

## ***Enterococcus* resistente a la vancomicina en Cuba: impacto clínico-terapéutico y epidemiología molecular**

Quiñones Pérez, Dianelys<sup>1</sup>  
Meiji Soe<sup>2</sup>  
Joao P Martins<sup>3</sup>  
Noriko Urushibara<sup>2</sup>  
Kobayashi, Nobumichi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), Cuba

<sup>2</sup> Universidad Médica de Sapporo, Sapporo, Japón

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Beira Interior, Portugal

Correo del autor principal: dia@ipk.sld.cu

### **Resumen**

**Introducción:** *Enterococcus* es un patógeno relevante relacionado a infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS) a nivel mundial, favorecido por su resistencia a la mayoría de los antimicrobianos. *Enterococcus* resistente a vancomicina (ERV) constituye un patógeno emergente desde 1990 que demanda una vigilancia sistemática para su control. **Objetivos:** Determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana, y sus bases genéticas en ERV aislados en Cuba, su virulencia, linajes genéticos y su relación filogenética. **Materiales y métodos:** se caracterizaron, cinco cepas emergentes en Cuba de *Enterococcus* resistente a glicopéptidos procedente de cuatro provincias del país durante el período 2011 a 2013. Se evaluó la susceptibilidad a 13 antimicrobianos y se determinaron diferentes genes de resistencia para glicopéptidos (vancomicina y teicolplanina, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclina y genes de virulencia mediante la técnica de PCR. Las mutaciones *gyrA*, *parC* en aislamientos resistentes a fluoroquinolonas y las secuencias multilocus (ST) se evaluaron por secuenciación de ADN. **Resultados:** La resistencia glicopeptídica obedeció al gen *vanA* detectado en dos *E. faecalis* y tres *E. faecium* causantes de septicemia. No se detectó resistencia a linezolid. Todas las cepas fueron resistentes a gentamicina asociada a la enzima *aac(6′)-aph(2″)*. La resistencia a levofloxacina resultó muy frecuente obedeciendo a mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*. *E. faecalis* fue más virulento que *E. faecium* y perteneció al complejo clonal (CC)87 mientras que dos *E. faecium* pertenecieron al CC17 y otro correspondió a la nueva ST1349. **Conclusiones:** ERV persiste circulando en Cuba con multidrogorresistencia causando infección invasiva. La linezolid se corrobora como droga de elección. Para comprender mejor la epidemiología del ERV y sus orígenes, es imprescindible perfeccionar la vigilancia y desarrollar nuevos estudios de epidemiología molecular.

**Palabras clave:** *Enterococcus*, resistencia, vancomicina, Cuba, epidemiología molecular

## I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera el problema de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias patógenas una línea prioritaria de actuación para mejorar la salud humana. Se ha documentado una diseminación mundial de clones bacterianos resistentes y también de genes que confieren resistencia a las drogas antimicrobianas, siendo el género *Enterococcus* un buen ejemplo de ello (1).

A nivel mundial, la infección enterocócica se cita entre las 10 primeras infecciones adquiridas en el hospital. Su emergencia como patógeno es un hecho desde finales de la década de los años 80 y está relacionada con el empleo de antimicrobianos de amplio espectro, el uso de técnicas diagnósticas y terapéuticas invasivas, estancias hospitalarias prolongadas, aumento de la población inmunodeprimida, habilidad para adquirir determinantes genéticos de resistencia, adquisición de factores de virulencia, así como su fácil diseminación en el ambiente hospitalario (2).

*Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son las especies más comunes, responsables de una amplia variedad de infecciones entre las que se citan infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones del torrente sanguíneo, infecciones del sistema nervioso central, endocarditis, infecciones intrabdominales, hepatobiliares, pélvicas y sepsis neonatal (3).

El tratamiento de elección se basa, en la combinación sinérgica de un betalactámico y un aminoglucósido, generalmente ampicilina y gentamicina. Los glicopéptidos, en especial la vancomicina, resulta el principal fármaco alternativo (4). El género *Enterococcus* tiene como principal característica su resistencia intrínseca a numerosos antimicrobianos y, además, es capaz de adquirir fácilmente determinantes genéticos que codifican resistencias añadidas. Lo anterior limita considerablemente sus opciones terapéuticas, presentando un gran desafío para el control de la infección enterocócica. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, siglas en inglés) de Estados Unidos declaran, en 1990 que *Enterococcus* resistente a la vancomicina (ERV) es un “patógeno emergente” que constituye un dilema terapéutico (5). Ante la diseminación mundial de clones de ERV, la linezolid, primer fármaco de la familia de las oxazolidinonas que comenzó a desarrollarse desde los años 80, ha jugado un papel primordial en el tratamiento de las infecciones ocasionadas por este patógeno. Desafortunadamente, la resistencia a linezolid se viene reportando desde el 2001 y aunque su frecuencia continúa siendo baja entre las bacterias Gram positivas, este hallazgo constituye un reto terapéutico frente a ERV (6,7).

Los estudios de epidemiología molecular, evidencian la existencia de epidemias intra e interhospitalarias por la diseminación de clones de *Enterococcus*, entre ellos *E. faecium* CC17 y *E. faecalis* CC2 y CC9 (8). Resulta imprescindible, el estudio de la epidemiología y la estructura poblacional de las cepas para detectar y prevenir la transmisión de cepas virulentas o resistentes.

Entre los años 2000 y 2001 se notifica, por primera vez el ERV en Cuba, [9,10] observándose una baja prevalencia de este patógeno (0,4%) hasta 2005 [2]. Durante el período de 2010 a 2013, cinco nuevos ERV fueron detectado entre 596 aislamientos recolectados a través de la vigilancia nacional, pero la vigilancia sistémica de VRE se ha detenido desde entonces por lo que es imprescindible profundizar en

el conocimiento de las cepas de *Enterococcus* circulantes en Cuba, su susceptibilidad antimicrobiana, las bases moleculares de la resistencia, sus factores de virulencia, y llevar a cabo un análisis molecular de los aislados resistente a la vancomicina que aporten datos sobre la diversidad genética de ellos y su relación filogenética con aislamientos de otras partes del mundo, por tal motivo desarrollamos la presente investigación. Este estudio es crucial para trazar políticas de control en el país.

## II. MÉTODO

**Aislamientos bacterianos.** Se caracterizaron cinco aislamientos cubanos emergentes de *Enterococcus* resistentes a glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) que forman parte de la colección de cultivos microbianos del Laboratorio Nacional de Referencia para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana de patógenos relacionados con IAAS (LNR-IAAS) del IPK. Estos aislamientos procedieron de las 3 regiones del país: Occidental (La Habana); Central (Villa Clara) y Oriental (Holguín y Santiago de Cuba) durante el período 2011 a 2013.

**Identificación bacteriana:** Se procedió al cultivo de los aislamientos coleccionados en placas de agar sangre de carnero al 5% que se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez comprobada la pureza del cultivo, se realizó la identificación de las especies mediante las pruebas bioquímicas convencionales y se complementó con el sistema semiautomatizado rapid ID 32 STREP (BioMérieux, Francia).

**Susceptibilidad antimicrobiana.** Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se llevaron a cabo mediante el método de microdilución en caldo acorde al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI, siglas en inglés) (11). Se evaluaron los siguientes antimicrobianos ampicilina; oxacilina; altos niveles de resistencia para gentamicina; arbekacina; clindamicina; levofloxacina; eritromicina; minociclina; quinupristina/dalfopristina; trimetoprim-sulfamethoxazol; teicoplanina y vancomicina. Como control de calidad se utilizó la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**Detección de genes de resistencia a los antimicrobianos.** Se investigó la presencia de los genes de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)Ia*, *ant(3'')(9)*, *aph(2'')-id* y *aph(2'')-ic* en los aislamientos resistentes a gentamicina y arbekacina. También se analizó la presencia de los genes de resistencia a glicopéptidos *van(A)* y *van(B)* en los aislamientos resistentes a la vancomicina y a la teicoplanina; de los genes de resistencia a macrólidos *erm(B)*, *erm(A)*, *erm(C)* y *mef(A)* y finalmente, se investigó la presencia de siete genes de resistencia a tetraciclina *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(K)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(T)* y *tet(U)*, en los aislamientos resistentes a este antibiótico. Se aplicó la técnica de PCR simple [genes *van(A)* y *van(B)*] y PCR múltiple (resto de los genes), usando cebadores específicos y según protocolos estandarizados (12).

**Detección de genes de virulencia** El estudio genotípico de virulencia se llevó a cabo mediante la detección de cinco genes que codifican los factores de virulencia: sustancia de agregación (*agg*), gelatina (*gelE*), hemolisina (*cylA*), proteína de superficie (*esp*) y feromonas sexuales (*ccf*). Para ello, se aplicó la técnica de PCR múltiple usando los cebadores descritos en la literatura (13). Los productos de la amplificación se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa.

**Estudio de la estructura poblacional (detección de linajes genéticos) de *Enterococcus resistente a la vancomicina* mediante estudio de secuencias multilocus (MLST, siglas en inglés).** Se aplicó en los cinco aislamientos, objeto de estudio, siguiendo el esquema previamente publicado disponible en el sitio web [www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Enterococcus.html](http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Enterococcus.html).

- **Desarrollo de la PCR.** Se amplificaron mediante PCR los fragmentos internos de siete genes metabólicos muy conservados en *Enterococcus* (*gdh*, enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gyd* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), *pstS* (phosphate ATP binding cassette transporter), *gki* (glucoquinasa), *aroE* (shikimato 5- deshidrogenasa), *xpt* (xantina fosforibosiltransferasa) y *yqiL* (acetil-CoA acetiltransferasa), siguiendo el esquema previamente propuesto en la base de datos (<http://mlst.net>).
- **Secuenciación de ácidos nucleicos.** Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y las bandas de amplificación obtenidas en cada caso se cortaron del gel y purificaron usando el estuche comercial Wizard SV gel (Promega, EE.UU.) según el protocolo que provee el fabricante. Los fragmentos de PCR purificados se secuenciaron directamente en ambas direcciones usando un secuenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, CA, EE. UU.).
- **Análisis filogenético.** A cada nueva secuencia o alelo identificado para cada uno de los siete genes que integraron el esquema se les asignó un número en función del orden de aparición y en concordancia con la base de datos de MLST para *E. faecalis* y *E. faecium*. Posteriormente, a las combinaciones de los siete alelos se les asignó un perfil alélico o secuencia tipo (ST) utilizando los genes en el siguiente orden: *gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yqiL*. Las ST se agruparon en complejos clonales (CCs) mediante el programa informático eBURST software version.3 (<http://www.mlst.net>).

### III. RESULTADOS

Los cinco *Enterococcus* resistentes a vancomicina (*E. faecalis* CU709, *E. faecalis* CU789, *E. faecium* CU207, *E. faecium* CU710, *E. faecium* CU850) procedieron de muestras de sangre aisladas de diferentes pacientes en cuatro provincias de Cuba (Tabla 1). Esto corrobora la importancia de *Enterococcus* como causa importante de septicemias en hospitales cubanos acorde a estudios previos (9). Todos los aislados portaron el gen *vanA* con secuencias idénticas, que se depositaron en GenBank con los números de acceso MG460317 y MG460318 para *E. faecalis* aislado CU709 y *E. faecium* aislado CU710, respectivamente, y mostró una resistencia de alto nivel a la gentamicina asociado con la enzima *aac(6')-aph(2'')*. (Tabla 1).

Todos los aislados, excepto uno (*E. faecium* CU710) fueron resistentes a la levofloxacina mediada por mutaciones a nivel de los genes *gyrA* y / o *parC*.

Todos los aislados mostraron resistencia de alto nivel a gentamicina (CIM>1024µg/ml), pero fueron susceptible a fosfomicina y linezolid. También se observó un 100% de resistencia para trimetoprim-sulfametoxazol.

La linezolid, mostró un 100% de efectividad en los ERV lo que revela su importancia terapéutica en Cuba

*E. faecalis* portó varios factores de virulencia incluyendo *esp* y *gelE*, no detectándose los genes *cylA*, *egg*, *asaI* mientras que *E. faecium* albergó solo *efaAfm* y *acm*, excepto el aislado CU207 portador

además de *esp* y *ccf*. Los genes de virulencia *gelE*, *cylA*, *cpd*, *agg*, *cob*, *hyl* no se detectaron in *E. faecium*

El elemento de inserción IS16, es un marcador nosocomial generalmente asociado con aislados del complejo clonal (CC) 17. Sin embargo, no se encontró en la ST 262 de *E. faecium*, mientras que fue positivo en ST1349 (línea no CC17).

Aislamientos	CU709	CU789	CU207	CU710	CU850
Especies de Enterococcus	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
Año de aislamiento	2011	2012	2010	2011	2013
Provincia	Villa Clara	Holguin	Habana	Habana	Santiago de Cuba
Muestra clínica	sangre	sangre	sangre	sangre	sangre
Secuencia tipo ST (Complejo clonal,CC)	ST28 (CC87)	ST28 (CC87)	ST656 (CC17)	ST262 (CC17)	ST1349
Patrones de Resistencia <sup>1</sup>	GEN, ABK, ERY, CLI, VAN, TEC, Q-D, SXT, LVX	GEN, ABK, ERY, CLI, VAN, TEC, Q-D, SXT, LVX	AMP, OXA, GEN, ERY, CLI, VAN, TEC, SXT, LVX	AMP, OXA, GEN, FOX, ERY, CLI, VAN, TEC, SXT	AMP, OXA, GEN, MIN, ERY, CLI, VAN, TEC, SXT, LVX
Factores de Virulencia	<i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>cpd</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ace</i>	<i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>cpd</i> , <i>ccf</i> , <i>cob</i> , <i>efaAfs</i> , <i>ace</i>	<i>esp</i> , <i>ccf</i> , <i>efaAfm</i> , <i>acm</i>	<i>efaAfm</i> , <i>acm</i>	<i>efaAfm</i> , <i>acm</i>
Genes de Drogo resistencia	<i>aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(B)</i>	<i>aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>tet(M)</i> , <i>erm(B)</i>	<i>aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aac(6)-Ii</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aph(3)-IIIa</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>msrB</i>	<i>aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aac(6)-Ii</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aph(3)-IIIa</i> , <i>tet(U)</i> , <i>erm(B)</i>	<i>aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia</i> , <i>aac(6)-Ii</i> , <i>ant(6)-Ia</i> , <i>aph(3)-IIIa</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>msrB</i>
Mutación en ORDR <sup>2</sup>					
<i>gyrA</i>	S 84 I	S 84 I	S 84 R	no mutación	no mutación
<i>parC</i>	S 85 I	S 85 I	S 82 R	no mutación	S 82 R
IS16	-	-	+	-	+

\*1 Abreviaturas: ABK, Arbekacina; AMP, Ampicilina; CLI, Clindamicina; ERY, Eritromicina; GEN, Gentamicina; LVX, levofloxacin; MIN, Minocyclina; OXA, Oxacilina; Q-D, quinupristina/dalfopristina; SXT, Trimetoprim-Sulfamethoxazol; TEC, Teicoplanina; VAN, Vancomicina.

\*4 región determinante de resistencia a quinolonas

Por otra parte, perfiles genéticos también fueron diferentes entre CU710 y CU850, lo que sugiere que estos son cepas genéticamente no relacionadas, aunque ST1379 es un *Single locus variant* (SLV, siglas en inglés) (STs que se diferencian en un solo alelo) de la ST262. Ambos aislamientos de *E. faecalis* se clasificaron como ST28 (CC87), que se notificó anteriormente como uno de los linajes comunes en Polonia [14,15].

Los aislados de *E. faecium* pertenecieron a tres genotipos diferentes (ST262, ST656 y ST1349). La ST656 es un SLV de ST412 perteneciente a CC17, y ST1349 (SLV de ST262) es una nueva ST identificada en el presente estudio. La ST412 había sido identificada en América del Sur (Brasil, Perú, Colombia, Venezuela) [8,9] y ST262 en China, Rusia y Dinamarca [16-18]. Sin embargo, la relación de los aislados cubanos de *E. faecium* en relación a los notificados previamente en esos países no se puede definir solo por las STs porque el genoma de *E. faecium* está sujeto a una alta tasa de recombinación, causando cambios en las STs [19].

La diversidad genética y los rasgos únicos de *E. faecium* encontrados en el presente estudio sugiere diferencias de origen o durante el proceso evolucionista molecular de esta especie.

#### IV CONCLUSIONES

Se avala, científicamente, la persistencia de la circulación de *Enterococcus* resistente a la vancomicina en Cuba en diferentes provincias diseminándose con multidrogorresistencia y causando infección severa.

La linezolidina mostró una efectividad *in vitro* en todos los aislamientos, objetos de estudio, lo que corrobora su clasificación como la droga de elección en infecciones severas por ERV.

Para comprender mejor la epidemiología del ERV y sus orígenes, es imprescindible perfeccionar la vigilancia nacional y desarrollar nuevos estudios de epidemiología molecular en este patógeno bacteriano.

#### REFERENCIAS

1. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill*. 2008;13(47): pii19046.
2. Quiñones Pérez D. *Enterococcus* aislados en Cuba: resistencia antimicrobiana, virulencia y diversidad genética. Doctoral Thesis [ ID: tesis-311 ], Habana, 2010, [http://tesis.repo.sld.cu/311/1/dianelys\\_quinones.pdf](http://tesis.repo.sld.cu/311/1/dianelys_quinones.pdf)
3. Baldassarri L, Creti R, Recchia S, Pataracchia M, Alfarone G, Orefici G. Virulence factors in enterococcal infections of orthopedic devices. *Int J Artif Organs*. 2006;29:402-6.
4. Kuch A, Willems RJ, Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Sundsfjord A, et al. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:551-8.
5. Bolyard EA, Tablan OC, Williams WW, Pearson ML, Shapiro CN, Deitchman SD et al. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1995;16:105-13.
6. Diekema DJ, Jones RN. Oxazolidinones. *Drugs* 2000; 59: 7-16.
7. Rincón S, Panesso D, Díaz L, Carvajal L, Reyes J, Munita JM, Arias C. Resistencia a antibióticos de última línea en cocos Gram positivos: la era posterior a la vancomicina. *Biomedica*. 2014; 34(01): 191-208
8. Del Campo R, Ruiz-Garbajosa P, Sánchez Moreno P, Baquero F, Torres C, Cantón R, et al. Antimicrobial resistance in recent fecal enterococci from healthy volunteers and food handlers in Spain: genes and phenotypes. *Microb Drug Resist*. 2003;9:47-59.
9. Quiñones D, Goñi P, Rubio MC, Duran E, Gómez-Lus R. *Enterococci* spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;51:63-7.
10. Quiñones-Pérez D, Goñi P, Rubio MC, Baquero F, Gómez-Lus R, Del Campo R. Genetic relatedness and antimicrobial resistance determinants among clinical isolates of enterococci from Cuba. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:793-7.
11. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; document M 100, 27<sup>th</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

12. Nishimoto Y, Kobayashi N, Alam M, Ishino M, Uehara N, Watanabe N. Analysis of the prevalence of tetracycline resistance genes in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese hospital. *Microb Drug Resist*. 2005;11:146-53.
13. Eaton TJ, Gasson M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:1628-35.
14. Kuch A, Willems RJ, Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Sundsfjord A, et al. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:551-8.
15. Kawalec M, Pietras Z, Daniłowicz E, Jakubczak A, Gniadkowski M, Hryniewicz W, et al. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *J Clin Microbiol*. 2007;45:147-53.
16. Yang JX, Li T, Ning YZ, Shao DH, Liu J, Wang SQ, et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. *Infect Genet Evol*. 2015;33:253-60.
17. Brilliantova AN, Kliasova GA, Mironova AV, Tishkov VI, Novichkova GA, Bobrynina VO, et al. Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in two haematological centres in Russia. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:177-81.
18. Lester CH, Sandvang D, Olsen SS, Schønheyder HC, Jarløv JO, Bangsberg J, et al. Emergence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in Danish hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62:1203-6.
19. van Hal SJ, Ip CL, Ansari MA, Wilson DJ, Espedido BA, Jensen SO, et al. Evolutionary dynamics of *Enterococcus faecium* reveals complex genomic relationships between isolates with independent emergence of vancomycin resistance. *Microb Genom*. 2016;2(1). doi: 10.1099/mgen.0.00004