

## **EIMC-D-15-00425 REVISADO**

### **Manuscrito (Original Breve)**

#### **PERSISTENCIA DE UN CLON ST6 DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS-vanB2* EN DOS HOSPITALES DE ARAGÓN**

#### **PERSISTENCE OF A ST6 CLONE OF *vanB2-ENTEROCOCCUS FAECALIS* IN TWO HOSPITALS FROM ARAGON (SPAIN)**

### **Resumen:**

**Introducción:** Con el objetivo de estudiar la evolución del brote por *Enterococcus faecalis* ST6 genotipo *vanB2* descrito en 2009-2010 en 3 hospitales de Zaragoza, se caracterizaron todos los aislados clínicos *E. faecalis* resistentes a vancomicina obtenidos entre 2011-2013 en dichos hospitales.

**Métodos:** Caracterización molecular de los aislados y estudio de su relación clonal por electroforesis en campos pulsados. Revisión de las historias clínicas de los pacientes.

**Resultados:** Se detectaron 79 aislados *E. faecalis* genotipo *vanB2* de 73 pacientes de 2 de los 3 hospitales analizados, la mayoría de origen urinario. El 46,5% de los casos fueron nosocomiales. La distribución según servicios hospitalarios mostró gran variabilidad, no pudiéndose identificar una fuente de infección común. Todas las cepas fueron multirresistentes (vancomicina-eritromicina-tetraciclina-ciprofloxacino-estreptomicina-gentamicina-kanamicina) y pertenecieron al clon ST6. El 93,7% eran indistinguibles al clon del inicio del brote o subtipos estrechamente relacionados.

**Conclusión:** El brote se mantiene constante en los 3 años posteriores a su descripción, lo que señala la necesidad de mantener un control activo que limite la emergencia y diseminación de clones resistentes a vancomicina.

## **Abstract**

**Introduction:** In order to study the evolution of the outbreak occurred between 2009-2010 in 3 hospitals from Zaragoza, all vancomycin-resistant clinical *Enterococcus faecalis* isolates identified between 2011-2013 at these hospitals were characterized.

**Methods:** Molecular characterization of the isolates and analysis of their clonal relatedness by pulsed field electrophoresis was performed. Retrospective review of the patient records.

**Results:** Seventy-nine vancomycin-resistant *E. faecalis* isolates with genotype *vanB2* of 73 patients were recovered in 2 of the 3 hospitals, most of them from urine specimens. About 46% of the cases were nosocomial. Distribution of the isolates among hospital services demonstrated high variability, making it difficult to predict a common source of infection. All the strains were multiresistant (vancomycin-erythromycin-tetracycline-ciprofloxacin-streptomycin-gentamicin-kanamycin) and belonged to lineage ST6. Seventy-four isolates (93.7%) were identical or closely related to the dominant one in the origin of the outbreak.

**Conclusions:** The outbreak remains constant over three years after its initial description, indicating the need to implement an active control in order to limit the emergence and spread of vancomycin-resistant clones.

**Palabras Clave:** *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, *vanB2*, ST6, brote, Spain

**Keywords:** Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*, *vanB2*, ST6, outbreak, Spain.

## **Introducción**

*Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* constituyen la tercera-cuarta etiología más frecuente de infección nosocomial<sup>1</sup>. En los años 80 se describieron en Europa las

primeras cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (EVR) y, desde entonces, los brotes hospitalarios fundamentalmente asociados a *E. faecium* han ido en aumento. El aislamiento de *E. faecalis* resistente a vancomicina (EFRV) continúa siendo infrecuente. La resistencia adquirida a glicopéptidos está mediada por diversos mecanismos, entre los cuales *vanA* y *vanB* son los más frecuentes. La adquisición de estas resistencias dificulta el tratamiento de las infecciones por EVR ya que las alternativas terapéuticas están aprobadas para indicaciones clínicas específicas y, frente a ellas, también hay descritas resistencias<sup>2</sup>.

España es uno de los países europeos con menor tasa de EVR, si bien se han publicado brotes nosocomiales esporádicos<sup>3,4,5</sup>, la mayoría asociados a *E. faecium* ST17. El único brote por *E. faecalis vanB2* publicado hasta la fecha en España se detectó entre 2009 y 2010 en 3 hospitales de Zaragoza<sup>6</sup>. Posteriormente, entre 2011-2013 se identificaron en dos de dichos hospitales 79 aislados con similares características. Nuestro objetivo fue caracterizar estos aislados para determinar si pertenecían al mismo brote y analizar las características y evolución del mismo.

## **Métodos:**

### *Descripción del brote y aislamientos bacterianos*

Tras el inicio del brote por EFRV con genotipo *vanB2* en noviembre de 2009 y su exhaustivo estudio hasta 2010<sup>6</sup>, se llevó a cabo un seguimiento posterior mediante selección y caracterización de todos los aislados EFRV resistentes a vancomicina obtenidos en el Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS), el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) y el Hospital Royo Villanova (HRV) entre enero de 2011 y diciembre de 2013. Los aislados procedían de muestras clínicas recibidas en el Laboratorio de Microbiología para el diagnóstico de la infección.

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes analizándose variables microbiológicas, demográficas y clínicas: edad, sexo, origen de la infección, patología de base, tratamiento antibiótico previo, tratamiento del proceso, evolución del paciente. En el caso de cepas del mismo paciente, se incluyeron sólo aquellas procedentes de muestras de distinto origen o diferente patrón de electroforesis en campo pulsado (ECP).

#### *Identificación y antibiograma*

El fenotipo de resistencia se determinó por métodos de difusión en disco y microdilución en caldo (MicroScan, Siemens). Se estudió la sensibilidad frente a ampicilina, clindamicina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacino, teicoplanina, vancomicina, tetraciclina, quinupristina-dalfopristina, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, estreptomina, kanamicina, linezolid y daptomicina siguiendo los criterios EUCAST<sup>7</sup>. La producción de beta-lactamasa no fue evaluada. La concentración mínima inhibitoria de vancomicina, teicoplanina y daptomicina se determinó por el método del Etest (Biomérieux). Los genes de resistencia a vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3* y *vanD*) se analizaron por PCR en todos los aislamientos y el gen *vanB2* fue secuenciado en una cepa seleccionada por cada perfil de ECP<sup>6,8</sup>.

#### *Tipificación molecular*

La relación clonal de los EFRV *vanB2* se analizó mediante digestión del DNA cromosómico (*SmaI*) y posterior separación de los fragmentos mediante ECP. Los perfiles genéticos se compararon siguiendo los criterios de Tenover<sup>9</sup>.

Se seleccionó un aislamiento por cada patrón de ECP y éstos fueron estudiados por multilocus sequence typing (MLST), amplificando y secuenciando los fragmentos de los genes *gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt* e *yqiL* (<http://efaecalis.mlst.net>).

### **Resultados:**

En el periodo de estudio (2011-2013), se detectaron 79 aislados *E. faecalis* resistentes a vancomicina con genotipo *vanB2* (46 en HUMS, 33 en HCULB), procedentes de 73 pacientes (45,5% varones; edad media: 73 años). En el HRV no se detectó ningún EFRV en el periodo en estudio. La mayoría de los aislados (62, 78,5%) se obtuvieron de muestras urinarias. Ninguno de los pacientes con datos disponibles sobre terapia antibiótica previa había recibido vancomicina, pero sí beta-lactámicos (14/32) y/o fluoroquinolonas (20/32). En 54 pacientes, *E. faecalis vanB2* se confirmó como el agente causal del cuadro infeccioso. De los 71 casos en los que pudo estudiarse el origen de la infección, 32 (45,1%) fueron comunitarios, 33 (46,5%) nosocomiales y 6 (8,4%) asociados a cuidados sanitarios. La distribución de los aislamientos según servicios hospitalarios mostró una gran dispersión (gráfico 1), lo que sugiere la existencia de diferentes fuentes de infección o la transmisión de estos clones a través del personal sanitario o el traslado de pacientes. La infección cruzada de origen nosocomial parece especialmente probable en dos casos, uno en el Servicio de Neurocirugía del HUMS en abril-mayo de 2011 y otro en el Servicio de Traumatología del HCULB en mayo-junio de 2012. En ambos casos se aislaron EFRV *vanB2* con igual pulsotipo de distintos pacientes que coincidieron en el mismo servicio y periodo de tiempo durante su estancia hospitalaria.

En cuanto al estudio genotípico, todas las cepas portaban el gen *vanB2* y en todas se detectó una mutación puntual (G34T) que implicaba un cambio aminoacídico (Met11Ile) en dicho alelo. Los aislamientos presentaron un fenotipo multirresistente, que incluía además de resistencia a vancomicina, también a eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacino y alto nivel de resistencia a estreptomicina, gentamicina y kanamicina.

La ECP reveló la existencia de 3 perfiles genéticos (patrón A y sus subtipos, patrón B y patrón C). La mayoría de las cepas (n=74; 93,7%) pertenecía a un clon idéntico al del

inicio del brote (A, n=43) o a algún subtipo (A<sub>1</sub>-A<sub>14</sub>, n= 31) estrechamente relacionado (1-3 bandas de diferencia). Cuatro cepas, aisladas en ambos hospitales y pertenecientes a distintos pacientes, fueron identificadas como clon B y una como clon C (>6 bandas de diferencia). El tipado por MLST realizado en 16 aislados representativos de los diferentes tipos y subtipos de ECP, demostró que todos ellos pertenecían a la secuencia tipo ST6. El gráfico 2 muestra que la frecuencia en la detección de los aislamientos EFRV *vanB2*-ST6 durante los 3 años de seguimiento del brote se mantiene estable.

## **Discusión**

A diferencia de Estados Unidos, donde se han descrito brotes por EVR (mayoritariamente *E. faecium*) con relativa frecuencia, en Europa la prevalencia ha sido menor, aunque en los últimos años se ha evidenciado un incremento en algunos países<sup>1</sup>. Durante años, la detección de *E. faecium* con genotipo *vanA* ha sido frecuente en animales de granja y alimentos, probablemente en relación con el amplio uso de avoparcina como promotor de crecimiento en animales hasta 1997, año en que fue prohibido este uso en la UE. Si bien *E. faecalis* es el principal responsable de las infecciones enterocócicas, *E. faecium* presenta mayores tasas de resistencia adquirida a los antimicrobianos. Las infecciones por EFRV siguen siendo infrecuentes. Así, debido a las especiales características del primer brote por *E. faecalis vanB2* descrito en España, en este trabajo realizamos el seguimiento y caracterización de los aislamientos clínicos de los años siguientes. Cabe señalar que la relación clonal de los aislados se estableció mediante ECP, indicado preferentemente para cepas aisladas en hospitales durante periodos inferiores a 6 meses<sup>10</sup>. Sin embargo, la falta de metodologías alternativas en términos de coste, reproducibilidad y poder discriminatorio ha favorecido la extensión de su uso en estudios de evolución de brotes. Por otra parte, la

adquisición de elementos de transferencia horizontal puede dar lugar a cambios en más de 6 bandas, lo que podría repercutir en una subestimación del total de clones relacionados.

En cuanto al origen de las cepas, la mayoría provenían de muestras urinarias, como también se describe en anteriores trabajos<sup>11</sup>. Ninguno de los pacientes **de** los que pudo obtenerse información acerca del tratamiento antibiótico previo había recibido vancomicina, por lo que a diferencia de otros estudios<sup>3</sup>, no se observó asociación entre consumo previo de vancomicina y emergencia de EFRV *vanB2*. Sin embargo, la selección de estos clones como consecuencia de la administración previa de antibióticos de otras familias frecuentemente relacionadas con adquisición de ERV<sup>3,12</sup> (como fluoroquinolonas, frente a las cuales mostraron resistencia los clones estudiados, o cefalosporinas), no puede descartarse.

La secuencia tipo ST6 a la que pertenecieron los aislamientos de *E. faecalis* es, junto con la ST17 (en *E. faecium*), una de las líneas genéticas mejor adaptadas al ambiente hospitalario en España<sup>13</sup>. En 2004, se describió la diseminación en tres hospitales portugueses de un clon de *E. faecalis* perteneciente a este linaje pero portador del gen *vanA*<sup>14</sup>. Estos hechos, respaldan los estudios que sugieren que ST6 es particularmente apto para captar genes exógenos (como *vanA* o *vanB*) por recombinación<sup>15</sup>. Cepas de *E. faecalis* pertenecientes a este linaje también han sido detectadas en cerdos<sup>16</sup> y en una rata silvestre<sup>17</sup>, mostrando características muy similares a las cepas clínicas de Portugal y España. Cabe destacar, que la mutación detectada en el alelo *vanB2* (G34T), que conlleva un cambio aminoacídico (Met11Ile), también se observó en el aislado proveniente de la rata. Serán necesarios futuros estudios que determinen la posible implicación biológica de esta mutación presente en el alelo *vanB2* de cepas de enterococo distribuidas en entornos tan variados.

La tipificación molecular, nos permitió observar la circulación de 3 clones presentes en ambos hospitales y con una distribución temporal sin una tendencia definida. A diferencia de lo que se observa en los brotes causados por *E. faecium*, usualmente policlonales y en los que el clon predominante al inicio va dejando paso a otras variantes<sup>6,7,11</sup>, en este brote tanto el clon predominante (A) como otros clones (B, C) e incluso sus subtipos (A<sub>1</sub>-A<sub>14</sub>) se detectaron a lo largo de los 3 años, sin una asociación clara de una variante a un determinado hospital. Esto, junto con la elevada tasa de casos comunitarios y la gran variabilidad en la distribución de los aislados por servicio hospitalario, plantea la posibilidad de que se trate de un clon que esté ampliamente distribuido en éste área. Es necesario, por tanto, la implementación de estrategias de control para reducir la persistencia de estos EFRV, evitar la diseminación y emergencia de nuevos clones, la posible transferencia horizontal de genes *vanB* a otras cepas y preservar la utilidad clínica de la vancomicina.

### **Financiación:**

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto SAF2012-35474 del Ministerio de Economía y Competitividad (Competitividad(MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). C.A.Alonso tiene una beca FPI predoctoral del MINECO adscrita al proyecto SAF2012-35474.

### **Referencias:**

1. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe. EuroSurveill 2008;13:1-11.



2. Seedat J, Zick G, Klare I, Konstabel C, Weiler N, Sahly H. Rapid emergence of resistance to linezolid during linezolid therapy of an *Enterococcus faecium* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4217-9.
3. Nebreda T, Oteo J, Aldea C, García-Estébanez C, Gastelu-Iturri J, Bautista V, et al. Hospital dissemination of a clonal complex 17 *vanB2* containing *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:806-7.
4. Torres C, Escobar S, Portillo A, Torres L, Rezusta A, Ruiz-Larrea F, et al. Detection of clonally related *vanB2*-containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals. *J Med Microbiol* 2006;55:1237-43.
5. Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecón MA, Ortega M, Coque TM, García M, Sáez-Nieto JA. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing TN5382 in a Spanish Hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2009. 63: 17-20.
6. López M, Rezusta A, Seral C, Aspiroz C, Marne C, Aldea MJ, et al. Detection and characterization of a ST6 clone of *vanB2-Enterococcus faecalis* from three different hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:257-60.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2015. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. <http://www.eucast.org>.
8. Dahl KH, Lundblad EW, Rokenes TP, Olsvik O, Sundsford A. Genetic linkage of the *vanB2* gene cluster to TN5382 in vancomycin-resistant enterococci and characterization of two novel insertion sequences. *Microbiology* 2000;146:1469-79.
9. Tenover FC, Arbet RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.

10. McLaughlin M, Malczynski M, Qi C, Radetski J, Zembower T, Scheetz MH. Temporal changes in pulsed-field gel electrophoresis banding in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and implications for outbreak investigations. *Am J Infect Control* 2013;41:349-53.
11. Bourdon N, Fines-Guyon M, Thiolet JM, Maugat S, Coignard B, Leclercq R, et al. Changing trends in vancomycin-resistant enterococci in French hospitals, 2001-08. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:713-21.
12. Hayakawa K, Marchaim D, Palla M, Gudur UM, Pulluru H, Bathina P, et al. Epidemiology of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*: a case-control study. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:49-55.
13. Ruiz-Garbajosa P, Coque TM, Cantón R, Willems RJ, Baquero F, Del Campo R. High-risk clonal complexes CC2 and CC9 are widely distributed among *Enterococcus faecalis* hospital isolates recovered in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:513-8.
14. Novais C, Coque TM, Sousa JC, Baquero F, Peixe L and the portuguese resistance study group. Local genetic patterns within a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clone isolated in three hospitals in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3613-7.
15. McBride SM, Fischetti VA, Leblanc DJ, Moellering RC, Gilmore MS. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE* 2, e582.
16. Freitas AR, Coque TM, Novais C, Hammerum AM, Lester CH, Zervos MJ, et al. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. *J Clin Microbiol* 2011;49:925-31.

17. Lozano C, González-Barrio D, García JT, Ceballos S, Olea PP, Ruiz-Fons F, et al.  
Detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ST6-*vanB2* and *E. faecium* ST915-*vanA* in faecal samples of wild *Rattus rattus* in Spain. *Vet Microbiol* 2015;177:168-74.

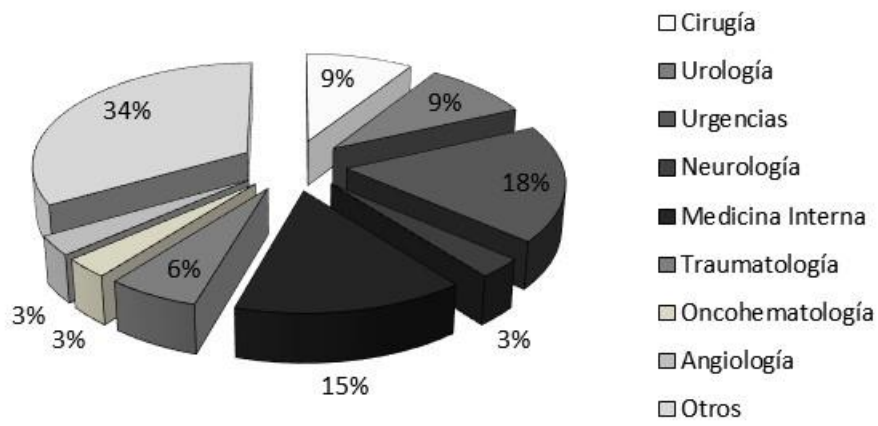
**Leyendas:**

**Gráfico 1:** Distribución de los aislamientos según servicio hospitalario en los dos hospitales analizados.

**Gráfico 2:** Evolución temporal (2011-2013) de los aislamientos de *E. faecalis vanB2* y patrones de PFGE detectados(A, A1-A14, B, y C).

**Gráfico 1.**

**Distribución de los aislamientos según servicios (Hospital Lozano Blesa)**



**Distribución de los aislamientos según servicios (Hospital Miguel Servet)**

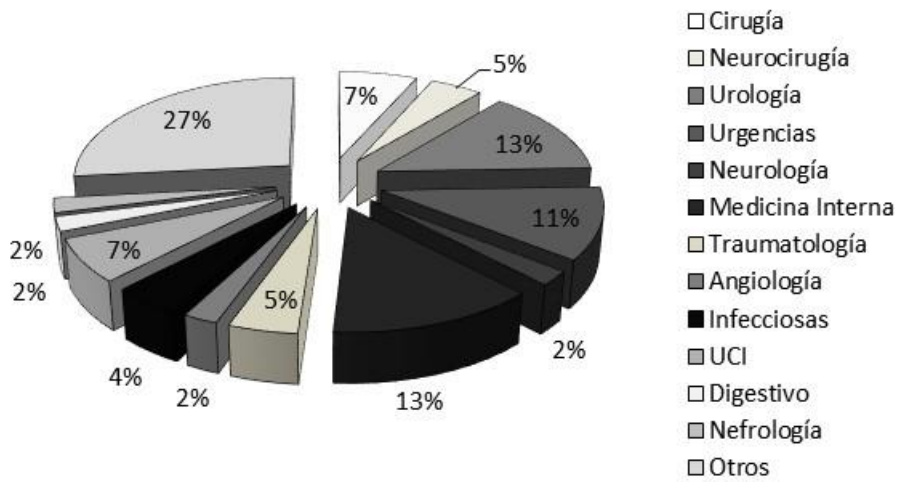
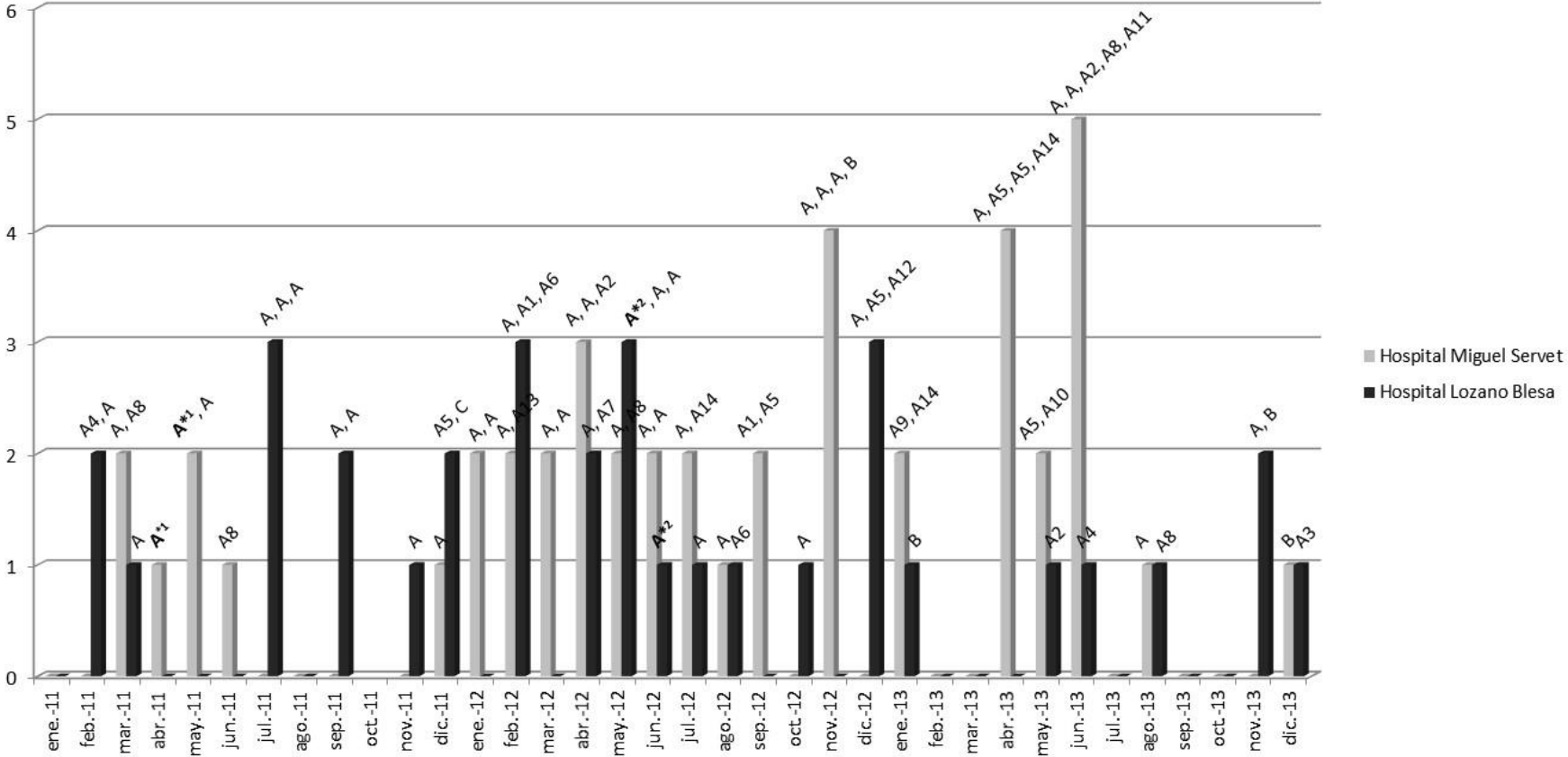


Gráfico 2.



\*1, \*2 Posibles casos de infección cruzada de origen nosocomial.