



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

**CARACTERIZACIÓN DE DOS BROTES DE**  
***Enterococcus faecium* RESISTENTE A VANCOMICINA**  
**EN UN HOSPITAL PEDIÁTRICO DE TERCER NIVEL**

**TESIS DE POSGRADO**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MEDICO ESPECIALISTA EN**

**INFECTOLOGÍA**

PRESENTA:

**DRA. MARTHA JOSEFINA AVILES ROBLES**

TUTOR DE TESIS

**DRA. ALEJANDRA NAVA RUÍZ**

Médico adscrito al Departamento de Infectología  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

**DRA. MARGARITA NAVA FRIAS**

Médico adscrito al Departamento de Infectología  
Hospital Infantil de México Federico Gómez



MÉXICO, D.F.

JULIO 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*A **Papá y Mamá** por su amor, amor y más amor, por ser incondicionales, por apoyarme en cada proyecto que emprendo en la vida, por respetar mi sueños, por siempre estar “no importa qué”... y por la maravillosa familia que tenemos!!*

*A **Gaby, Fher y Cess**, una vez más a mis –puntos cardinales- por compartir los buenos momentos y los no tan buenos, por ser fuente de amor y alegría en mi vida, por ser mi orgullo y fortaleza.*

*A la **Beba**, por ser mi hermana VIP, por la amistad mas verdadera que he conocido, por la complicidad, por lo ánimos, por el consuelo, por las alegrías, por darle a mi vida un -4- y fluir juntas.*

*Al Staff : Raúl, Gaby, Chris, Ge, Chech, Ángeles, Rodrigo, Rosa y David, por permanecer después de tanto tiempo, por ser amigos para toda la vida, por ser parte de excelentes recuerdos y por los que todavía faltan por acumular.*

*A mis niños HIM (por nombrar algunos): Moni, Alex, Brandon, Nataly, Bombón, Anita-Giselle; por haberse cruzado en mi vida, por brindarme una sonrisa que paga cualquier cantidad de horas trabajando, por enseñarme a ser guerrero incansable, por un beso que es mi mayor recompensa, por llenar mi vida de amor...*

*A Riquita, mi más reciente adquisición de un Ángel en el cielo.  
A abuelito por estar conmigo siempre,  
cuidándome desde lejos.*

**MAR, MD9V.**

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por estos últimos dos años de mi vida;  
por la oportunidad de aprender y disfrutar  
enormemente de ellos.*

*A la Dra. Ale Nava por el profesionalismo, dedicación, entrega y paciencia  
depositada para generar esta tesis. ¡Y también por la amistad!*

*A la Dra. Margarita Nava por apoyar mis proyectos y aceptar mi personalidad  
en el servicio.*

*Al Dr. Juan Xicohtencatl por las facilidades para la realización de la parte  
laboratorial de esta tesis.*

*A Leticia Dávila y Gerardo Escalona por compartir sus conocimientos y  
orientar el camino de esta tesis.*

*A Lilia, Carmen, Lucy, Vicky, Mary, Ara e Isabel por su participación no menos  
valiosa cuando esta tesis se estaba concibiendo.*

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
MARCO TEORICO.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	28
OBJETIVOS.....	29
MATERIAL Y MÉTODO.....	30
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47
ANEXOS.....	50

## INTRODUCCIÓN.

El género *Enterococcus* forma parte de la flora comensal intestinal humana y también de otros mamíferos, aves e insectos. Son capaces de sobrevivir en medios poco enriquecidos como agua y suelo, alimentos; en hospitales sobreviven en las manos de los portadores, fuentes y superficies inanimadas durante 24 horas. A pesar de su escasa virulencia, los enterococos son uno de los principales agentes de infección nosocomial. La frecuencia de aislamiento de las distintas especies varía de acuerdo con el huésped, su edad, dieta y otros aspectos relacionados con sus condiciones fisiológicas. La especie aislada con mayor frecuencia es *Enterococcus faecalis* (80-90%), seguida de *Enterococcus faecium* (5-10%) y otras especies de enterococo (menos del 10%). Aunque, clásicamente se consideraba que la infección enterocócica era de origen endógeno, la infección exógena, por transmisión cruzada a través de las manos contaminadas del personal sanitario, está claramente demostrada en la actualidad.

La importancia de este género radica en su alta resistencia natural a múltiples antimicrobianos y a su capacidad de adquirir resistencia a otros; así mismo este género tiene ciertas características que les facilita la diseminación entre los pacientes hospitalizados:

- Puede colonizar el tracto gastrointestinal de los trabajadores de la salud y de los pacientes, proveyendo un reservorio continuo para la diseminación intrahospitalaria.
- Presentan resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos (β-lactámicos, lincosaminas, aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol) y tienen una gran capacidad para adquirir nuevas resistencias.
- Puede contaminar el medio ambiente hospitalario y sobrevivir en él por períodos prolongados.

- Puede contaminar las manos de los trabajadores de la salud, permaneciendo por más tiempo si los empleados no cumplen con las normas de lavado de manos.

Estos factores hicieron que los enterococos emergieran como uno de los patógenos nosocomiales más importantes.

En 1986 se reportaron en Inglaterra las primeras cepas de Enterococo resistentes a la vancomicina (ERV), casi 30 años después de que la vancomicina fuera introducida para su uso clínico, desde entonces las infecciones por *Enterococcus* resistente a vancomicina han aumentado progresivamente en las últimas dos décadas.

Las infecciones por ERV ocurren en el ambiente hospitalario en los pacientes debilitados o invadidos y se expresan en forma de bacteriemias, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas quirúrgicas, endocarditis o abscesos.

Los análisis genéticos de epidemiología molecular han sido de gran ayuda para conocer la epidemiología de los ERV (estudio del ADN cromosómico por electroforesis en campo pulsado, estudios del ADN plasmídico y de los genes de resistencia mediante PCR). La biología molecular ha permitido demostrar la rápida diseminación intra e interhospitalaria de una sola clona, así como la participación de más de una especie en un mismo brote. Todo esto permite implementar medidas para el manejo de los brotes nosocomiales.

## ANTECEDENTES

En las infecciones nosocomiales el género *Enterococcus* se encuentra dentro de los principales agentes etiológicos, las particularidades de este germen, en especial su resistencia intrínseca a ciertos grupos de antibióticos así como su capacidad de generar nuevos mecanismos de resistencia, lo han colocado en los últimos años como un agente reportado cada vez más como responsable de este tipo de infecciones.

Dado a que el enterococo forma parte de la flora intraabdominal su participación en la patogénesis de las infecciones a dicho nivel era incierta, fue hasta 1906 que se logró identificar al enterococo como patógeno responsable de infecciones del tracto urinario y endocarditis, que posteriormente fue confirmado por un número creciente de reportes.<sup>1</sup>

La presencia de elevada resistencia a gentamicina y otros aminoglucósidos fue reportada por primera vez en 1979, por lo que se inicio el uso de glucopéptidos como la vancomicina y teicoplanina. La elevada resistencia a gentamicina es endémica en algunas regiones de Estado Unidos, Chile, Italia, Tailandia, Japón y Reino Unido.<sup>2</sup>

En 1986 se reportaron las primeras cepas de Enterococo resistentes a la vancomicina. Este hecho coincidió con el uso generalizado de dicho medicamento en el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativos y diarrea por *Clostridium difficile*, esto facilitó la selección y diseminación de las cepas de Enterococos resistentes a glucopéptidos.<sup>3</sup>

La epidemiología global de los ERV no se ha comprendido del todo; en Estados Unidos la prevalencia de colonización e infección es alta en los pacientes hospitalizados, pero un reservorio en la comunidad de ERV en personas o animales parece estar ausente, en contraste en Europa los reportes de colonización e infección hospitalaria permanece bajo mientras que la colonización de personas sanas y animales es prevalente.<sup>4</sup>

En estados Unidos la emergencia de infecciones nosocomiales por *E. faecium* fue caracterizada por un aumento en la resistencia a ampicilina en los años 1980s y un rápido incremento de resistencia a la vancomicina en la década siguiente.<sup>5,6.</sup>

En Chile se reportaron las primeras infecciones asociadas a ERV en el año 2000 pero no se cuenta con reportes de casos clínicos; posterior a ello se desarrollo un sistema de vigilancia activa de portación intestinal de ERV reportándose un registro de cepas de ERV de 5% de *E. Faecalis* y 29% de *E. faecium* en un total de 145 cepas de Enterococos referidos de todo Chile.<sup>7</sup> En un estudio de revisión del año 2001 a 2006 se reportaron 23 casos de infección relacionada a ERV siendo en *E. faecium* el germen aislado con mayor frecuencia en el 82.6% de los pacientes.<sup>8</sup>

En Europa se ha descrito la presencia de cepas de ERV en cerdos que han sido expuestos a agentes antimicrobianos con el fin de estimular el crecimiento en animales que producen alimentos par el hombre; se ha documentado que dicho enterococo es capaz de colonizar el intestino del hombre y se ha logrado recuperar de pacientes con infecciones graves. Este hecho puede condicionar el riesgo de la emergencia de nuevas cepas de ERV en el medio extrahospitalario.<sup>9</sup>

En Alemania se reportó un brote de Enterococos resistente a Vancomicina en el 2004 en un Hospital Universitario, posteriormente dicho brote se estudio con el fin de demostrar el costo que pudo haber sido evitado con medidas de detección temprana mediante métodos estadísticos simples.<sup>10</sup>

En México la resistencia a vancomicina en cepas aislada de *Enterococcus* de mayo de 2004 a abril de 2005 se reportó en una incidencia de 0.27%. Posteriormente en un estudio retrospectivo realizado en el INCMNSZ de mayo de 2005 a abril de 2006 se reportó una incidencia de *E. faecium* resistente a vancomicina de 6.23%; dentro de las características que predominaban en este grupo de paciente se encontraban el aislamiento del germen a nivel intestinal (51.9%), la presencia de líneas venosas centrales (92.6%) , cirugías previas (74.1%) siendo de estas la cirugía abdominal el procedimiento quirúrgico predominante (85%), y el uso previo de antibióticos

(88.8%) como factores asociados a la infección por el ERV. Finalmente el análisis por medio de electroforesis en gel por campos pulsados demostró la existencia de una población heterogénea de ERV pero con el establecimiento de una cepa como predominante.<sup>11</sup>

En el 2005 en Alaska se emprendió un estudio en la región Beringia con el fin de demostrar la presencia de cepas de ERV en animales en áreas remotas del mundo, demostrando que la presencia de genes de resistencia y bacterias resistentes a antibióticos se encuentran ya dispersas en una de las áreas mas remotas del norte de América.<sup>12</sup>

## MARCO TEÓRICO

Los *Enterococcus* fueron reconocidos como género independiente de los *Streptococcus* en 1984,<sup>13</sup> casi 85 años después de su primer reporte en la literatura francesa donde fue descrito como un “diplococo” encontrado como comensal en el tracto gastrointestinal y que tenía el potencial de volverse patógeno para el hombre. Desde entonces los enterococos han cobrado importancia clínica asociándose a entidades patológicas y más recientemente a infecciones intrahospitalarias.

### Microbiología y Taxonomía.

Los enterococos son cocos Gram positivos, que se encuentran aislados, de a pares, o formando cadenas cortas, anaerobios facultativos catalasa negativa, capaces de crecer en condiciones un tanto extremas. Las características bioquímicas sobresalientes incluyen: la habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6.5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH de 9.6. Tienen la capacidad de hidrolizar la esculina, crecer en presencia de bilis al 40%, sobrevivir 30 min a 60°C e hidrolizar la L-pirrolidonil β-naftil-amida al producir la enzima pirrolidonil- aril-amidasa (PYR) (Excepto *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens* y *E. saccharolyticus*). En agar soya triptica y agar sangre de carnero al 5% las colonias pueden ser alfa o beta hemolíticas; la mayoría reacciona con el antisuero del grupo D de Lancefield y algunos con el antisuero del grupo Q; algunas especies como *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* son móviles.<sup>14,33</sup>

Los enterococos aislados de infecciones en humanos se nombran en la tabla 1; de estos las especies que más se ha asociado a infecciones en el humano son el *E. faecalis* y el *E. faecium*; la importancia de poder diferenciar estas dos especies radica en su virulencia y el perfil de resistencia a los antibióticos que expresan.<sup>33</sup>

Tabla 1. Especies de *Enterococcus* aisladas en infecciones humanas.

<b>Especies de <i>Enterococcus</i> aisladas en infecciones humanas.</b>
<i>E. faecalis</i>
<i>E. faecium</i>
<i>E. gallinarium</i>
<i>E. durans</i>
<i>E. avium</i>
<i>E. raffinosus</i>
<i>E. pallens</i>
<i>E. gilvus</i>
<i>E. cecorum</i>
<i>E. malodoratus</i>
<i>E. italicus</i>
<i>E. sanguinicola</i>
<i>E. mundtii</i>
<i>E. casseliflavus/flavescens</i>
<i>E. dispar</i>
<i>E. hirae</i>
<i>E. pseudoavium</i>
<i>E. bovis</i>

Los métodos convencionales para identificar a las especies de enterococos incluyen diferenciaciones bioquímicas manuales basadas en múltiples prueba como la hidrólisis de arginina, PYR, formación de ácidos entre otros. Debido a que puede existir ciertas limitaciones en este tipo de estudios, se han desarrollado técnicas moleculares para lograr la identificación e las especies; dichas técnicas no son utilizadas de manera rutinaria y dentro de ellas podemos nombrar la amplificación de los genes *ddl*, amplificación y sondeo del gen *ace* y la secuenciación de ARN.

### **Colonización y Virulencia.**

Los enterococos son organismos que han desarrollado múltiples mecanismos para adaptarse y sobrevivir en el tracto gastrointestinal del hombre. Han establecido una relación simbiótica con el sistema inmune y otras bacterias dentro de las que predominan los anaerobios. Cuando se administra un antibiótico que altera la dinámica de la colonización intestinal en favor de los

enterococos sobreviene la infección. Los antibióticos que se excretan por la bilis o que tienen una acción anaerobicida predominante sin actividad para inhibir a los enterococos (por ejemplo las cefalosporinas) se presenta un incremento en la colonización del tracto gastrointestinal por enterococos (por ejemplo enterococos resistentes a vancomicina).<sup>15</sup> Otro factor que puede influir a favor del sobrecrecimiento de enterococos en el intestino es el incremento en el pH del estómago, generalmente secundario a la administración de medicamentos antiácidos.

Una vez que el enterococo se ha establecido y adherido a la mucosa intestinal por medio de adhesinas es capaz de invadir el sistema linfático y el torrente sanguíneo a través de mecanismo que aún no han sido completamente elucidados. Algunos de los determinantes patogénicos que se ha estudiado incluyen citolisinas, gelatinasas, proteasas de serina y proteínas Gls24, todos estos caracterizados en el *E. faecalis*. En cuanto al *E. faecium* se ha postulado que un plásmido codifica una proteína con un dominio hialuronidasa siendo este uno de sus principales factores de virulencia.<sup>16</sup>

### ***Factores de Virulencia.***

#### **A. Sustancia de agregación (AS).**

La AS es una proteína superficial codificada principalmente por el plásmido pAD1, específicamente por el gen *asa1*, cuya presencia incrementa considerablemente la adherencia e internalización enterocócica en los macrófagos, previa interacción con las integrinas CD11b, CD18 y CR3, presentes también en otras células de defensa del humano. (Sigurd y cols, 2000),<sup>17</sup>

En concreto, la sustancia de agregación (AS) desempeña las siguientes funciones:

- 1) Potenciación de la conjugación de plásmidos.
- 2) Adhesión a los tejidos del hospedero.
- 3) Promoción de la internalización y la supervivencia en los fagocitos.

## **1) Potenciación de la conjugación de plásmidos**

Uno de los rasgos más característicos del género *Enterococcus* radica en la eficacia con la que lleva a cabo la conjugación plasmídica; el proceso inicia cuando una clona que funge como potencial receptora libera al medio ciertos péptidos, denominados feromonas, que promueven la aproximación de enterococos hacia ella y la secuencial transferencia de diversos plásmidos provenientes de las células bacterianas capaces de actuar como donadoras.

A tal respecto, entre los plásmidos inducibles por las feromonas, destacan el pCF10 –que confiere resistencia a la tetraciclina– y el pAD1, uno de los principales productores de AS la cual, entre otras funciones, suele participar en la formación de agregados constituidos por células donadoras y receptoras para facilitar e intensificar la transferencia plasmídica. Aparentemente, la transferencia de plásmidos bacterianos implica cuatro pasos críticos:

1. El contacto directo entre las células donadora y receptora.
2. La formación de un canal que permite la transferencia del DNA entre ellas.
3. El desplazamiento del plásmido o del segmento de DNA a través de dicho canal.
4. La estabilización del DNA plasmídico en el nuevo huésped, ya sea por replicación autónoma o mediante su inserción en el genoma.

En los enterococos, la unión de una a cinco moléculas de feromonas a la superficie de la célula donadora, induce un proceso de transmisión de señales que da como resultado la expresión de distintos genes relacionados con la transferencia de plásmidos.<sup>17</sup>

## **2) Adhesión a los tejidos del hospedero.**

La región del extremo N-terminal de la AS contiene la secuencia encargada de interactuar con los receptores presentes en las células eucariotes. Es importante señalar que los receptores de la AS en las células humanas son las integrinas  $\beta 2$ , proteínas que se localizan en la superficie de numerosos leucocitos, e inclusive, de las células epiteliales y endoteliales; no

obstante, aquella adhesina enterocócica también reconoce a diversas matrices celulares humanas en las que predominan la colágena y/o la laminina.

### **3) Promoción de la internalización y la supervivencia en los fagocitos.**

Aparentemente, en las numerosas infecciones endógenas debidas a enterococos, es determinante el papel de los macrófagos, los cuales suelen fungir como vehículos responsables de la traslación del microorganismo, desde el intestino hasta el sistema linfático o el torrente circulatorio del individuo involucrado. Diversos hallazgos apuntan hacia la AS, como la promotora de que los enterococos se adhieran a los fagocitos, penetren en ellos, e inclusive, sobrevivan intracelularmente. En cuanto a la internalización, diversos autores han analizado la influencia de dos moléculas codificadas por el plásmido pCF10: la sustancia de agregación Asc10 y la proteína Sec10. El microorganismo es capaz de internalizarse, mediante un mecanismo que implica a su propia envoltura y a las microvellosidades apicales de los enterocitos.

## **B. Hemolisina**

La citolisina de *E. faecalis* destruye células eucariotes y procariotes, así como a los eritrocitos de humano, caballo, vaca y conejo. Se considera que dicha sustancia desempeña un papel importante durante la primera fase de la infección por enterococos la cual, aún cuando es asintomática, implica la penetración bacteriana en los tejidos intestinales humanos, así como una toxemia y cierto daño tisular que antecede a la segunda fase, en la que ocurre la manifestación de los principales síntomas. La citolisina enterocócica también está codificada por el plásmido pAD1 y se constituye por tres subunidades, mismas que interactúan para provocar la lisis celular.<sup>17</sup>

Desempeña relevantes funciones patogénicas: actúa como toxina provocando la ruptura del sistema membranoso de los glóbulos rojos y de diversas células humanas, es probable que induzca la liberación de mediadores inflamatorios a partir del tejido dañado o de las células fagocitarias y que, de esa manera, contribuya a la severidad del proceso inflamatorio.

### C. Gelatinasa y Proteasas de serina

Estas enzimas son capaces de degradar a la gelatina, caseína, hemoglobina y a ciertos péptidos bioactivos, incluidas las feromonas quimiotácticas de *E. faecalis*, las cuales promueven la llegada de neutrófilos a los tejidos colonizados por el microorganismo; en tal sentido, una de las posibles funciones de esta proteasa podría consistir en modular o modificar, junto con las feromonas quimiotácticas, la defensa del hospedero, induciendo alternativamente la ausencia o la acumulación de leucocitos en los tejidos colonizados

Otros mecanismos por los que se cree que estas enzimas bacterianas contribuyen a la virulencia del *E. faecalis* incluyen:

1. La facilitación de la invasión microbiana por alteración de las inmunoglobulinas y las moléculas del complemento.
2. El procesamiento de los factores de virulencia para regular la autólisis y liberar DNA extracelular de alto peso molecular, un componente crítico para el desarrollo del biofilm por parte de *E. faecalis*.
3. La degradación del tejido conectivo del hospedero exponiendo así ligandos para la adherencia bacteriana y posiblemente proviendo nutrientes para la célula.<sup>14</sup>

Otros proteínas de superficie que se han asociado a la virulencia de los enterococos son: La proteína de superficie del *E. faecalis* (Esp); la proteína Ace que se une a la colágena; la proteína Acm del *E. faecium* similar a la proteína Ace; la proteína ElrA (del inglés enterococcal leucine-rich repeat-containing protein) y los pilis, estos últimos juegan un papel mayor en la formación del biofilm del enterococo.<sup>17</sup>

El genoma del primer *E. faecalis* resistente a vancomicina fue aislado en E.U.A. siendo designado como V583, más de una cuarta parte de dicho genoma es DNA móvil (más que el genoma de cualquier otra bacteria). Uno de los elementos más importantes del V583 es la isla de patogenicidad, que es un elemento genético largo que acarrea un juego de genes de virulencia, un trasposon con el conjunto de genes del *vanB*, 3 plásmidos con determinantes

de resistencia antibiótica y secuencias de inserción. Estas islas de patogenicidad codifican factores que hacen al enterococo capaz de ganar ventaja en el intestino, como lo son las citolisinas, múltiples adhesinas, vías de utilización de carbohidratos y enzimas que le permiten colonizar ciertas áreas del intestino.<sup>17</sup>

## **Epidemiología.**

Las 2 especies de enterococos mas frecuentemente implicadas en las infecciones humanas son el *E. faecalis* y el *E. faecium*, La otra especie de enterococo asociada a transmisión nosocomial y brotes de manera esporádica es el *E. gallinarum*. Se reporta que el género enterococo se encuentra dentro de las primeras causas de infecciones nosocomiales (segunda o tercera según la referencia consultada).<sup>17,19</sup> . De las infecciones por enterococos los ERV representan el 30%, siendo el *E. faecium* el más identificado en el 90% de los casos.<sup>20</sup> Un estudio multicéntrico en E.U.A. demostró que el 28% de los enterococos aislados en la unidad de cuidados intensivos eran resistentes a la vancomicina.<sup>21</sup> De manera mas alarmante un estudio de un hospital escuela demostró la incidencia en un 9.5% de co-colonización con ERV y *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA),<sup>22</sup> Posteriormente en el 2003 se reportó en Michigan el primer caso de resistencia a la vancomicina transferida del ERV a MRSA en un paciente con una herida por los dos organismos.<sup>23</sup>

## **Colonización.**

El primer paso en el proceso de infección por ERV es la colonización del tracto gastrointestinal del hombre y en segundo lugar la piel. Esta colonización es asintomática y puede durar por largos periodos (más de 1 semana) y servir como reservorio para la transmisión de ERV a otros pacientes.<sup>24</sup> Así mismo se ha demostrado que el ambiente hospitalario puede ser altamente colonizado por el ERV incluyendo: venoclisis, manguitos de presión para baumanómetros, termómetros, estetoscopios, oxímetros de pulso, glucómetros, equipos de monitorización y orinales entre otros;<sup>14,24</sup> el mobiliario (teléfonos, almohadillas inflables, mesas, sillas, cabeceras, barandales de cama y teclados), pisos,

paredes, inodoros, ropa de cama y otro tipo de equipo médico como: tubos de ventilador, bombas, lavabos, dispensadores automáticos de medicamentos y postes para colocar venoclisis pueden ser también sitios reservorios.<sup>24,27</sup>

Los huéspedes susceptibles de ser colonizados por ERV incluyen a los pacientes gravemente enfermos, aquellos que han recibido múltiples y prolongados esquemas antibióticos, receptores de órganos sólidos y aquellos con patologías hemato-oncológicas. Otros factores de riesgo incluyen: la presencia de inmunosupresión y condiciones comórbidas graves (por ejemplo insuficiencia renal), días de estancia intrahospitalaria prolongados, estancia en unidades de cuidados intensivos, proximidad a otro paciente colonizado o infectado, hospitalización en un cuarto previamente utilizado por un paciente colonizado por ERV, procedimientos invasivos.<sup>14,24,28</sup> En Estados Unidos se ha reportado hasta un 10% de prevalencia de colonización por ERV en los pacientes con hemodiálisis.<sup>25</sup>

Los trabajadores de la salud y sus contactos en casa pueden estar en riesgo de colonización por ERV.<sup>14,24,28</sup> Las manos de los trabajadores de la salud parecen ser la fuente de transmisión más frecuente de ERV, dicho organismo es capaz de sobrevivir en las manos, guantes y batas de los trabajadores de la salud por tiempos prolongados; un factor de riesgo independiente para la contaminación de guantes y batas incluye el contacto con catéteres de drenajes, tronco y extremidades inferiores de los pacientes colonizados.<sup>26</sup>

Después de que un paciente es colonizado por ERV el riesgo de desarrollar una infección sanguínea por dicha cepa de ERV parece aumentar. Los rangos de infección del torrente sanguíneo reportados van del 0 al 34% y parecen ser mayores en pacientes con cáncer y trasplantes de órganos sólidos y médula ósea. Los riesgos para que se desarrolle esta infección incluyen: cáncer, diabetes, procedimientos gastrointestinales, insuficiencia renal aguda, exposición previa a vancomicina e infección de otro sitio que no sea la sangre.<sup>14,24</sup> Los sitios de entrada para el ERV generalmente incluyen el tracto urinario, fuentes intraabdominales (vías biliares, tracto gastrointestinal) o

pélvicas, heridas (úlceras por decúbito, heridas quirúrgicas) y dispositivos intravasculares.

### **Presentaciones clínicas.**

Como ya se ha comentado la mayoría de las infecciones por enterococos ocurren en individuos con rupturas en la barreras físicas normales. Otros factores mas frecuentemente asociados a infecciones en niños corresponden a hospitalizaciones prolongadas, uso previo de antibióticos y compromiso del sistema inmune. En neonatos los enterococos se asocian mas frecuentemente a septicemia, mientras que en niños mas grandes y adultos generalmente producen bacteremia, infecciones del tracto urinario o abscesos intraabdominales.

A continuación se resumen las características más relevantes de las principales infecciones nosocomiales debidas a enterococos.

#### ***Infección Neonatal.***

Los enterococos forman parte de la flora normal de la vagina y pueden ser adquiridos por los neonatos durante el parto. Representa el 10% de las infecciones del torrente sanguíneo. La incidencia de dicha infección parece incrementar con el tiempo de sobrevivida del paciente. La mayoría de las infecciones se deben a *E. faecalis*, mientras que *E. faecium* es menos frecuente pero se ha reportado en casos de brotes nosocomiales.<sup>29</sup> En general se ha asociado al género enterococo en un 17% a infecciones del tracto urinario, 10% bacteriemias, 9% infecciones de heridas quirúrgicas, 6% sepsis neonatal tardía, 5% en neumonías.<sup>14,29</sup>

#### ***Bacteriemia.***

La Bacteriemia sin endocarditis es de las presentaciones más frecuentes y los enterococos son una de las primeras causas de bacteriemia nosocomiales. Las fuentes de diseminación se encuentran en el tracto genitourinario y gastrointestinal. Los focos de bacteriemia nosocomial mas frecuentes son catéteres urinarios e intravasculares, otras fuentes menos frecuentes de infección se encuentra a nivel intra-abdominal, pélvico, tracto

biliar, heridas (incluyendo pacientes con quemaduras) y hueso. La bacteriemia por enterococo generalmente ocurre en el contexto de un paciente debilitado, con uso previo de antibióticos de amplio espectro y con una condición de base grave. Estudios han publicado que la bacteriemia por *E. faecium* tiene un peor pronóstico debido a la capacidad de este organismo de generar mayor resistencia a los antibióticos.

Los pacientes neutropénicos colonizados por ERV se encuentra en riesgo de desarrollar bacteriemia por ERV como resultado de una traslocación de bacterias del intestino, infección relacionada a dispositivos intravasculares o infecciones del tracto urinario.<sup>24</sup>

### ***Endocarditis.***

La endocarditis infecciosa corresponde a la infección de una o más válvulas cardíacas, lo cual en dos terceras partes de los casos es posterior a ciertas patologías cardiovasculares preexistentes. Además, durante la edad pediátrica, la localización inicial del cuadro implica en la mayoría de los casos algún defecto congénito del endocardio. La incidencia de endocarditis por enterococo varía del 1% al 32% según la referencia consultada, colocando a los enterococos como el segundo o tercer agente implicado en las endocarditis.<sup>14</sup> Dicho microorganismo puede afectar tanto a válvulas nativas como a válvulas protésicas y causar endocarditis de origen comunitario como nosocomial. El *E. faecalis* es el germen más frecuentemente recuperado y la infección generalmente se origina del tracto genitourinario o gastrointestinal. Los procedimientos asociados a endocarditis por enterococo incluyen: cistoscopias, cesáreas, prostatectomías, biopsias prostáticas transrectales, cortocircuitos portosistémicos, litotripsia extracorpórea, colonoscopias y biopsia hepática. El cuadro es generalmente subagudo con fiebre, soplo cardíaco y síntomas constitucionales como pérdida de peso, dolor muscular, malestar general. En mucha menor frecuencia se observan petequias, nódulos de Osler, y machas de Roth entre otros.

### ***Infecciones de vías urinarias.***

Los enterococos son agentes etiológicos comunes de las infecciones de las vías urinarias (IVUs), patologías consideradas como las más frecuentes entre los pacientes ubicados en las unidades de cuidados intensivos. Las infecciones de las vías urinarias se pueden dividir en uretritis, cistitis, pielonefritis y abscesos perirrenales, El acceso de los microorganismos ocurre mediante dos vías: la hematógica y la ascendente. En las infecciones de vías urinarias de adquisición nosocomial se asocia la presencia de catéteres urinarios, instrumentación y anomalías del tracto genitourinario. En Estados Unidos se reporta una incidencia de *E. faecium* del 40% y *E. faecalis* del 35% del total de los enterococos como agentes responsables de infecciones de vías urinarias en pacientes hospitalizados.<sup>14</sup>

### ***Infecciones intra-abdominales y pélvicas.***

Los enterococos son comensales del tracto gastrointestinal y genitourinario y se aíslan con frecuencia de las infecciones pélvicas y abdominales, generalmente junto con otros organismos Gram negativos y anaerobios. Se ha visto que la presencia del enterococo a nivel intra-abdominal incrementa el riesgo de infecciones y complicaciones postquirúrgicas, así como la mortalidad de los pacientes. Los enterococos son capaces de producir peritonitis espontánea y empiema en pacientes con insuficiencia renal crónica y cirrosis, así mismo se ha asociado a peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal ambulatoria.

### ***Infecciones de Piel y tejidos blandos.***

Los enterococos se han asociado a infecciones de piel y tejidos blandos incluyendo heridas. Cuando se aíslan en muestras clínicas generalmente van acompañadas de otros microorganismos por lo que su potencial patógeno es debatible. Los enterococos son causas raras de abscesos en tejidos blandos, pese a ello se ha llegado a reportar en la literatura abscesos de hígado, pulmón y cerebro por este microorganismo.<sup>14</sup>

Las infecciones de heridas quirúrgicas constituyen la tercera causa de enfermedades nosocomiales, estimándose que entre el 5 y 12 % de los pacientes intervenidos quirúrgicamente desarrollan infecciones post-operatorias. Las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia a partir de infecciones en heridas son, nuevamente, *Staphylococcus aureus*, los estafilococos coagulasa negativa y *Enterococcus sp.*

### **Tratamiento y Resistencia a los antibióticos.**

El tratamiento de las infecciones por enterococos es un reto para el clínico debido a que este microorganismo es intrínsecamente resistente a varios grupos de antibióticos (tabla 2) y a que es capaz de reclutar nuevos genes de resistencia. La resistencia es mas común y generalmente mas significativa en el *E. faecium* que en el *E. faecalis*. (tabla 3).

Tabla 2. Tipos de resistencia del género *Enterococcus*.

<b>RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE LOS ENTEROCOCOS</b>
Resistencia Intrínseca (codificada cromosómicamente): <ul style="list-style-type: none"><li>- Aminoglucósidos (bajo nivel)</li><li>- <math>\beta</math>-lactámicos (especialmente penicilinas y cefalosporinas)</li><li>- Clindamicina (bajo nivel)</li></ul>
Resistencia adquirida: <ul style="list-style-type: none"><li>- Aminoglucósidos (alto nivel)</li><li>- Cloranfenicol</li><li>- Eritromicina y clindamicina de alto nivel</li><li>- Fluoroquinolonas</li><li>- Penicilinas (<math>\beta</math>-lactamasas)</li><li>- Tetraciclinas</li><li>- Vancomicina</li></ul>

Tabla 3. Susceptibilidad antimicrobiana de los enterococos.

Antibiótico	<i>E. faecalis</i>			<i>E. faecium</i>		
	Rango	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Rango	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Penicilina	2->8	2	8	2->8	>8	>8
Ampicilina	0.25-8	2	2	0.25-128	128	128
Piperacilina	8-128	8	16	8-128	128	128
Imipenem	1->8	8	16	1->8	>8	>8
Cloranfenicol	8->16	8	16	8->16	8	>16
Levofloxacino	1->4	2	>4	1->4	>4	>4
Vancomicina	2->64	2	8	2->64	>64	>64
Linezolid	1-4	2	4	0.5-4	2	4

Tomado de: Noskin GA, Siddqui F, Stosir V, et al. *In vitro* activities of linezolid against important gram-positive bacterial pathogens including vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2059.

La resistencia es la capacidad que tienen o han adquirido los microorganismos para inhibir la acción del sitio blanco del antibiótico, por la presencia de moléculas capaces de destruir o modificar al antibiótico o la presencia de estructuras del microorganismo que evadan su acción. Se han descrito 2 tipos de resistencia: la natural o intrínseca y la adquirida o extrínseca.

La resistencia intrínseca se encuentra presente en el genóforo bacteriano y se expresa de maneras diversas fenotípicamente. En el enterococo no posee el sitio blanco sobre el que actúa el antibiótico ya que posee cambios en el material genético producidos por mutaciones (por ejemplo por modificación del DNA sintetiza porinas con una modificación estructural que impiden el paso del antibiótico).

La resistencia adquirida o extrínseca es aquella en donde los enterococos logran por mecanismos de transferencia genética horizontal (plásmidos, transposones e integrones) pasar información genética de una bacteria a otra; se observan 3 tipos de transferencia: 1. conjugación de una bacteria donadora a otra receptora, 2. transferencia genética mediante un

bacteriógafo y 3. la transformación que es la transferencia genética mediante DNA libre en el medio.

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a múltiples antibióticos. La resistencia intrínseca se basa en genes cromosómicos que no son transferibles. La penicilina, ampicilina, piperacilina, imipenem y vancomicina son los antibióticos que muestran una actividad inhibitoria mas no bactericina contra *E. faecalis*. *E. faecium* es menos susceptible a los Beta-lactámicos porque sus proteínas de unión de penicilina (PBPs) tienen menor afinidad a estos antibióticos.<sup>33</sup>

La resistencia adquirida del enterococo a los antibióticos se debe a intercambio de genes que codifican resistencia que son acarreados o conjugados con transposones, plásmidos que responden a feromonas y otros plásmidos de amplio rango en el huésped.<sup>33</sup>

### **Resistencia a $\beta$ -lactámicos.**

Los enterococos son altamente resistentes a cefalosporinas y penicilinas semisintéticas como la nafcilina, oxacilina y meticilina. Son moderadamente resistentes a penicilinas de amplio espectro como ticarcilina y carbenicilina. La ampicilina, imipenem y penicilina son los agentes beta lactámicos mas activos contra enterococos, con concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) entre 1 a 8 mcg/ml (tabla 3). En ocasiones la concentración bactericida mínima (CBM) es considerablemente mayor y la tolerancia a estos antibióticos es frecuente (CBM a CIMs ratio >32).<sup>29</sup>

La susceptibilidad natural de *E. faecalis* a ampicilina es mayor (CIM entre 0.5 y 4mcg/ml) que *E. faecium* (4 a 8 mcg/ml). Ambas especies pueden adquirir resistencia de dos tipos a este antimicrobiano:

*Bajo nivel*: CIM de 8 a 32mcg/ml determinada por una mayor producción de PBP5 con menor afinidad a ampicilina y *Alto nivel*: CIM >64mcg/ml que se debe a la producción de Beta-lactamasas, lo cual es inhabitual y se ha descrito sólo en *E. faecalis*.<sup>7</sup>

Algunas cepas de *E. faecalis* producen beta-lactamasas codificadas por plásmidos, estas cepas son completamente resistentes a penicilinas y se necesita el uso de vancomicina, imipenem o penicilina + inhibidor de beta-lactamasas para su erradicación. Algunas cepas de *E. faecalis* susceptibles a imipenem pueden ser resistentes a meropenem o ertapenem, todos los *E. faecium* son resistentes a carbapenémicos, esta resistencia involucra mutaciones sobreexpresión del gen *pbp5* que disminuye la afinidad de su producto a la ampicilina.<sup>14</sup>

### **Resistencia a Aminoglucósidos.**

Todos los enterococos tienen una resistencia de bajo grado a los aminoglucósidos (CIM de 8-25mcg/ml), probablemente reflejando poco transporte de este antibiótico a través de la pared celular. El uso concomitante de un agente que actúa a nivel de la pared celular (por ejemplo beta-lactámico, glucopéptido) mejora la permeabilidad de la pared celular a los aminoglucósidos resultando en un efecto bactericida sinergista.

La resistencia de alto nivel (RAN) a los aminoglucósidos es definida por el crecimiento a concentraciones de 2000mg/L y 500mg/L de estreptomina y gentamicina respectivamente en agar infusión cerebro-corazón, o 1000mg/L de estreptomina cuando se usa caldo infusión cerebro-corazón.<sup>14</sup> La presencia de RAN a la gentamicina y estreptomina abole el efecto sinergista de estos antibióticos en la práctica clínica. Dicha resistencia de alto nivel se debe a la presencia de una enzima modificadora bifuncional aminoglicosida, la AAC(6')Ie-APH(2''), que confiere la resistencia de alto nivel a gentamicina (y al sinergismo con otros aminoglucósidos excepto estreptomina). La RAN a estreptomina se debe a mutaciones en la subunidad ribosoma 30S y a la presencia de una 6-6'adeniltransferasa de estreptomina.<sup>14</sup> La enzima 3'fosfotransferasa inactiva a la kanamicina y la amikacina. La producción de estas enzimas modificadoras de los aminoglucósidos está modificada por plásmidos.<sup>30</sup>

### ***Resistencia a Glucopéptidos.***

Tradicionalmente la vancomicina había sido efectiva contra enterococos resistentes a múltiples antibióticos. Hace 2 décadas se reportó el primer ERV en Reino Unido y desde entonces la proporciones de infecciones por este agente ha incrementado de 0.5% en 1989 a un 30% en la actualidad.<sup>29,31</sup> La resistencia a la vancomicina va generalmente acompañada de resistencia a otros glucopéptidos incluyendo la teicoplanina y daptomicina.

La vancomicina y otros glucopéptidos inhiben la biosíntesis de la pared celular por unión con las terminales D-Alanil-D-alanina (D-ala-D-ala) del precursor del peptidoglicano en la parte externa de la membrana citoplasmática. Esta interacción bloquea la formación de un peptidoglicano maduro, principalmente impidiendo el acceso de la transpeptidasa a su sustrato, y con esto previniendo la formación de los puentes peptídicos cruzados entre las cadenas de polisacáridos que dan a la pared celular su estabilidad.<sup>35</sup>

Se reporta en la literatura el uso de vancomicina vía oral en los hospitales para tratar diarrea asociada a antibióticos como uno de los factores incitantes de la emergencia de la resistencia a la vancomicina. Debido a que la vancomicina no se absorbe en el intestino llega en grandes concentraciones al colon para favorecer la colonización por enterococos que de ser tolerantes se volverán resistentes a vancomicina. Por este motivo se presume que la administración oral de glucopéptidos es un factor de riesgo importante para la emergencia de enterococos resistentes a vancomicina. Así mismo las cefalosporinas de espectro extendido y otros beta-lactámicos de actividad similar y las drogas con una potente actividad contra anaerobios (principales competidores con los enterococos por la colonización del colon) predisponen a la colonización e infección por ERV, ya sea por si falta de actividad contra enterococos resistentes a penicilina o por su actividad contra la flora competitiva de los enterococos.<sup>32</sup>

La resistencia a la vancomicina se debe a alteración del sitio de acción; para actuar con éxito, los glicopéptidos se ligan a la porción terminal del

peptidoglicano de la pared bacteriana del Gram positivo, las cepas resistentes alteran los últimos aminoácidos de esta molécula evitando que los glicopéptidos se unan y ejerzan su efecto antibacteriano.<sup>34</sup> Esta resistencia adquirida presenta diferentes genotipos y sus características resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Características de los fenotipos de resistencia de enterococos resistentes a glucopéptidos (Cetinkaya Y. et al, 2000).

Genotipo	Expresión	Localización	Vancomicina CIM (mcg/ml)	Teicoplanina CIM (mcg/ml)	Terminación del precursor	Especie
Van A	Inducible	Cromosoma Plásmidos (Tn 1546)	> 128	>64	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
Van B	Inducible	Cromosoma Plásmidos	4- 1024	<2	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
Van C	Constitutiva	Cromosoma	4- 16	0.5 - 1	D-Ala-D-Ser	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>
Van D	Inducible o constitutiva	Cromosoma	64 – 128	4 – 8	D-Ala-D-Lac	<i>E. faecium</i>
Van E	Inducible	No descrito	16	0.5	D-Ala-D-Ser	<i>E. faecalis</i>
Van G	Inducible	No descrito	12-16	0.5	D-Ala-D-Ser	<i>E. faecalis</i>

### Fenotipo VanA

Las cepas con fenotipo VanA se caracterizan por presentar resistencia inducible de alto nivel tanto a la vancomicina (MIC >64 mcg/ml) como a la teicoplanina (MIC >16 mcg/ml). La resistencia tipo VanA es transferible. El gen de resistencia *vanA* se encuentra localizado en el trasposón Tn1546, de 10,8 Kb, generalmente localizado en un plásmido, aunque, en algunos casos, se ha transferido al cromosoma. En este trasposón están codificadas las siete proteínas que intervienen en la resistencia a los glucopéptidos, a saber: a) VanR y VanS, implicadas en la regulación del gen de resistencia; b) VanA, VanH y VanX, que serían las responsables directas de la resistencia a glucopéptidos; c) VanY y VanZ, proteínas accesorias.

La vancomicina actúa uniéndose al dipéptido D-alanil-D-alanina terminal del precursor del péptidoglucano, inhibiendo la síntesis de la pared celular. La proteína VanA es una ligasa similar a las codificadas cromosómicamente pero que, en lugar de sintetizar el dipéptido terminal D-Ala-D-Ala, sintetiza el depsipéptido D-Ala-D-lactato (D-Ala-D-Lac) con una afinidad 1000 veces menor por la vancomicina<sup>35</sup>. La proteína VanH reduciría el piruvato a D-Lac, necesario para la expresión de la proteína VanA, pero que está generalmente ausente en el ambiente natural de los enterococos. Por otro lado, las ligasas de codificación cromosómica, siguen sintetizando el dipéptido D-Ala-D-Ala que se unirá a los precursores de la pared celular y, por lo tanto, conservarán la afinidad a la vancomicina. La expresión de la resistencia a la vancomicina dependerá del desequilibrio entre los precursores con el depsipéptido o el dipéptido terminal.

### **Fenotipo VanB**

Las cepas portadoras del gen *vanB* se caracterizan por niveles variables de resistencia a la vancomicina (CIM entre 4 y  $\square$  1000  $\square$  g/ml) y sensibilidad a la teicoplanina.

La resistencia VanB se transfiere en algunas cepas por conjugación y se asocia a la movilización de material genético de elevado peso molecular de cromosoma a cromosoma. El análisis de la secuencia de aminoácidos de VanB ha permitido demostrar la elevada homología (65-75%) existente con la ligasa VanA, la deshidrogenasa VanH y la dipeptidasa VanX. Probablemente, las diferencias observadas en la expresión fenotípica y en las sustancias inductoras de la resistencia entre las cepas con fenotipo VanA y VanB sean debidas a variaciones en el sistema regulador, cuya homología es menor (<40%).

### **Fenotipo VanC**

El fenotipo VanC se observa en las especies *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus* y *Enterococcus flavescens*, intrínsecamente

resistentes a la vancomicina, con CIM entre 2-32  $\mu$ g/ml, pero sensibles a la teicoplanina.

El gen *vanC1*, presente en la especie *E. gallinarum*, y el *vanC2*, presente en las especies *E. casseliflavus* y *E. flavescens* (por homología del ADN parece tratarse de la misma especie), determinan la síntesis del depsipéptido terminal D-alanina-D-serina que también tiene menor afinidad por la vancomicina.

### **Fenotipo VanD**

Este fenotipo de resistencia se ha descrito en una cepa de *E. faecium* aislada en los Estados Unidos. Esta cepa presentaba resistencia constitutiva moderada a la vancomicina (CMI 64 mcg/ml) y de bajo nivel a la teicoplanina (CMI 4 mcg/ml). En este aislamiento no se detectó ninguno de los tres genes responsables de la resistencia a la vancomicina descritos hasta la actualidad.

### **Fenotipo VanE y VanG.**

Los aislamientos de enterococos con fenotipo VanE y VAN G tienen una ligasa D-alanil-D-serina (D-Ala-D-Ser) en vez de la ligasa D-Ala-D-Lac. La sustitución de D-Ser por D-Ala resulta en una disminución de 6 veces la afinidad por la vancomicina y por lo tanto una resistencia de bajo nivel.<sup>35</sup>

La resistencia a los glucopéptidos en *Enterococcus* ocasiona la pérdida de una importante alternativa terapéutica en un género que presenta resistencia intrínseca a muchos antibióticos y que muestra una gran capacidad para adquirir nuevas resistencias. Además, no debe descartarse la posibilidad de transferencia *in vivo* de esta resistencia al género *Staphylococcus*, hecho que ya se ha logrado *in vitro*, lo que plantearía graves dificultades terapéuticas, sobre todo en las infecciones causadas por *S. aureus* resistente a la meticilina.

Se ha visto en el laboratorio que los genes VanA y VanB se pueden transferir del enterococo a otras bacterias. El *Staphylococcus aureus* ha hecho resistencia a la vancomicina (SAVR) a través de la transferencia intergénica del trasposon Tn 1546 que acarrea los genes *van* en las cepas VanA de un co-

aislamiento de *E. faecalis*, creando así un *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina .<sup>33, 35</sup>

### **Tratamiento de las infecciones por ERV.**

#### **Daptomicina.**

Es un antibiótico lipopéptido cuyo eventos moleculares para su acción antibacterianos no son bien conocidos hasta el momento, se cree que la daptomicina se inserta en la membrana celular bacteriana en una dominio calcio-dependiente y que subsecuentemente produce una alteración en el potencial de membrana que eventualmente lleva a la muerte de la célula bacteriana por un mecanismo desconocido. La FDA (Food and Drug Administration por sus siglas en inglés) ha aprobado el uso de daptomicina para el tratamiento de las infecciones complicadas de piel y tejidos blandos incluyendo *E. faecalis* sensibles a vancomicina, así mismo no se ha aprobado para su uso contra *E. faecium* (independientemente de su patrón de susceptibilidad) o para infecciones por ERV.<sup>14</sup>

#### **Linezolid.**

Inhibe la síntesis proteica pero en una etapa diferente de otros antimicrobianos que actúan en esta fase metabólica. No tiene resistencia cruzada con otros antimicrobianos y tiene una excelente actividad contra especies Gram positivas multiresistentes, incluyendo *Enterococcus* resistente a vancomicina y *Staphylococcus* multi- resistentes. Su efecto también es bacterostático. A diferencia de quinupristina/dalfopristina, puede ser utilizado por vía oral con buena biodisponibilidad y pocos efectos colaterales. Su uso en el caso de endocarditis se ha reportado resultados controversiales, pero la Asociación Americana del Corazón lo recomienda como una de las dos drogas que pueden ser usadas como terapia de primera línea para endocarditis causada por *E. faecium* resistente a Beta-lactámicos, glucopéptidos y aminoglucósidos.

### **Quinupristina/dalfopristina (Q/D).**

Son dos estreptograminas (tipo A: dalfopristina y tipo B: Quinopristina) que actúan sinérgicamente en la síntesis proteica, representantes de una nueva clase relacionada a macrólidos y lincosaminas. Fue el primer antibiótico aprobado por la FDA para el tratamiento de infecciones por ERV. La resistencia de *E. faecalis* a quinupristina/dalfopristina es intrínseca debido a la presencia de una cassette de unión ATP (ABC), homólogo a la proteína Lsa, que actúa como una bomba de eflujo.<sup>14,34</sup> Los efectos secundarios de este medicamento como son flebitis, mialgias, artralgias y anomalías metabólicas son causa de interrupción del tratamiento. Se ha llegado a reportar falta de susceptibilidad de los enterococos a Q/D por resistencia mediada por genes que disminuyen la actividad de Q/D, genes acarreados por plásmidos que codifican acetiltransferasas que inactivan a la estreptogramina A y por bombas de eflujo codificadas por ABC.<sup>14</sup>

## PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En los últimos años la emergencia de cepas nosocomiales de enterococo resistente a vancomicina se ha incrementado a nivel mundial. El uso indiscriminado de antibióticos, en especial la vancomicina, aunado a otros factores de riesgo predispone la emergencia de dichas cepas. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez se reportaron dos brotes de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, el primero en agosto de 2009 en la unidad de terapia intensiva pediátrica y el segundo en noviembre de 2009 en la sala de oncología. El estudio y caracterización genética de dicho enterococo es indispensable para determinar la presencia de una cepa circulante y plantear medidas preventivas y de control de la diseminación del agente implicado.

## JUSTIFICACIÓN

El adecuado abordaje e investigación de un brote nosocomial permite al clínico identificar por medio de estudios epidemiológicos y técnicas moleculares la presencia de una cepa circulante, determinar su naturaleza y gravedad y brindar la posibilidad de adoptar técnicas de prevención y control que permitan romper la cadena de transmisión en sus puntos críticos.

En el caso de los enterococos resistentes a vancomicina debido a su facilidad de diseminación y al creciente uso de este glucopéptido especialmente en los pacientes inmunocomprometidos hay inquietud por la posibilidad de la rápida diseminación de este agente, haciéndose necesarios los estudios epidemiológicos y de biología molecular para identificar de manera oportuna a los portadores con factores de riesgo y los brotes por dicho agente para prevenir y limitar la transmisión del microorganismo.

## OBJETIVO GENERAL

Describir las características epidemiológicas, microbiológicas y moleculares de dos brotes de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina reportados en un hospital pediátrico de tercer nivel en agosto y noviembre de 2009.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las especies de *Enterococcus* circulantes y su perfil de susceptibilidad *in vitro*.
- Realizar la caracterización genotípica las cepas circulantes.
- Establecer por medio de electroforesis en gel por campos pulsados la existencia de correlación entre los enterococos aislados para determinar si pertenecen o no a una misma clona.
- Determinar si los pacientes presentaban factores de riesgo para la colonización y/o infección por enterococo resistente a vancomicina.
- Plantear estrategias de prevención y control de la diseminación de estas cepas.

## MATERIAL Y MÉTODO.

### ***Tipo de estudio.***

Se realizó un estudio descriptivo de serie de casos.

### ***Población de estudio.***

Pacientes pediátricos hospitalizados en la unidad de terapia intensiva pediátrica y sala de Hemato-Oncología de un hospital pediátrico de tercer nivel con reporte de aislamientos de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina en agosto y noviembre de 2009.

### ***Periodo y Sitio de estudio.***

La unidad de terapia intensiva pediátrica del Hospital Infantil de México Federico Gómez que se encuentra constituida por 8 camas y 2 cuartos aislados y la Sala de Hemato-Oncología constituida por 42 camas repartidas en 6 cubículos con 4 camas cada uno, en los meses de agosto y noviembre de 2009 respectivamente.

### ***Definición operacional de Variables.***

Variable Resultado.

- a. **Presencia de Enterococo resistente a vancomicina (ERV).**  
Aislamiento de *Enterococcus faecium* de un sitio estéril o no estéril con patrón de susceptibilidad in vitro con concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) a vancomicina >64mcg/ml.

Variabes Confusoras.

- a. **Edad.** Tiempo que ha vivido el paciente. (años).
- b. **Sexo.** Condición orgánica femenino o masculino.
- c. **Enfermedad de base.** Entidad nosológica que es la principal patología del paciente.
- d. **Uso de terapia antibiótica previa.** Empleo de antibióticos antes del aislamiento de ERV.

- e. **Uso previo de vancomicina.** Empleo de vancomicina antes del aislamiento de ERV.
- f. **Infecciones concomitantes.** Presencia de un evento infeccioso diferente al causado por el ERV durante el aislamiento del ERV.
- g. **Colonización o infección por *Staphylococcus aureus*.** Aislamiento de *Staphylococcus aureus* de un sitio estéril o no estéril en el paciente con ERV.
- h. **Inmunosupresión.** Disminución o anulación de la respuesta del sistema inmune
- i. **Catéter venoso central (CVC).** Presencia de un dispositivo endovascular para la administración de líquidos intravenosos en un vaso de la circulación sistémica.
- j. **Otros dispositivos invasivos.** Presencia de uno dispositivo dentro del organismo del paciente diferente a un CVC.
- k. **Procedimientos quirúrgicos.** Realización de alguna cirugía previa al aislamiento de ERV.
- l. **Trauma.** Lesión de los tejidos u órganos por acción mecánica externa.
- m. **Otros procedimientos invasivos.** (punción lumbar, paracentesis, pleurocentesis, traqueostomía, hemodiálisis, nutrición parenteral total). Realización de técnicas que impliquen la introducción de un dispositivo dentro del cuerpo del paciente.
- n. **Tiempo de hospitalización.** Numero de días de estancia intrahospitalaria.
- o. **Tiempo de hospitalización previo al aislamiento del ERV.** Numero de días de estancia intrahospitalaria antes del aislamiento del ERV.

## **DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.**

### **a. Descripción de la población**

De cada paciente se describirán las características epidemiológicas y se recuperará del expediente clínico por medio de una hoja de recolección de datos la siguiente información: edad, sexo, enfermedad de base, sala de hospitalización, presencia de inmunosupresión, uso previo de terapia antibiótica

de amplio espectro, uso previo de vancomicina, presencia de catéter venoso central u otro dispositivo invasivo, infecciones concomitantes, procedimientos quirúrgicos, trauma, otros procedimientos invasivos (punción lumbar, paracentesis, pleurocentesis, traqueotomía, hemodiálisis, nutrición parenteral total), tiempo de hospitalización previo al aislamiento del ERV.

## **b. Estudio microbiológico.**

### ***Pruebas bioquímicas.***

Para la validación de los aislamientos de *E. faecium* resistente a vancomicina se resembraran dichas cepas en agar sangre de carnero. Se validará la morfología y características de las colonias aisladas usando las técnicas de tinción de Gram y catalasa. Posteriormente se determinará el grado de hidrólisis, la prueba de PYR, el crecimiento en NaCl al 6.5%, crecimiento a 45°C, crecimiento en telurito y crecimiento y morfología en Agar bilis esculina. Finalmente para determinar la especie de Enterococcus se sembraran las cepas en telurito.

La prueba de Pirrolindonilarilamidasa (PYR) se realiza sobre un portaobjetos colocando un disco del PYR comercial, se humidifica y se frota con un palillo cargado con varias colonias del microorganismo a estudiar. Se agrega una gota del reactivo revelador (N-N dimetilaminocinamaldehido) y posteriormente se deja unos cinco minutos y fue efectuada la lectura. La prueba es negativa si el disco permanece incoloro y es positiva cuando el disco cambia a color rojo.

### ***Susceptibilidad a antibióticos.***

Para determinar el patrón de susceptibilidad de los *E. faecium* se correrán vancomicina y teicoplanina. Se suplementará el medio Müller Hinton con las diferentes concentraciones de antibióticos. Se depositará una gota de cada bacteria ( $1 \times 10^4$ ) en la superficie del medio con antibióticos y se dejaran crecer por 24 horas a 37°C y una atmósfera de CO<sub>2</sub>. El crecimiento de las bacterias se evaluará por la presencia de halos que indican la inhibición y/o el

grado de crecimiento; todo esto de acuerdo a las especificaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para el año 2009.

### ***Formación de Biopelícula.***

Las cepas de *E. faecium* se sembrarán en caldo soya tripticasa al 0.25% de glucosa y se dejarán crecer durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se realizará una dilución 1:20 con caldo soya tripticasa al 0.25% de glucosa. Se agregará 200 microlitros de dicha suspensión en los pozos de una microplaca de poliestireno y se incubarán durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se invierte el sobrenadante y se lava con 200ml de PBS, se adiciona formalina

durante toda la noche. Al día siguiente se invierte el sobrenadante y se lava nuevamente con PBS. Se tiñe con cristal violeta al 1% por 15 minutos. Se invierte el sobrenadante y se lava con PBS. Se solubiliza el cristal violeta con 200 microlitros de etanol cetona. Se deja por 10 min a temperatura ambiente y finalmente se lee la absorbancia de 620nm.<sup>39</sup>

### ***Extracción del DNA total***

Los aislamientos se crecerán en placas de agar sangre a 37°C en aerobiosis durante 24 horas. A partir de este cultivo se tomará una colonia aislada y se realizará un crecimiento de toda la noche, inoculando en caldo BHI, de aquí se tomará 1ml del cultivo, y se realizará la extracción con el kit Wizard® de Promega, para extracción de DNA a Gram positivos.

### ***Amplificación de DNA a través de PCR para los genes vanA y vanB,***

Los genes *vanA* serán detectados y caracterizados para cada una de las cepas probadas por PCR. La secuencia de primer (oligonucleótidos), las condiciones para la amplificación y la confirmación del gen se realizará según la descripción siguiente:

La mezcla de reacción para la PCR se realizará en tubos eppendorf, en donde se agrega el DNA molde (20 ng/μl) 2μL para su correspondiente reacción 2μL de oligonucleótidos con 10 pmol, DNA polimerasa (taq polimerasa) en concentración de 1.6 U, lones de magnesio (Mg<sup>2+</sup>) a 2.5 mM,

agregado comúnmente como cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 100 mM.

Tabla 5. Oligonucleótido para la amplificación por PCR de los genes *vanA* de cepas de *Enterococcus faecium*.

Gen	Secuencia	Producto amplificado (pb)	Referencia
<i>Van A</i>	5'- CAT GAA TAG AAT AAA AGT TGC AAT A - 3'	1,030	Clark, N. C.,
	5'- CCC CTT TAA CGC TAA TAC GAT CAA - 3'		

La reacción se llevará a acabo en un termociclador “express” con las siguientes condiciones:

Tabla 6. Programa en termociclador “express” para la amplificación del Gen *Van A*

Ciclo	Temperatura	Tiempo	No. Ciclados
Desnaturalización inicial	94	5 min.	1
Desnaturalización	94	1min.	30
Alineación	55	1 min.	30
Extensión	72	1 min.	30
Extensión final	72	5 min.	1

***Tipificación de E. faecium por electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE).***

Todos los aislamientos de *E. faecium* se tipificaran por PFGE para determinar la relación molecular de los organismos. Se incuban a 37°C con agitación en caldo BHI (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) hasta obtener una densidad óptica (OC<sub>610</sub>) de 0.8, se centrifuga 1.5ml del cultivo que

creció durante la noche ( $16,000 \times g$  por 10 min) y se lava 2 veces con el amortiguador PIV ( $1 \text{ ml l}^{-1}$  Tris-HSC,  $1 \text{ ml l}^{-1}$  cloruro de sodio (NaCl), pH 7.6). Inmediatamente después las células se resuspenden en  $150 \mu\text{l}$  de amortiguador PIV y se calientan por unos minutos a  $45^\circ\text{C}$ . La suspensión bacteriana se mezcla con  $150 \mu\text{l}$  de agarosa de bajo punto de fusión (BioRad, Hercules, California, USA) y se coloca en moldes para preparar los bloques. Después de su solidificación los bloques se tratan con un amortiguador para lisis ( $1 \text{ mol l}^{-1}$  Tris,  $1 \text{ mol l}^{-1}$  NaCl,  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  ácido dietileno diaminetetracético (EDTA), desoxiclorato de sodio 0.2%, sarkosyl 0.5%, y  $50 \mu\text{g}$  de ribonucleasa A) y se incuban toda la noche a  $37^\circ\text{C}$ . El amortiguador para lisis se remueve y  $500 \mu\text{l}$  de amortiguador ESP ( $0.4 \text{ mol l}^{-1}$  EDTA, sarkosyl 0.1% y  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  proteinasa K, pH 9-9.5) se agrega para incubar los bloques durante toda la noche a  $50^\circ\text{C}$ . El día siguiente los bloques se lavan 6 veces en TE 1x/PMFS [ $5 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris,  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  EDTA, pH 7.5,  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  phenil-methylsulphonilfluorhidre (PMFS)]. Finalmente se equilibran con  $300 \mu\text{l}$  de amortiguador de restricción (1x) a temperatura ambiente. Las muestras fueron digeridas con 50U de *Sma* I (Invitrogen, Carlsbad CA.) a  $37^\circ\text{C}$ . Los fragmentos de restricción se separan por electroforesis en gel agarosa al 1% usando una agarosa DNA ultra-pura (BioRad, Hercules, California, USA) y TBE 0.5x como amortiguador de corrimiento con CHEF MAPPER (BioRad laboratories, Hercules, California, USA).

Las muestras se corren a  $6.0 \text{ v/cm}$  con un pulso inicial de 5 segundos y un pulso final de 35 segundos a  $14^\circ\text{C}$  por 22 horas. El marcador de peso molecular utilizado fue lambda ladder (New England Biolabs, Hertfordshire, England, UK) y el gel se reveló en una solución  $0.5 \text{ mg/ml}$  de bromuro de etidio para visualizarse bajo luz UV. Se creará un dendograma usando el programa Quantity one versión 4.4.1 (BioRad laboratories, Hercules, California, USA).

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para el análisis estadístico se utilizará el paquete SPSS 15.1 (SPSS Inc., Chicago IL). Se utilizarán pruebas paramétricas (media, mediana, moda y desviación estándar) para las variables numéricas.

## RESULTADOS

### DESCRIPCION DE LOS CASOS CLÍNICOS.

Se aislaron 14 cepas de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (ERV) de muestras clínicas obtenidas de 5 pacientes; 5 aislamientos fueron realizados en hemocultivos, 5 en cultivos de orina, 3 en cultivos de broncoaspirados y uno de una muestra tomada por punción-aspiración de una zona de celulitis. El número de aislamientos por paciente se puede consultar en la tabla 7. Del primer paciente también se aisló un ERV en un coprocultivo pero la cepa no pudo ser recuperada para completar su análisis molecular.

Tabla 7. Aislamientos de *E. faecium* resistente a vancomicina.

Paciente	Número de aislamientos	Clave de cultivo
1	1	408U
2	2	220D, 315U
3	3	813U, 825U, 93D
4	6	311D, 196H, 298H, 319H, 329H, 429H
5	2	613U, 398D

De los pacientes con aislamientos de ERV 3 se encontraban hospitalizados en la sala de oncología y 2 en la unidad de terapia intensiva pediátrica. Los 5 casos fueron individuos del sexo femenino con edades entre uno y 15 años de edad con una edad promedio de 3 años. Los diagnósticos al momento del ingreso fueron: politraumatismo con sección medular, linfocitosis hemofagocítica, linfoma anaplásico, leucemia linfoblástica aguda L1 y linfoma no Hodgkin de células grandes. Debido al diagnóstico de base 4 de los pacientes presentaban algún grado de inmunosupresión (80%) y en 4 de los casos (80%) se habían administrado esteroides con anterioridad.

El 100% de los pacientes había estado expuesto previamente al uso de antibióticos de amplio espectro (cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos, ureidopenicilinas, quinolonas, metronidazol), con un rango de

2 a 7 antibióticos distintos cada uno; 4 de estos pacientes (80%) tenía el antecedente de uso previo de vancomicina y el aislamiento de ERV se realizó entre los 30 y 98 días posteriores al uso de vancomicina (promedio 57.4 días).

Todos los pacientes presentaban algún grado de invasión con dispositivos externos: 4 pacientes (80%) tenían colocado un catéter venoso central, 4 pacientes (80%) se encontraban bajo intubación orotraqueal , 4 pacientes (80%) presentaban sonda urinaria y en 2 pacientes (40%) se colocó un sello pleural. Otro tipo de dispositivos invasivos que se llegaron a instalar fueron: 1 sonda nasogástrica, 1 catéter Mahurkar y 1 sonda de cistostomía.

Tres de los pacientes (60%) fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos, uno de los pacientes (20%) contaba con el antecedente de trauma al ingreso y finalmente durante la hospitalización 3 pacientes (60%) fueron sometidos a otros procedimientos invasivos: 2 pleurocentesis, un aspirado de médula ósea y una plasmaféresis.

La defunción se presentó en 2 de los pacientes (40%) secundaria a choque séptico.

## **ESTUDIOS DE LABORATORIO.**

### **a. Pruebas Bioquímicas.**

Para la validación de los aislamientos de *E. faecium* resistente a vancomicina se resembraron las cepas en agar sangre de carnero y se realizó la lectura a las 24 horas de incubación: En la tinción de Gram se observaron la presencia de cocos Gram positivos, las pruebas de catalasa y PYR fueron positivas. En el medio agar bilis-esculina se observó el crecimiento de colonias negras y al retar las cepas a crecer a 45°C y a una concentración de Na Cl al 6.5% se obtuvo el desarrollo de colonias bacterianas. Finalmente en telurito no se observó crecimiento de bacterias (tabla 8).

Tabla 8. Características bioquímicas de las cepas de *E. faecium* aisladas.

Cepa	Gram	Catalasa	PYR	Bilis esculina	Crecimiento en NaCl al 6.5%	Crecimiento a 45°C	Crecimiento en Telurito
408U	Positivo	Negativa	Positiva	C. Negras	Si	Si	No
220D	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
813U	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
825U	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
196H	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
298H	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
319H	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
329H	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
429H	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
93 D	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
311D	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
398D	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
315U	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No
613U	Positivo	Negativa	Positiva	C. negras	Si	Si	No

#### **b. Patrón de Susceptibilidad a antibióticos.**

El patrón de susceptibilidad *in vitro* por el método de difusión en disco Kirby-Bauer de los enterococos aislado se muestra en la tabla 9. Todos los *E. faecium* mostraron resistencia a amikacina, vancomicina y teicoplanina, así como alta resistencia a gentamicina (>500µg/ml) . Las cepas mostraron susceptibilidad a estreptomicina y linezolid.

Tabla 9. Patrón de susceptibilidad *in vitro* por difusión en disco de los ERV.

No.	Sitio	AM	GE	ST	TEC	VAN	QDA	LZD
408-U	Urocultivo	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
220-D	Broncoaspirado	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
813-U	Urocultivo	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
825-U	Urocultivo	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
196-H	Hemocultivo Periférico	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
298-H	Hemocultivo Periferico	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S

<b>319-H</b>	Hemocultivo Periférico	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
<b>329-H</b>	Hemocultivo Central	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
<b>315-C</b>	Urocultivo	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	1µg/ml S
<b>93-D</b>	Punción/Aspiración	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
<b>311-D</b>	Broncoaspirado	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
<b>398-B</b>	Broncoaspirado	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
<b>429-H</b>	Hemocultivo Central	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S
<b>613-U</b>	Urocultivo	>32µg/ml R	>500µg/ml R	<10000µg/ml S	>32µg/ml R	>32µg/ml R	0.5µg/ml S	2µg/ml S

\* Resistente, \*\*Sensible. AM: amikacina; GE: gentamicina; ST: Estreptomicina; TEC: teicoplanina; VAN: vancomicina; QDA: quinupristina/dalfopristina; LZD: linezolid.

Posteriormente se calcularon las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) por método de dilución en agar obteniéndose en las catorce cepas resistencia a vancomicina y teicoplanina (fenotipo *vanA*).

### **c. Determinación del gen *vanA*.**

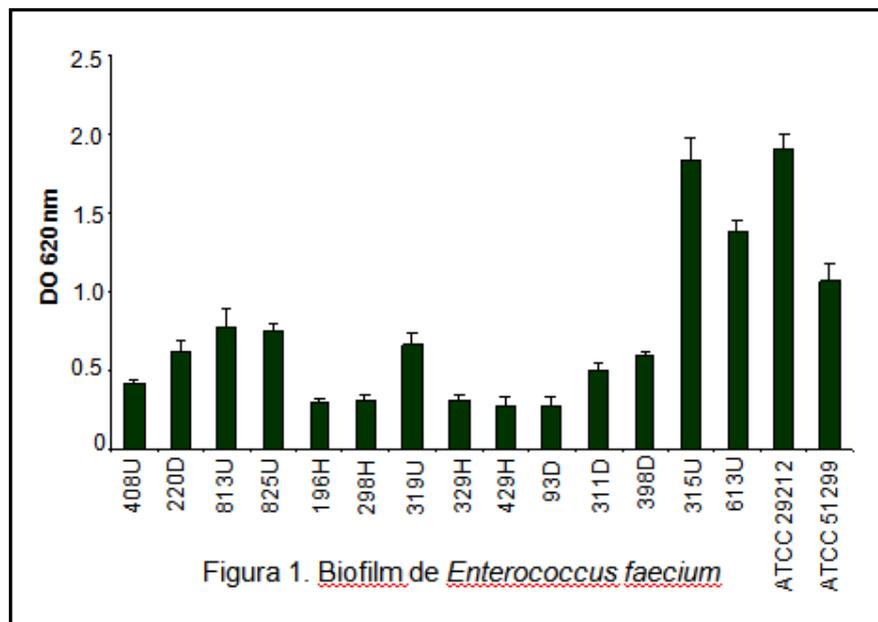
Después de la extracción del DNA bacteriano y su análisis por reacción en cadena de polimerasa se encontró el gen *vanA* en los 14 aislamientos de *E. faecium*, lo que concuerda con el fenotipo expresado en los patrones de susceptibilidad *in vitro*.

### **d. Formación de Biofilm**

Al evaluar la formación de biofilm por parte de los *E. faecium* observamos diferentes cantidades de biofilm en cada aislamiento. El 50% de los enterococos aislados formó una monocapa. Las cepas 813U, 825U, 315U y 613U mostraron niveles de formación de biofilm comparables con las cepas

ATCC de *E. Faecium* (29212 y 51299), mientras que las cepas 196H, 298H, 329H, 429, y 93D mostraron una baja producción de biofilm. (figura 1).

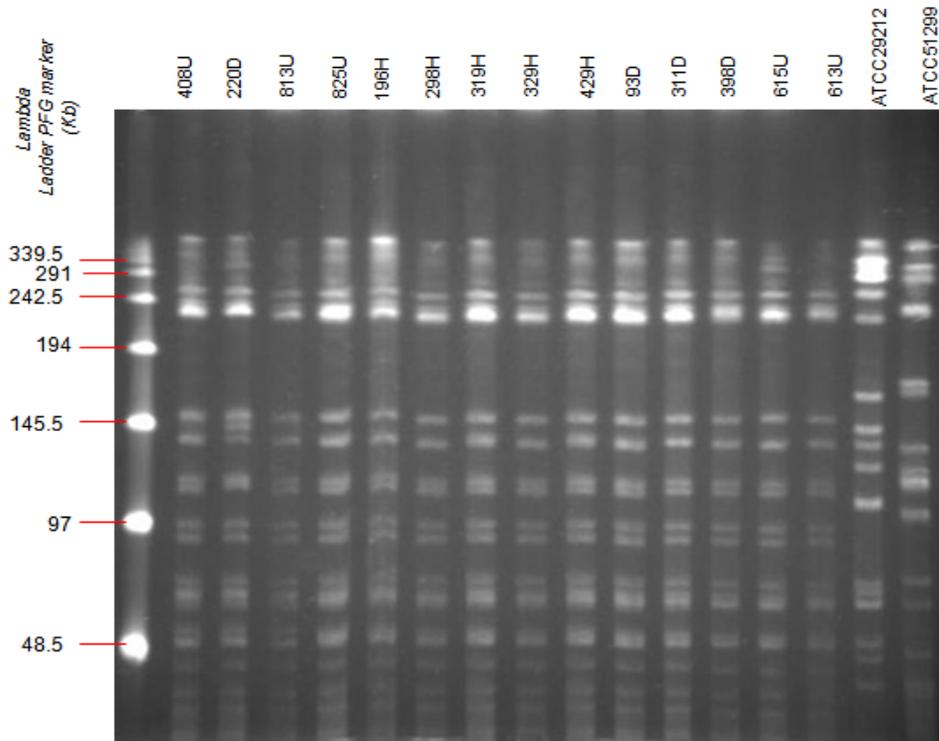
Figura 1. Cuantificación de la formación de Biofilm. Las bandas de error muestran las desviaciones estándar.



**e. Electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE).**

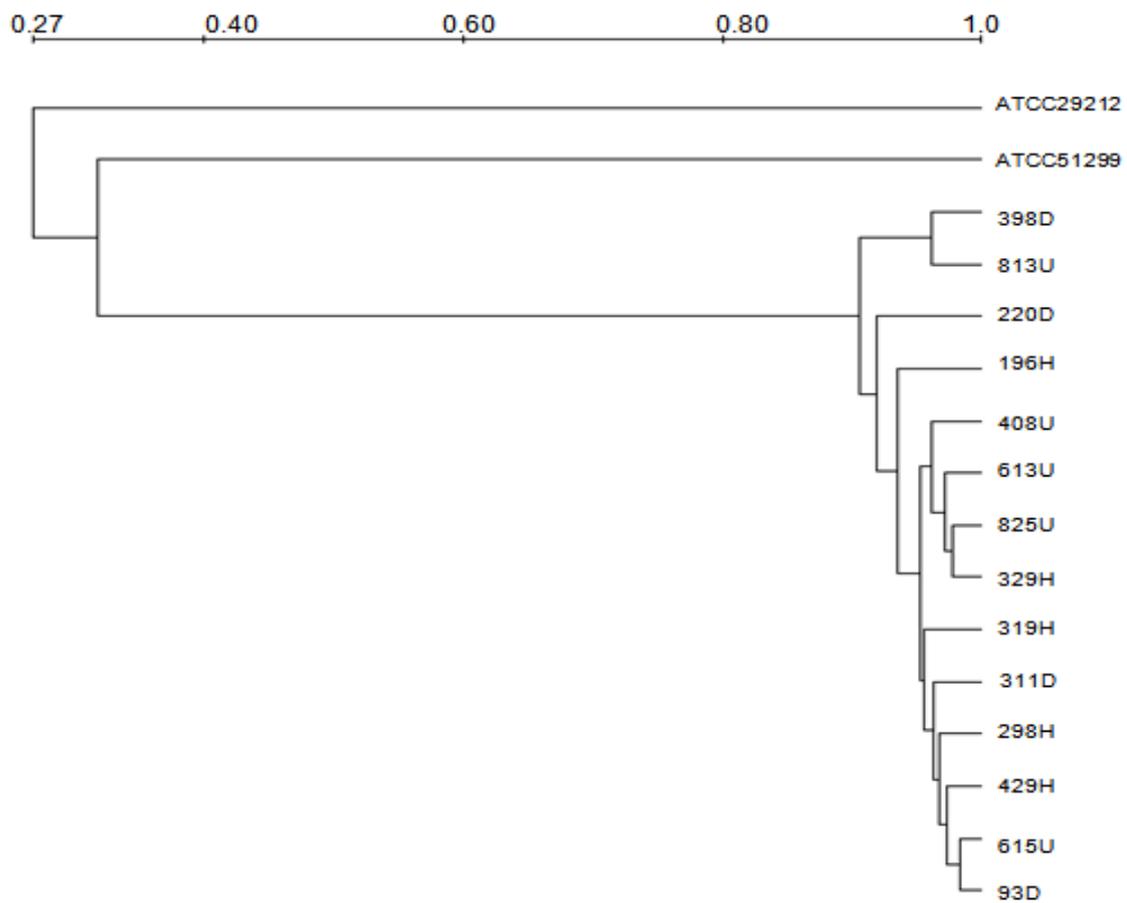
Al observar la fotografía en gel que muestra el perfil genotípico de los 14 aislamientos de *E. faecium* resistente a vancomicina, se evidencia según el patrón de restricción el mismo número de bandas de la similar talla molecular; esto sugiere que se trata de aislamientos indistinguibles y considerados muy relacionados epidemiológicamente derivado de la inspección visual según criterios que establece Tenover y col. (1995), (Figura 2). Dicha relación genética entre las cepas se muestra también en el dendograma, con una similitud mayor al 80% que sugiere se trata de la misma clona de enterococos (Figura 3).

Figura 2. Patrón de bandas de restricción por electroforesis por PFGE de *E. faecium*.



Al confirmarse que se trataba de la misma cepa de *E. faecium* resistente a vancomicina se dio notificación al servicio de Epidemiología quienes en conjunto con el servicio de Infectología implementaron medidas para evitar la diseminación del brote; se enfatizó la importancia del lavado de manos antes y después de revisar a cada paciente y en cuanto a los pacientes con aislamiento de ERV se utilizaron medidas de aislamiento de contacto que incluyeron: colocar al paciente en un cuarto aislado (según las posibilidades de la sala), uso de guantes y batas para revisar al paciente así como para el manejo de secreciones y la utilización personalizada de los instrumentos médicos necesarios con cada paciente.

Figura 3. Dendograma del porcentaje de similitud de patrón de restricción de DNA entre los aislamientos de *E. faecium*.



## DISCUSIÓN

El género enterococo es uno de los principales patógenos involucrado en las infecciones nosocomiales; su habilidad para adquirir genes que codifiquen resistencia a antibióticos combinada con la resistencia natural a varios agentes antimicrobianos así como su capacidad de resistir ambientes extremos lo coloca como uno de los patógenos de mayor importancia en las infecciones intrahospitalarias.<sup>17,19,20,22.</sup>

En este estudio se reportaron los aislamientos de enterococos resistentes a vancomicina en 2 periodos de tiempo; el primero ocurrido en la terapia intensiva pediátrica y el segundo en la sala de oncología. Las terapias intensivas son escenarios donde ocurren con mayor frecuencia este tipo de infecciones nosocomiales<sup>21</sup> teniendo consecuencias devastadoras según la magnitud del brote; en este caso, el ERV solo se aisló en 3 pacientes y no se reportó diseminación del patógeno a otros pacientes. En la sala de oncología la mayoría de los pacientes tiene algún grado de inmunosupresión, factor ampliamente reportado en la literatura como un factor de riesgo para la emergencia de este tipo de cepas multiresistentes.<sup>14,24</sup> Es meritorio de comentarse que una de las pacientes que presentó aislamiento de ERV en la terapia intensiva posteriormente ingresó a la sala de oncología donde tiempo después se volvió a documentar el aislamiento de ERV en la paciente, lo que demuestra que dicha paciente quedó colonizada por el ERV a pesar de haber completado un esquema antibiótico específico contra este microorganismo y después de haber tenido cultivos de control negativos.

Si bien, estudios publicados en Europa, Estados Unidos y Chile han podido identificar algún tipo de reservorio para este patógeno<sup>8,14,28</sup>, en nuestro estudio se contó con la limitante de no haber realizado estudios de escrutinio microbiológico tanto en el personal médico y de enfermería que laboró en las salas afectadas, como en otro tipo de posibles reservorios en el ambiente hospitalario dentro de lo que se incluyen: soluciones, venoclisis, nutrición parenteral total, guantes, batas, barandales, monitores, oxímetros de pulso,

glucómetros, bombas de infusión, ventiladores, lavabos, ropa de cama, mesas, sillas, cabeceras, pisos y paredes entre otros, por lo que no se pudo establecer una fuente común de infección o reservorio.

Durante el primer brote de ERV no fue posible tomar coprocultivos de escrutinio a los pacientes que fueron contactos en la sala de terapia intensiva, por lo que no se pudo conocer si alguno de ellos presentaba el estado de portador de dichos enterococos a nivel del tracto gastrointestinal con el fin de identificarlos como probables fuente de infección en futuros internamientos; solo en uno de los pacientes con aislamiento de ERV se evidenció el mismo patógeno en coprocultivo pero la cepa no se pudo rescatar para completar su análisis molecular. Durante el segundo brote de ERV en la sala de oncología se iniciaron las medidas de escrutinio en 5 de 12 pacientes que se encontraban hospitalizados durante el momento de los aislamientos, pero ninguno de ellos evidenció la presencia de ERV en coprocultivos; el resto de los pacientes no pudo ser evaluado debido a que ya habían egresado al momento de iniciarse las medidas de tamizaje.

En cuanto a los factores de riesgo asociados a la emergencia de cepas de enterococos resistentes a vancomicina, en nuestro estudio se reportó una incidencia similar a lo publicado en la literatura:<sup>14,24,26,27,28</sup> el 100% de los pacientes contaban con el antecedente de una estancia intrahospitalaria prolongada, uso previo de antibióticos de amplio espectro y multi-invasión; solo el 60% fue sometido a procedimientos quirúrgicos o otros procedimientos invasivos. Así mismo en el 80% de los casos se documentó algún grado de inmunosupresión tanto por el padecimiento de base (en su gran mayoría pacientes oncológicos), como secundaria a uso de esteroides. El perfil de los pacientes es concordante con lo publicado previamente y refuerza la estrecha asociación entre hospederos debilitados, invadidos y médicamente complejos, con este tipo de infecciones.

La resistencia a glucopéptidos en los enterococos ocasiona la pérdida de una importante alternativa terapéutica en un género que presenta resistencia intrínseca a muchos antibióticos y que muestra una gran capacidad para

adquirir nuevas resistencias. Además, no debe descartarse la posibilidad de transferencia *in vivo* de esta resistencia al género *Staphylococcus*, hecho que ya se ha logrado *in vitro*, lo que plantearía graves dificultades terapéuticas, sobre todo en las infecciones causadas por *S. aureus* resistente a la meticilina.<sup>33,35</sup> El uso previo de vancomicina se ha reportado como un factor de riesgo para la emergencia de cepas de *Staphylococcus* y *Enterococcus* resistentes a gluco péptido,<sup>31,32,34</sup>. En nuestra revisión pudimos documentar el uso de este medicamento en el 80% de los casos, con un intervalo mínimo de administración de vancomicina de 30 días previos al surgimiento de las cepas de enterococos resistentes.

En la serie de casos que estudiamos se presentaron 2 defunciones, ambas en pacientes oncológicos y secundarias a choque séptico. La estrecha asociación entre bacteriemias graves o letales y pacientes onco-hematológicos es un hecho reconocido en la literatura y el desarrollo de sepsis grave o *shock* séptico en los días siguientes a la aparición de la bacteriemia.<sup>24</sup> En el primer caso se documentó en 5 hemocultivos la presencia del ERV previo a la defunción del paciente y en el segundo caso en 2 urocultivos tomados con una técnica adecuada así como de una zona de celulitis, por lo que toda la evidencia sustenta que la defunción de los pacientes fue secundaria a la infección por enterococo resistente a vancomicina.

En la actualidad la posibilidad de contar con estudios de caracterización genética nos brinda la oportunidad de definir el origen y la clonalidad de los brotes intrahospitalarios y con esto permitir la implementación de medidas de control para evitar la diseminación de un brote y lograr su erradicación. Así mismo al conocer la prevalencia de algún patógeno multiresistente permite mantener una vigilancia epidemiológica estrecha con el fin de evitar la aparición de nuevos brotes.

Las medidas universales de protección y en el caso de los ERV las medidas de aislamiento de contacto son hasta el momento una herramienta útil e indispensable en la prevención de la diseminación de infecciones nosocomiales<sup>3,38</sup>.

## CONCLUSIONES

- El género *Enterococcus* es uno de los principales agentes involucrados en las infecciones nosocomiales; su capacidad para generar mecanismos de resistencia a antibióticos los coloca como un problema de salud que ha tomado importancia en los últimos años.
- El uso de antibiótico de amplio espectro así como el uso previo de vancomicina predisponen a la emergencia de cepas de *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos.
- La multi-invasión, los procedimientos quirúrgicos y la inmunosupresión tanto natural como adquirida pueden predisponer la emergencia de *Enterococcus* resistentes a vancomicina.
- Las técnicas de biología molecular proporcionan evidencia para relacionar tanto epidemiológicamente como genéticamente aislamientos de microorganismos patógenos durante un periodo de tiempo determinado.
- La vigilancia epidemiológica estrecha es indispensable para una adecuada prevención y control de posibles brotes de microorganismos resistentes en los hospitales.
- Las medidas universales de seguridad biológica empezado por un adecuado lavado de manos son técnicas indispensables para evitar la diseminación de cepas multi-resistentes, por lo que se debe insistir en su apego para lograr un mejor control de las infecciones nosocomiales.

## REFERENCIAS

1. Rhinehart E, Smith NE, et al. Rapid dissemination of B lactamase-production, aminoglycoside resistant *Enterococcus faecalis* among patients and staff on an infant-toddler surgical ward. *N. England J Med* 1990; 1814- 1818.
2. Miranda G, Lee Linda, et al. Antimicrobial resistance from Enterococci in a Pediatric Hospital, Plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates with High-level Gentamicin and streptomycin resistance. *Archives of medical Research* 2001: 32-103.
3. Cookson B.D. Murray M.B. Barrett S.P. et al. Guidelines for the control of Glycopeptide- resistant Enterococci in hospitals. *Journal of Hospital Infection* 2006; 62: 6-21.
4. Helen L. Leavis,\*† Rob J.L. Willems, et al; Epidemic and Nonepidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium*; *Emerging Infectious Diseases* • Vol. 9, No. 9, September 2003
5. Grayson ML, Eliopoulos GM, Wennersten CB, Ruoff KL, De Girolami PC, Ferraro MJ, et al. Increasing resistance to beta-lactam antibiotics among clinical isolates of *Enterococcus faecium*: a 22- year review at one institution. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2180-4.
6. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med* 2000;342:710-21.
7. Chrystal Juliet L; Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. *Rev Chil Infect* 2002; 19 (Supl 2): S111-115.
8. Alberto Fica C., María Irene Jemena P, Emergencia de infecciones por *Enterococcus* sp resistente a vancomicina en un hospital universitario en Chile; *Rev Chil Infect* 2007; 24 (6): 462-471.
9. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clone in Swine, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 11 No. 12, December 2005.
10. Ulrich Sagel, Berit Schulte, Peter Heeg. Vancomycin-resistant Enterococci outbreak, Germany, and calculation of outbreak start. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 14, No. 2, February 2008.
11. Sifuentes-Osornio. Jose, Cuellar-Rodríguez Jennifer, Galidno-Fraga Arturo, Et al. Vancomycin-resistant Enterococci , Mexico City. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 13, No. 5, May 2007.
12. Drobní Mirova, Bonnedahl Jonas, Hernández Jorge, Et al. Vancomycin-resistant Enterococci, Point Barrow, Alaska, USA, *Emerging Infectious Diseases*. Vol 15. No. 5, May 2009.
13. Schleifer KH, Klipper-Balz R: Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* no. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. Nov and *Enterococcus faecium* comb. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 1984; 34:31-34.
14. Mandell: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. Churchill Livingstone, Elsevier, 2009. Chapter 201.
15. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, et al: Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 2000; 343:1925-1932.

16. LB, Carias L, Rudin S, et al: A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis* 2003; 187:508-512.
17. García-Velazco Raúl, Hernández-Acosta Karen, Mejia-Chavez Adriana: Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *Lab-acta*, 14(1): 11-20, 2002.
18. Feigin Cherry, Textbook of Pediatrics Infectious Diseases. Philadelphia, Pennsylvania Ed. W. Saunders. Company 4rd edition, 1998; 1:1106-1116.
19. Reik R, Tenover FC, Klein E, et al: The burden of vancomycin-resistant enterococcal infections in US hospitals, 2003 to 2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 62:81-85.
20. Deshpande LM, Fritsche TR, Moet GJ, et al: Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58:163-170.
21. Streit JM, Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). *Int J Antimicrob Agents*. 2004;24:111-118.
22. Warren DK, Nitin A, Hill C, Fraser VJ, Kollef MH. Occurrence of cocolonization or co-infection with vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25:99-104.
23. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, et al, Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Investigative Team. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*. 2003; 348:1342-1347.
24. Zirakzadeh Ali, Patel Robin: Vancomycin-Resistant Enterococci: Colonization, Infection, Detection and Treatment. *Mayo Clin Proc*. April 2006; 81 (4): 529-536.
25. Burrell LJ, Grabsch EA, Padiglione AA, Grayson ML. Prevalence of colonisation with vancomycin-resistant enterococci (VRE) among haemodialysis outpatients in Victoria: implications for screening [letter]. *Med J Aust*. 2005;182:492.
26. Snyder GM, Thom KA, Furuno JP, et al: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on the gowns and gloves of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:583-589.
27. Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, et al. Epidemiology of colonization of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci *Lancet*. 1996;348:1615-1619.
28. Mascini E.M, Bonten M.J. M: Vancomycin-resistant enterococci: consequences for therapy and infection control. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 (suppl. 4): 43-56.
29. Long: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, 3rd ed. 2008. Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier. Chapter 120.
30. Wright. Goroma D: Aminoglycoside modifying enzymes. *Current opinion in microbiology* 199; 2: 499-503.

31. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report : Data summary from January 1992-June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32:470.
32. Rice Louis B: Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 7, No. 2 March-April 2001.
33. Huycke Mark M. Sahm F Daniel, Gilmore S. Michael: Multiple-Drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an Agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 4.No.2 April-June 1998.
34. Sander Helio S. Enterococos resistentes a vancomicina: ¿infección emergente inminente?. *Rev chil infectol* V.19, supl. 1, Santiago 2002.
35. Hee-Jeon Hong Matthew, Hutchings I, Buttner Mark J: Vancomycin resistance VanS/VanR Two-component systems. *Bacterial Signal Transduction: Networks and drug Targets*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 2008. Chapter 14.
36. Dupré I, Zanatti S, Et al: Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of medical Microbiology* (2003) 52, 491-498.
37. Tenover Fred C. Arbeit Robert D, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. Sept 1995. P 2233-2239.
38. Johnston B. Lynn, Bryce Elizabeth. Hospital infection control strategies for vancomycin- resistant *Enterococcus*, methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile*. *Canadian Medical Association Journal*. March 17, 2009. P 627-631.
39. Toledo-Arana A., Valle J. Solano. Et al. The enterococcal surface protein, EspI, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ Microbiol* 2001. 67, 4538-4545.

## ANEXO 1

### HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre \_\_\_\_\_ Registro \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Fecha ingreso \_\_\_\_\_ Fecha egreso \_\_\_\_\_ Sala de hospitalización \_\_\_\_\_

Diagnóstico de Base \_\_\_\_\_

Presencia de:

Inmunosupresión (No=0, Si=1)	
Uso de esteroide (No=0, Si=1)	
Uso previo de antibióticos: (No=0, Si=1)	
- Número de antibióticos	
Uso previo de Vancomicina: (No=0, Si=1)	
Tiempo de hospitalización previo al aislamiento de ERV:	
Presencia de CVC: (No=0, Si=1)	
Presencia de otro dispositivo invasivo: (No=0, Si=1)	
Tipo de dispositivo invasivo: 1= sonda urinaria, 2=tubo endotraqueal, 3= sello pleural, 4=otro	
Infecciones concomitantes: (No=0, Si=1)	
- Tipo de infección concomitante:	
Procedimientos quirúrgicos: (No=0, Si=1)	
- Tipo de procedimiento:	
Trauma: (No=0, Si=1)	
Otros procedimientos invasivos: (No=0, Si=1)	
Tipo de procedimiento invasivo: 1=paracentesis, 2= pleurocentesis, 3= traqueostomía, 4= hemodiálisis, 5= punción lumbar 6= otro	
Defunción (No=0, Si=1)	