

Primer aislamiento de *Enterococcus faecium* vancomicina-resistente con genotipo *vanB* en la Argentina: presentación de dos casos

G. MIRANDA^{1*}; A. CORSO², R. MELANO², P. ARISMENDI¹, M. RODRIGUEZ², L. GARBERVETSKY¹

¹ Laboratorio de Microbiología, Policlínico Bancario, Gaona 2197, 1416 Buenos Aires, y ² Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina.

* Correspondencia. TE/FAX: 54 - 011-4251-3582. E-mail: patriaris@yahoo.com.

RESUMEN

En el presente trabajo se comunican los primeros aislamientos de *Enterococcus faecium vanB*, registrados en Argentina. Las cepas fueron aisladas de pacientes ambulatorias, sin internaciones recientes ni tratamiento antibiótico prolongado previo, atendidas en un hospital de Buenos Aires en julio de 2000. Las CIMs a vancomicina fueron de 32 µg/ml para ambos aislamientos y para teicoplanina 0,12 µg/ml en el caso 1 y 0,25 µg/ml en el caso 2. La detección genética de la resistencia a vancomicina se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos para el genotipo *vanB*. Para determinar la relación de los aislamientos se realizó electroforesis en campo pulsado. El análisis del producto de la restricción demostró que ambos aislamientos fueron indistinguibles entre sí, no obstante no se registraron nuevos aislamientos *vanB* en el hospital.

Palabras claves: *Enterococcus faecium*, enterococos, *vanB*, resistencia, vancomicina

SUMMARY

First isolate of *vanB* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. Report of two cases. We describe the first isolate of *van B* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Argentina. The strains were recovered from ambulatory patients admitted to a hospital of Buenos Aires city in July 2000. They were not high-risk patients, they had not received previous antibiotic therapy, and they were assisted in different services. MICs for vancomycin were 32 µg/ml for both strains, whereas MICs for teicoplanin were 0.12 µg/ml in case 1 and 0.25 µg/ml in case 2. PCR was performed to confirm the *vanB* genotype. The molecular fingerprints of the isolations by PFGE revealed that they were identical. No further *VanB* strains were isolated in the hospital.

Key words: *Enterococcus faecium*, enterococci, *vanB*, vancomycin, resistance

Los enterococos forman parte de la flora normal de la piel y mucosas humanas; no obstante, se los encuentra asociados tanto a infecciones hospitalarias como de la comunidad. Su emergencia como agentes etiológicos de infecciones nosocomiales ha cobrado importancia en virtud a su conocida resistencia natural a varios antimicrobianos y a su capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia. En este sentido, han sido los primeros cocos gram positivos de importancia clínica en adquirir resistencia a vancomicina (13). Hasta la fecha se han descrito seis fenotipos de resistencia a glicopéptidos en enterococos: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG (4, 11). Los fenotipos VanA y VanB son en el mundo los más ampliamente distribuidos y se presentan especialmente en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, aunque también han sido reconocidos en otras especies (13). El fenotipo VanA se caracteriza por un elevado nivel de resistencia a vancomicina (CIM \geq 64 µg/ml) y por la resistencia a teicoplanina (CIM \geq 16 µg/ml), mientras que los aislamientos VanB presentan

resistencia variable a vancomicina (CIM entre 4 y 1000 µg/ml) y son sensibles a teicoplanina (13). La mayoría de los aislamientos de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) se refieren a pacientes hospitalizados, ya sea en unidades de cuidados intensivos, salas de oncología o unidades de trasplante. También se los ha aislado en pacientes que presentaron largos períodos de internación, algún grado de inmunosupresión o se les había administrado antibióticos. Estos factores fueron determinantes para que se los encontrara asociados a brotes de infección hospitalaria (2).

El primer aislamiento de ERV fehacientemente documentado en la Argentina fue una cepa de *E. faecium* VanA (10). Posteriormente se comunicaron otros aislamientos de *E. faecium* VanA e incluso de *E. faecalis* VanB (3, 16). El objetivo de esta comunicación es la presentación de dos casos clínicos en los que se obtuvo el aislamiento de *E. faecium* resistente a vancomicina, con genotipo *vanB*. Los pacientes provenían de la comunidad y eran de sexo femenino. No referían internaciones

previas recientes ni tratamiento antimicrobiano prolongado y fueron atendidos en el Policlínico Bancario de Buenos Aires en julio de 2000.

Caso N°1: Paciente de 30 años, sexo femenino, con antecedentes de lipoaspiración de piernas e inyección de grasa en mamas unos siete años atrás. Se presentó a la consulta en el Servicio de Ginecología por la presencia de un nódulo quístico de mama que había recidivado. El mismo era de 4 cm de diámetro, ocupaba toda la mama e impresionaba clínicamente como un hematoma infectado. El diagnóstico presuntivo fue el de un tumor inflamatorio de mama izquierda. Se realizaron estudios de ecografía mamaria, mamografía bilateral y punción de mama para la búsqueda de células neoplásicas y el estudio bacteriológico. La ecografía reveló un componente inflamatorio importante. En la mamografía se veían imágenes compatibles con focos de necrosis infectada. La investigación de células neoplásicas resultó negativa y en el estudio bacteriológico se aisló *E. faecium* resistente a vancomicina (aislamiento 2119). Antes de obtenerse el resultado del antibiograma se inició terapia empírica con gentamicina durante 10 días. Luego de finalizado el tratamiento se realizó la extracción quirúrgica del nódulo. La paciente fue dada de alta con buena evolución clínica.

Caso N°2: Paciente de 23 años, sexo femenino, que consultó ambulatoriamente al Servicio de Guardia por dolor e inflamación en genitales externos. Se realizó una punción de uno de los labios mayores de la vulva y se solicitó el examen bacteriológico del material obtenido. El cultivo mostró *E. faecium* resistente a vancomicina (aislamiento 2120). No se encontraron registros con antecedentes, tratamiento antibiótico indicado, ni seguimiento de la paciente con posterioridad a la consulta.

En ambos casos los aislamientos fueron monomicrobianos y compatibles con la observación microscópica directa del material estudiado.

Las cepas aisladas fueron identificadas bioquímicamente por métodos convencionales (6) y automatizados (VITEK, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Las pruebas iniciales de sensibilidad in vitro se realizaron por el método de difusión en agar con discos según NCCLS (14) y por el sistema automatizado VITEK. Las cepas

resultaron sensibles a teicoplanina y resistentes a vancomicina por ambos métodos. Los halos de inhibición fueron de 20 mm para teicoplanina y de 13 mm para vancomicina por el método de difusión. Para confirmar la resistencia a vancomicina se realizó el método de «screening» en agar infusión cerebro-corazón con 6 µg/ml de vancomicina (14) con las cepas control *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. faecalis* ATCC 51299. Fueron inoculados 10 µl de una suspensión con turbidez equivalente al tubo N° 0,5 de la escala de McFarland. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) de teicoplanina y vancomicina se obtuvieron por los métodos de E-test (según especificaciones del fabricante: AB Biodisk, Solna, Suecia) y por macrodilución en medio líquido según normas de NCCLS (14). También se determinaron las CIMs de vancomicina, ampicilina, teicoplanina, gentamicina, estreptomina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina y ciprofloxacina por el método de dilución en medio sólido según el NCCLS (14). Ambos aislamientos presentaron resistencia a vancomicina, tetraciclina, eritromicina y ciprofloxacina, sensibilidad intermedia a cloranfenicol y sensibilidad a teicoplanina, ampicilina y gentamicina (Cuadro 1). Ambas cepas presentaron moderado nivel de resistencia a estreptomina. La detección genética de la resistencia a glicopéptidos se realizó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores (*primers*) específicos para el genotipo *vanB*, obteniéndose el producto de amplificación esperado de 618 pares de bases (Figura 1A). Como control positivo del genotipo *vanB* se utilizó *E. faecium* TX2405, gentilmente cedida por B. Murray. Con el fin de determinar la relación clonal de los aislamientos, se extrajo el DNA total de ambos y se digirió con 15 UI de *Sma*I (Gibco BRL), según protocolos descriptos previamente (5). Luego se realizó una electroforesis en campo pulsado (PFGE) en un equipo CHEF-DRIII (Bio-Rad). El gel de agarosa al 0,8% fue corrido por 26 h a 7 °C. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 5 seg de tiempo inicial, 35 seg de tiempo final a 6V/cm. El gel se tiñó con 0,3 µg/ml de bromuro de etidio por 30 min y se fotografió con una película Polaroid 665. El análisis del perfil de restricción obtenido por PFGE mostró que ambos aislamientos fueron indistinguibles entre sí (Figura 1B).

Cuadro 1. Resultados de la detección genética por PCR, electroforesis de campo pulsado (PFGE) y determinación de CIM

VRE	PCR	PFGE	CIM en µg/ml (interpretación)								
			VAN	TEI	AMP	GEN	STR	CMP	TET	ERY	CIP
CASO 1 (2619)	<i>van B</i> (+)	A	32 (R)	0,12 (S)	8 (S)	8 (S)	1024 (S)	16 (I)	64 (R)	≥1024 (R)	4 (R)
CASO 2 (2620)	<i>van B</i> (+)	A	32 (R)	0,25 (S)	8 (S)	8 (S)	1024 (S)	16 (I)	64 (R)	≥1024 (R)	4 (R)

VAN: vancomicina, TEI: teicoplanina, AMP: ampicilina, GEN: gentamicina, STR: estreptomina, CMP: cloramfenicol, TET: tetraciclina, ERY: eritromicina, CIP: ciprofloxacina. R: resistente, I: intermedio, S: sensible.

Los ERV emergieron en los últimos años como patógenos nosocomiales, pero aún no ha sido completamente dilucidada su epidemiología. Esta emergencia en los hospitales se relaciona con la presión selectiva ejercida por el uso masivo de antimicrobianos (7). En los EEUU la colonización con ERV en personas no hospitalizadas es muy infrecuente y se limita a pacientes de alto riesgo o que han tenido algún contacto con el medio hospitalario (4). Por el contrario, estudios europeos que demostraron la portación de ERV (especialmente *E. faecium*) en individuos sanos, plantean la hipótesis de que estos microorganismos son llevados desde la comunidad al hospital, donde podrían desencadenar los brotes epidémicos (1, 8, 12). Estos hallazgos estarían relacionados con el uso de un glicopéptido llamado avoparcina como suplemento en las dietas de animales de cría para consumo (8). En nuestro país, de acuerdo a los casos documentados, el modelo epidemiológico concordaría con el norteamericano y la mayoría de los aislamientos mostraron el fenotipo VanA (15). Los casos clínicos descriptos en el presente informe involucraron a pacientes ambulatorias atendidas en distintos servicios de un mismo hospital. No se trataba de pacientes de alto riesgo y aparentemente no hubo ninguna relación entre ellas. No puede descartarse el origen hospitalario de las cepas puesto que ambas fueron aisladas de procedimientos realizados en la institución con dos días de diferencia y

sus patrones de PFGE fueron idénticos. Dado que no se había implementado la vigilancia epidemiológica de ERV en el personal potencialmente portador o en salas de alto riesgo, es difícil evaluar si estas cepas preexistían en el hospital. Con posterioridad a estos hallazgos y hasta la fecha no se han registrado aislamientos con igual fenotipo, si bien se han aislado cepas colonizantes o infectantes de ERV fenotipo VanA. Las CIMs a estreptomycin fueron de 1024 µg/ml por el método de dilución en agar y de 512 µg/ml por microdilución (datos no mostrados). Considerando los puntos de corte de NCCLS serían sensibles (alto nivel de resistencia a estreptomycin con CIM > 2000 µg/ml y >1000 µg/ml para dilución en agar y microdilución, respectivamente). Por el método de difusión, utilizando discos de alta carga (300 µg) ambos aislamientos se mostraron como resistentes. Debido a que las CIMs obtenidas difieren en menos de una dilución con respecto al punto de corte, y que por el método por difusión fueron categorizadas como resistentes, ambos aislamientos se consideraron con moderada resistencia a estreptomycin. Se ha demostrado que los ERV con niveles bajos o intermedios de resistencia, pueden no ser detectados por los métodos automatizados o de difusión con discos (4). En nuestro caso, todos los métodos ensayados detectaron correctamente la resistencia a vancomycin. Asimismo el uso del método de «screening» en agar infusión cerebro-corazón con 6 µg/

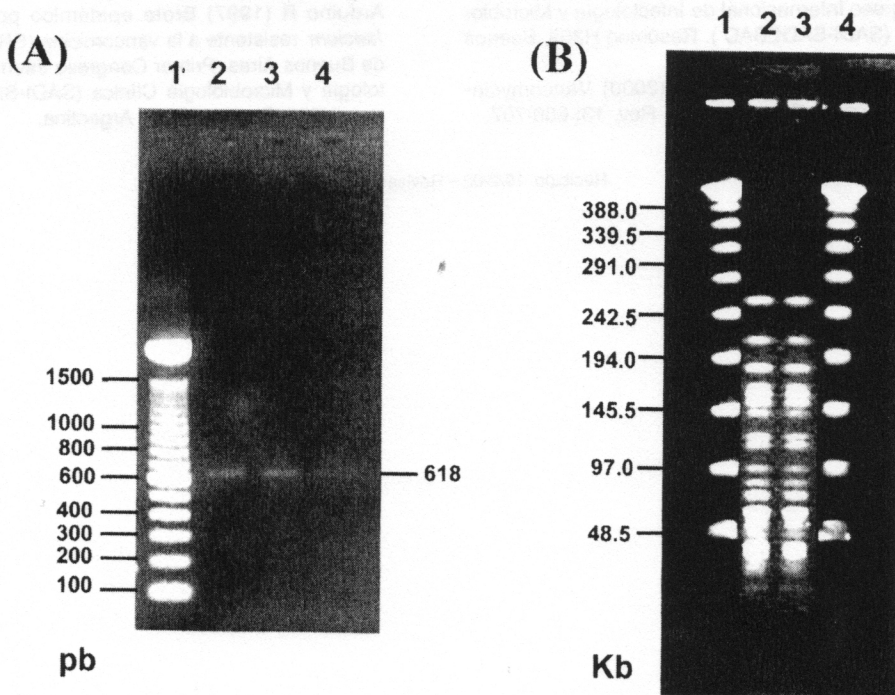


Figura 1. Detección genética por PCR de la resistencia a vancomicina. A. PCR vanB: línea 1, ladder 100pb, línea 2, *E. faecium* 2119, línea 3, *E. faecium* 2120, línea 4, *E. faecium* TX2405 (control positivo). B PFGE-SmaI: línea 1 y 4, PFGE Lambda ladder, línea 2, *E. faecium* 2119; línea 3, *E. faecium* 2120.

ml de vancomicina, recomendado por la NCCLS para la detección de ERV, tiene una elevada sensibilidad y especificidad, siendo accesible para los laboratorios de bacteriología clínica.

A nuestro entender, éstos serían los primeros aislamientos de *E. faecium* VanB registrados en la Argentina conjuntamente con un caso detectado en Mar del Plata proveniente de un paciente hospitalizado (comunicación personal de las Dras. Sosa y Monzani del Hospital Materno Infantil Dr. Tetamanti, Mar del Plata). La emergencia de los ERV implica un desafío terapéutico y epidemiológico. Los estudios que demuestran la colonización con ERV en pacientes no infectados (9) y los casos clínicos aquí presentados, sugieren que debería tenerse en cuenta la potencial presencia de ERV en todo paciente que ingrese a un hospital en la ciudad de Buenos Aires. Estos casos, además, enfatizan el hecho que se podría subestimar la magnitud del reservorio de los ERV si sólo se focaliza la atención del control epidemiológico en salas de alto riesgo y en pacientes infectados.

Agradecimientos: Agradecemos al Dr. Horacio Lopardo por habernos cedido la cepa de referencia *E. faecium* TX2405 y por la revisión crítica del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- Bates J (1997) Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. *J. Hosp. Infect.* 37: 75-77.
- Boyce JM (1995) Vancomycin-resistant enterococci: pervasive and persistent pathogens. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 116: 676-679.
- Casellas JM, Tomé G, Lopez Furst MJ, Rolón MJ, Aiub J, Marcopido M, *et al* (1997) Aislamiento de cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina en Argentina. 1º Congreso Internacional de Infectología y Microbiología Clínica (SADI-SADEBAC). Resumen H369, Buenos Aires, Argentina.
- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 686-707.
- De Lencastre H, Brown A, Chung M, Armstrong D, Tomasz A (1999) Role of transposon Tn5482 in the epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the pediatric oncology unit of a New York City Hospital. *Microb. Drug Resistance* 5: 113-129.
- Facklam RR, Collins MD (1989) Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27: 731-734.
- French GL (1998) Enterococci and vancomycin resistance. *Clin. Infect. Dis.* 27 (Suppl 1): S75-S83.
- Leclercq R, Courvalin P (1997) Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clin. Infect. Dis.* 24: 545-556.
- Lopardo HA, Kaufman S, Lauro L, Vidal P and Buenos Aires Microbiology Network (2000) One-day prevalence study on colonization with vancomycin-resistant enterococci (VRE) in intensive care units (ICU) of Buenos Aires City. En: Martin D, Tagg JR. (Ed.), *Streptococci and streptococcal diseases. Entering the new millennium. (Proceedings of the XIV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases)*. Securacopy, New Zealand.
- Marín ME, Mera JR, Arduino RC, Correa AP, Coque TM, Stamboulia D, Murray BE (1998) First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. *Clin. Infect. Dis.* 26: 235-236.
- Mc Kessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC (2000) Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3224-3228.
- Murray B (1998) Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 37-47.
- Murray BE (2000) Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N. Engl. J. Med.* 342: 710-721.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Tenth International Supplement. NCCLS document M100-S10. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Podestá OS, Mera JR, Marín ME, Galdón F, Correa AP, Stamboulia D, *et al* (1997) Brote de enterococo resistente a la vancomicina (ERV) en un servicio de clínica médica en un hospital en Mendoza. Primer Congreso Internacional de Infectología y Microbiología Clínica (SADI-SADEBAC), Resumen H332. Buenos Aires, Argentina.
- Targa L, Carbone E, Gallego V, Podestá O, Marín M, Arduino R (1997) Brote epidémico por *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (ERV) en un hospital de Buenos Aires. Primer Congreso Internacional de Infectología y Microbiología Clínica (SADI-SADEBAC). Resumen H330, Buenos Aires, Argentina.

Recibido: 19/2/02 - Revisado: 2/10/02