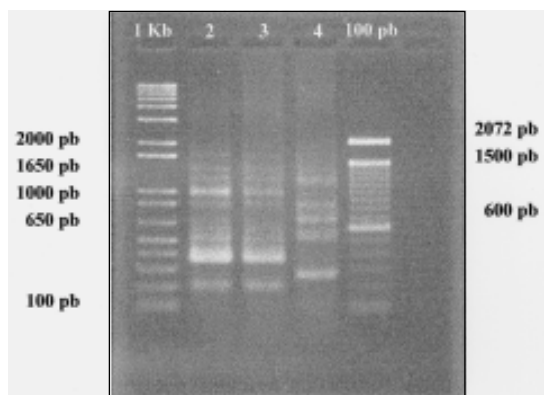
En la Figura 1 se observa el producto de amplificación genética obtenido de las cepas previamente identificadas por métodos bioquímicos, como *E. faecium*. El fragmento de ADN amplificado (550 pb) fue comparable con el producto de amplificación de la cepa control *E. faecium* C-68, demostrándose por tanto una amplificación positiva para *E. faecium*. Por otra parte, las CMI's de vancomicina sobre las cepas EVR-1 y EVR-2 fueron de 128 µg/ml,



**Figura 1.** Carril 2 y 3 cepas controles de *E. faecalis* y *E. faecium* respectivamente; carril 4, producto de amplificación cepa EVR-1; carril 5, producto de amplificación cepa EVR-2.



**Figura 2.** Carril 2, cepa CDC 106 control *vanA*; carril 3 cepa ATCC 51299 control *vanB*; carril 4, cepa EVR-1 con partidores específicos *vanA*; carril 5, cepa EVR-1 con partidores específicos *vanB*; carril 6, cepa EVR-2 con partidores específicos *vanA*; carril 7, cepa EVR-2 con partidores específicos *vanB*.



**Figura 3.** Carril 2 y 3 productos de amplificación cepa EVR-1 y EVR-2 respectivamente; carril 4 cepa control de *E. faecium* C-68.

**Tabla 1. Niveles de susceptibilidad de cepas de *Enterococcus faecium* frente a glicopéptidos y quinupristin/dalfopristin**

Cepa bacteriana	Concentración inhibitoria mínima (µg/ml)		
	Vancomicina	Teicoplanina	Quinupristina/dalfopristina
EVR-1	128	1,0	0,5
EVR-2	128	0,25	0,5

mientras que las de teicoplanina fueron 1,0 µg/ml y 0,25 µg/ml, respectivamente (Tabla 1).

En la Figura 2, se observa la amplificación positiva para genotipo *vanB* de EVR-1 y EVR-2, ya que el producto de amplificación de 635 pb es comparable al obtenido en la cepa control ATCC 51299. La Figura 3 evidencia el probable origen clonal de ambos aislamientos.

## DISCUSIÓN

Es importante considerar que en nuestro centro se ha iniciado, al igual que en el resto del país y de acuerdo a las recomendaciones ministeriales, la búsqueda prospectiva de cepas de ERV, habiéndose confirmado sólo a comienzos del segundo semestre del año 2001 el aislamien-

to de cepas de este microorganismo. Las dos cepas estudiadas en el presente artículo fueron aisladas de muestras de hisopado rectal en diciembre del año 2000, esta latencia entre ambos resultados se relaciona en gran medida a la selección de pacientes a los cuales se les realizó el estudio microbiológico.

Nuestro objetivo fue realizar un estudio inicial sobre la presencia de ERV en pacientes con claros factores de riesgo para el aislamiento de esta bacteria, particularmente inmunodepresión, hospitalización prolongada tanto en unidades de paciente crítico como en servicios médico-quirúrgicos, uso de vancomicina, cefalosporinas y duración del tratamiento antimicrobiano.<sup>6,13,14</sup> En los dos pacientes seleccionados se confirmó el aislamiento de *E. faecium* resistente a vancomicina con estudio fenotípico y genotípico co-

respondiente a *vanB*. Más aún, de acuerdo al resultado de la rep-PCR puede plantearse el probable origen clonal de los aislamientos. Epidemiológicamente ambos pacientes fueron tratados en unidades clínicas diferentes y la parte final de su hospitalización se realizó en el mismo piso pero en distintas unidades (paciente con neoplasia hematológica en la Unidad de Intermedio Médico y la paciente, durante su rehospitalización por diarrea asociada a uso de antimicrobianos en el Servicio de Medicina Mujeres). Estos resultados contrastaron con los resultados iniciales obtenidos de acuerdo a la recomendación ministerial, fundamentalmente por los antecedentes epidemiológicos de los pacientes estudiados en nuestra comunicación. Confirmando nuestro planteamiento, los primeros aislamientos de EVR realizados en agosto de 2001 en el Hospital Clínico Regional de Concepción se obtuvieron de pacientes que tenían un perfil epidemiológico de riesgo.

Finalmente debe destacarse que ambos pacientes evolucionaron satisfactoriamente y que la pesquisa de EVR se realizó de muestras de hisopado rectal, reflejando colonización digestiva por estos microorganismos, condición epidemiológica que puede mantenerse por prolongados períodos.<sup>14</sup>

En resumen, se describe la colonización digestiva por *E. faecium* resistente a vancomicina con genotipo *vanB*, en dos pacientes del Hospital Clínico Regional de Concepción. Basándose en nuestros resultados y los de otros centros, es interesante complementar la vigilancia ministerial con estudios multicéntricos que permitan entre otros objetivos aclarar aspectos sobre la epidemiología clásica y molecular de este microorganismo.

## RESUMEN

La resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos ha aumentado durante las últimas décadas. De particular importancia es la descripción de aislamientos de *Enterococcus* resistente a vancomicina (EVR), de reciente y progresiva descripción en nuestro país. Comunicamos el aislamiento de dos cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina de pacientes colonizados por este microorganismo en el Hos-

pital Clínico Regional de Concepción. El estudio fenotípico y genotípico fue positivo para *vanB*, además ambos aislamientos presentaron similitud genética en un estudio de tipificación molecular por rep-PCR. Interesantemente el aislamiento de estas cepas precedió al aislamiento de EVR según el protocolo ministerial. Esta diferencia puede explicarse por los factores de riesgo que presentaron los pacientes estudiados.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- MC GOWAN J E Jr. The impact of changing pathogens of serious infections in hospitalized patients. Clin Infect Dis 2000; 31 (Suppl 4): S124-S130.
- 2.- MOELLERING Jr. R C. Introduction: problems with antimicrobial resistance in Gram positive cocci. Clin Infect Dis 1998; 26: 1177-8.
- 3.- FRIDKIN S K. Vancomycin-intermediate and – resistant *Staphylococcus aureus*: What the infectious disease specialist needs to know. Clin Infect Dis 2001; 32: 108-15.
- 4.- HIRAKATA Y, IZUMIKAWA K, YAMAGUCHI T et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene *bla<sub>IMP</sub>*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 2006-11.
- 5.- MAROVAC J, CAMPOS M I. *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. Rev Méd Chile 2000; 128: 685-6.
- 6.- WEBB M, RILEY L W, ROBERTS R B. Cost of hospitalization for and risk factors associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection and colonization. Clin Infect Dis 2001; 33: 445-52.
- 7.- BARTON A L, DOERN G V. Selective media for detecting gastrointestinal carriage of vancomycin-resistant enterococci. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 23: 119-22.
- 8.- FACKLAM R R, SHAM D F, TEXEIRA L M. *Enterococcus*. En Manual of Clinical Microbiology 7<sup>th</sup> Edition Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH., eds. ASM Press, Washington DC, 1999; 297-305.
- 9.- CARVALHO M, TEXEIRA L, FACKLAM R. Use of test for acidification of methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside and susceptibility to efrotomycin for differentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera. J Clin Microbiol 1998; 36: 1584-7.
- 10.- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 9<sup>th</sup> information supplement. NCCLS

- document No. M100-S9. Vol 19. Wayne, PA: NCCLS, 1999.
- 11.- DUTKA-MALEN S, EVERS S, COURVALIN P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 24-7.
- 12.- DUTKA-MALEN S, EVERS S, COURVALIN P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33(5): 1434.
- 13.- RIDLEY A N. Genomic fingerprinting by application of rep-PCR. En: Woodford N, Johnson AP. Eds. Methods in Molecular Medicine, Vol 15: Molecular bacteriology: protocols and clinical applications. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1998; 103-15.
- 14.- BOYCE J M. Vancomycin-resistant *Enterococcus*. Detection, epidemiology, and control measures. Infect Dis Clin North Am. 1997; 11: 367-84.

Correspondencia a:  
Sergio Mella Montecinos  
E-mail: pignatio@vtr.net