

Título: Análisis de epidemiología molecular de aislamientos de *Enterococcus faecalis* en Cuba mediante Multilocus Sequence Typing.

Autores: Dianelys Quiñones dia@ipk.sld.cu ; Nobumichi Kobayashi², y Shigeo Nagashima²

Centro de procedencia: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri".

Introducción

En los últimos años se ha documentado la importancia de *Enterococcus* como patógeno nosocomial a nivel mundial. *E. faecalis* es la especie más prevalente asociada con infecciones hospitalarias y comunitarias (17). La principal preocupación sobre *Enterococcus* es su multirresistencia antimicrobiana debido a su resistencia adquirida por la ganancia de elementos genéticos móviles, y resistencia intrínseca a una amplia gama de antibióticos (13).

Se han aplicado diferentes métodos de tipaje genético para las investigaciones sobre la epidemiología molecular de *Enterococcus*. Recientemente, se desarrolló un método molecular basado en la identificación de alelos de secuencias de genes del metabolismo bacteriano (*housekeeping genes*) denominado Multilocus Sequence typing (*MLST*, siglas en inglés), que permite conocer los linajes genéticos de *E. faecalis* y *E. faecium* y ha sido de gran utilidad en la diferenciación de la estructura poblacional de estas especies distribuidas globalmente (9, 17). Sin embargo, se han desarrollado pocos estudios en *Enterococcus* usando esta técnica novedosa por lo que la historia evolutiva y la distribución de estos linajes genéticos en el mundo es aún poco conocidas.

La importancia de *Enterococcus* en los hospitales cubanos, y la diseminación intra e interhospitalaria de clones de *E. faecalis* se reportó previamente mediante el uso del PFGE (15, 16). Sin embargo, la técnica de PFGE no es adecuada para estudiar la evolución genética de clones bacterianos (12). Por consiguiente, llevamos a cabo el primer estudio sobre *MLST* en cepas de *E. faecalis* aisladas en Cuba y se analizó la relación de Secuencias Tipos (ST) y la presencia de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos.

Diseño metodológico

Cepas bacterianas, identificación

Se seleccionaron veinte y tres aislamientos de *E. faecalis* procedentes de diversas áreas geográficas de Cuba aisladas entre los años 2001 y 2005. *E. faecalis* se seleccionó proporcionalmente según el número de aislamientos por año, por provincias, y hospitales. La identificación de la especie se llevó a cabo mediante el API 20 Strep (bioMérieux, Marcy, L'Etoile, Francia), y se confirmó esta identificación por la técnica de PCR descrita por Dutka-Malen y colaboradores (5).

Estudio de susceptibilidad antimicrobiana.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para gentamicina, estreptomina amikacina ampicilina; vancomicina, teicoplanina ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, rifampicina, fosfomicina nitrofurantoína; eritromicina cloranfenicol y tetraciclina por el método de dilución en agar según las normas Clinical Laboratory Standar Institute del 2007 (*CLSI*, siglas en inglés) (3).

Detección de genes de resistencia a antibióticos por PCR.

La presencia de genes de resistencia a antibióticos se investigó por PCR mediante el uso de cebadores específicos, reportados previamente [el *erm(B)*, *erm(A)*, *erm(C)*, y *mef(A)* (22), *tet(M)* y *tet(L)* (14) y *aac(6')* - el *aph(2'')*, *aph(3')*, *ant(6)*, *ant(3'')* (9), *aph(2'')* - el *id* y *aph(2'')* - el *ic*] (1,14, 20). Se incluyeron cepas como control positivo y control negativo en todas las reacciones de PCR.

Detección de genes de virulencia

Los genes de virulencia en *E. faecalis* se determinaron, también, mediante PCR y se usaron cebadores reportados previamente (2, 6, 11, 21, 22). Se investigó la presencia de seis genes que codifican la producción de sustancia de agregación (*agg*), gelatinasa (*gelE*), citolicina (*cylA*), proteína de superficie enterocócica (*esp*), proteína de adherencia (*efaAfs*) y feromona sexual (*ccf*).

Estudio de secuencias multilocus (MLST)

El MLST se llevó a cabo según el esquema descrito previamente (17). Se amplificaron, mediante PCR, fragmentos internos de 7 genes metabólicos muy conservados en *Enterococcus* (*gdh*, enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa),

gyd (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa), *pstS* (transportador del casete de unión de ATP-fosfato), *gki* (glucoquinasa), *aroE* (shikimato 5- deshidrogenasa), *xpt* (xantina fosforribosiltransferasa) y *yiqL* (acetil-CoA acetiltransferasa). El esquema de MLST, las secuencias de los cebadores usados para la PCR y las condiciones de la misma están disponibles en el sitio web de MLST (<http://efaecalis.mlst.net>). Las ST se agruparon en complejos clonales (CCs) mediante el programa informático eBURST, software versión.3. La relación genética entre las cepas se analizó mediante la construcción de un dendograma usando el programa MEGA4

Resultados

Linajes clonales identificados por MLST

Se detectaron trece STs diferentes, cinco de las cuales fueron nuevos tipos a nivel mundial (ST115, ST116, ST117, ST118 y ST225). Las STs encontradas con mayor frecuencia fueron ST64 y ST16 (4 aislamientos), seguidas por ST21 y ST6 (3 aislamientos), mientras otras nueve STs estuvieron representadas por un solo aislamiento (ST23, ST40, ST59, ST81) y las cinco nuevos STs. Al analizar la relación genética entre estas STs mediante el programa eBURST se detectó la presencia de siete complejos clonales es decir, CC2 (ST6), CC8 (ST64), CC21 (ST21 y ST117), CC25 (ST23), CC40 (ST40), CC58 (ST16), CC116 (ST116) y 3 singletons (ST81, ST118, y ST225) como se observa en la Figura 1. Dos STs, ST115 y ST59 representaron un single locus variant (SLV, siglas en inglés) de ST191 y ST33, respectivamente. ST6 es un double-locus variant (DLV, siglas en Inglés) de ST2 que pertenece al CC2 descrito en España. La ST64 representó una SLV de la ST8 que pertenece al CC8. La ST116, una nueva ST descrita en Cuba, fue SLV de la ST45 y la ST39 que se aislaron de pacientes hospitalizados en España. La ST117 es una DLV de la ST21 perteneciente al CC21 (uno de los CCs más grandes detectados en España) que incluye cepas procedentes de los animales, pacientes hospitalizados y voluntarios saludables de la comunidad (P. Ruiz-Garbajosa, comunicación personal).

Epidemiología de los complejos clonales

Los aislamientos de *E. faecalis* caracterizados por MLST se agruparon en los complejos clonales independientemente de su origen epidemiológico y geográfico.

La ST16 se encontró tanto en el hospital como en la comunidad y fue causa tanto de enfermedad invasiva como de una simple colonización. El singleton ST118 se encontró solamente en la comunidad. El resto de las STs y CCs se detectaron en los hospitales.

La ST64 (CC8), una de las ST más predominante en Cuba, según esta investigación, persistió por varios años en los hospitales (2001-2005) y se dispersó en la región occidental y oriental de Cuba, similar a la ST6 (CC2) pero esta sólo se detectó durante un año (2003). La ST16 (CC58) se detectó entre el 2004 y el 2005 en los hospitales y la comunidad de la región Oriental de Cuba.

El dendograma reveló la relación genética de STs de *E. faecalis* aislados en Cuba (n=23) y STs representativas (ST8, ST9, ST25, ST28, y ST104) perteneciendo a los CCs predominantes en varios países (Figura 2).

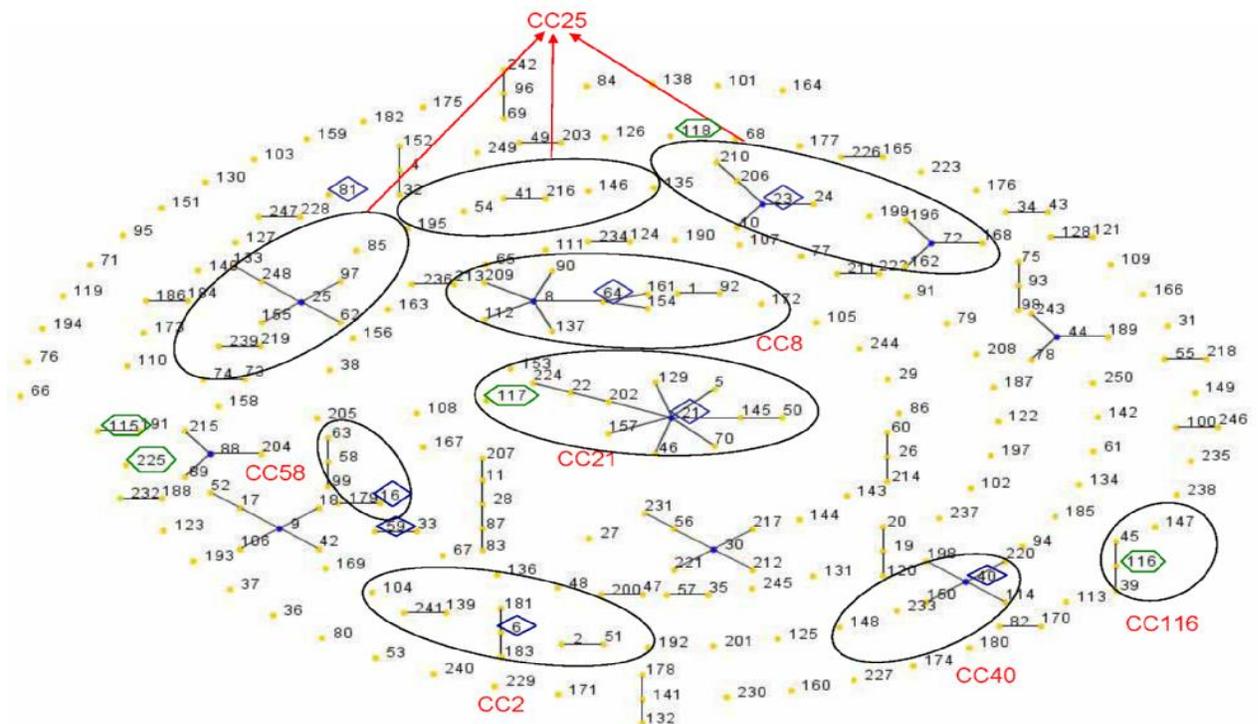


Figura 2. Diagrama eBURST de secuencias tipo de *E. faecalis* que incluye las STs detectadas en Cuba en este estudio. **Número:** representa la secuencia tipo; **Óvalos:** complejo clonal; **Números en hexágonos:** nuevas secuencias tipos

mundiales identificadas en cepas cubanas; **Números en rombo**: otras secuencias tipo previamente descritas y también encontradas en el presente estudio.

La mayoría de las STs detectadas en Cuba también se reportaron en países europeos (ST6, ST16, ST21, ST23, ST40, ST59, ST81) donde el 67% de los aislamientos correspondieron a cepas circulantes en España, Polonia y Holanda. Algunas de las nuevas STs (ST116, ST117, 118), estaban estrechamente relacionadas a aquéllas detectadas en Europa mientras las ST64, ST6, ST40 y otra nueva ST (ST115) estuvieron estrechamente relacionadas a algunas notificadas en EE.UU. (Figura 2).

Distribución de genes de virulencia y resistencia entre los linajes de *E. faecalis* detectados

No se detectó ningún aislamiento resistente a ampicilina, vancomicina, teicoplanina y moxifloxacina. No obstante, se encontraron tasas elevadas de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos, gentamicina (48%), estreptomina (52%) y amikacina (69.5%). Resultados similares se obtuvieron para la eritromicina (69.5%), el cloranfenicol (43.4%), la tetraciclina (91%) y la rifampicina (56.5%). Bajos porcentajes de resistencia se encontraron para la ciprofloxacina (22%), la norfloxacina (13%), la levofloxacina (22%), la fosfomicina (4.3%) y la nitrofurantoína (8.7%). Se observó multidrogorresistencia la cual se distribuyó en todas las STs excepto para la ST117 y el singleton ST225.

Altos niveles de resistencia a gentamicina fueron significativamente más frecuente en la ST6 (CC2), ST16 (CC58) y ST64 (CC8) (riesgo relativo > 1.5, $p < 0.05$), mientras ninguno de los aislamientos pertenecientes a la ST21 (CC21) fueron resistente a este aminoglucósido. Los genes de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')* - *le-aph(2'')* - *la*, *aph(3')*, *ant(6)*, *ant(3'')* (9) se detectaron más frecuentemente en ST6, ST16, ST64, ST23, ST115 y ST118. Todas las cepas de *E. faecalis* caracterizadas en este estudio portaron los genes *cad* y *efa*, mientras que el 61.5%, 46%, 38.5% y 23% de las cepas portaron los genes *esp*, *gel*, *agg* y *cyl*, respectivamente. La presencia del gen *cyl* estuvo relacionada,

específicamente, con la ST64 (CC8) y la ST16 (CC58) que correspondieron al 35% de todos el aislamientos estudiados (riesgo relativo > 1.5, p < 0.05).

Discusión

A nivel mundial, existen pocos estudios de caracterización de *E. faecalis* por MLST, lo que implica la necesidad de una interpretación cuidadosa de los datos sobre la epidemiología molecular de esta especie en diferentes países. La caracterización de 23 aislamientos de *E. faecalis*, mediante secuencias multilocus, brindan los primeros datos sobre la estructura poblacional genética de esta especie en Cuba y permitió compararla con reportes mundiales y conocer la diseminación de algunos de estos linajes clonales de *E. faecalis* hacia Cuba.

En el presente estudio, no se encontró ninguna correlación entre el origen clínico de los aislamientos y la estructura clonal de *E. faecalis*. Similarmente, se había reportado por otros autores que este fenómeno de "especificidad de origen" no se había encontrado en esta especie (18). Los aislamientos comunitarios se obtuvieron de muestras vaginales, los que mostraron multirresistencia y portaron algunos genes de virulencia. Este hallazgo podría constituir un riesgo para la ocurrencia de infecciones endógenas en el paciente a partir del sitio primario de colonización, sobretodo, sí el paciente sufre una instrumentación del tracto urinario, cateterización vesical o litiasis vesical (7). Esto es una evidencia de la diseminación de cepas de *Enterococcus* multirresistentes y virulentos en la comunidad de Cuba y refuerza la necesidad de realizar investigaciones sobre el impacto de la trasmisión horizontal de los genes de resistencia y de virulencia de *Enterococcus* que infectan a los pacientes. La ST64, la más persistente durante el período de estudio, mostró multidrogosresistencia, albergando los genes de resistencia antimicrobiana *aac(6)*-*el aph(2)* ", *ant(3)*"(9), *aph(3)*, *tet(M)*, *erm(B)* y los genes de virulencia *ccf*, *efa*, *cyl*, *gelE* y *agg*. Estas características pudieron contribuir a su persistencia en el ambiente hospitalario y al incremento de su transmisión y la diseminación de la resistencia antimicrobiana en *E. faecalis* (18). Los resultados de este estudio demostraron una amplia diseminación de STs de *E. faecalis* porque algunos linajes se dispersaron en las regiones occidental y oriental de Cuba durante un largo período (ST6, ST16, ST21 y ST64). El uso de

antimicrobianos pudo favorecer la selección de estas subpoblaciones enterocócicas con resistencia antimicrobiana, virulencia y facilidad para diseminarse.

Se encontraron algunas relaciones genéticas significativas entre aislamientos cubanos con otros procedentes de varios países. Las ST16, ST6, ST21 y ST40 son un ejemplo de la diseminación de líneas genéticas de *E. faecalis* ya que se han encontrado en diferentes partes del mundo, por ejemplo, en España, Polonia, Holanda, Hungría, Dinamarca, y EE.UU. (10, 17). Cepas pertenecientes a la ST16 se aislaron previamente de pacientes hospitalizados y no hospitalizados, así como de animales, mientras que cepas pertenecientes a la ST40 se aislaron de pacientes hospitalizados, de manipuladores de alimentos en España y de animales en Holanda (19).

El CC40 se descubre en Europa, con un probable origen en Polonia o los países vecinos, según la hipótesis de Kawalec y colaboradores (10). Los resultados de la presente investigación evidencian la diseminación del CC40 en el continente americano. También se notificó la circulación del CC21 sin multidrogorresistencia en Polonia (10). Similarmente, las cepas cubanas pertenecientes a este CC21 no fueron multirresistentes o presentaron resistencia a pocos antimicrobianos.

Ruiz-Garbajosa y colaboradores describieron cuatro CCs mayores en España (CC9, CC2, CC21 y CC10). Los dos primeros se definen como complejos clonales de alto riesgo, por su especial adaptación al ambiente hospitalario e incluyen cepas con resistencia a la vancomicina y con producción de β -lactamasa (17). Un año después, Kawalec y colaboradores informaron la circulación de CC2 en Polonia donde un tercio de sus aislamientos mostraron resistencia a la vancomicina (10). En la presente investigación se detectó la circulación de la ST6 que pertenece al CC2 pero ninguna de las cepas cubanas incluidas en este complejo fueron resistentes a la vancomicina o productoras de β -lactamasa. Este hallazgo reforzó la hipótesis de que los clones se han extendido originalmente como clones vancomicina susceptibles y más tarde, adquirieron un gen de resistencia a este antimicrobiano a través de la transmisión horizontal del gen,

como se demostró previamente en Cuba, España, Portugal y Polonia (4, 10, 16). Entre las STs que se identificaron en este estudio, ST23, ST59 y ST81 también se encontraron previamente en Polonia, España y Holanda (10, 17) mientras que cinco STs (ST115, ST116, ST117, ST118 y ST225) constituyeron nuevos tipos. Estas STs no han sido reportada en otros países y la alta diversidad de sus perfiles alélicos sugiere que ellas no están relacionadas genéticamente. La falta de información en la estructura poblacional de *E. faecalis* que circula en los países de Centroamérica y el Caribe hizo difícil teorizar sobre la diseminación regional de estas nuevas STs detectadas en Cuba. Una alta prevalencia del gen *esp* se detectó entre las STs descritas en este estudio. Hace unos años, se sugiere que el gen *esp* puede servir como un marcador para la presencia de islas de patogenicidad albergando múltiples factores de virulencia en *E. faecalis* y en *E. faecium* (19). Shankar y colaboradores, también, informaron sobre una expansión clonal de *E. faecalis esp*-positivo en aislamientos de origen porcino en Dinamarca y pertenecientes a la ST16 y ST40 (19). Los resultados de la presente investigación coincidieron con este hallazgo ya que todas las cepas relacionadas con la ST16 y ST40 portaron este gen de virulencia. La presencia del gen *cytA*, que codifica para una citolisina, se relacionó específicamente con la ST16 y la ST64. Tres de las 4 cepas que conformaron la ST64 fueron aisladas de muestras de sangre por lo que este hallazgo sugiere una asociación de la citolisina con la infección enterocócica severa como se reportó previamente (22).

Conclusiones

Esta investigación proporcionó los primeros datos sobre la estructura poblacional de *E. faecalis* circulante en Cuba. La mayoría de las cepas cubanas se relacionan con cepas europeas, y algunas otras se relacionan con cepas de EE.UU. El CC2, el CC8 y el CC21 (tres de los más grandes complejos clonales diseminados en el mundo) y el CC58 están circulando en Cuba y se asocian con multidrogorresistencia y rasgos de virulencia. Secuencias tipos específicas de *E. faecalis* se notificaron tanto en el hospital como en la comunidad sugiriendo una amplia diseminación de estas STs en el país.

Palabras claves: MLST, *Enterococcus faecalis*, Cuba

Bibliografía

1. **Alam, M.M., N. Kobayashi, M. Ishino, A. Sumi, K. Kobayashi, N. Uehara, and N. Watanabe.** 2005. Detection of a novel *aph(2'')* allele (*aph[2'']-Ie*) conferring high-level gentamicin resistance and a spectinomycin resistance gene *ant(9)-Ia* (*aad 9*) in clinical isolates of enterococci. *Microb. Drug Resist.* **11**: 239-247.
2. **Camargo, I.L., M.S.Gilmore, and A.L. Darini.** 2006. Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:1123-1130.
3. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. 17th Informational supplement. CLSI document M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
4. **Del Campo, R., C. Tenorio, M. Zarazaga, R. Gomez-Lus, F. Baquero, and C. Torres.** 2001. Detection of a single *vanA*-containing *Enterococcus faecalis* clone in hospitals in different regions in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**:746–747.
5. **Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin.** 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 24-7.
6. **Eaton, T.J. and M.J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ Microbiol.* **67**:1628-1635.
7. **Felmingham D, A. P. Wilson, A. Quintana, and R. Grüneberg.** 1992. *Enterococcus* Species in Urinary Tract Infection. *Clinical Infect Dis.* **15**: 295-301.
8. **Herrera C.** 2005. Determinación de genes de virulencia y susceptibilidad antimicrobiana en *Enterococcus* spp. procedentes de pacientes VIH/SIDA [Tesis]. Ciudad de La Habana, Instituto Pedro Kourí.

9. **Homan, W.L., D. Tribe, S. Poznanski, M. Li, G. Hogg, E. Spalburg, J.D. Van Embden, and R.J. Willems.** 2002. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol. **40**:1963-1971.
10. **Kawalec, M., Z. Pietras, E. Danilowicz, A. Jakubczak, M. Gniadkowski, W. Hryniewicz, and R. Willems.** 2007. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: the characterization of epidemic clones. J Clin Microbiol. **1**:147-153.
11. **Martin, B., M. Garriga, M. Hugas, and T. Aymerich.** 2005. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. J. Appl. Microbiol. **98**:1177-1190.
12. **Nallapareddy, S. R., H. Wenxiang, G.M. Weinstock, and B.E. Murray.** 2005. Molecular Characterizations of a Widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive enterococcus faecalis lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. J bacteriol. **187**: 5709-5718.
13. **Nallapareddy, S. R., R.W. Duh, K.V. Singh, and B. E. Murray.** 2002. Molecular Typing of selected *Enterococcus faecalis* Isolates: Pilot Study Using Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Microbiol. **40**: 868-876.
14. **Nishimoto, Y., N. Kobayashi, M.M. Alam, M. Ishino, N. Uehara, and N. Watanabe.** 2005. Analysis of the prevalence of tetracycline resistance genes in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a Japanese hospital. Microb. Drug Resist. **11**:146-153.
15. **Quiñones, D., P. Goñi, M.C. Rubio, F. Baquero, R. Gomez-Lus, and R. Del Campo.** 2006. Genetic relatedness and antimicrobial resistance determinants among clinical isolates of enterococci from Cuba. Clin Microbiol Infect. **12**: 793–797.
16. **Quiñones, D., P. Goñi, M.C. Rubio, E. Duran, and R. Gomez Lus.** 2005. *Enterococci* spp. isolated from Cuba: Species Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility Profile. Diagn Microbiol and Infect Dis. **51**: 63-67.

17. **Ruiz-Garbajosa, P., M.J. Bonten, D.A. Robinson, J. Top, S.R. Nallapareddy, C. Torres, T. M. Coque, R. Canton, F. Baquero, B. E. Murray, R. del Campo, and R. Willems.** 2006. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol.* **44**: 2220-8.
18. **Ruiz-Garbajosa, P., T.M. Coque, R. Cantón, R. Willems, F. Baquero, and R. del Campo.** 2007. Los complejos clonales de alto riesgo CC2 y CC9 están ampliamente representados en cepas hospitalarias de *Enterococcus faecalis* *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **25**: 513-518.
19. **Shankar, N., A. S. Baghdayan, R. Willems, A.M. Hammerum, and L.B. Jensen.** 2006. Presence of Pathogenicity Island Genes in *Enterococcus faecalis* Isolates from Pigs in Denmark *J Clin Microbiol.* **44**: 4200–4203.
20. **Sutcliffe, J., T. Grebe, A. Tait-Kamradt, and L. Wondrack.** 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**: 2562-2566.
21. **Vankerckhoven, V., T. Van Autgaerden, C. Vael, C. Lammens, S. Chapelle, R. Rossi, D. Jabes, and H. Goossens.** 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4473-4479.
22. **Vergis, E.N., N. Shankar, J.W. Chow, M.K. Hayden, D.R. Snyderman, M.J. Zervos, P.K. Linden, M.M. Wagener, and R.R. Muder.** 2002. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis.* **35**: 570-5.