

INTRODUCCIÓN

Los enterococos forman parte de la flora gastrointestinal, aislándose en más del 90% de los individuos sanos. A pesar de su escasa virulencia, los enterococos son uno de los principales agentes de infección nosocomial. La infección enterocócica más frecuente es la urinaria. El enterococo también se aísla en infecciones de heridas pélvicas y abdominales, aunque en estos casos, generalmente, se trata de infecciones mixtas en las que el papel patógeno del enterococo es dudoso. Es causa de bacteriemias primarias o secundarias, endocarditis (entre el 5-20% de ellas tienen este origen) y otras infecciones mucho más infrecuentes, como la meningitis postquirúrgica, las osteomielitis o las infecciones respiratorias. 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.

Los enterococos se caracterizan por presentar resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos (β -lactámicos, lincosaminas, aminoglucósidos y trimetoprim-sulfametoxazol) y por su capacidad para adquirir nuevas resistencias. La resistencia intrínseca a los β -lactámicos se manifiesta por concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) más elevadas que en el género *Streptococcus*. Estos antibióticos, como los glucopéptidos, tienen actividad bacteriostática, pero no bactericida, frente a estos microorganismos, por lo que en caso de infecciones graves como la endocarditis o la meningitis es necesaria una asociación sinérgica y bactericida. La combinación de un aminoglucósido y un agente que actúe sobre la pared celular, como los β -lactámicos o glucopéptidos, permite adquirir la actividad bactericida que desaparece en caso de desarrollo de resistencia elevada a cualquiera de sus componentes.

La vancomicina se desarrolló en los años 50 como un antimicrobiano activo frente a grampositivos y, sobre todo, frente a los estafilococos productores de β -lactamasa. El desarrollo de los nuevos antibióticos con menos efectos indeseables limitó su uso a los casos de alergia a los β -lactámicos. La aparición, en los años 80, de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y el aumento en el número de pacientes susceptibles de presentar infecciones por microorganismos grampositivos, favoreció de nuevo el uso de la vancomicina, en estos momentos con menor desarrollo de reacciones alérgicas, toxicidad ótica y renal.

No es hasta 1986, treinta años después de la introducción clínica de la vancomicina, cuando se aíslan las primeras cepas de *Enterococcus* resistentes a los glucopéptidos. En la actualidad, este tipo de resistencia se asocia a tres fenotipos bien definidos: VanA, VanB y VanC (Tabla 1). Últimamente, se ha descrito un cuarto tipo, VanD, en una cepa de *E. faecium*.

Tabla 1. Resistencia a vancomicina en el género *Enterococcus*^a.

Fenotipo	Descrito en	CMI (μ g/ml)	
		Vancomicina	Teicoplanina
VanA	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>	64– >1000	16– 512
VanB	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	4– 1024	0,25– 2

VanC	E. gallinarum E. casseliflavus E. flavescens	2– 32	0,12– 2
VanD	E. faecium		2– 4

^aLeclercq R, Courvalin P. Clin Infect Dis 1997; 24:545-556.

FENOTIPOS DE RESISTENCIA A LA VANCOMICINA

Fenotipo VanA

Las cepas con fenotipo VanA se caracterizan por presentar resistencia inducible de alto nivel tanto a la vancomicina (MIC \geq 64 μ g/ml) como a la teicoplanina (MIC \geq 16 μ g/ml). La resistencia tipo VanA es transferible. El gen de resistencia *vanA* se encuentra localizado en el trasposón Tn 1546, 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 con mucha menor afinidad por la vancomicina. 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. La proteína VanX es una peptidasa que hidrolizaría el dipéptido D-Ala-D-Ala, pero no el D-Ala-D-Lac, evitando así la síntesis de precursores con afinidad normal a la vancomicina. La proteína VanY hidrolizaría los d-Ala-D-Ala terminales ya incorporados a los precursores del péptidoglucano. La proteína VanZ confiere resistencia de bajo nivel a la teicoplanina por un mecanismo desconocido. Las proteínas VanR y VanS, determinarían la transcripción de los genes *vanA*, *vanH* y *vanX* en presencia de vancomicina en la superficie bacteriana.

Fenotipo de resistencia VanB

Las cepas portadoras del gen *vanB* se caracterizan por niveles variables de resistencia a la vancomicina (CIM entre 4 y \geq 1000 μ g/ml) y sensibilidad a la teicoplanina. En estos casos, a diferencia de las cepas VanA, la resistencia estaría inducida por la vancomicina pero no por la teicoplanina, a pesar de que se han descrito mutantes resistentes a la teicoplanina *in vivo*, tras tratamiento con vancomicina, y en animales de experimentación tratados con 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 de resistencia 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 μ 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 μ g/ml) y de bajo nivel a la teicoplanina (CMI 4 μ g/ml). En este aislamiento no se detectó ninguno de los tres genes responsables de la resistencia a la vancomicina descritos hasta la actualidad.

EPIDEMIOLOGIA DE LA RESISTENCIA A LOS GLUCOPEPTIDOS EN *Enterococcus*

La resistencia a la vancomicina fue inicialmente descrita en cepas de la especie *E. faecium*, aisladas en Francia y Reino Unido. La epidemiología de los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) parece ser diferente en América y en Europa.

Actualmente, menos de un 5% del total de enterococos aislados en Europa son resistentes a la vancomicina. La mayoría corresponden a aislamientos procedentes de casos de colonización o infección adquiridos en la comunidad, aunque existen descritos brotes intrahospitalarios. Algunos autores han apoyado la hipótesis de que la aparición de estas cepas estaría relacionada con la utilización del glucopéptido avoparcina en la agricultura y la industria alimentaria, ya que se han aislado en animales de granja. En los Estados Unidos no está autorizada la utilización de este glucopéptido con este fin, y no se han aislado ERV en los animales de granja.

Como hemos dicho, la epidemiología de los ERV en los Estados Unidos, es bien diferente. Se trata aquí de aislamientos asociados a infecciones nosocomiales que pueden estar causadas por uno o más clones simultáneamente. Los estudios epidemiológicos han permitido esclarecer los factores de riesgo, los mecanismos de transmisión y el clon o clones implicados en estos brotes.

Entre los factores de riesgo de la infección por ERV, hay muchos comunes a la infección por enterococos sensibles a la vancomicina: a) la administración de antibióticos múltiples o de amplio espectro (vancomicina, cefalosporinas, carbapenemas y antibióticos con acción antianaeróbica, como la clindamicina y el metronidazol), que favorecerían el sobrecrecimiento de los enterococos al actuar sobre el resto de la flora bacteriana, b) pacientes con enfermedad de base grave: trasplante, cáncer, diabetes mellitus, etc., c) la hospitalización en una unidad quirúrgica, onco-hematológica o de cuidados intensivos, d) una prolongada estancia hospitalaria, e) la yatrogenia no invasiva, como la inmunosupresión, o invasiva, como la cateterización, y f) la proximidad a pacientes colonizados o infectados por ERV.

En los brotes intrahospitalarios estas cepas pueden aislarse en pacientes o portadores sanitarios con colonización rectal, aunque en estos últimos con muy baja frecuencia. Asimismo, pueden cultivarse de muestras ambientales, donde es difícil todavía valorar si se trata de un reservorio o es la consecuencia de la liberación de ERV por el paciente colonizado o infectado. Por último, cabe aislarlos de las manos del personal sanitario, que actuaría de transmisor de la infección.

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, RFLP, 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 un solo clon, así como la participación de más de un clon y de más de una especie en un mismo brote, siendo *E. faecium* la especie aislada con mayor frecuencia.

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. Por estas razones, los laboratorios de microbiología deben estar alerta para detectar este tipo de cepas lo más rápidamente posible, con el fin de establecer las medidas de aislamiento, de control de política antibiótica y de detección de nuevos pacientes colonizados o infectados.

DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A LA VANCOMICINA EN EL LABORATORIO

Dentro del género *Enterococcus*, es conocida la dificultad en la detección de la resistencia a determinados antibióticos como, por ejemplo, los β -lactámicos. Las cepas productoras de β -lactamasa pueden no detectarse mediante los métodos convencionales de estudio de la sensibilidad (microdilución y difusión en agar), por el bajo nivel de producción de la enzima y los bajos inóculos utilizados. Por esta razón, en las cepas aisladas en casos de endocarditis o de infecciones graves, deberá estudiarse siempre la presencia de β -lactamasa mediante el disco de nitrocefina.

Algo similar ocurre con la sensibilidad a los glucopéptidos (Tabla 2). Actualmente, está claramente reconocida la dificultad en la detección de las cepas de enterococo con resistencia intermedia o baja, sobre todo cuando se utilizan métodos automatizados o semiautomatizados y el método de difusión en agar. Existen múltiples estudios multicéntricos que ponen de manifiesto la dificultad en la detección de la resistencia tipo VanB cuando ésta es baja. Probablemente, esta dificultad también se presenta con la teicoplanina, pero pocos estudios hacen referencia directa a ella, ya que la mayoría se han realizado en hospitales de los Estados Unidos, donde la teicoplanina no está comercializada.

Tabla 2. Criterios actuales de sensibilidad a los glucopéptidos en *Enterococcus*.

Glucopéptido (carga de disco)	Difusión con discos ^a (mm)			CMI (μ g/ml)		
	S	I ^b	R	S	I	R
Vancomicina (30 μ g)	≥ 17	15-16	≤ 14	≤ 4	8-16	≥ 32

Teicoplanina (30 µ g)	≥ 14	11-13	≤ 10	≤ 8	16	≥ 32
-----------------------	------	-------	------	-----	----	------

^aDeben incubarse las placas durante 24 h, valorando la presencia de cualquier crecimiento en el interior del halo; en caso de duda, hay que incubar 24 h más

^bEn las cepas con sensibilidad intermedia, deberá estudiarse la CMI

El método de difusión con discos es poco discriminativo. Los glucopéptidos son moléculas de gran tamaño, por lo que difunden poco. Los halos de inhibición son pequeños, al igual que las diferencias entre los halos que indican sensibilidad o resistencia. El método cuantitativo de difusión E-test® permite detectar todos los niveles de resistencia pero, al igual que en la técnica con discos, debe valorarse cualquier crecimiento en el interior del halo de inhibición y, en caso de duda, realizar nueva lectura tras 24 horas de incubación.

Los métodos comerciales automatizados y semiautomatizados son útiles para detectar la resistencia elevada, pero fallan en la detección de la media y baja resistencia, probablemente debido a que el corto tiempo de incubación no permite la inducción ni la expresión de la resistencia. En algunos casos, la revisión visual de los paneles de sensibilidad o la utilización de una placa de cribado de agar infusión cerebro-corazón con 6 µ g/ml o 4 µ g/ml de vancomicina, según los autores, mejoran la sensibilidad en la detección de la resistencia. La placa de cribaje de 4 µ g/ml sería útil para detectar las especies con bajo nivel de resistencia a la vancomicina, fundamentalmente las pertenecientes al fenotipo VanC, que podrían no crecer en presencia de 6 µ g/ml de vancomicina.

El análisis de los resultados del Control de Calidad adjunto son un reflejo de las mencionadas dificultades. Respecto a la sensibilidad a la vancomicina, los resultados son satisfactorios, y esperables. Al tratarse de una cepa con CMI elevada, los errores deben atribuirse más bien a la necesaria variabilidad inherente a todo control que no a dificultades propias de la cepa a estudio.

No ocurre lo mismo con la teicoplanina, lo que se debe a varias razones que merecen comentarse. En primer lugar, las CMI para este antibiótico de los enterococos son más bajas que las correspondientes a la vancomicina. Nos movemos, por tanto, en un terreno similar a las cepas de sensibilidad intermedia a este último antibiótico. Es bien conocida la dificultad para discernir este tipo de resistencia, especialmente mediante métodos de disco-placa, por la escasa difusión de estas moléculas en el agar y los consiguientes pequeños diámetros de halo. Sin embargo, las dificultades todavía han sido mayores con las técnicas de microdilución comerciales y aquí, en gran medida, obedecen a la insuficiencia de los criterios del NCCLS. Si nos fijamos en las tablas 1 y 2, observaremos que, de seguir dichos criterios, podrían originarse interpretaciones clínicas ambiguas, siendo difícil el reconocimiento de los distintos fenotipos de resistencia. Esta situación le ocurre al laboratorio de referencia con uno de los métodos que utiliza. La CMI de 8 µ g/ml para la teicoplanina podría haber sido interpretada como sensible, y de hecho así lo hizo el sistema comercial. Sin embargo, este resultado de CMI, junto con el correspondiente a la vancomicina, indicaba la presencia de un fenotipo vanA o, lo que es lo mismo, ineficacia clínica de la teicoplanina ("Resistente").

Otro factor importante en la detección en el laboratorio de la resistencia a la vancomicina es la correcta identificación de la especie. *E. gallinarum* y el complejo de especies *E. casseliflavus*-*E. flavescens* pueden confundirse, en la práctica diaria, con aislamientos clínicos de *E. faecium*, si no se les realiza el estudio del pigmento y de la movilidad. Algunos aislamientos de *E. gallinarum* no son móviles, lo que dificulta todavía más su identificación. En ocasiones las características fenotípicas no son suficientes para la identificación y es necesario recurrir a métodos genéticos (PCR). A pesar de que las especies de *Enterococcus* con resistencia intrínseca a la vancomicina representan un número muy pequeño de los aislamientos y se trata generalmente de casos de colonización/infección adquirida en la comunidad, su verdadero papel no estará claramente establecido hasta que no exista un método simple que permita una correcta identificación.

BIBLIOGRAFÍA

- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N Engl J Med 1988; 319:157-161.
- Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1988; 1:57-58.
- Tenover FC, Tokars J, Swenson J, Paul S, Spitalny K, Jarvis W. Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agent-resistant enterococci. J Clin Microbiol 1993; 31:1695-1699.
- Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:1563-1571.
- Torres C, Reguera JA, Sanmartin MJ, Perez-Diaz JC, Baquero F. VanA-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp in sewage. J Antimicrob Chemother 1994; 33:553-561.
- Cercenado E. Resistencia de los enterococos a los antibióticos glucopéptidos. Rev Clin Esp 1995; 195 (Supl 4):22-27.
- Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DCE. Current perspectives on glycopeptide resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8:585-615.

Leclercq R, Courvalin P. Resistance to glycopeptides in enterococci. Clin Infect Dis 1997; 24:545-556.

Leclercq R. Enterococci acquire new kinds of resistance. Clin Infect Dis 1997; 24(Supl):S80-S84.

Perichon B, Reynolds O, Courvalin P. VanD-type glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2016-2018.

Anónimo. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighth informational supplement. NCCLS 1998; 18(1): Documento M100-S8.

French GL. Enterococci and vancomycin resistance. Clin Infect Dis 1998; 27(Supl 1):S75-S83.

Linden PK. Clinical implications of nosocomial grampositive bacteremia and superimposed antimicrobial resistance. Am J Med 1998; 104(5A):24S-33S.

Liassine N, Frei R, Jan I, Auckenthaler R. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from a Swiss hospital. J Clin Microbiol 1998; 36:1853-1858.

Moellering RC. The specter of glycopeptide resistance: current trends and future considerations. Am J Med 1998; 104(5A):3S-5S.

Moellering RC. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis 1998; 26:1196-1199.

Murray BE. Diversity among multidrug resistant enterococci. Emerging Infect Dis 1998; 4:37-47.