

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Caracterización molecular de los genotipos de  
resistencia a glucopeptidos en enterococos  
de los hospitales de Canarias**

**Autor: Pérez Hernández, Carmen Xiomara**

**Directores: Félix Claverie Martín  
y Antonio Burgos Ojeda**

**Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría,  
Medicina Preventiva y Salud Pública**



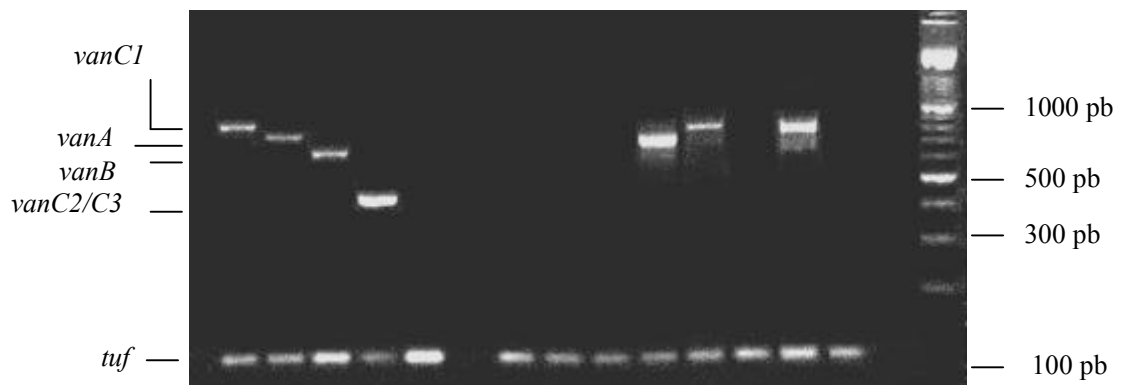
# UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia,  
Medicina Preventiva y Salud Pública.

## TESIS DOCTORAL

**“Caracterización molecular de los genotipos de  
resistencia a glucopéptidos en enterococos de  
los hospitales de Canarias.”**



**Carmen Xiomara Pérez Hernández**  
**Santa Cruz de Tenerife, Junio de 2002**



# **Universidad de La Laguna**

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia,  
Medicina Preventiva y Salud Pública.

## **“Caracterización molecular de los genotipos de resistencia a glucopéptidos en enterococos de los hospitales de Canarias”**

**Tesis Doctoral**

Carmen Xiomara Pérez Hernández

**Santa Cruz de Tenerife, Junio de 2002**

# **Universidad de La Laguna**

Facultad de Medicina

Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia,  
Medicina Preventiva y Salud Pública.

## **Caracterización molecular de los genotipos de resistencia a gluco péptidos en enterococos de los hospitales de Canarias”**

---

Dr. Félix Claverie Martín.

**Director**

---

Dr. Antonio Burgos Ojeda.

**Co-Director**

**Santa Cruz de Tenerife, Junio de 2002**

**Dr. Antonio Burgos Ojeda**

Profesor Titular del Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia, Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad de la Laguna.

**Informa:**

Que **Dña. Carmen Xiomara Pérez Hernández**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi tutoría y co-dirección el presente trabajo titulado "**Caracterización molecular de los genotipos de resistencia a glucopéptidos en enterococos de los hospitales de Canarias.**", el cual reúne las condiciones exigidas por la legislación vigente para su presentación con el fin de optar al grado de Doctora en Medicina.

---

**Dr. Antonio Burgos Ojeda.**

**En Santa Cruz de Tenerife, Junio de 2002**

**Dr. Félix Claverie Martín**

Jefe del Laboratorio de Biología Molecular

Unidad de Investigación del Hospital Universitario Ntra. Sra.  
de Candelaria.

**Informa:**

Que **Dña. Carmen Xiomara Pérez Hernández**,  
Licenciada en Biología, ha realizado en éste laboratorio bajo  
mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado  
**“Caracterización molecular de los genotipos de  
resistencia a glucopeptidos en enterococos de los  
hospitales de Canarias”**, el cual reúne las condiciones  
exigidas por la legislación vigente para su presentación con  
el fin de optar al grado de Doctora en Medicina.

---

**Dr. Félix Claverie Martín.**

**En Santa Cruz de Tenerife, Junio de 2002**

El presente trabajo se realizó en parte gracias a la ayuda recibida de la **Consejería de Educación, Cultura y Deportes, Proyecto 1999/074** (Investigador principal Dr. Félix Claverie Martín), y de **FUNCIS PI40/00** (Investigador principal Dr. Manuel Macía Heras), ambas instituciones del Gobierno Autónomo de Canarias. Durante el período de 1 de Marzo de 1999 a 31 de Julio de 2000, la doctorando recibió una beca de investigación en biología molecular, otorgada por la **Asociación Científica Pulmón y Ventilación Mecánica**.

“Todos los esfuerzos realizados en el área de la salud deben tener un objetivo final común: la disminución del sufrimiento humano.”

Conferencia Mundial de Alma Ata.



*En memoria de Amparo Gómez.  
Por lo que juntas nos tocó vivir.*

*Agradecimientos*

## **Agradecimientos:**

- Al Dr. Antonio Burgos Ojeda, quien me ha ofrecido todo el apoyo y la ayuda necesaria como tutor del tercer ciclo y en la co-dirección de ésta tesis.
- Al Dr. Félix Claverie Martín, en cuyo laboratorio se realizó la mayor parte del trabajo experimental, por su orientación y asesoramiento así como por haberme brindado la oportunidad de realizar ésta tesis doctoral bajo su dirección.
- Al Dr. Jesús Villar, Director de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, por haberse interesado en mi trabajo y por ayudarme a realizarlo otorgándome una beca de investigación durante dieciséis meses.
- Al Dr. José Carlos Rodríguez, Director de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Dr. Negrín, por haberme permitido terminar ésta tesis en la sede de dicha Unidad .

- A los Servicios de Microbiología de los cuatro hospitales que participaron en este estudio, representados por los doctores Antonio Sierra, Teresa Delgado (Hospital Universitario de Canarias), Antonio Moreno (Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria), Margarita González (Hospital Universitario Insular) y Agustín González e Isabel Álamo (Hospital Universitario Dr. Negrín). Sin su valiosa colaboración éste trabajo no habría sido posible.

- A María Dolores Fiuza Pérez y a Fayna Álamo Santana, de la Sección de Estadística y Epidemiología de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Dr. Negrín, por su inestimable ayuda en el procesamiento de los datos y por su orientación.

- A la Dra. Nadia Liassine, del Laboratorio Central de Bacteriología del Hospital Universitario de Génova, por habernos enviado gentilmente las cepas de referencia.

- A María del Carmen Durán Trujillo, compañera y amiga, por ponerme en el camino de ésta tesis.

- A los compañeros de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria Dr. Sebastián Méndez Álvarez, José Antonio Reyes Darias, Eduardo Pérez Roth e Hilaria González Acosta, por su desinteresada ayuda en el laboratorio.
  
- A todos los demás compañeros de las Unidades de Investigación de los Hospitales Universitarios Nuestra Señora de Candelaria y Dr. Negrín por su ayuda, apoyo y amistad.
  
- A Antonio Rodríguez Santana y a Alberto Guerra Medina por su ayuda en la ilustración.
  
- A mi familia y amigos, que han vivido éste esfuerzo como suyo propio, y en especial a mis hijas Oriana y Marília, mis más incondicionales colaboradoras.



## ÍNDICE

|  | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| <b>I Introducción</b> .....  | 12            |
| <b>II Objetivos</b> .....  | 21            |
| <b>III Revisión y antecedentes</b> .....   | 24            |
| <b>3.1</b> Generalidades del género <i>Enterococcus</i> .....  | 24            |
| <b>3.2</b> El fenómeno de la resistencia.....  | 26            |
| <b>3.3</b> Los antibióticos glucopéptidos.....   | 28            |
| <b>3.4</b> Fenotipos de resistencia a glucopéptidos<br>en enterococos y genes implicados.....                                | 34            |
| <b>3.5</b> Regulación de la resistencia a glucopéptidos. ....  | 43            |
| <b>3.6</b> Origen de la resistencia a glucopéptidos en<br>enterococos.....   | 46            |
| <b>3.7</b> Epidemiología.....  | 48            |
| <b>3.8</b> Dependencia a glucopéptidos en enterococos. ....  | 51            |
| <b>3.9</b> Métodos moleculares para la<br>identificación de <i>Enterococcus spp</i> y la<br>resistencia a glucopéptidos..... | 52            |
| <b>3.10</b> Nuevos antibióticos frente a ERV.....  | 58            |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>IV Material y métodos.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>4.1</b> Población, muestras y período de estudio.....  | 63        |
| <b>4.2</b> Identificación de los aislados clínicos.....   | 65        |
| <b>4.3</b> Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....  | 66        |
| <b>4.3.1</b> A través de métodos automatizados.....   | 66        |
| <b>4.3.2</b> A través del método de dilución en agar.....   | 66        |
| <b>4.4</b> Prueba de producción de $\beta$ -lactamasa.....  | 68        |
| <b>4.5</b> Estudio de la resistencia a glucopéptidos en<br>los aislados clínicos.....   | 69        |
| <b>4.5.1</b> Estudio fenotípico.....  | 69        |
| <b>4.5.2</b> Estudio genotípico.....  | 70        |
| <b>4.5.2a</b> Método rápido de obtención<br>de DNA.....   | 70        |
| <b>4.5.2b</b> Amplificación de DNA a través<br>de PCRs: a nivel de género, a nivel de<br>genotipo de resistencia, por PCR-múltiple<br>para la rápida identificación de ERV..... | 71        |
| <b>4.6</b> Estudio de la resistencia a glucopéptidos<br>en los aislados de colonización.....  | 73        |
| <b>4.6.1</b> Estudio fenotípico.....  | 73        |
| <b>4.6.2</b> Estudio genotípico.....  | 74        |
| <b>4.7</b> Electroforesis de campo pulsado.....   | 75        |



---

|               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| <b>4.8</b>    | Análisis estadístico.....   | 78        |
| <b>V</b>      | <b>Resultados.....</b>  | <b>82</b> |
| <b>5.1</b>    | Descripción de la muestra.....  | 82        |
| <b>5.1.1</b>  | Distribución según origen de la muestra.....  | 82        |
| <b>5.1.2</b>  | Distribución según origen de<br>la muestra y hospital.....  | 82        |
| <b>5.1.3</b>  | Distribución de los aislados clínicos<br>según tipo de muestra.....                                 | 85        |
| <b>5.1.4</b>  | Distribución de los aislados clínicos<br>según especies y hospital de origen.....                   | 85        |
| <b>5.1.5</b>  | Sensibilidad a antibióticos<br>de los aislados clínicos según especies y<br>hospital de origen..... | 87        |
| <b>5.1.5a</b> | Sensibilidad a penicilina.....  | 89        |
| <b>5.1.5b</b> | Sensibilidad a ampicilina.....  | 91        |
| <b>5.1.5c</b> | Sensibilidad a alto nivel<br>de gentamicina.....  | 92        |
| <b>5.1.5d</b> | Sensibilidad a alto nivel<br>de estreptomicina.....   | 94        |
| <b>5.1.5e</b> | Sensibilidad a alto nivel de gentamicina y<br>a alto nivel de estreptomicina.....                   | 96        |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>5.1.5f</b> Sensibilidad a ampicilina, alto nivel de gentamicina y alto nivel de estreptomina.....                                      | 98  |
| <b>5.1.5g</b> Sensibilidad a ciprofloxacina.....  | 101 |
| <b>5.1.6</b> Producción de $\beta$ -lactamasa.....  | 103 |
| <b>5.2</b> Fenotipo de los aislados clínicos  |     |
| [DetECCIÓN de la resistencia a vancomicina según métodos automatizados y de crecimiento en ABE sin y con vancomicina (6 $\mu$ g/ml)]..... | 103 |
| <b>5.3</b> Genotipo de los aislados clínicos.....   | 104 |
| <b>5.3.1</b> DNA obtenido por extracción rápida.....  | 104 |
| <b>5.3.2</b> Fragmentos de DNA obtenidos a través de PCRs.  |     |
| <b>5.3.2a</b> PCR para la identificación a nivel de género.....   | 106 |
| <b>5.3.2b</b> PCR para la identificación de los genotipos de resistencia a glucopéptidos... ..  | 108 |
| <b>5.3.2c</b> PCR-Múltiple para la rápida identificación de ERV.....  | 110 |
| <b>5.4</b> Características de los aislados de ERV.....  | 112 |
| <b>5.4.1</b> Origen de aislamiento y sensibilidad a otros antibióticos.....   | 112 |

---

|              |   |            |
|--------------|---|------------|
| <b>5.4.2</b> | Confirmación de la identificación a través de pruebas bioquímicas.....  | 114        |
| <b>5.4.3</b> | Determinación de las CMI's a antibióticos glucopéptidos a través del método de dilución en agar.....  | 116        |
| <b>5.5</b>   | Fenotipo y genotipo de los aislados de colonización.....  | 118        |
| <b>5.6</b>   | Relación clonal entre los aislados ERV de genotipo <i>vanA</i> .....  | 119        |
| <b>5.7</b>   | Características de los aislados ERV de genotipo <i>vanA</i> previamente identificados en el HUN. Origen de aislamiento y sensibilidad a otros antibióticos..... | 121        |
| <b>VI</b>    | <b>Discusión.....</b>   | <b>125</b> |
| <b>6.1</b>   | Estudio descriptivo.....  | 125        |
| <b>6.2</b>   | Estudio de la resistencia a glucopéptidos.....  | 139        |
| <b>VII</b>   | <b>Conclusiones.....</b>  | <b>162</b> |
| <b>VIII</b>  | <b>Bibliografía.....</b>  | <b>166</b> |



## Índice de abreviaturas.

**AARDRA:** del inglés Amplified Ribosomal DNA Restriction Assay.

**ABE:** agar bilis esculina.

**BHI:** del inglés Brain Heart Infusion.

**BE:** bilis esculina.

**CDC:** del inglés Center for Disease Control.

**CHEF:** del inglés Countour-Clamped Homogeneous Electric-Field Electrophoresis.

**CTA:** del inglés Cysteine Tryptic digest Agar base.

**CMI:** concentración mínima inhibitoria.

**Ddl:** proteína ligasa.

***ddl*:** gen de la proteína ligasa.

**D-Ala-D-Ala:** dipéptido terminal de la cadena de peptidoglucano en las cepas de enterococos sensibles a glucopéptidos.

**D-Ala-D-Lac:** depsipéptido terminal de la cadena de peptidoglucano en las cepas de enterococos resistentes a glucopéptidos tipo VanA, VanB y VanD.

**D-Ala-D-Ser:** dipéptido terminal de la cadena de peptidoglucano en las cepas de enterococos sensibles a glucopéptidos tipo VanC, VanE y VanG.

**D-ala:D-Ala:** proteína ligasa que sintetiza el dipéptido D-Ala-D-Ala.

**D-ala:D-Ser:** proteína ligasa que sintetiza el dipéptido D-Ala-D-Ser.

**D-ala:D-Lac:** proteína ligasa que sintetiza el depsiéptido D-ala:D-Lac.

**DNA:** del inglés Desoxy-ribo Nucleic Acid.

**ERV:** enterococo(s) resistente(s) a vancomicina.

**EF-Tu:** factor de elongación que participa en la formación de la cadena peptídica y que es un constituyente esencial de la célula bacteriana.

**FDA:** del inglés Food and Drug Aministration.

**GPS-TA:** sistema automatizado de identificación bacteriana de la casa BioMérieux.

**HUC:** Hospital Universitario de Canarias.

**HUNSC:** Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria.

**HUN:** Hospital Universitario Dr. Negrín.

**HUI:** Hospital Universitario Insular.

**HICPAC:** del inglés Hospital Infection Control Practices Advisory Committee.

**I:** sensibilidad intermedia.

**Kb:** Kilobases.

**Mb:** Megabases.

**NAP:** leucina- $\beta$ - naftilamida.

**NCCLS:** del inglés National Committee for Clinical Laboratory Standards.

**OFAGE:** del inglés Ortogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis.

**OR:** del inglés Odds Ratio.

**PYR:** del inglés Pyrrodonyl- arylamidase.

**PCR:** del inglés Polimerase Chain Reaction.

**PFGE:** del inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis.

**Pb:** pares de bases.

**RFLP:** del inglés Restriction Fragments Length Polymorphism.

**PCRm:** PCR múltiple.

**REP-PCR:** del inglés Repetitive Extragenic Palindrome PCR.

**RAPD:** del inglés Random Amplified Polymorphic DNA.

**RNA:** del inglés Ribo-Nucleic Acid.

**R:** resistente.

**SIDA:** Síndrome de Inmuno-Deficiencia Adquirida.

**S:** sensible.

**Tn1546:** transposón 1546 en el que se ubican los genes del fenotipo VanA de resistencia.

**Tn1547:** transposón 1547 en el que se ubican los genes del fenotipo VanB de resistencia.

**tuf:** gen del factor de elongación EF-Tu.

**TBE:** tampón Tris-Borato con EDTA.

**UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos.

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.

**UV:** luz ultravioleta.

**Van:** se refiere al fenotipo de resistencia.

**van:** se refiere al genotipo de resistencia.





## 1. INTRODUCCIÓN

Al comercializarse la primera generación de antibióticos por 1940, se creó en todo el mundo una gran corriente de euforia y se llegó incluso a profetizar el fin de la era infecciosa. La penicilina surtía efectos milagrosos entre los heridos de la segunda guerra mundial y la creación de la isoniacida hizo pensar que la tuberculosis sería pronto parte del pasado. Los geneticistas de la época sugerían que, teniendo en cuenta la baja frecuencia de aparición de mutantes espontáneos, el desarrollo de resistencia durante la terapia sería poco probable.

Sin embargo, la gran capacidad de las bacterias para adquirir e intercambiar información genética así como la presión ejercida por el uso indiscriminado de los antibióticos, ha conducido a la aparición y rápida expansión de diferentes mecanismos de resistencia. De hecho, apenas cuatro años después del uso masivo de la penicilina, aparecen en 1943 las primeras cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* (1); en 1967 también *Streptococcus pneumoniae* se hace resistente y en 1976 se suma al grupo *Neisseria gonorrhoeae*. En 1956 se

informa sobre las primeras cepas con multi-resistencia en *Shigella dysenteriae* en Japón y posteriormente, a finales de 1960 y principios de 1970, se registran numerosos fenómenos de multi-resistencia, primero en *S. aureus* y luego en una variedad de organismos Gram-positivos y Gram-negativos, especialmente en agentes responsables de brotes nosocomiales (2).

En la década de los ochenta surge un estancamiento en la búsqueda de nuevos antibióticos. Las compañías farmacéuticas dirigen sus líneas de investigación hacia la producción de anti-retrovirales debido a la aparición y rápida expansión del fenómeno del SIDA (Síndrome de Imunodeficiencia Adquirida) y mientras tanto, los antibióticos se utilizan de forma indiscriminada no sólo en humanos, sino como promotores del crecimiento animal, todo lo cual conduce a la aparición y diseminación de nuevas resistencias.

Por otra parte, se produce un aumento de la población susceptible de padecer infecciones, a expensas de los pacientes de SIDA, de los que reciben terapia inmunosupresora por padecer cáncer ó haber sido trasplantados, y por el aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados que deriva en el envejecimiento de la población. El resultado es que para 1992 se

registran sólo en los Estados Unidos 13.000 muertes atribuibles a la resistencia a antibióticos (3), (4).

Los enterococos constituyen uno de los grupos bacterianos cuya importancia como agentes de infección ha aumentado en los últimos años, y ello debido más a fenómenos de resistencia que de virulencia, ya que poseen potentes habilidades de intercambio genético tanto a través de plásmidos capaces de responder a feromonas, como de transposones altamente promiscuos (5).

Entre las características particulares de resistencia de los enterococos se encuentra la de presentar resistencia natural a cefalosporinas, penicilinas, bajas concentraciones de aminoglucósidos y clindamicina y a trimetopin, (*in vivo*), (6); pero además, en los últimos años han venido adquiriendo nuevas resistencias, principalmente a  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, alto nivel de aminoglucósidos y finalmente a gluco péptidos (7). Ésta última resistencia a aparecido debido al uso masivo de la vancomicina durante las últimas décadas, siendo precisamente la que más preocupa en éstos momentos, y ello por varias razones: a) su rápida expansión.

- b) la pérdida de sinergismo cuando se combina la vancomicina con aminoglucósidos.
- c) la alta frecuencia de resistencia simultánea cuando se combina la vancomicina con otros antibióticos, lo cuál limita las alternativas terapéuticas y finalmente,
- d) el riesgo potencial de transmisión a bacterias más virulentas como *S. pneumoniae* ó *S. aureus* (8). Ésta última transmisión ya fue lograda *in vitro* en 1992 (9). También se ha podido transmitir a otras especies como *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus spp* y *Lactobacillus spp* (5).

La vancomicina, el más importante de los antibióticos glucopéptidos, se ha venido utilizando en clínica desde 1.958 (10). Las primeras cepas de enterococos resistentes a vancomicina fueron informadas en Inglaterra en 1988 (11), (12). A partir de entonces, la resistencia a vancomicina en Estados Unidos aumentó del 0.3% de los aislados enviados al CDC de Atlanta en 1989 al 23% en 1999 (4). Durante el mismo período, el porcentaje de aislados resistentes de las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs) pasó del 0.4% al 23.4% (6). Durante la última década, la resistencia a vancomicina en enterococos se ha informado en numerosos hospitales de distintas regiones de los Estados Unidos (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19).

En Europa la aparición de enterococos resistentes a vancomicina se ha informado en muchas naciones (20), (21), (22), (23), (24), (25), (26), (27). Al contrario de lo que ocurre en Estados Unidos, dónde el hallazgo de este tipo de aislados resistentes se ha detectado principalmente a nivel hospitalario, en Europa además se ha informado la presencia de colonización gastrointestinal por enterococos resistentes a vancomicina tanto en pacientes extrahospitalarios como en individuos de la comunidad (22), (28), (29), (30).

También se ha informado sobre el aislamiento de estos agentes en animales de granja (25), (31), (32). En un esfuerzo por conocer la prevalencia global de éste hecho a nivel paneuropeo, se han realizado varios estudios multicéntricos que incluyen cepas procedentes de distintos países, determinándose que la prevalencia en Europa de la resistencia a glucopeptidos en enterococos es baja, oscilando entre el 2 y el 5% (33), (34), (35), (36).

En España diversos autores han informado sobre la aparición de éste fenómeno en distintos hospitales (37), (38), (39), (40), (41), (42). No sólo se han realizados aislamientos esporádicos

sino que se han detectado brotes intrahospitalarios, y se ha informado sobre la presencia de enterococos resistentes a vancomicina en animales de granja (31), (43), (44). Al igual que en el resto de Europa, en España la resistencia a vancomicina en enterococos es baja, estimándose en alrededor de un 1.8% (35), (45), (46). Sin embargo, España ha sido reconocida por la comunidad científica internacional como uno de los países con más altas tasas de resistencia a antibióticos, lo cuál indica que se requiere establecer medidas para controlar los nuevos tipos de resistencia (47).

Hasta donde sabemos, en la Comunidad Autónoma de Canarias existen pocos datos publicados sobre *Enterococcus spp.* y sus patrones resistencia a antibióticos y en particular, de la resistencia a glucopéptidos. Por otra parte, los trabajos publicados hasta la fecha se refieren en cada caso a cepas procedentes de un único hospital (48), (49), (50).

Teniendo en cuenta la evolución del problema de los enterococos en otros lugares del mundo, y los cambios que se han producido tanto en su importancia como patógeno como en su sensibilidad a antibióticos, hemos considerado de interés realizar un estudio multicéntrico que incluyera los cuatro

mayores hospitales de la Comunidad Autónoma de Canarias. Para ello, hemos contado con la inestimable colaboración de los Servicios de Microbiología del hospital Universitario de Canarias y del hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, por la Provincia de Tenerife, y del hospital Universitario Insular y del hospital Universitario Dr. Negrín por la Provincia de Las Palmas. A través de éste estudio, hemos querido conocer no sólo la prevalencia de aislamientos de enterococos y su respuesta a antibióticos en cada uno de los hospitales participantes durante el período de muestreo, sino abordar en particular el problema de la resistencia a glucopéptidos. En relación a este último punto nos hemos planteado utilizar técnicas moleculares, comparándolas con las tradicionales. Así mismo, hemos querido investigar la presencia de colonización intestinal por enterococos resistentes a vancomicina en un grupo de pacientes sometidos a hemodiálisis.

En el momento de iniciar el presente estudio, sólo conocíamos el aislamiento previo de algunas cepas con alto nivel de resistencia a glucopéptidos en el Hospital Dr. Juan Negrín de Gran Canaria (Isabel Álamo y Agustín González, datos no publicados), cuya caracterización molecular fue realizada en el Centro de Referencia de Majadahonda (Madrid). En este estudio



nos propusimos poner a punto en nuestro laboratorio éstas técnicas moleculares que permiten la caracterización de la resistencia a glucopéptidos, y que no estaban disponibles hasta ahora en Canarias. Además, desarrollamos una nueva técnica de PCR capaz de identificar simultáneamente tanto género como genotipo de resistencia, lo cuál resulta de utilidad diagnóstica.

Por último, en el caso de que se encuentren varios aislados de alto nivel de resistencia, la técnica de electroforesis de campo pulsado nos permitirá conocer la existencia de relación clonal tanto entre ellos como con las cepas de alto nivel de resistencia a vancomicina previamente aisladas en el Provincia de Gran Canaria, abordando así el estudio de la epidemiología molecular de la resistencia a glucopéptidos en enterococos de los hospitales de Canarias.



## **2. OBJETIVOS.**

**2.1** Conocer la prevalencia de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) durante el período de estudio, utilizando para ello técnicas tradicionales y técnicas moleculares.

**2.2** Determinar la prevalencia de aislamientos de *Enterococcus spp* informados por los Servicios de Microbiología de los cuatro principales hospitales de la Comunidad Autónoma de Canarias, obtenidos a partir de muestras clínicas de pacientes hospitalizados y por un período de nueve meses.

**2.3** Conocer y comparar los patrones de sensibilidad a antibióticos de los aislados clínicos recibidos.

**2.4** Investigar la presencia de colonización gastrointestinal por ERV en un grupo de pacientes de hemodiálisis.

**2.5** Desarrollar una PCR múltiple que amplifique simultáneamente el fragmento del gen *tuf* específico del género

*Enterococcus* y los genes de resistencia *vanA*, *vanB*, *vanC1* y *vanC2/3*.

**2.6** Comparar la utilidad de las técnicas moleculares frente a las técnicas tradicionales en la identificación de éstos patógenos y su resistencia a glucopeptidos

**2.7** Establecer a través de electroforesis de campo pulsado, la existencia de relación clonal entre los aislados de *Enterococcus spp* con alto nivel de resistencia.

### *III Revisión y antecedentes*

### **3. REVISIÓN Y ANTECEDENTES.**

En el presente apartado se realizará una revisión actualizada sobre el género en el que vamos a realizar el trabajo, el fenómeno de la resistencia y en particular las bases moleculares de la resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus*, su epidemiología y los métodos moleculares aplicables al estudio de éste problema. Asimismo, se revisarán los nuevos antibióticos en uso ó en estudio para el tratamiento de las infecciones por éste tipo de gérmenes. Con ello pretendemos establecer un marco de referencia que sirva de base al trabajo de investigación que se detallará a continuación.

#### **3.1 Generalidades del género *Enterococcus*.**

Considerado como un género aparte de otros miembros del género *Streptococcus* a partir de los ochenta (51), los enterococos son cocos Gram-positivos que se agrupan en pares y en cadenas cortas. Son anaerobios facultativos, catalasa

negativos y crecen óptimamente a 35°C, son capaces de crecer en presencia de cloruro de sodio al 6.5% y a 45°C, hidrolizan la esculina en presencia de bilis e hidrolizan el pyrrolidonyl arylamidase (PYR) y la leucina-  $\beta$ -naphthylamida (NAP) (52).

Los enterococos forman parte de la flora comensal humana y animal y están adaptados al ambiente rico en nutrientes y bajo en oxígeno que prevalece en el tracto gastrointestinal, la cavidad oral y el canal vaginal. Son agentes causales de infecciones urinarias, bacteremias, endocarditis e infecciones de heridas (53).

Aunque los enterococos pueden infectar el sistema nervioso central, el pulmón, tejidos blandos, senos paranasales, oídos y tejido periodontal, éstas infecciones ocurren con menor frecuencia (5). El género incluye al menos una docena de especies, de las cuáles *Enterococcus faecalis* es el responsable de entre el 80 y el 90% de las infecciones en humanos mientras que *Enterococcus faecium* causa la mayoría de las restantes (53). Las otras especies raramente se comportan como agentes de infección.

### **3.2 El fenómeno de la resistencia.**

La resistencia a antibióticos no es más que el producto de la selección natural. En toda población de organismos, incluyendo las bacterias, existe una pequeña proporción de individuos con características distintas, en éste caso con respecto a la capacidad de resistir la acción de un determinado antibiótico. Cuando éste antibiótico se aplica a la población, las bacterias sensibles desaparecen mientras que las resistentes sobreviven y ésta ventaja ecológica les permite multiplicarse a sus anchas.

El primer mecanismo de resistencia fue descubierto por Abraham y Chain en 1940 (54), que aislaron y caracterizaron una enzima de *Escherichia coli* (entonces llamada *Bacterium coli*) capaz de hidrolizar la penicilina. En 1944, Kirby (55), informó de la presencia de una enzima semejante en *S. aureus*. A partir de entonces se han descrito diversos mecanismos de resistencia a antibióticos dirigidos a modificar la estructura del antibiótico haciéndolo inactivo, a impedir su entrada en la célula ó bien a modificar su diana de acción. Existen en la naturaleza varias formas de adquirir la resistencia (5), (56).



◆Por mutación espontánea: ésta ocurre en muy pequeña proporción y no sería muy preocupante a no ser por la gran capacidad que tienen las bacterias para almacenar e intercambiar material genético.

◆Por conjugación: ocurre cuando dos bacterias se ponen en contacto a través de un puente de unión intercambiando a través de él material genético.

◆Por transducción: a través de bacteriófagos que actúan como transportadores.

◆A través de elementos móviles como plásmidos y transposones: éstos tienen la capacidad de saltar de una bacteria a otra y es la forma más frecuente y peligrosa de transferir la resistencia.

En el caso de los enterococos, como ya se ha mencionado anteriormente, su frecuencia como patógenos ha ido en aumento en las últimas décadas, y ello debido más a factores de resistencia que de virulencia. Además de presentar resistencia natural a varios grupos de antibióticos, los enterococos han ido adquiriendo nuevos tipos de resistencia gracias a que poseen

potentes habilidades de intercambio genético, tanto a través de plásmidos capaces de responder a feromonas, como de transposones altamente promiscuos (5).

De los nuevos tipos de resistencia que se han presentado en enterococos, la aparición en 1988 en Inglaterra de la resistencia a vancomicina y su rápida expansión es un tema de gran preocupación entre la comunidad médica (12), (14), (18), (19), (24), (25), (26), (27). Ello es debido a que estos antibióticos constituyen una importante alternativa terapéutica en el tratamiento de infecciones graves producidas por enterococos, especialmente por aquellos resistentes a betalactámicos y/o aminoglucósidos, así como por otros patógenos Gram-positivos (6), (57).

### **3.3 Los antibióticos glucopeptidos.**

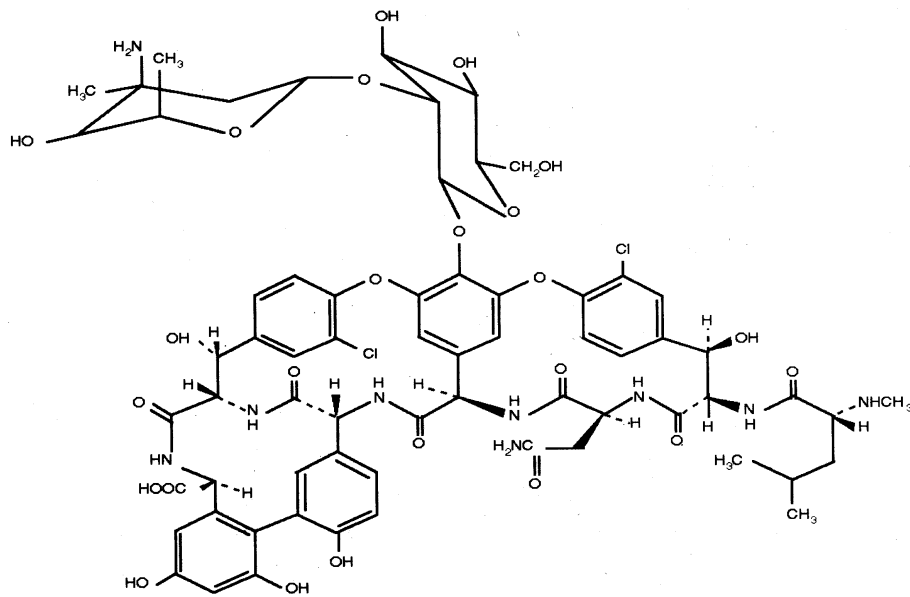
Aunque se han identificado más de 200 tipos de antibióticos glucopeptidos, sólo la vancomicina y la teicoplanina tienen hasta hoy aplicaciones clínicas en humanos (58). Un tercer glucopeptido, la avoparcina, ha sido ampliamente utilizado en Europa tanto en agricultura como en veterinaria (31). Se han estudiado las aplicaciones potenciales en agricultura de un

cuarto agente, la actaplanina, pero éste glucopéptido aún no ha sido comercializado. Un quinto agente, la ristocetina, aportó resultados prometedores en ensayos clínicos pero no se llegó a comercializar debido a su toxicidad.

Los glucopéptidos son estructuras complejas, formadas por un anillo peptídico central (el componente aglicona) que en el caso de la vancomicina está constituido por siete aminoácidos unidos entre sí formando un heptapéptido, una mitad inusual éter trifenil y varias moléculas de azúcar unidas a la cadena lateral de aminoácidos (59) (Figura 3.3a).

Como el resto de los glucopéptidos, la vancomicina es producida por varias especies del género *Actinomyces*, pero recientemente se ha logrado su síntesis en el laboratorio (60). El último logro alcanzado por el grupo de Nicolau ha consistido en convertir el componente aglicona en vancomicina añadiendo los dos azúcares, lo cual hace pensar que en principio sería posible la adición de azúcares modificados. Dado que los azúcares juegan un papel importante en promover la actividad de los glucopéptidos, la vancomicina con azúcares modificados podría mejorar su actividad frente a los enterococos resistentes a la misma, así como a *S. aureus* resistente a meticilina (60).

**Figura 3.3a Estructura química de la vancomicina**



**Fuente: Glycopeptide resistance in enterococci.  
Internat Microbiol 2000; 3:71-80.**

**Elaboración: Méndez – Álvarez S, Pérez – Hernández X,  
Claverie – Martín F.**

El mecanismo de acción de los glucopéptidos es a nivel de síntesis de la pared, inhibiendo la elongación por transglicosilación de la cadena precursora del péptidoglicano. En las cepas sensibles, ésta cadena precursora termina en el dipéptido D-alanina-D-alanina, sintetizado por una proteína ligasa (Ddl) y añadido a un precursor tripéptido para formar así un precursor pentapéptido (58). Es al extremo carboxiterminal del residuo de D-alanina al que se une el glucopéptido, interfiriendo así con el crecimiento de la pared y produciendo la muerte de la bacteria (58).

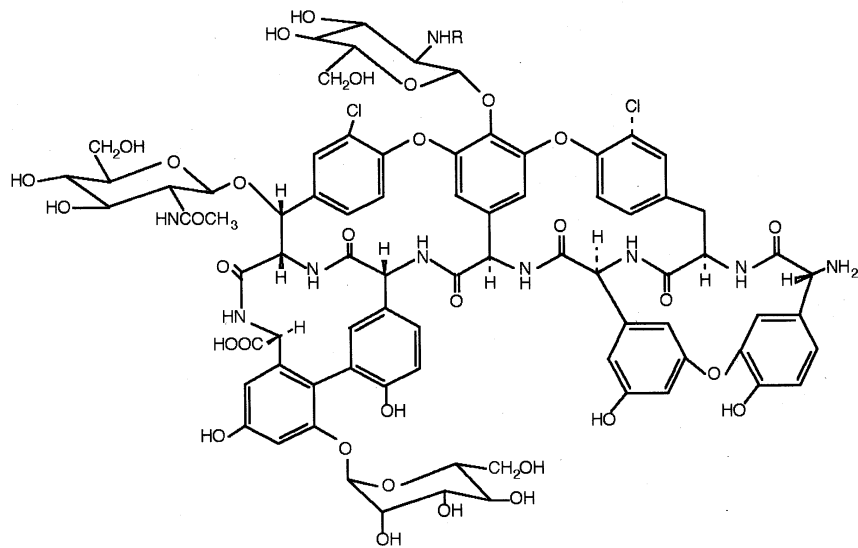
Los glucopéptidos no penetran en el citoplasma y la interacción con la diana sólo ocurre después de la traslocación del precursor unido al lípido transportador hacia la superficie externa de la membrana citoplasmática. La unión del fármaco en éste punto bloquea la incorporación por transglicosilación de nuevas sub-unidades de pentapéptido disacáridos a la cadena naciente de peptidoglucano (59).

En las cepas resistentes, una proteína ligasa (Ddl) D-Ala:D-Lac ó D-Ala:D-ser de especificidad alterada, sintetiza como precursor un depsipéptido terminado en D-lactato ó en D-serina (61), (62); la sustitución del enlace peptídico del precursor

normal por el enlace tipo éster en el precursor alterado no influye en la síntesis de la pared, pero elimina un puente de hidrógeno en posición 5 que reduce la afinidad del glucopéptido en 3 órdenes de magnitud lo cuál es suficiente para que se dé la resistencia (59), (61). Sin embargo, en el peptidoglucano de las cepas resistentes no se observan muropéptidos que contengan lactato, por lo que se sugiere que bien los precursores terminados en lactato no son incorporados ó los residuos de lactato son removidos durante la síntesis del peptidoglucano (63), (64). La teicoplanina, que presenta un componente lipídico, tiene el mismo mecanismo de acción que la vancomicina, pero ésta acción es potenciada por su capacidad para anclarse en la membrana, (Figura 3.3b).

Muchos patógenos Gram-positivos son susceptibles *in vivo* a la vancomicina y a la teicoplanina, incluyendo los estreptococos, estafilococos, clostridium y corinebacterias. Sin embargo, algunas bacterias Gram-positivas como *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus flavescens*, *Enterococcus casseliflavus* y lactobacilos son intrínsecamente resistentes a los antibióticos glucopéptidos (59). Las bacterias Gram-negativas son en general

**Figura 3.3b Estructura química de la teicoplanina.**



Fuente: Glycopeptide resistance in enterococci. *natl Microbiol* 2000; 3:71-80. □ □  
Elaboración: Méndez - Álvarez S, Pérez - Hernández X, verie - Martín F. □ □

resistentes a los glucopéptidos, debido a que éstos antibióticos no atraviesan la membrana externa de la pared celular.

### **3.4 Fenotipos de resistencia a glucopéptidos en enterococos y genes implicados.**

Hasta el momento se han descrito seis fenotipos de resistencia en enterococos (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG) en base a su nivel de resistencia e inducibilidad a vancomicina y teicoplanina (Tabla 3.4), siendo VanA y VanB los fenotipos de resistencia más comunes. El fenotipo VanA se caracteriza por presentar resistencia adquirida a altos niveles de vancomicina y teicoplanina; la resistencia es inducida tanto por vancomicina como por teicoplanina. Éste tipo de resistencia ha sido descrito en *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. raffinosus*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. mundii* y *E. gallinarum* (13), (31), (58), (65), (66), (67), (68).

El fenotipo VanB se caracteriza por presentar resistencia adquirida a varias concentraciones de vancomicina pero no de teicoplanina; la resistencia tipo VanB es inducida sólo por vancomicina y no por teicoplanina. Éste fenotipo ha sido descrito



**Tabla 3.4 Tipos de resistencia a gluco péptidos.**

| Tipo | Expresión                 | Localización de genes          | MIC (ug/ml) |              | Terminación precursor del péptidoglicano |
|------|---------------------------|--------------------------------|-------------|--------------|--|
|      |                           |                                | Vancomicina | Teicoplanina |  |
| VanA | Inducible                 | Cromosoma y plásmidos (Tn1546) | >128        | >64          | D-Ala-D-Lac                              |
| VanB | Inducible                 | Cromosoma y plásmidos (Tn1547) | 16-1024     | <2           | D-Ala-D-Lac                              |
| VanC | Constitutive              | Cromosoma                      | 4-16        | 0.5-1        | D-Ala-D-Ser                              |
| VanD | Inducible or constitutive | Cromosoma                      | 64-128      | 4            | D-Ala-D-Lac                              |
| VanE | Inducible                 | ND                             | 16          | 0.5          | D-Ala-D-Ser                              |
| VanG | Inducible                 | ND                             | 12-16       | 0.5          | D-Ala-D-Ser                              |

**Fuente:** Glycopeptide resistance in enterococci.  
Internatl Microbiol 2000; 3:71-80.

**Elaboración:** Méndez – Álvarez S, Pérez – Hernández X,  
Claverie – Martín F.

en *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* y *E. raffinosus* (13), (19), (69). Los genes que codifican para los fenotipos VanA y VanB se encuentran en los transposones Tn1546 y Tn1547 respectivamente, los cuáles pueden hallarse en plásmidos ó insertos en el cromosoma. Los operones *vanA* y *vanB* contienen siete genes (ver más adelante Figura 3.5) y las funciones de las proteínas codificadas por éstos genes han sido bien estudiadas (59). Los genes *vanS* y *vanR* codifican para un sistema de regulación de señales de transducción de dos componentes, requerido para la inducción de los genes de resistencia en respuesta a la presencia de antibióticos glucopéptidos en el medio (70). Los fenotipos de resistencia VanA y VanB se caracterizan por tanto por la expresión inducible de sus genes de resistencia.

Los genes *vanA* ó *vanB* y *vanH* permiten a los enterococos sintetizar precursores terminados en D-Ala-D-Lactato, en vez de en D-Alanina-D-Alanina (14), (70), (71), (72), (73). *vanA* y *vanB* codifican la síntesis de ligasas que unen D-Lac a D-Ala , y *vanH* codifica la síntesis de una deshidrogenasa que sintetiza el D-Lac a partir de piruvato . Los genes *vanX* y *vanY* codifican la síntesis de una DD-dipeptidasa y de una DD-carboxipeptidasa,

respectivamente, que eliminan los precursores de peptidoglucano terminados en D-ala-D-Ala (74), (75), (76), (77), (78). La DD-dipeptidasa separa el dipéptido D-Ala-D-Ala del pentapéptido precursor, y la DD-carboxipeptidasa, enzima dependiente de  $Zn^{2+}$ , separa el extremo C-terminal D-Ala. El operón *vanA* contiene además otro gen, *vanZ*, que codifica la síntesis de una proteína que confiere bajo nivel de resistencia a teicoplanina por un mecanismo desconocido. Por otro lado, el operón *vanB* contiene a *vanW*, pero la función de la proteína para la que codifica es desconocida (79).

El fenotipo *VanC* se caracteriza por la expresión constitutiva de bajo nivel de resistencia a vancomicina y susceptibilidad a teicoplanina, siendo ésta una propiedad intrínseca en *E. gallinarum* (*vanC1*), *E. caseliflavus* (*vanC2*) y *E. flavescens* (*vanC3*) (58), (80). Éste tipo de resistencia requiere de tres proteínas: VanC y VanXY<sub>C</sub>, que catalizan la síntesis de D-ala-D-Ser y eliminan los precursores terminados en D-Ala-D-Ala respectivamente, y VanT, una racemasa unida a membrana que produce la D-Ser (80), (81), (82), (83). La secuencia de nucleótidos de los genes *vanC1*, *vanC2* y *vanC3* ya ha sido publicada (80), (82).

Existe una gran homología entre los genes *vanC2* y *vanC3*. De hecho, en un estudio reciente, *E. casseliflavus* y *E. flavescens* se han considerado una misma especie, y se recomienda conservar *E. casseliflavus* para denominar la especie (84). Los productos del gen *vanC* están estructuralmente relacionadas con las ligasas D-Ala:D-Ala y D-Ala:D-Lac (85). Además de *vanC*, éstas especies contienen también una ligasa codificada por un gen *ddl* cromosómico que codifica la síntesis de la ligasa D-Ala:D-Ala (82).

Al contrario de los genes que determinan la resistencia tipo VanA y VanB, los genes *vanC* se localizan exclusivamente en el cromosoma bacteriano. El gen *vanC1* sintetiza el dipéptido D-Ala-D-Ser que reemplaza al dipéptido D-Ala-D-Ala en el extremo terminal de los precursores del peptidoglucano (78), (86). La inactivación insercional de *vanC1* en *E. gallinarum* origina la reversión hacia la susceptibilidad a la vancomicina, indicando que *vanC1* es necesario para la expresión de la resistencia a vancomicina (80). Los precursores del peptidoglucano en éste mutante insercional terminan en D-Ala-D-Ala.

El gen que sigue a *vanC1* codifica la síntesis de la proteína VanXY<sub>C</sub>, que tiene tanto actividad DD-dipeptidasa como DD-carboxipeptidasa (81). La proteína VanXY<sub>C</sub> es similar a VanX en una secuencia de 158 aminoácidos, y contiene secuencias de consenso para la unión de zinc, la estabilización de sustrato y la catálisis de la hidrólisis, presentes tanto en *vanX* (*vanX<sub>B</sub>*) como en *vanY* (*vanY<sub>B</sub>*). Al contrario de VanX, VanXY<sub>C</sub> tiene muy poca actividad dipeptidasa frente a D-Ala-D-Ser y al contrario de VanY, no tiene actividad frente a los precursores del peptidoglucano terminados en D-ala-D-Ser (81). La función de VanXY<sub>C</sub> parece ser la hidrólisis de D-Ala-D-Ala y la remoción del D-Ala C-terminal de los precursores del peptidoglucano terminados en D-Ala-D-Ala. *E. gallinarum* también produce VanT, una serina racemasa unida a membrana que cataliza la conversión de L a D-Ser (83). La inactivación insercional del gen *vanC1* tiene un efecto polar en el gen *vanT*. Por otra parte, se han descrito cepas de *E. gallinarum* que poseen tanto los genes *vanA* como *vanC1*, así como cepas con los genes *vanC1* y *vanB* (66), (69).

Más recientemente se han descrito tres nuevos tipos de resistencia: VanD, VanE y VanG, encontrados en *E. faecium* el primero y los dos últimos en *E. faecalis* (87), (88), (89). Éstos

tipos de resistencia son poco comunes ya que sólo se ha identificado un pequeño número de aislados. El fenotipo VanD se caracteriza por presentar niveles intermedios de resistencia a vancomicina y bajos niveles de resistencia a teicoplanina, lo cuál es el resultado de la síntesis de precursores terminados en D-Ala-D-Lac (87). El fenotipo VanD se ha encontrado en *E. faecium* BM4339 y en otros tres aislados de *E. faecium* (87), (90).

En *E. faecium* BM4339, el fenotipo VanD se expresa constitutivamente (87), mientras que en los otros tres aislados la resistencia a vancomicina es inducida por la presencia en el medio de éste antibiótico (90). Los genes que determinan el fenotipo VanD parecen estar localizados en el cromosoma y no son transferibles a otros enterococos (87), (90). Esto explicaría la escasez de cepas de Van D frente a la dispersión y alta prevalencia de cepas VanA y VanB.

El operón *vanD* contiene seis genes: *vanR<sub>D</sub>*, *vanS<sub>D</sub>*, *vanY<sub>D</sub>*, *vanH<sub>D</sub>*, *vanD*, y *vanX<sub>D</sub>* (91). Las correspondientes deshidrogenasas *vanH<sub>D</sub>*, ligasa VanD y DD-dipeptidasa *vanX<sub>D</sub>* son muy similares a las proteínas correspondientes codificadas por los operones VanA y VanB. La proteína VanY<sub>D</sub> es homóloga a la proteína de unión a penicilina que presenta actividad DD-

carboxipeptidasa. No se han encontrado en VanD genes homólogos a los *vanZ* y *vanW* de los operones VanA y VanB respectivamente (91). La ligasa D-ala:D-ala de *E. faecium* BM4339 no es funcional debido a una mutación debida a un cambio en la pauta de lectura del gen *ddl* cromosomal.

La resistencia tipo VanE se ha descrito en una única cepa de *E. faecalis*, la BM4405, la cuál es resistente a bajos niveles de vancomicina y susceptible a teicoplanina (88). La resistencia en BM4405 es inducible por vancomicina. Se ha caracterizado parcialmente un gen con homología a *vanC*, lo cuál concuerda con el hecho de que la cepa BM405 sintetiza precursores del peptidoglicano terminados en D-ala-D-Ser. Se ha encontrado actividad serin-racemasa en la fracción de membrana de BM405, por tanto la resistencia tipo VanE se debe a la síntesis de precursores del peptidoglucano terminados en D-Ala-D-Ser. No se sabe si los genes están localizados en plásmidos ó en el cromosoma.

Un nuevo locus de resistencia, *vanG*, se ha encontrado en cuatro aislados de cepa de *E. faecalis*, que presentan nivel moderada resistencia a vancomicina y susceptibilidad a teicoplanina (89). La caracterización de éste nuevo tipo de

resistencia se llevó a cabo utilizando la cepa *E. faecalis* WCH9. Aunque los genes de resistencia a glucopéptidos previamente descritos se han designado de la A hasta la E, el presente tipo se ha denominado *vanG* debido a que recientemente, el nombre de *vanF* se ha utilizado para designar un locus semejante a *vanA* encontrado en *Paenibacillus popillae* (92).

El examen de la secuencia del locus *vanG* indica que contiene siete genes, y que a excepción de los del sistema regulador de dos componentes (*vanR* y *vanS*) que se localizan en el extremo 5', la organización del resto de los genes es diferente a la de los otros loci *van* previamente descritos. La secuencia a partir de los genes reguladores sería: *vanY<sub>G1</sub>*, *vanW<sub>G</sub>*, *vanG*, *vanY<sub>G2</sub>* y *vanT<sub>G</sub>*. *vanY<sub>G1</sub>* y *vanY<sub>G2</sub>* codificarían para la síntesis de dos supuestas D,D-dipeptidasas (*VanG<sub>1</sub>* y *VanG<sub>2</sub>*), *vanW<sub>G</sub>* daría lugar a una proteína de función desconocida, *vanG* a la ligasa y *vanT<sub>G</sub>* a una enzima racemasa (89).

El grado de homología en la secuencia de aminoácidos entre *VanG* y las otras ligasas es bajo (39 a 47%), lo cuál indicaría que *VanG* representa una clase distinta de ligasa.

El locus *vanG* carece de una supuesta D,D-dipeptidasa *VanX*, indicando que la supuesta proteína *VanY<sub>G</sub>* puede ser similar a



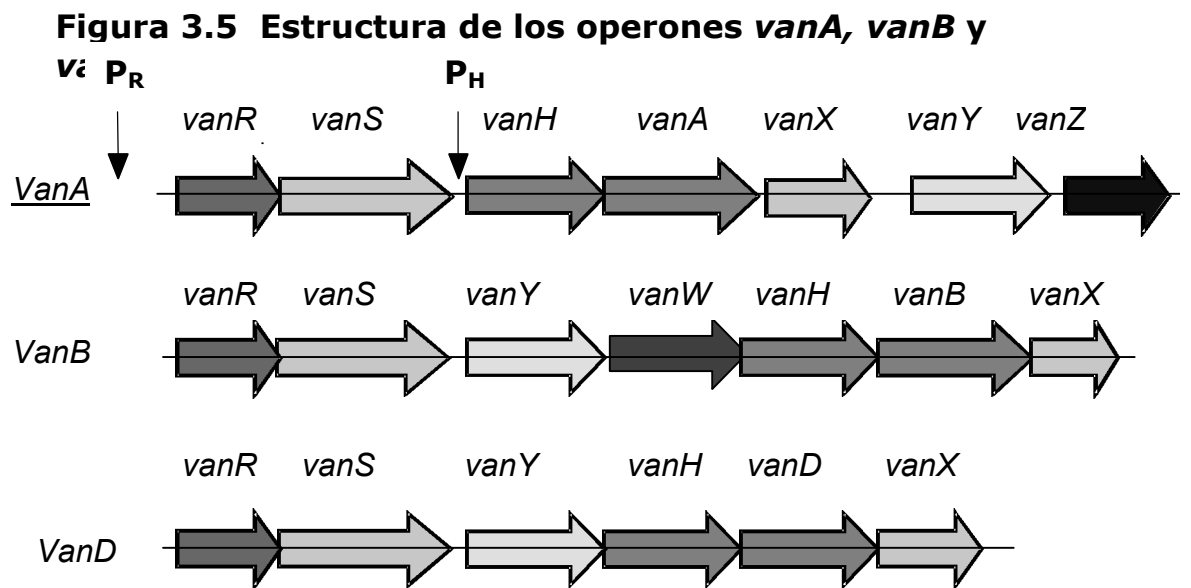
VanXY<sub>C</sub> del locus *vanC1*, y dar lugar tanto a la actividad D,D-dipeptidasa como a la D,D-carboxipeptidasa. No se ha demostrado la transmisión de *vanG* a otros enterococos (89).

### **3.5 Regulación de la resistencia a glucopéptidos.**

La presencia de vancomicina ó teicoplanina induce la expresión del operón de resistencia *vanA* en los enterococos de fenotipo de resistencia VanA. La inducción tiene lugar a nivel transcripcional a través de un sistema regulador de dos componentes, VanR y VanS (58), (93), (94). (Figura 3.5).

La presencia del glucopéptido en el medio provoca la autofosforilación de un residuo de histidina en el sensor VanS que se encuentra asociado a la membrana y que posee actividad kinasa. El grupo fosforilo es entonces transferido a un residuo de aspartato del regulador VanR. La fosforilación de VanR incrementa la afinidad del mismo por las regiones promotoras *vanP<sub>R</sub>* y *vanP<sub>H</sub>*, activándose de ésta manera la transcripción de los genes de resistencia (95), (96).

El mecanismo de regulación en las cepas VanB debe ser diferente porque, al contrario de lo que ocurre en el operón



Fuente: Glycopeptide resistance in enterococci.  
Internat'l Microbiol 2000; 3:71-80.

Elaboración: Méndez Álvarez S, Pérez  
Claverie – Martín F.

*vanA*, la activación sólo se produce en presencia de vancomicina. Las variantes tipo VanB constitutivas poseen mutaciones en el gen sensor *vanS<sub>B</sub>*. Se piensa que esas mutaciones alteran la defosforilación del regulador VanR<sub>B</sub>. (97).

Las proteínas VanR<sub>D</sub> y VanS<sub>D</sub> de *E. faecium* BM4339 contienen la secuencia de aminoácidos característica de las proteínas Kinasa, así como las regiones conservadas en proteínas reguladoras de respuesta (91). Casadewall y Courvalín han sugerido que el fenotipo constitutivo de *E. faecium* BM4339 puede ser el resultado de una mutación ubicada cerca del supuesto sitio de autofosforilación, y que se sabe altera la actividad fosfatasa de VanS<sub>B</sub> (97). Alternativamente, la señal de reconocimiento de VanS<sub>D</sub> puede encontrarse alterada, dando lugar a la fosforilación de VanR<sub>D</sub> aún en ausencia de vancomicina.

### **3.6 Origen de la resistencia a glucopeptidos en enterococos.**

El origen de los genes que dan lugar a la resistencia de alto nivel a glucopeptidos en enterococos es desconocido. Se ha postulado que, bajo la presión del incremento en el uso de glucopeptidos tanto en agricultura como en la práctica clínica, los genes de resistencia a vancomicina presentes en el ambiente hayan podido ser transferidos a los enterococos (98). Tanto las bacterias ácido-lácticas intrínsecamente resistentes a vancomicina (*Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*) como los microorganismos productores de glucopeptidos podrían ser reservorios potenciales.

Por otra parte, los genes de resistencia podrían haberse originado a través de mutaciones en genes homólogos presentes en enterococos así como en otras bacterias. *Leuconostoc mesenteroides* produce una ligasa D-Ala:D-Lac y una D-Lactato-deshidrogenasa, aunque la ligasa difiere notablemente de la de enterococos en una región que es crítica para la catálisis.

Marshall y cols en 1998 (99), han clonado tres genes a partir de dos organismos productores de glucopéptidos (*Streptomyces toyocaensis* y *Amylocaptosis orientalis*) que codifican proteínas con alto grado de homología con VanH, VanA, (VanB) y VanX. La disposición de éstos genes es idéntica a la encontrada en ERV. Éstos resultados indican que los organismos productores de glucopéptidos poseen un mecanismo de resistencia similar al encontrado en ERV, y sugiere que tal vez posean un origen común.

Sin embargo, no todos los genes de resistencia pudieron adquirirse en una sola transferencia de un organismo a otro. Existe una fuerte evidencia de que el mecanismo básico procede de un organismo productor, pero el sistema regulador pudo fácilmente ser adquirido a partir de otra bacteria Gram-positiva. En conformidad con esto último, el contenido en G+C de los genes de ERV *vanH, vanA (vanB) y vanX* es de 5 a 10% superior al de los genes adyacentes *vanR, vanS, vanY, vanZ ( ó vanW)*, por lo que pudo existir una movilización como unidad de los genes *vanH, vanA (vanB) y vanX* (99). También resulta interesante que el contenido en G+C del ADN que flanquea los genes clonados a partir de éstos microorganismos productores es 69.9% superior al de *S. toyocaensis* y 68.4% superior al de *A. orientalis*, por lo

que éstos organismos parecen también haber adquirido éste grupo de genes, reforzándose así la hipótesis de un ancestro común.

Recientemente se ha identificado en *Bacillus popilliae*, una bacteria resistente a vancomicina, una secuencia que presenta homología con la secuencia del grupo de genes *vanA* y que se ha denominado *vanF* (92). La secuencia de aminoácidos esperada a partir de *vanF* tiene altos porcentajes de identidad con VanZ, VanH, VanA y VanX. Dado que algunos biopesticidas contienen esporas de *B. popilliae* y que éstos se han utilizado en los Estados Unidos para uso agrícola por más de cincuenta años, ésta bacteria pudo haber servido como donador de los genes de resistencia ó bien haber tenido igualmente un ancestro común (100). A pesar de éstos hallazgos, hasta la fecha las fuentes exactas de los genes de resistencia a vancomicina continúan siendo un misterio (92).

### **3.7 Epidemiología.**

En las últimas décadas los enterococos se han convertido en importantes agentes de infección nosocomial, siendo

especialmente preocupante el incremento en el número de aislamientos de ERV (8), (10), (68).

Curiosamente la epidemiología de los enterococos resistentes a vancomicina muestra distintos patrones según se trate de Europa ó de los Estados Unidos. En Europa, la resistencia a vancomicina se ha detectado no sólo en muestras hospitalarias, sino también en infecciones adquiridas en la comunidad así como en portadores asintomáticos y en animales de granja. La aparición de tales cepas resistentes se ha asociado al uso de la avoparcina, un antibiótico glucopéptido que ha sido utilizado desde 1974 como promotor del crecimiento animal (31),(101),(102). El uso de la avoparcina puede haber ejercido una presión selectiva provocando la aparición de ERV en aves y cerdos, que probablemente constituyen el mayor reservorio de ERV para el ser humano, además de los pacientes hospitalizados con colonización intestinal por ERV y de las superficies y equipos médicos contaminados a partir de los pacientes (32), (103), (104), (105), (106). Algunos aislados humanos son indistinguibles de los provenientes de fuentes animales, lo que sugiere que los ERV pueden pasar de animales a humanos a través de la cadena alimentaria (22), (107), (108), (109). Por

ésta razón, el uso de la avoparcina se ha prohibido en la Unión Europea a partir de 1997 (101),(110).

En los Estados Unidos por el contrario, donde el uso de la avoparcina nunca ha sido permitido, la resistencia a vancomicina se ha detectado principalmente en los hospitales. La aparición de éste tipo de resistencia se asocia con el uso frecuente de la vancomicina, especialmente por vía oral para el tratamiento de entidades como la colitis pseudomembranosa producida por *Clostridium difficile*, así como al uso de altas dosis de éste antibiótico (111). Sin embargo, recientemente se han aislado ERV en comida de animales en USA (112).

La diseminación de ERV incluye tanto la diseminación clonal de una única cepa resistente así como la transferencia horizontal de plásmidos y/ó transposones entre distintas cepas e incluso entre distintas especies (113). En los hospitales en los que los brotes se han detectado con rapidez, los casos se han debido con frecuencia a una única cepa (13),(18),(22). Sin embargo, cuando los ERV han estado presentes en un hospital ó en una comunidad durante meses ó años, los estudios moleculares suelen revelar que la resistencia a vancomicina se ha extendido



a través de plásmidos y transposones dando lugar a múltiples clones (19), (114), (115), (116).

### **3.8 Dependencia a glucopeptidos en enterococos.**

Últimamente se han descrito varios aislados clínicos de enterococos que se caracterizan por requerir la presencia de vancomicina en el medio de cultivo para su crecimiento, y que se han obtenido a partir de pacientes tratados por largo tiempo con éste antibiótico (117), (118), (119). Se ha logrado además obtener *in vivo* así como *in vitro* mutantes con éste mismo fenotipo (67), (97), (120), (121).

La dependencia a vancomicina viene dada por la inactivación del gen *ddl* cromosómico, que se traduce en la síntesis defectuosa del dipéptido D-Ala-D-Ala ó en la sustitución en uno de los aminoácidos de dicho dipéptido; como resultado, no pueden sintetizarse precursores de péptidoglucano terminados en D-Ala-D-Ala y el crecimiento de la bacteria sólo es posible cuando, en presencia de vancomicina, se induce la síntesis de precursores terminados en D-Ala-D-Lac (122). Se ha demostrado

que las cepas dependientes de vancomicina pueden revertir al fenotipo no dependiente (118).

### **3.9 Métodos moleculares para la identificación de *Enterococcus spp* y la resistencia a glucopeptidos.**

El laboratorio constituye una de las primeras líneas de defensa en la prevención y control de la resistencia a antibióticos. Estudios previos han documentado que existen problemas en la detección de la resistencia de los enterococos a niveles bajos ó intermedios de vancomicina, tanto por los métodos convencionales como por los automatizados (33), (123), (124). La clasificación como sensible de un aislado resistente tiene serias implicaciones, tanto para el manejo clínico del paciente como para el diseño y aplicación de medidas por parte del servicio de vigilancia de la resistencia, mientras que la sobre-estimación de ERV supone añadir gastos innecesarios en aplicar medidas de prevención y control. También la rapidez del diagnóstico constituye un factor crítico para evitar la diseminación, ya que los genes que confieren resistencia a niveles altos ó intermedios de vancomicina son transferibles a

diferentes especies de enterococos ó incluso a otros géneros (58).

El desarrollo de métodos moleculares rápidos, de alta sensibilidad y especificidad como la PCR (del inglés Polimerase Chain Reaction), han mejorado el tiempo y la precisión del diagnóstico de las infecciones por ERV. La PCR puede constituir un medio rápido y preciso para la detección de ERV independiente del cultivo, directamente a partir de una variedad de muestras clínicas, ofreciendo resultados en apenas unas horas. Son varios los métodos de PCR descritos para la detección de enterococos (125), (126), (127), (128). Ke y cols. (128), han descrito un ensayo de PCR para la detección específica de todos los enterococos de importancia clínica a nivel de género. Amplificando un fragmento del gen *tuf* que codifica para el factor de elongación EF-Tu, éste método permite la detección con alto grado de sensibilidad y con especificidad aceptable de la mayoría de las especies una vez obtenido el cultivo .

Varios ensayos de PCR-Múltiple permiten la detección simultánea de los genes de resistencia *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* y/ó *vanC1*, *vanC2* y *vanC3* a través de la

amplificación de fragmentos específicos del gen de la *ddl* ligasa (126), (127), (129), (130), (131). Uno de éstos métodos permite además la detección específica de *E. faecium* y *E. faecalis* (127). Por otra parte, varios métodos de PCR permiten la detección de *vanA* directamente a partir de la muestra clínica como alternativa al cultivo, lo cuál reduce aún mas tiempo de detección. En particular, se ha desarrollado un ensayo de PCR para la detección de *vanA* a partir de muestras de heces logrando un alto grado de especificidad y sensibilidad aceptable, lo cuál puede resultar de mucha utilidad a la hora de realizar estudios de portadores (132), (133), (134). Otro método desarrollado por Patel y cols es una PCR RFLP (del inglés Restricción Fragments Lenght Polymorphim) que puede realizarse a partir de colonias de *Enterococcus spp* para detectar y discriminar los genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*. La reciente clonación de los genes de resistencia *vanD*, *vanE* y *vanG* permitirá el futuro desarrollo de ensayos de PCR para la detección específica de éstos nuevos tipos de resistencia (87), (88), (89).

Otros métodos moleculares permiten conocer la precisa identificación de cada aislado así como estimar la diversidad genética dentro de cada tipo de resistencia. La determinación de

la secuencia de RNA (del inglés Ribo Nucleic Acid) ribosomal 16S se ha convertido en un procedimiento común, (135), (136), (137), (138). Alternativamente, se puede realizar un estudio de ribotipaje ó ARDRA (del inglés Amplified Ribosomal DNA Restriction Assay) (139), (140), (141).

Adicionalmente se dispone de otros métodos para realizar pruebas rápidas que constituyen una herramienta útil a la hora de establecer diferencias sutiles entre cepas de enterococos muy relacionadas. REP-PCR (del inglés Repetitive Extragenic Palindrome PCR) RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA) y RFLP (del inglés Restriction Fragments Length Polymorphism) y PFGE (del inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis) (8), (135), (142). Estos métodos varían en su reproducibilidad y en su capacidad discriminatoria, siendo considerada la PFGE como la más exitosa.

La PFGE fue descrita por Schwartz y Cantor en 1984 (143), y constituye un sistema electroforético capaz de separar moléculas de DNA (del inglés Desoxy-ribo Nucleic Acid) de entre 10 Kilobases (kb) y 10 megabases (Mb), permitiendo así el estudio genómico de los microorganismos. El principio básico de ésta técnica es provocar una reorientación continua de las moléculas

de DNA, causada por un cambio constante en la dirección del campo eléctrico. El resultado es una velocidad de migración en la dirección del campo eléctrico neto, que depende mayoritariamente del tamaño de las moléculas de DNA.

Posteriormente se han realizado modificaciones de la técnica original dando lugar a diferentes sistemas de PFGE que varían en la forma en que los campos eléctricos son aplicados al gel. Entre ellos los más utilizados son el OFAGE (144) y el CHEF (145). El sistema OFAGE (del inglés Ortogonal Field-Alternating Gel Electrophoresis) fue la primera modificación hecha sobre el sistema original y consiste en que dos largos cátodos y dos ánodos puntuales se colocan con ángulos de  $90^\circ$  entre sí. La separación de las moléculas se consigue variando la orientación del campo norte/sur a este/oeste, es decir, los campos alternantes son perpendiculares entre sí.

En cuanto al CHEF (del inglés Contour-Clamped Homogeneous Electric-Field Electrophoresis) se trata de un sistema en el que el campo eléctrico se distribuye a lo largo de una estructura hexagonal de electrodos. Los distintos lados del hexágono son activados alternativamente con un ángulo de  $120^\circ$ , resultando una dirección neta de migración perpendicular

a los pocillos donde se coloca la muestra. El uso combinado de PFGE con endonucleasas de restricción de baja frecuencia de corte ha permitido la obtención de patrones de restricción cromosómico (ó extracromosómico) característicos de cada bacteria estudiada. Esto supone una aproximación a la organización física del cromosoma puesto que es un reflejo de la pauta de distribución de secuencias a lo largo del mismo. La comparación de los patrones de restricción así obtenidos ha sido aplicada a diversos estudios epidemiológicos y en el caso de los enterococos la PFGE se considera actualmente como el método de referencia para el tipaje de cepas y ha sido ampliamente utilizada en la caracterización epidemiológica molecular de los ERV (146), (147), (148), (149).

Las nuevas técnicas de biología molecular han representado un avance importante no sólo en lo que se refiere a la rapidez y precisión del diagnóstico, sino también en el conocimiento del número y tipos de cepas resistentes presentes en un lugar y momento determinado (147). Éste conocimiento es especialmente importante a la hora de diseñar planes de prevención, cuidado y control de la aparición de ERV, así como para establecer medidas para el uso apropiado de la vancomicina.

### **3.10 Nuevos antibióticos para el tratamiento de ERV.**

Las infecciones por ERV generalmente ocurren en pacientes con compromiso significativo de las defensas y serias comorbilidades, lo cual magnifica la importancia de un tratamiento antimicrobiano efectivo. Las opciones de tratamiento incluyen fármacos ya disponibles que no tienen una aprobación específica frente a ERV (cloranfenicol, doxiciclina, altas dosis de ampicilina ó ampicilina/sulbactam), y nitrofurantoína (para infecciones del tracto urinario inferior) (150). Asimismo, se están estudiando nuevos antibióticos, de los cuáles los más importantes son la quinupristina-dalfopristina, el linezolid, el LY33328 y la ramoplanina (151), (152), (154), (155).

La quinupristina-dalfopristina pertenece a la familia de los antibióticos macrólidos-lincosaminas-estreptograminas, y actúa uniéndose de forma irreversible al ribosoma bacteriano inhibiendo la síntesis de proteínas (153). Es especialmente activo frente a microorganismos multi-resistentes como *S. aureus* resistente a meticilina y *E. faecium* resistente a glucopéptidos, no así frente a *E. faecalis* (154), (155). Aunque se ha descrito la



aparición de resistencia adquirida, no se ha demostrado resistencia cruzada con glucopéptidos ó  $\beta$ -lactámicos (156). Por otra parte, se ha visto que *in vitro* la adición de doxyciclina a quinupristina-dalfopristina reduce la aparición de resistencia frente a éste último y mejora la acción frente a ERV (157).

El linezolid, un miembro de las oxazolidinonas aprobado por la FDA (del inglés Food and Drug Administration), es activo *in vitro* tanto a *E. faecium* como a *E. faecalis* resistentes a vancomicina, aunque no tiene acción bactericida (157), (158). Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la síntesis de proteínas y estudios *in vitro* parecen demostrar que la selección de mutantes resistentes no ocurre fácilmente (159). Hasta ahora no se ha realizado un estudio comparativo entre los dos agentes aprobados para el tratamiento de las infecciones por ERV, quinupristina-dalfopristina y linezolid (150).

Uno de los agentes más activos frente a ERV es un glucopéptido semisintético denominados LY33328, presentando actividad tanto bactericida como bacteriostática (151). Su mecanismo de acción es aún desconocido pero se supone que sea similar al de la vancomicina. Estudios *in vitro* realizados en ratas han demostrado que el LY33328 tiene una mayor vida

media que la vancomicina, por lo que requeriría una menor frecuencia de dosificación (160). Sin embargo, queda por dilucidar su farmacocinética en humanos y sus posibles efectos tóxicos, problemas que ya se han presentado en el pasado con otros fármacos prometedores como la daptomicina (161).

La ramoplanina es un lipoglucopepsipéptido que inhibe la síntesis de la pared actuando a nivel de la formación del lípido intermediario (152). Presenta actividad bactericida frente a enterococos y se ha sugerido que podría utilizarse en el tratamiento de la colonización por ERV así como para la erradicación de *Clostridium difficile*, sin el riesgo de seleccionar ERV (162), (163). Se han propuesto estrategias para erradicar la colonización por ERV con el uso oral cambiando de ramoplanina más bacitracina ó doxiciclina lo cuál, si resultara exitoso, sería de utilidad para reducir el riesgo de infección en pacientes de alto riesgo, tales como los que presentan neutropenia post-quimioterapia ó los trasplantados (150).

Finalmente, actualmente se llevan a cabo investigaciones tanto con nuevos agentes que están ya en fase II ó III (uno de ellos es la tigiliciclina GAR-936, un nuevo análogo de minociclina) así como con derivados de la teicoplanina y otros glucopéptidos

(150), (164), (165). Hasta que estos nuevos agentes puedan ofrecerse como tratamiento alternativo es necesario conocer más datos en cuánto a su actividad, dosis y ausencia de toxicidad ó de resistencia cruzada con vancomicina y teicoplanina.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS.**

A continuación se describe la muestra estudiada así como los métodos tradicionales y las técnicas moleculares utilizadas para su estudio genotípico y fenotípico. Asimismo se detallan las características de los hospitales participantes y los métodos estadísticos utilizados para el estudio descriptivo.

### **4.1 Población, muestras y período de estudio.**

Se estudiaron 406 aislados clínicos pertenecientes al género *Enterococcus* informados por los Servicios de Microbiología de cuatro hospitales de la Comunidad Autónoma de Canarias entre el 1 de Abril y el 31 de Noviembre de 2000, gracias a la ayuda económica recibida de la Consejería de Educación, Cultura y Deportes, de Funcis y de la Asociación Científica Pulmón y Ventilación Mecánica tal como se especifica al inicio de este trabajo. Los aislados procedían de muestras clínicas de pacientes hospitalizados, y se incluyó un sólo aislado por paciente en el estudio. Los aislados así obtenidos se almacenaron en perlas "Microbank" (Pro-lab diagnostics) a  $-80^{\circ}$  C y se recopilaron los respectivos informes de laboratorio.

Los hospitales participantes fueron:

◆ Hospital Universitario de Canarias (HUC), Provincia de Santa Cruz de Tenerife, de nivel terciario con 882 camas, tiene un área de influencia de 377.954 habitantes (2,3 camas/1000 habitantes).

◆ Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria (HUNSC), Provincia de Santa Cruz de Tenerife, es un hospital universitario, de nivel terciario con 680 camas y con un área de influencia de 390.520 habitantes (1,7 camas/1000 habitantes).

◆ Hospital Universitario Dr. Juan Negrín (HUN), Provincia de Las Palmas, es hospital universitario de nivel terciario con 705 camas y un área de influencia de 435.920 habitantes (1,6 camas/1000 habitantes).

◆ Hospital Universitario Insular (HUI), Provincia de Las Palmas, hospital universitario de nivel terciario con 465 camas y un área de influencia de 395.155 habitantes (1,2 camas/1000 habitantes).

Adicionalmente, para realizar el estudio de colonización gastrointestinal, se recogieron 31 hisopados rectales de igual

número de pacientes de la Unidad de Hemodiálisis del HUNSC.

Los criterios de inclusión de estos pacientes fueron:

- a) Ser mayor de 18 años.
- b) Haber estado en el programa de hemodiálisis de forma estable un tiempo igual ó superior a tres meses.

#### **4.2 Identificación de los aislados clínicos.**

Para la identificación de los aislados clínicos se utilizaron pruebas bioquímicas convencionales y métodos automatizados. Las pruebas bioquímicas incluyeron tinción de Gram, ausencia de catalasa, crecimiento en agar bilis esculina, crecimiento en presencia de cloruro de sodio al 6,5% y presencia de pyrrolidonyl arylamidase (PYR). A las cepas de ERV encontradas en el estudio se les realizó además prueba de utilización de los siguientes azúcares: sorbitol, manitol, arabinosa, sorbosa, lactosa, inulina, sacarosa, trehalosa, rafinosa y salicina, todos ellos en Cystine-tryptic digest agar base medium (CTA) y según las recomendaciones descritas por Facklam (53). La identificación a nivel de especie se llevó a cabo utilizando el sistema automatizado GPS-TA (Vitek 1, bio-Mérieux) en los hospitales HUC, HUNSC y HUN mientras que en el HUI se utilizó el sistema

Wider (Diffco). Se realizó la prueba de la motilidad para diferenciar *E. gallinarum* de otras especies.

#### **4.3 Pruebas de sensibilidad a antibióticos.**

A continuación se describen las pruebas de sensibilidad a antibióticos.

##### **4.3.1 A través de métodos automatizados.**

Tanto el HUC como el HUNSC y el HUN informaron los resultados obtenidos a través del sistema automatizado GPS-TA (Vitek1, bio-Mérieux), mientras que el HUI informaron los resultados obtenidos con el sistema Wider (Diffco).

##### **4.3.2 A través del método de dilución en agar.**

En todos los hospitales participantes se realizó ésta prueba para el estudio del alto nivel de resistencia a gentamicina (500 µg/ml) y a estreptomina (2000 µg/ml) siguiendo las recomendaciones de la NCCLS (del inglés National Committee for Clinical Laboratory Standars) (documento M7-A4, 1997), (166).

Las CMIs (Concentraciones Mínimas Inhibitorias) de los aislados ERV para vancomicina y teicoplanina se determinaron a



través del método de dilución en agar según éste mismo documento. Para ello, se prepararon placas de agar Mueller Hinton (Difco) incorporando el antibiótico al medio de cultivo, teniendo en cuenta la potencia del lote utilizado según la fórmula:

$$\text{Volumen}(ml) = \frac{\text{peso}(mg) \times \text{potencia}(mg/mg)}{\text{concentración deseada}(mg/ml)}$$

Las concentraciones finales en agar utilizadas tanto para vancomicina como para teicoplanina fueron de 0.125 µg/ml a 512 µg/ml.

A partir de un cultivo de 24 horas en agar sangre (bio-Mérieux) se preparó una suspensión equivalente a una turbidez de 0.5 en la escala de Mac Farland, de ésta se sembró una dilución 1:10 utilizando un replicador de Steer de tal forma que el inóculo final en la placa fue de 10<sup>4</sup> UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Las placas así inoculadas se incubaron a 35-37°C durante 16-20 horas (24 horas en el caso de vancomicina y teicoplanina) en aerobiosis, leyendo e interpretando las CMI's utilizando los criterios del NCCLS (documento M7-A4, 1997), (166). Según esto, los puntos de corte utilizados para la interpretación de sensible (S), intermedio (I) ó resistente (R) fueron ≤ 4 mg/l, 8-16 mg/l y ≥ 32 mg/l para la vancomicina.

Para la teicoplanina los puntos de corte de S ó R fueron  $\leq 8\text{mg/l}$  y  $\geq 32\text{mg/l}$  respectivamente.

Las cepas de referencia utilizadas para el control de calidad fueron:

- Para el cribado de gentamicina, estreptomina y vancomicina.

*E. faecalis* ATCC 29212: sensible a gentamicina  $500\ \mu\text{g/ml}$ , sensible a estreptomina  $2000\ \mu\text{g/ml}$ , sensible a vancomicina  $6\ \mu\text{g/ml}$ .

*E. faecalis* ATCC51299: resistente a gentamicina  $500\ \mu\text{g/ml}$ , resistente a estreptomina  $2000\ \mu\text{g/ml}$ , resistente a vancomicina  $6\ \mu\text{g/ml}$ .

- Para el control de las CMI a vancomicina y teicoplanina.

*S. aureus* ATCC 29213: presenta una CMI frente a vancomicina de  $0.5\text{-}2\ \mu\text{g/ml}$  y una CMI frente a teicoplanina de  $0.25\text{-}1\ \mu\text{g/ml}$ .

#### **4.4 Prueba de producción de b-lactamasa.**

Para la investigación de la producción de  $\beta$ -lactamasa se utilizó el método del disco de nitrocefina (Cefinase BBL). Esta prueba sólo se realizó en el HUN.

## **4.5 Estudio de la resistencia a glucopéptidos en los aislados clínicos.**

Todos los aislados clínicos incluidos en el estudio se sometieron al esquema de trabajo que se describe a continuación (Figura 4.5).

### **4.5.1 Estudio fenotípico.**

De cada uno de los aislados clínicos conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  se sembró una perla a partir del tubo de "Microbank" en una placa de agar sangre (bio-Mérieux) a través de estriación para comprobar la pureza y viabilidad. Posteriormente la perla se depositó en un tubo con 3,5 ml de BHI (del inglés Brain Heart Infusion), (Oxoid), y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, obteniéndose así un cultivo de una turbidez aproximada al 0,5 en la escala de Mc-Farland. A partir de éste cultivo líquido y utilizando un hisopo estéril, se sembró en placas de Agar Bilis Esculina (ABE) (Oxoid) sin vancomicina y con vancomicina ( $6\ \mu\text{g/ml}$ ). Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en aerobiosis y se observó la presencia de crecimiento, evidenciada por un oscurecimiento del medio, a las 24, 48 y 72 horas. Las cepas de referencia utilizadas para el control de calidad fueron:

*E. faecium* BM 4147 (*vanA*), *E. faecalis* V583 (*vanB*), *E. gallinarum* BM 4174 (*vanC1*) , *E. faecalis* ATCC 29212 (sensible a vancomicina 6 µg/ml) y *S. aureus* 29213.

#### **4.5.2 Estudio Genotípico.**

A continuación se describe el estudio genotípico realizado.

##### **4.5.2a Método rápido de obtención del DNA.**

Los aislados se crecieron en placas de agar sangre a 37° C en aerobiosis durante 24 horas. A partir de este cultivo se tomaron de tres a cinco colonias y se suspendieron en 1 ml de agua destilada estéril. Después de homogeneizar la suspensión por agitación en un agitador "Vortex", se calentó durante 15 minutos a 100°C y luego se centrifugó a 15.000 g por 10 minutos. El sobrenadante que contenía el DNA se separó y se almacenó a - 20°C hasta su uso. Con el fin de comparar protocolos se utilizó alternativamente la extracción a través de un equipo comercial de extracción de DNA (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante y previo tratamiento enzimático con lisozima y lisostafina a las concentraciones finales 1 y 10 µg/ml respectivamente.

#### **4.5.2b Amplificación de DNA a través de PCR.**

En la primera fase del estudio se pusieron a punto en el laboratorio las PCRs descritas por Ke y cols y por Dutka-Malen y cols. para la identificación del género *Enterococcus* y de los principales genotipos de resistencia a glucopéptidos respectivamente (127), (128). Posteriormente se procedió a desarrollar una PCR-múltiple (PCRM) que permitiera la identificación simultánea tanto del género *Enterococcus* como de los principales tipos de resistencia, utilizando además el método rápido de obtención de DNA ya descrito.

A partir del DNA obtenido por el método rápido se realizaron las reacciones de PCR-múltiple (167) añadiendo 20  $\mu$ l del sobrenadante a 80  $\mu$ l de una mezcla de reacción que contenía: 1X de tampón de reacción [16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67mM Tris-HCL (pH 8.8)], 0.2 mM de cada uno de los cuatro trifosfato deoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Promega Corp., Madison, EEUU), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 pmol de cada cebador *vanA* , *vanB*, *vanC1* y *vanC2/C3* y 4 pmol de cada cebador *Ent* (Roche Diagnostics,Alemania) y 1.2 U de taq DNA polimerasa

(Bioline, Reino Unido). Todos los ensayos de PCR se llevaron a cabo con un control negativo que contenía todos los reactivos excepto el DNA y con cinco controles positivos con el DNA de las cepas de referencia *E. faecium* BM 4147 (*vanA*), *E. faecalis* V583(*vanB*), *E. gallinarum* BM 4174 (*vanC1*) , *E. faecalis* ATCC 29212 (sensible a vancomicina y teicoplanina) y *S. aureus* ATCC 29213.

La amplificación de DNA se llevó a cabo en un sistema termociclador de PCR GeneAmp system 2400 ó en un GeneAmp system 9700 (PE, Applied Biosystems, EEUU), con el siguiente esquema de ciclos: un paso inicial de desnaturalización a 94° C por 2 minutos seguidos de 25 ciclos de amplificación, cada uno de los cuáles consistieron de 94° C por 60 segundos, anillamiento a 55° C por 60 segundos y extensión a 72° C por 60 segundos, terminando con un paso final de extensión a 72° C por 5 minutos. Después de la amplificación, se tomaron 5 µl de cada reacción de PCR y se revelaron a través de electroforesis en gel de agarosa (1.5% agarosa, 1X TBE, 100V) para calcular los tamaños moleculares de los productos de amplificación, comparándolos con marcador de 100 pb (Roche Diagnostics, Alemania).

El gel se tiñó con bromuro de etidio al 5% y los amplificadores se visualizaron utilizando una cámara de luz ultravioleta (UV) (168).

#### **4.6 Estudio de la resistencia a gluco péptidos en los aislados de colonización.**

Las muestras obtenidas a partir de los pacientes de hemodiálisis en los cuáles se investigó la presencia de colonización intestinal por ERV, fueron sometidas al esquema de trabajo que se describe a continuación (Figura 4.6).

##### **4.6.1 Estudio fenotípico.**

Utilizamos medios líquidos de enriquecimiento que aumentan significativamente la detección de ERV en muestras fecales (169). Una vez realizado el hisopado rectal se envió directamente al laboratorio, donde se realizó una suspensión introduciendo el hisopo en un tubo con 1 ml de solución salina fisiológica. A partir de ésta suspensión se sembraron 100µl en placas de agar bilis esculina-azida sódica (Oxoid) sin y con

vancomicina (6µg/ml) y 50 µl en un tubo con 3.5 mL de BHI (Oxoid), incubando a 37°C durante 24, 48 y 72 horas, examinando cada día las placas en busca de colonias negras bilis-esculina (BE) positivas. Tras las primeras 24 horas de incubación se sembraron 50 µl a partir del cultivo líquido en placas de agar bilis esculina-azida sódica (Oxoid) sin y con vancomicina (6µg/ml), incubando a 37° C durante 24, 48 y 72 horas, examinando cada día las placas en busca de colonias bilis-esculina positivas.

#### **4.6.2 Estudio genotípico.**

A partir de las colonias negras que crecieron en las placas de agar bilis esculina-azida sódica con vancomicina (6µg/ml), se procedió según se describe en el punto 4.5, Estudio de la resistencia a gluco péptidos en los aislados clínicos, 4.5.2 Estudio genotípico.



#### **4.7 Electroforesis de campo pulsado.**

Para la preparación de los insertos, se inocularon 10 ml de BHI (Oxoid) partir de un cultivo fresco en agar sangre (BioMérieux) y se incubaron con agitación 18 horas a 37°C. Se midió la absorbancia a 540 nm y se escogió el volumen según la D.O.: 10 ml para una D.O. de 0.6 a 0.7, 7 ml para una D.O. de 1.3 y 5 ml para una D.O. mayor de 1.5. El volumen escogido se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 1 ml de tampón de suspensión (10mM Tris pH 7.6, 1M NaCl). De ésta suspensión se tomó la mitad del volumen por cubo de agar (50 µl), se equilibró a 50°C y se mezcló con igual volumen de agarosa (Incert agarose FM Bioproducts, EEUU) al 1.6%, lo que dió una concentración final de agarosa del 0.8%. Manteniendo la suspensión de células-agarosa a 50°C, se transfirió la mezcla a los moldes y se dejó solidificar a 4°C durante 40-60 minutos. Una vez solidificados, se transfirieron los insertos a tubos cónicos de centrifuga y se incubaron durante 24 horas a 37°C en 2 ml de tampón de lisis (6 mM NaCl, 100 mM EDTA pH7.5, 0.2% deoxicolato de sodio, 0.5% sarcosilato , 0,5 brij 58, lisozima 1 mg/ml, lisostafina 60 µg/ml, RNAasa 20 µg/ml). Se retiró el tampón de lisis y se añadieron 2 ml de tampón de digestión (0.5

M EDTA pH 9-9.5, 1% sarcosilato, proteinasa K 1mg/ml). Se incubó a 50°C durante 48 horas. Para la digestión y el lavado de los insertos, se descartó el tampón de digestión y se añadieron 12 ml de tampón de lavado (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA pH 8.0), y se incubó 24 horas a temperatura ambiente. Se realizó un segundo lavado con el mismo volumen de tampón, agitando durante una hora a temperatura ambiente. Se cambió nuevamente el tampón de lavado y se almacenaron así los insertos a 4°C.

La macro-restricción del DNA genómico se llevó a cabo durante la noche a 37°C en 200 µl de tampón de restricción de la enzima con 30U de Sma I (Promega Corporation, EEUU). Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis de campo pulsado utilizando el sistema CHEF II (Bio-rad Laboratories, EEUU), colocando trozos de cada inserto (2 por 0.5 mm) en los pocillos del gel de agarosa al 1% (pulsed field certified agarose, Bio-rad Laboratories, EEUU) preparado en 0.5X TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) y se sellaron con la misma agarosa. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA del fago lambda (Bio-rad Laboratories, EEUU).

La electroforesis se llevó a cabo sumergiendo el gel en la cubeta con 2 litros de 0.5X TBE equilibrados a 14 °C, a un voltaje constante de 6v/cm<sup>3</sup>, a un ángulo de 120° y en las siguientes condiciones: un primer bloque con pulsos de 5 a 15 segundos durante 12 horas y un segundo bloque con pulsos de 15 a 40 segundos durante 10 horas. El gel se tiñó con bromuro de etidio al 5% y la visualización se llevó a cabo a través de la exposición a una lámpara de luz ultravioleta.

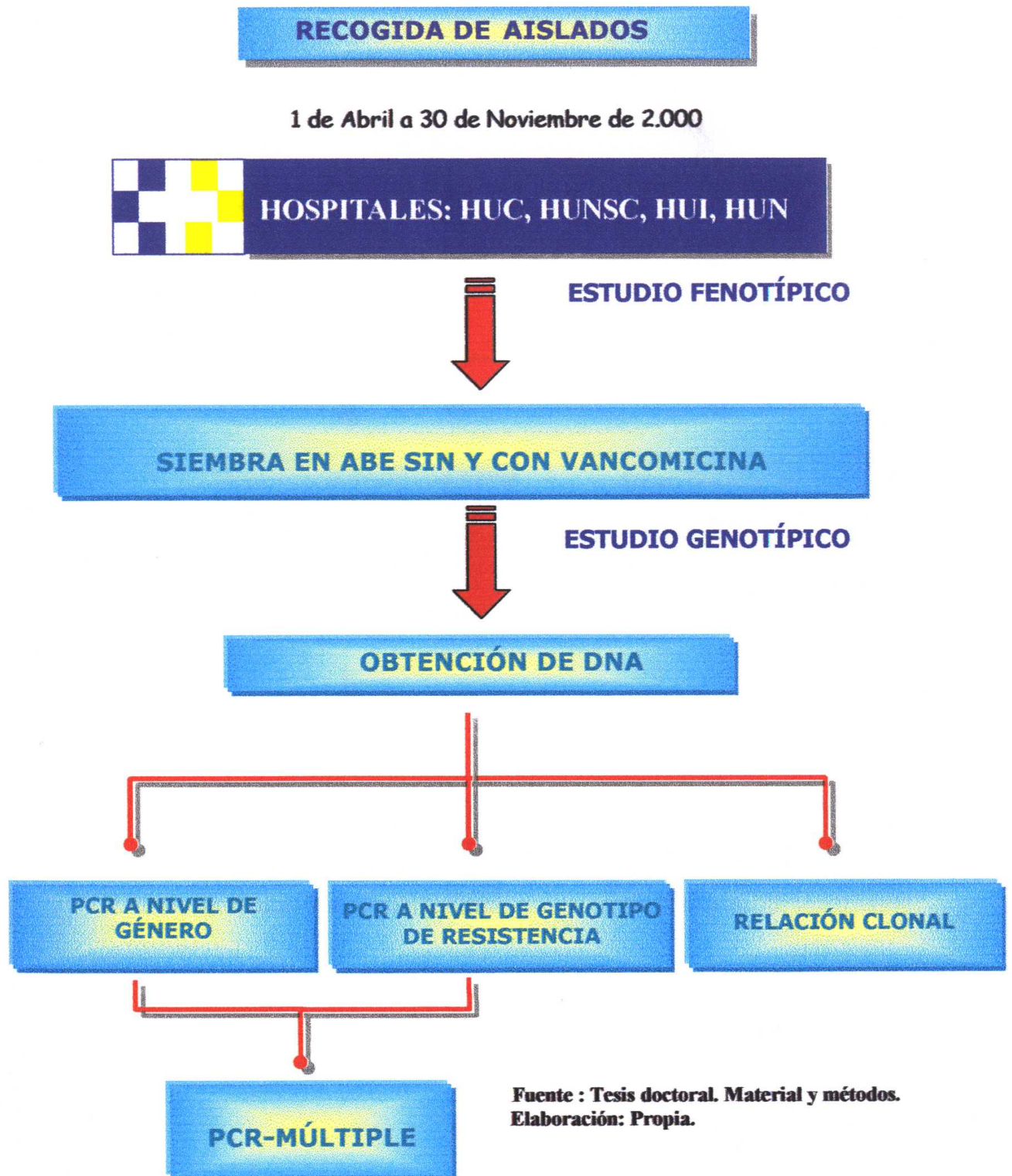
Los patrones de bandas se interpretaron según los criterios de Tenover (142). Los aislados se consideraron idénticos si poseían igual número de bandas del mismo peso molecular. Aislados muy relacionados ó posiblemente relacionados diferían en cambios consistentes en un solo evento genético (2 a 3 bandas diferentes) ó 2 eventos genéticos independientes (4 a 6 bandas diferentes), respectivamente. Cepas no relacionadas diferían en 3 ó más eventos genéticos independientes (7 ó más bandas diferentes) (142).

#### **4.8 Análisis Estadístico.**

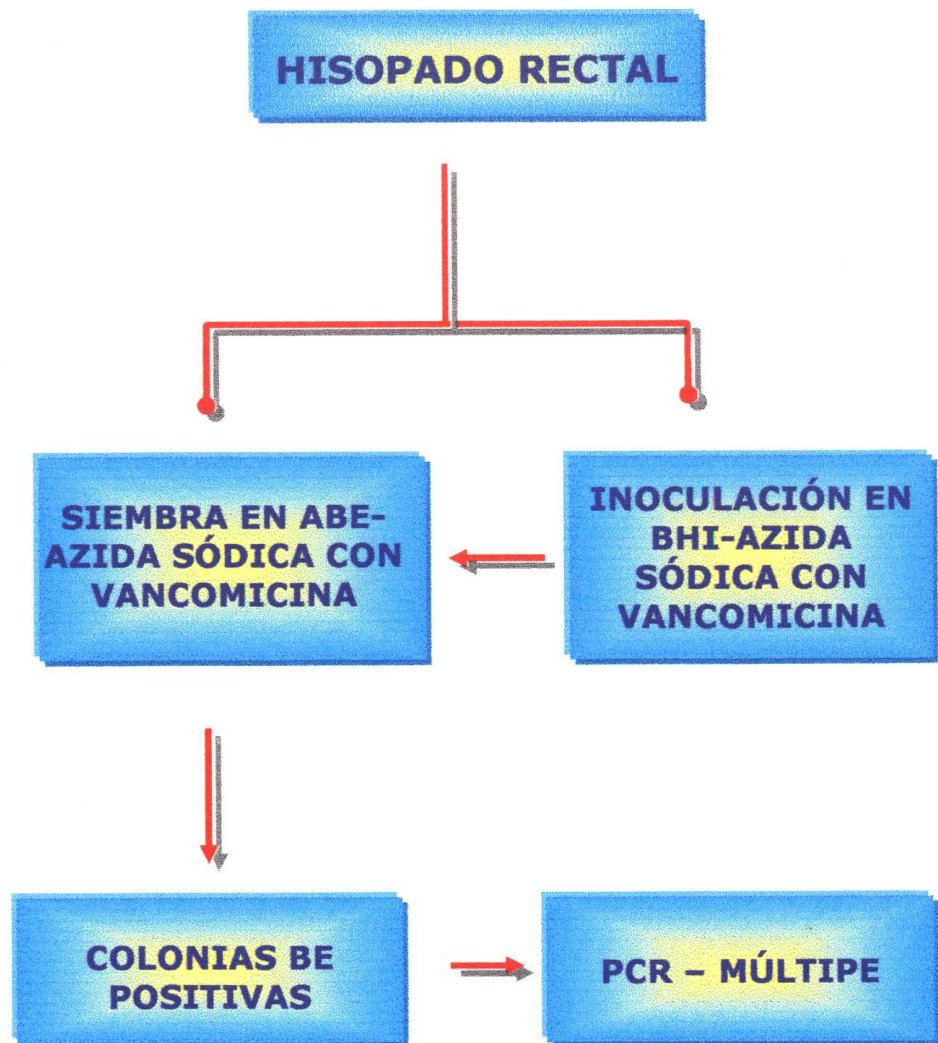
Las variables cualitativas se muestran en porcentajes. Las diferencias en la distribución de la sensibilidad a los antibióticos según hospital, tipo de germen y tipo de muestra se presentan en tablas de contingencia y se contrastó su independencia mediante la prueba Chi-cuadrado o la corrección exacta de Fisher cuando fuera necesario. Se estimó la fuerza de la asociación con el cálculo de odds ratios (OR) y sus correspondientes intervalos de confianza al 95% (IC95%).

El nivel de significación estadística se estableció para una  $p < 0.05$ . El análisis de los datos se efectuó con el paquete estadístico SPSS, versión 10.0 para Windows (170).

**Figura 4.5 Estudio de la resistencia a gluco péptidos en los aislados de clínicos.**



**Figura 4.6 Estudio de la resistencia a glucopéptidos en los aislados de colonización.**



**Fuente: Tesis doctoral. Material y métodos.  
Elaboración: Propia.**



## **5. RESULTADOS.**

### **5.1 Descripción de la muestra.**

A continuación se detallará el estudio descriptivo de la muestra estudiada.

#### **5.1.1 Distribución según origen de la muestra.**

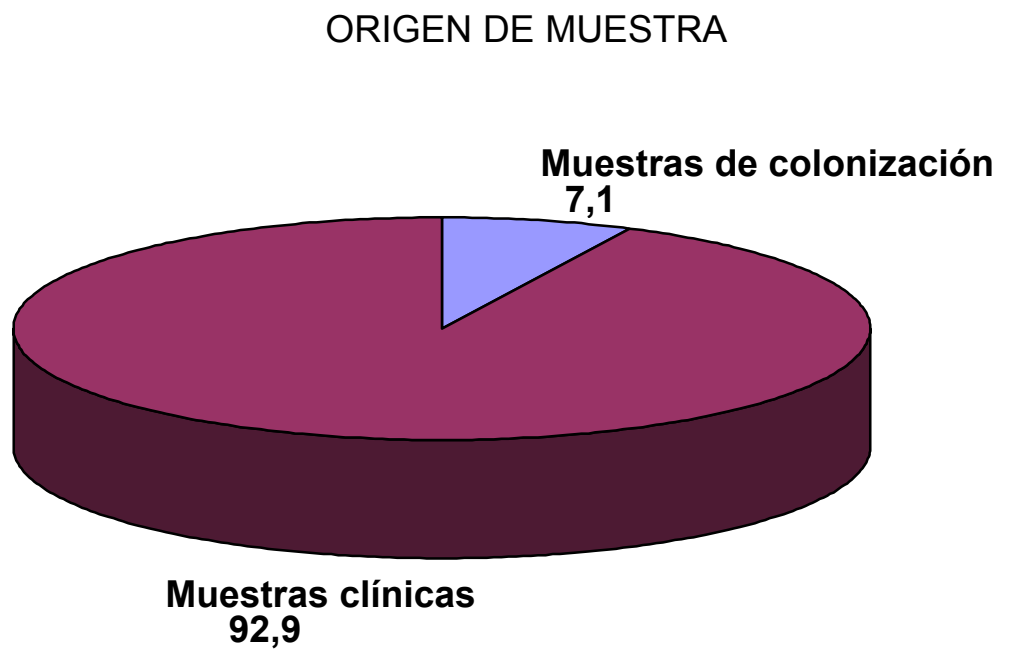
Entre el primero de Abril y el 30 de Noviembre de 2000, se recibieron un total de 437 aislados. De ellos, 406 (92,9%) procedían de muestras clínicas y 31 (7,1%) de muestras de colonización (Figura 5.1.1)

#### **5.1.2 Distribución según origen de la muestra y hospital.**

De los 406 aislados procedentes de muestras clínicas, 99 (24,4%) procedían del HUC, 120 (29,5%) del HUNSC, 141 (34,7%) del HUN y 46 (11,3%) del HUI. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.2 y en la Figura 5.1.2. Todos los aislados de colonización procedían de pacientes de la Unidad de Hemodiálisis del HUNSC.



**Figura 5.1.1 Distribución según origen de muestra.**



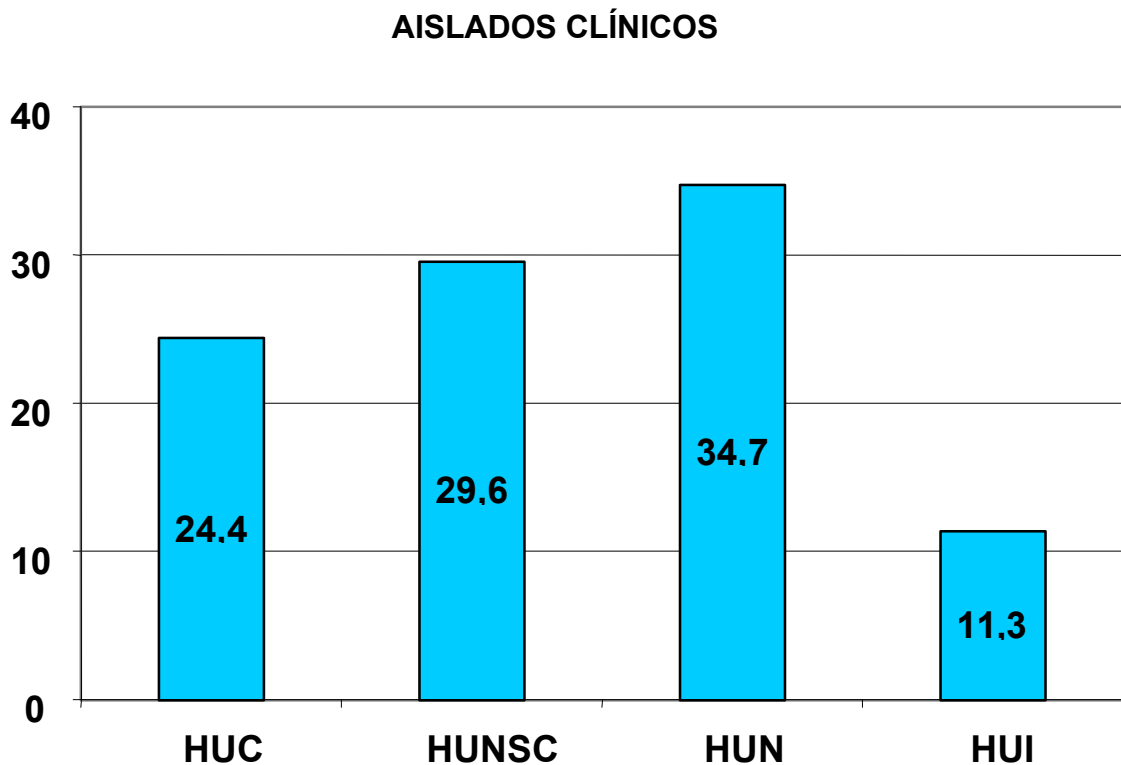
**Fuente:** Tesis doctoral. Base de datos.

**Elaboración:** Propia.

**Tabla 5.1.2 Distribución de los aislados clínicos según hospital de origen.**

| TIPO DE AGENTE Y HOSPITAL DE ORIGEN |                   |            |
|-------------------------------------|-------------------|------------|
|                                     | Aislados clínicos |            |
|                                     | Recuento          | Porcentaje |
| HUC                                 | 99                | 24,4%      |
| HUNSC                               | 120               | 29,6%      |
| HUN                                 | 141               | 34,7%      |
| HUI                                 | 46                | 11,3%      |
| Total de tabla                      | 406               | 100,0%     |

**Figura 5.1.2 Distribución de los aislados clínicos según hospital de origen.**



Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: Propia.

### **5.1.3 Distribución de los aislados clínicos según tipo de muestra.**

De los 406 aislados clínicos, 42,6% procedían de orina, 29,1% de pus y heridas, 11,3% de sangre, 7,1% de muestras de catéter, 4,4% de líquidos corporales, y 3,2% de otras muestras (Tabla y Figura 5.3.1). Los 31 aislados clínicos de colonización procedían de muestras de hisopado rectal.

### **5.1.4 Distribución de los aislados clínicos según especies y hospital de origen.**

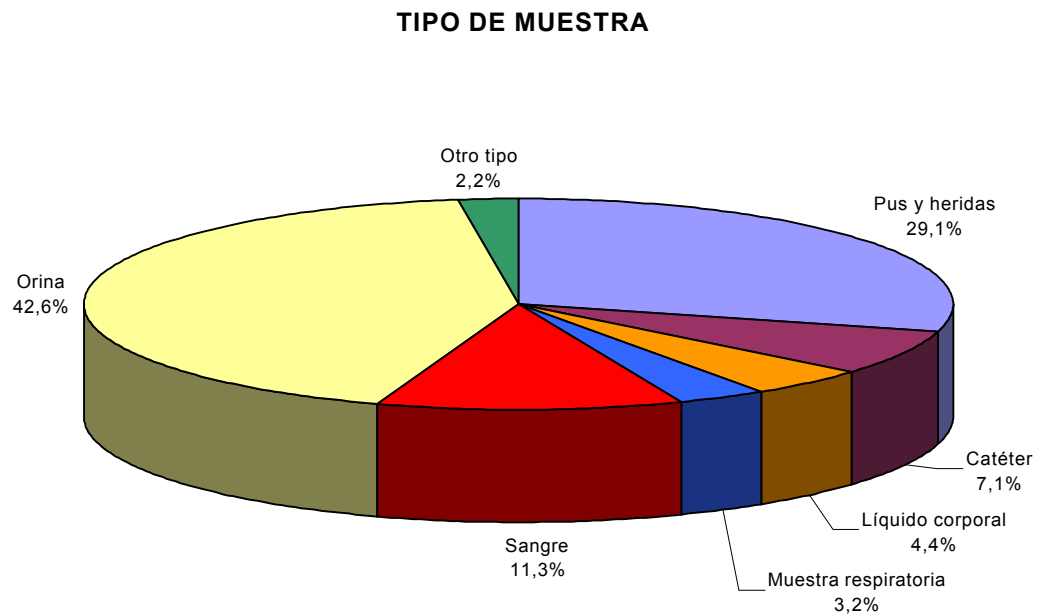
De los 406 aislados clínicos, 358 (88,2%) pertenecían a la especie *E. faecalis*, 40 (9,9%) a *E. faecium* y 8 (2%) a otras especies (4 *E. avium*, 2 *E. durans* y 2 *E. gallinarum*). La distribución por especies según los hospitales de origen fue la siguiente: en el HUC el 89,9% de los aislados (44) pertenecían a *E. faecalis*, y el 10,1% (10) a *E. faecium*. Del HUNSC el 80,0% de los aislados (96) pertenecían a *E. faecalis*, el 14,1% (17) a *E. faecium* y el 5,9% (7) a otras especies (3 *E. avium*, 2 *E. durans* y 2 *E. gallinarum*). En el HUC el 93,6% de los aislados (132)

**Tabla 5.1.3 Distribución de los aislados clínicos según tipo de muestra**

| TIPO DE MUESTRA      |            |               |
|----------------------|------------|---------------|
|                      | Recuento   | Porcentaje    |
| Pus y heridas        | 118        | 29,1%         |
| Catéter              | 29         | 7,1%          |
| Líquido corporal     | 18         | 4,4%          |
| Muestra respiratoria | 13         | 3,2%          |
| Sangre               | 46         | 11,3%         |
| Orina                | 173        | 42,6%         |
| Otro tipo            | 9          | 2,2%          |
| <b>Total</b>         | <b>406</b> | <b>100,0%</b> |

**Figura 5.1.3 Distribución según tipo de muestra.**

Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: Propia.



pertenecían a *E. faecalis* y el 6,4% (9) a *E. faecium* . En el HUI el 89,1% de los aislados (41) pertenecían a *E. faecalis*, el 8,7% (4) a *E. faecium* y el 2,2% a otras especies (1 *E. avium*). Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.4 y en la Figura 5.1.4.

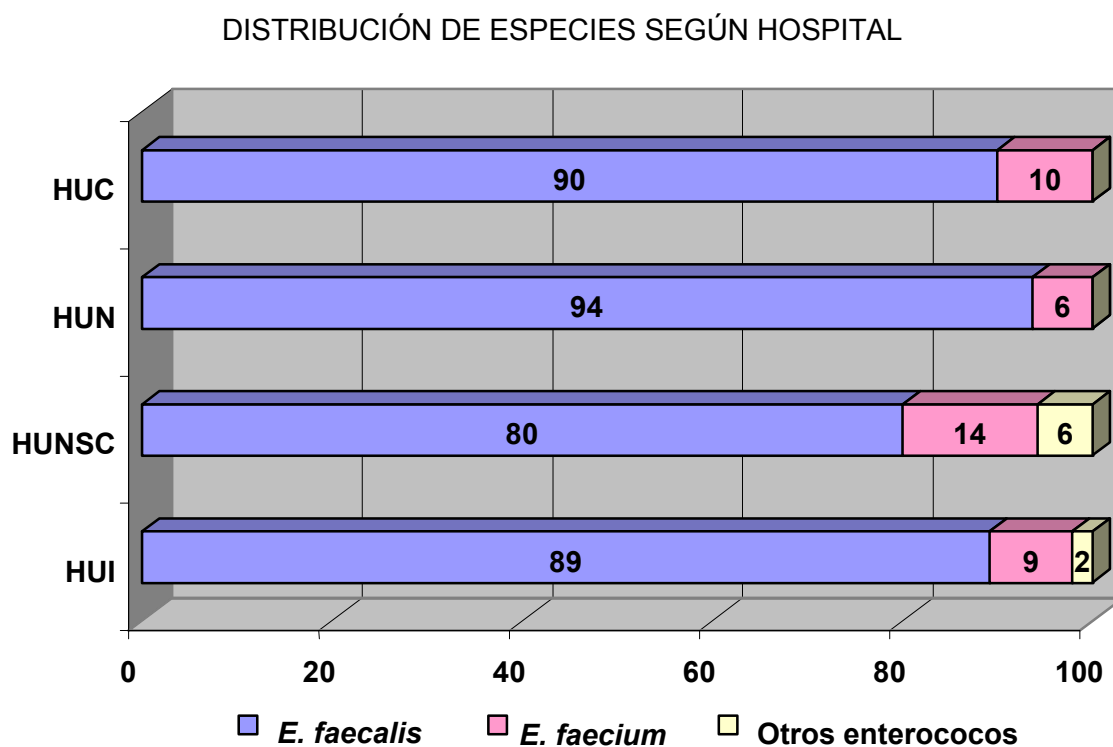
### **5.1.5 Sensibilidad a antibióticos de los aislados clínicos según especies y hospital de origen.**

Del total de 406 aislados clínicos, se realizó antibiograma en 331 aislados (81,5%). Los 75 aislados restantes (18,5%), provenían de muestras de orina del Hospital Dr. Negrín, a los cuáles no se informó el antibiograma sino que se sugirió “tratamiento con ampicilina ó amoxicilina, salvo en pacientes alérgicos a las mismas”. A continuación se detallan los resultados de sensibilidad a distintos antibióticos de los aislados sometidos a prueba, así como la distribución por especies y hospital de origen. Se realizó la comparación estadística entre los resultados obtenidos para cada antibiótico entre los distintos hospitales, excluyendo al HUI debido al pequeño tamaño muestral.

**Tabla 5.1.4 Distribución por especies y hospital de origen de los aislados clínicos.**

| DISTRIBUCIÓN POR ESPECIES Y HOSPITAL DE ORIGEN |             |        |            |        |                  |        |                |        |
|--|-------------|--------|------------|--------|------------------|--------|----------------|--------|
|  | E. faecalis |        | E. faecium |        | Otros enterococs |        | Total de tabla |        |
|  | Recuento    | %/fila | Recuento   | %/fila | Recuento         | %/fila | Recuento       | %/fila |
| HUC  | 89          | 89,9%  | 10         | 10,1%  |                  |        | 99             | 100,0% |
| HUNSC  | 96          | 80,0%  | 17         | 14,2%  | 7                | 5,8%   | 120            | 100,0% |
| HUN  | 132         | 93,6%  | 9          | 6,4%   |                  |        | 141            | 100,0% |
| HUI  | 41          | 89,1%  | 4          | 8,7%   | 1                | 2,2%   | 46             | 100,0% |
| Total de tabla                                 | 358         | 88,2%  | 40         | 9,9%   | 8                | 2,0%   | 406            | 100,0% |

**Figura 5.1.4 Distribución por especies y hospital de origen de los aislados clínicos.**



Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: Propia.

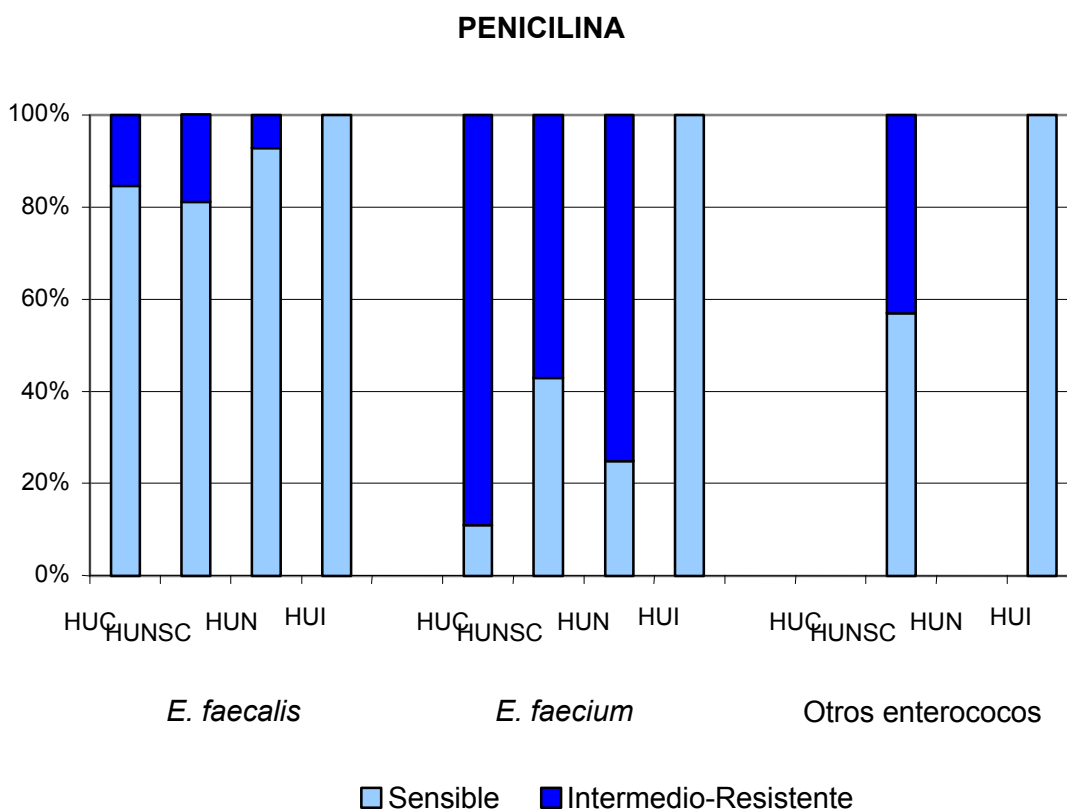
### 5.1.5a Sensibilidad a penicilina.

Del total de 406 aislados clínicos, se realizó la prueba de sensibilidad a penicilina en 280 aislados (68.9%). De los 237 aislados de *E. faecalis* a los que se les realizó la prueba (66,2% del total de *E. faecalis*), el mayor porcentaje de resistencia se presentó en el HUNSC (18,8% de los aislados probados), seguido del 15,4% y del 7,1% correspondientes a los HUC y HUN respectivamente . Todos los aislados de *E. faecalis* probados en el HUI (23 aislados) se mostraron sensibles a penicilina. De los 35 aislados de *E. faecium* a los que se les realizó la prueba ( 84,6% del total de *E. faecium*), el mayor porcentaje de resistencia se presentó en el HUC (88,9% de los aislados probados), seguido del 75,0% y del 57,1% de los HUN y HUNSC respectivamente. Todos los aislados de *E. faecium* probados en el HUI (4) fueron sensibles a penicilina. De los 8 aislados probados de otras especies de enterococos (100% del total), 3 de los probados en el HUNSC (42,9%) presentaron resistencia y el único aislado probado en el HUI fue sensible a penicilina. Las diferencias encontradas fueron sólo porcentuales, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre los Hospitales en lo que se refiere a la respuesta a éste antibiótico. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.5a y Figura 5.1.5a .

**Tabla 5.1.5a Sensibilidad a penicilina.**

| PENICILINA         |                    |        |       |       |                   |        |       |       |                   |        |        |       |
|--------------------|--------------------|--------|-------|-------|-------------------|--------|-------|-------|-------------------|--------|--------|-------|
| HOSPITAL DE ORIGEN | <i>E. faecalis</i> |        |       |       | <i>E. faecium</i> |        |       |       | Otros enterococos |        |        |       |
|                    | S                  |        | I-R   |       | S                 |        | I-R   |       | S                 |        | I-R    |       |
| HUC                | 66                 | 84,6%  | 12    | 15,4% | 1                 | 11,1%  | 8     | 88,9% | 4                 | 57,1%  | 3      | 42,9% |
| HUNSC              | 65                 | 81,3%  | 15    | 18,8% | 6                 | 42,9%  | 8     | 57,1% | 4                 | 57,1%  | 3      | 42,9% |
| HUN                | 52                 | 92,9%  | 4     | 7,1%  | 2                 | 25,0%  | 6     | 75,0% |                   |        |        |       |
| HUI                | 23                 | 100,0% |       |       | 4                 | 100,0% |       |       | 1                 | 100,0% |        |       |
| TOTAL              | 206                | 86,9%  | 31    | 13,1% | 13                | 35,1%  | 24    | 64,9% | 5                 | 62,5%  | 3      | 37,5% |
| Nº PRUEBAS         | 237                |        | 66,2% |       | 35                |        | 84,6% |       | 8                 |        | 100,0% |       |

**Figura 5.1.5a Sensibilidad a penicilina.**



Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: propia.



Entre los aislados resistentes a penicilina, 7 tuvieron una CMI  $\geq 64$   $\mu\text{g/ml}$ , todos pertenecientes a la especie *E. faecium* procedentes del HU y ello representa el 77,8% del total de *E. faecium* probados en ese hospital.

#### **5.1.5b Sensibilidad a ampicilina.**

Se probó la respuesta a ampicilina en 305 aislados clínicos (75% del total). De los 262 aislados de *E. faecalis* a los que se les realizó la prueba (73,2% del total de *E. faecalis*), sólo un aislado (1,1%) de los 87 probados en el HUC presentó resistencia a ampicilina. De los 37 aislados de *E. faecium* a los que se les realizó la prueba (92,5% del total de *E. faecium*), el mayor porcentaje de resistencia se presentó entre los aislados del HUC (90%), seguido del 60,0% y del 37,5% de los HNSC y HUN respectivamente. Todos los aislados de *E. faecium* probados en el HUI (4) se mostraron sensibles. De las otras especies de enterococos se probaron 6 aislados (75.0% del total) mostrando resistencia 2 de los 5 aislados probados en el HUNSC (40%) mientras que un único aislado probado en el HUI se mostró sensible (100%). Estas diferencias fueron de tipo porcentual, excepto entre el HUC y el HUN entre los

cuáles se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,043$ ) en la respuesta de los aislados de *E. faecium* a éste antibiótico. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.5b y en la Figura 5.1.5b. Entre los aislados resistentes a ampicilina, ninguno mostró alto grado de resistencia ( $\text{CMI} \geq 64 \mu\text{g/ml}$ ).

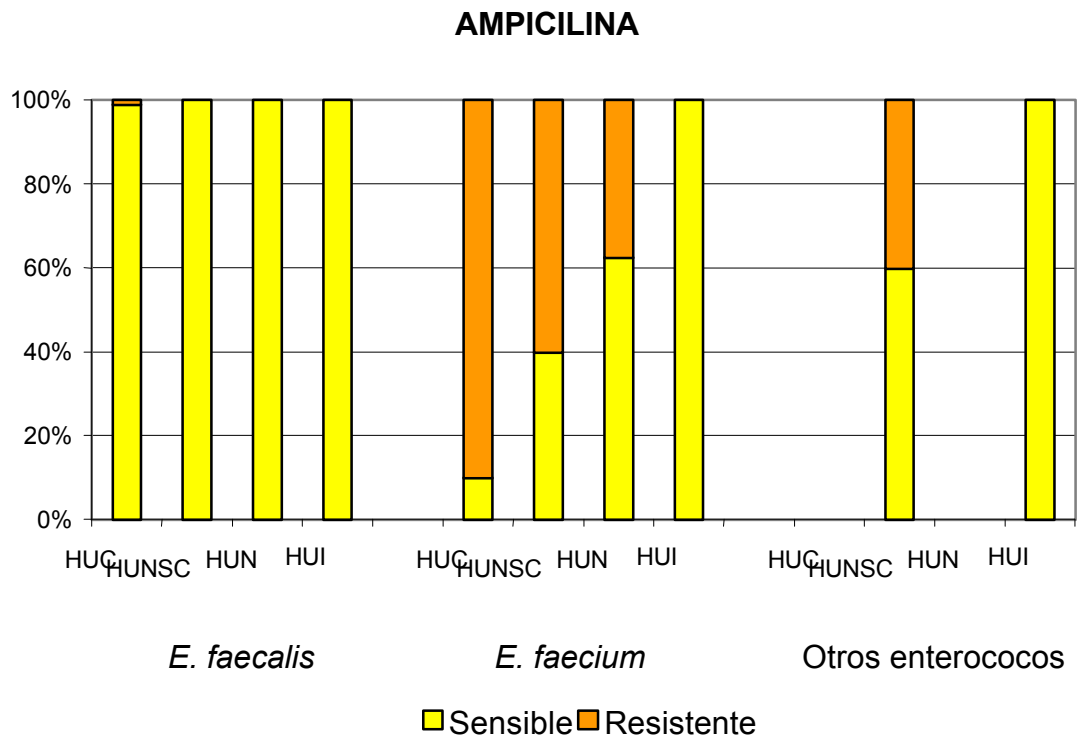
### **5.1.5c Sensibilidad a alto nivel de gentamicina.**

Se probaron 225 aislados clínicos, lo cuál representa el 55,4% del total. De los 198 aislados de *E. faecalis* en los que se realizó la prueba (55,3% del total de *E. faecalis*), los mayores porcentajes de resistencia a alto nivel de gentamicina se presentaron en el HUI (58,3%) y en el HUC (44,7%), seguidos de 31,1% y de 19,6% del HUNSC y del HUN respectivamente. De los 26 aislados de *E. faecium* probados (65% del total de *E. faecium*) sólo un aislado del HUN (14,3% de los probados en éste hospital) presentó resistencia a alto nivel de gentamicina. En el HUI no se probó ningún aislado de *E. faecium* frente a alto nivel de gentamicina. Se probó sólo un aislado de las otras especies (12,5% del total de otras especies) en el HUNSC y resultó sensible. Estas diferencias fueron de tipo porcentual, excepto entre el HUC y el HUN, entre los cuáles se encontró una diferencia estadísticamente

**Tabla 5.1.5b Sensibilidad a ampicilina.**

| HOSPITAL DE ORIGEN | AMPICILINA         |        |       |      |                   |        |       |       |                   |        |       |
|--------------------|--------------------|--------|-------|------|-------------------|--------|-------|-------|-------------------|--------|-------|
|                    | <i>E. faecalis</i> |        |       |      | <i>E. faecium</i> |        |       |       | Otros enterococos |        |       |
|                    | S                  |        | I-R   |      | S                 |        | I-R   |       | S                 | I-R    |       |
| HUC                | 86                 | 98,9%  | 1     | 1,1% | 1                 | 10,0%  | 9     | 90,0% |                   |        |       |
| HUNSC              | 78                 | 100,0% |       |      | 6                 | 40,0%  | 9     | 60,0% | 3                 | 60,0%  |       |
| HUN                | 57                 | 100,0% |       |      | 5                 | 62,5%  | 3     | 37,5% |                   |        |       |
| HUI                | 40                 | 100,0% |       |      | 4                 | 100,0% |       |       | 1                 | 100,0% |       |
| TOTAL              | 261                | 99,6%  | 1     | 0,4% | 16                | 43,2%  | 21    | 56,8% | 4                 | 0,7%   |       |
| Nº PRUEBAS         | 262                |        | 73,2% |      | 37                |        | 92,5% |       | 6                 |        | 75,0% |

**Figura 5.1.5b Sensibilidad a ampicilina.**



Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: Propia.

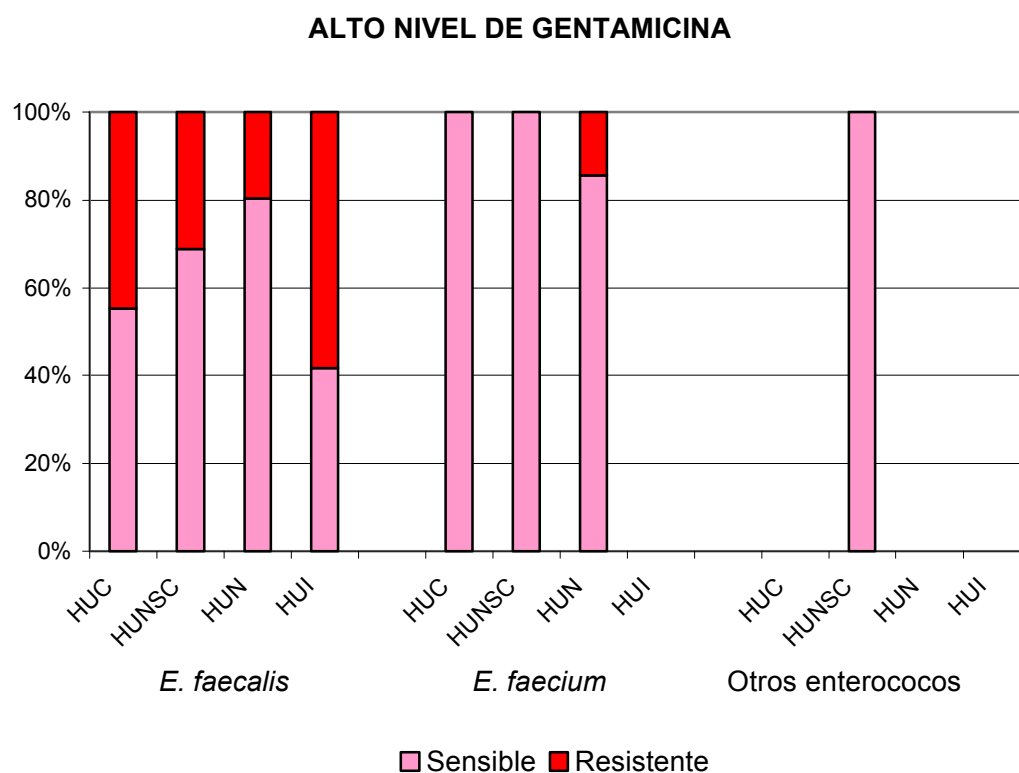
### 5.1.5d Sensibilidad a alto nivel de estreptomicina.

Del total de aislados clínicos se probaron 223 (54,9%). De los 196 aislados de *E. faecalis* a los que se les realizó la prueba (54,8% del total de *E. faecalis*), se presentó resistencia en todos los hospitales, correspondiendo el mayor porcentaje al HUI dónde el 63,6% de los aislados probados resultó resistente, seguido por el 53,3% del HUNSC, el 51,8% del HUC y el 40% del HUN. Se probaron 26 aislados de *E. faecium* ( 65,0% del total de *E. faecium*), de los cuáles mostraron resistencia el 57,1% de los probados en el HUN, el 44,4% de los probados en el HUC y el 20,0% de los probados en el HUNSC. En el HUI no se probó ningún aislado de *E. faecium* frente a alto nivel de estreptomicina. Se probó sólo un aislado de las otras especies (12,5% del total de otras especies) en el HUNSC, que se mostró sensible. Estas diferencias fueron de tipo porcentual sin que se encontraran

**Tabla 5.1.5c Sensibilidad a alto nivel de gentamicina.**

| ALTO NIVEL DE GENTAMICINA |                    |       |       |       |                   |        |       |       |                  |        |       |
|---------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------------------|--------|-------|-------|------------------|--------|-------|
| HOSPITAL DE ORIGEN        | <i>E. faecalis</i> |       |       |       | <i>E. faecium</i> |        |       |       | Otros enterococs |        |       |
|                           | S                  |       | I-R   |       | S                 |        | I-R   |       | S                | I-R    |       |
| HUC                       | 47                 | 55,3% | 38    | 44,7% | 9                 | 100,0% |       |       |                  |        |       |
| HUNSC                     | 31                 | 68,9% | 14    | 31,1% | 10                | 100,0% |       |       |                  |        |       |
| HUN                       | 45                 | 80,4% | 11    | 19,6% | 6                 | 85,7%  | 1     | 14,3% | 1                | 100,0% |       |
| HUI                       | 5                  | 41,7% | 7     | 58,3% |                   |        |       |       |                  |        |       |
| TOTAL                     | 128                | 64,6% | 70    | 35,4% | 25                | 96,2%  | 1     | 3,8%  | 1                | 100,0% |       |
| Nº PRUEBAS                | 198                |       | 55,3% |       | 26                |        | 65,0% |       | 1                |        | 12,5% |

**Figura 5.1.5c Sensibilidad a alto nivel de gentamicina.**



Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: Propia.

diferencias estadísticamente significativas entre los hospitales. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.5d y en la Figura 5.1.5d.

#### **5.1.5e Sensibilidad a alto nivel de gentamicina y a alto nivel de estreptomina.**

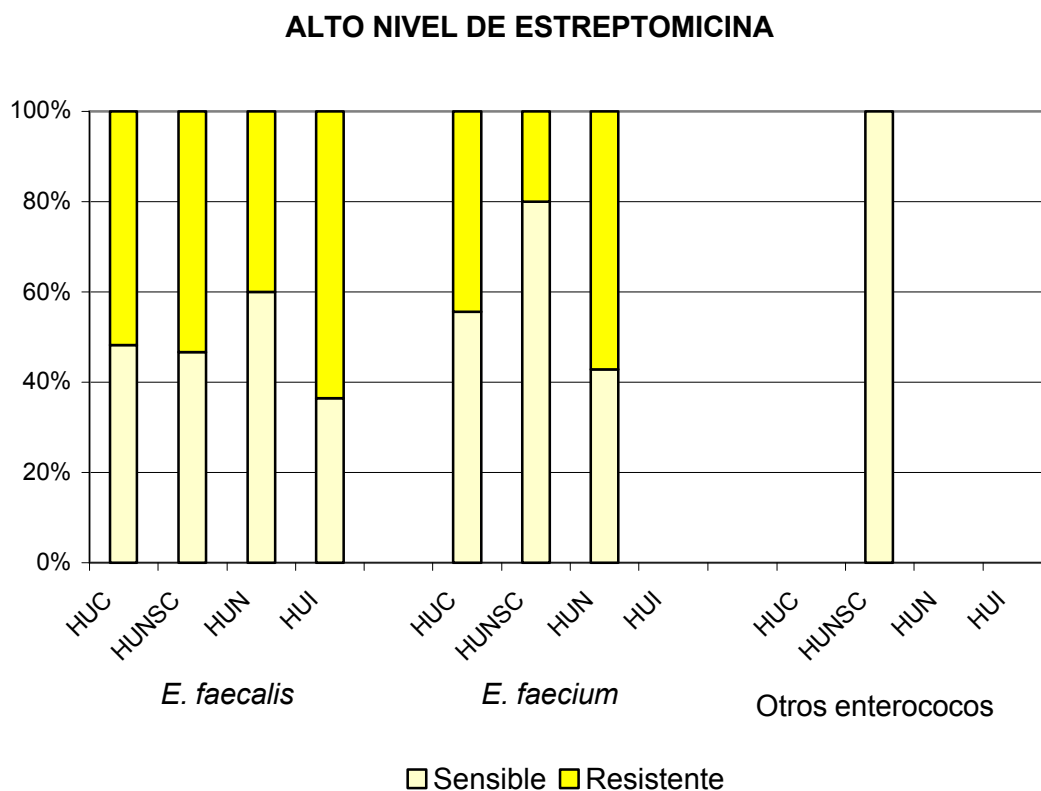
Del total de los aislados clínicos, en 165 (40,64%) se probó conjuntamente la sensibilidad a alto nivel de gentamicina y de estreptomina.

Del total de *E. faecalis* se realizó conjuntamente la prueba de sensibilidad a alto nivel de gentamicina y a alto nivel de estreptomina en 149 aislados (41,6% del total de *E. faecalis*). De ellos resultó resistente a ámbos antibióticos el 47,7% (31 aislados) de los *E. faecalis* probados en el HUC, el 39,4% (13 aislados) de los probados en el HUNSC, el 22,5% (9 aislados) de los probados en el HUN y el 63,3% (7 aislados) de los probados en el HUI. Del total de *E. faecium* se realizaron conjuntamente ambas pruebas 15 aislados (37,5% del total de *E. faecium*), de los cuáles el 100% resultó sensible a ambos antibióticos (5 aislados del HUC, 8 del HUNSC y 2 del HUN ). De las otras especies, se probó sólo un

**Tabla 5.1.5d Sensibilidad a alto nivel de estreptomicina.**

| ALTO NIVEL DE ESTREPTOMICINA |                    |       |       |       |                   |       |       |       |                   |        |  |
|------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------------------|-------|-------|-------|-------------------|--------|--|
| HOSPITAL DE ORIGEN           | <i>E. faecalis</i> |       |       |       | <i>E. faecium</i> |       |       |       | Otros enterococos |        |  |
|                              | S                  |       | I-R   |       | S                 |       | I-R   |       | S                 | I-R    |  |
| HCI                          | 41                 | 48,2% | 44    | 51,8% | 5                 | 55,6% | 4     | 44,4% |                   |        |  |
| HUNSC                        | 21                 | 46,7% | 24    | 53,3% | 8                 | 80,0% | 2     | 20,0% |                   |        |  |
| HUN                          | 33                 | 60,0% | 22    | 40,0% | 3                 | 42,9% | 4     | 57,1% | 1                 | 100,0% |  |
| HUI                          | 4                  | 36,4% | 7     | 63,6% |                   |       |       |       |                   |        |  |
| TOTAL                        | 99                 | 50,5% | 97    | 49,5% | 16                | 61,5% | 10    | 38,5% | 1                 | 100,0% |  |
| Nº PRUEBAS                   | 196                |       | 54,8% |       | 26                |       | 65,0% |       | 1                 | 12,5%  |  |

**Figura 5.1.5d Sensibilidad a alto nivel de estreptomicina.**



Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: Propia.

aislado (12,5% del total de otras especies) del HUNSC y que resultó sensible a ambos antibióticos. Estas diferencias fueron de tipo porcentual, excepto entre el HUC y el HUN entre los cuáles se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,013$ ) en las respuesta de los aislados de *E. faecalis* a éstos antibióticos. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.5e y en la Figura 5.1.5e.

#### **5.1.5f Sensibilidad a ampicilina, alto nivel de gentamicina y alto nivel de estreptomicina.**

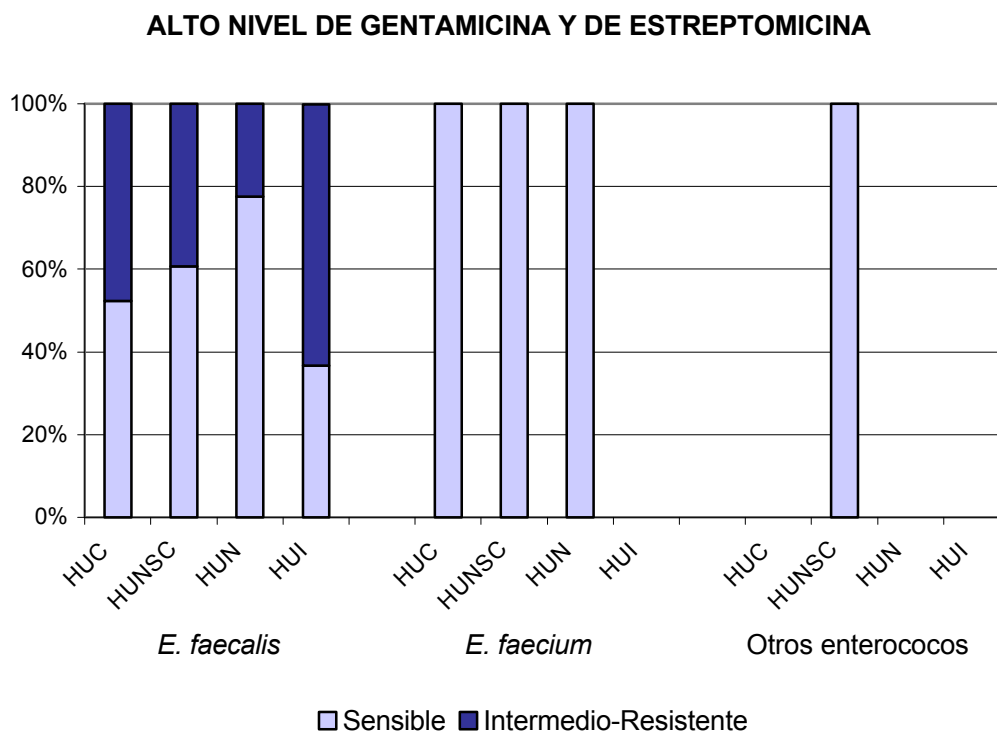
De 97 aislados probados para ampicilina, alto nivel de gentamicina y alto nivel de estreptomicina (23,8% del total de aislados clínicos) sólo un aislado de *E. faecalis* (1,0%) procedente del HUC mostró resistencia simultánea a ampicilina, a alto nivel de gentamicina y a alto nivel de estreptomicina . Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.5f y en la Figura 5.1.5f.



**Tabla 5.1.5e Sensibilidad a alto nivel de gentamicina y alto nivel de estreptomina.**

| ALTO NIVEL DE GENTAMICINA Y DE ESTREPTOMICINA |                    |       |     |       |                   |        |     |  |                   |        |       |  |   |  |       |  |
|---|--------------------|-------|-----|-------|-------------------|--------|-----|--|-------------------|--------|-------|--|---|--|-------|--|
| HOSPITAL DE ORIGEN                            | <i>E. faecalis</i> |       |     |       | <i>E. faecium</i> |        |     |  | Otros enterococos |        |       |  |   |  |       |  |
|   | S                  |       | I-R |       | S                 |        | I-R |  | S                 | I-R    |       |  |   |  |       |  |
| HUC   | 34                 | 52,3% | 31  | 47,7% | 5                 | 100,0% |     |  | 1                 | 100,0% |       |  |   |  |       |  |
| HUNSC   | 20                 | 60,6% | 13  | 39,4% | 8                 | 100,0% |     |  |                   |        |       |  |   |  |       |  |
| HUN   | 31                 | 77,5% | 9   | 22,5% | 2                 | 100,0% |     |  |                   |        |       |  |   |  |       |  |
| HUI   | 4                  | 36,6% | 7   | 63,3% |                   |        |     |  |                   |        |       |  |   |  |       |  |
| TOTAL   | 89                 | 40,3% | 60  | 40,3% | 15                | 100,0% |     |  | 1                 | 100,0% |       |  |   |  |       |  |
| Nº PRUEBAS                                    | 149                |       |     |       | 41,6%             |        |     |  | 15                |        | 37,5% |  | 1 |  | 12,5% |  |

**Figura 5.1.5e Sensibilidad a alto nivel de gentamicina y alto nivel de estreptomina.**

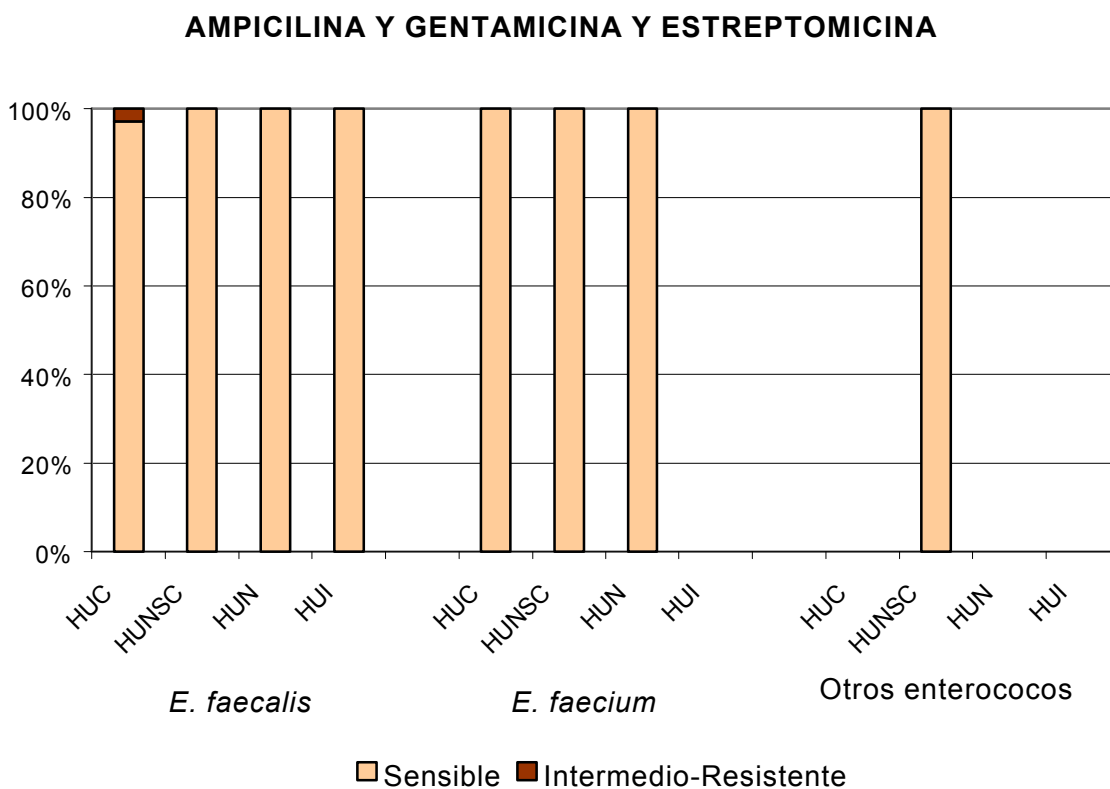


Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: Propia.

**Tabla 5.1.5f Sensibilidad a ampicilina, alto nivel de gentamicina y de estreptomina.**

| AMPICILINA Y GENTAMICINA Y ESTREPTOMICINA |                    |        |                   |        |                   |        |       |  |   |  |       |  |
|---|--------------------|--------|-------------------|--------|-------------------|--------|-------|--|---|--|-------|--|
| HOSPITAL DE ORIGEN                        | <i>E. faecalis</i> |        | <i>E. faecium</i> |        | Otros enterococos |        |       |  |   |  |       |  |
|   | S                  | I-R    | S                 | I-R    | S                 | I-R    |       |  |   |  |       |  |
| HUC                                       | 33                 | 97,1%  | 1                 | 2,9%   | 1                 | 100,0% |       |  |   |  |       |  |
| HUNSC                                     | 20                 | 100,0% | 4                 | 100,0% | 1                 | 100,0% |       |  |   |  |       |  |
| HUN                                       | 31                 | 100,0% | 2                 | 100,0% |                   |        |       |  |   |  |       |  |
| HUI                                       | 4                  | 100,0% |                   |        |                   |        |       |  |   |  |       |  |
| TOTAL                                     | 88                 | 98,9%  | 1                 | 1,1%   | 7                 | 100,0% |       |  |   |  |       |  |
| Nº PRUEBAS                                | 89                 |        | 24,9%             |        | 7                 |        | 17,5% |  | 1 |  | 12,5% |  |

**Figura 5.1.5f Sensibilidad a ampicilina, alto nivel de gentamicina y de estreptomina.**



Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.

Elaboración: Propia.

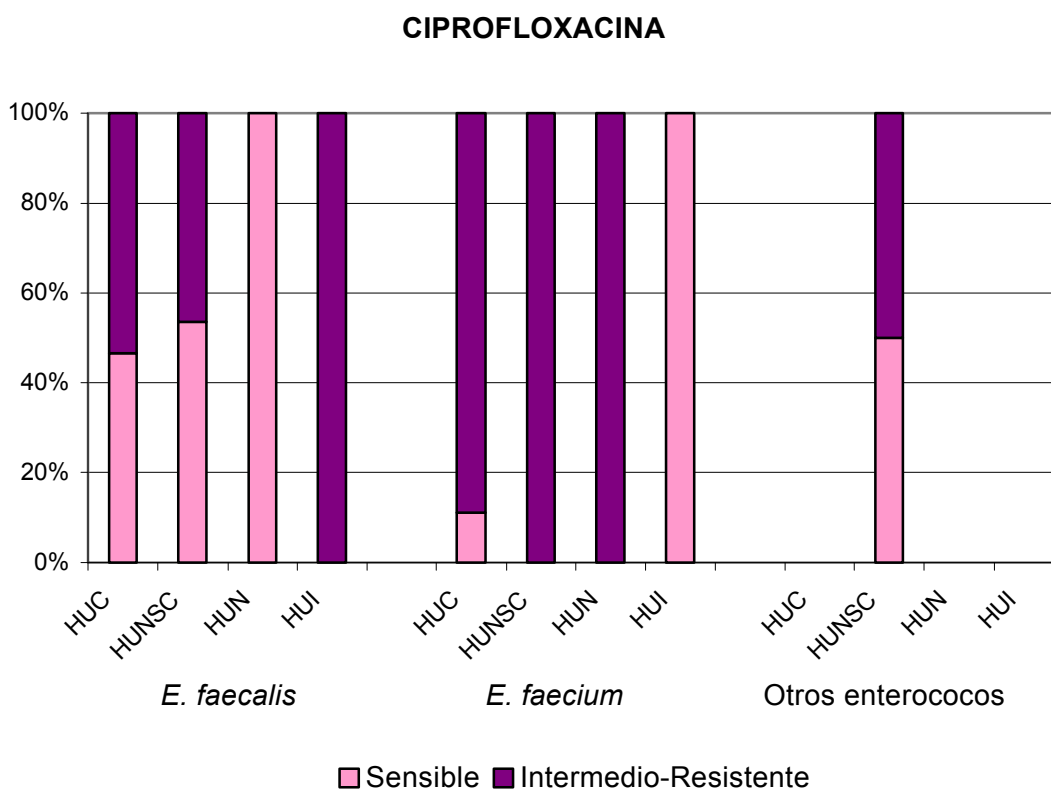
### 5.1.5g Sensibilidad a ciprofloxacina.

Esta prueba se realizó en 136 aislados clínicos (33,5% del total). De los 120 aislados de *E. faecalis* probados (33,5% del total de aislados de *E. faecalis*) el 100% de los aislados probados en el HUI (4) mostró sensibilidad intermedia ó resistente, frente al 53,6% de los probados en el HUC y el 46,4% del HUNSC . Todos los aislados probados en el HUN (3) se mostraron sensibles a ciprofloxacina. De los 14 aislados probados de *E. faecium* (35.0% del total de *E. faecium*), el 100% de los aislados probados en el HUNSC y en el HUN (3 y 1 respectivamente) mostraron sensibilidad intermedia ó resistencia a ciprofloxacina, así como el 88,9% de los probados en el HUC (8 aislados). De las otras especies se probaron 2 aislados (25% del total de otras especies), ambos del HUNSC y uno de ellos (50%) mostró sensibilidad intermedia ó resistencia a ciprofloxacina. Estas diferencias fueron de tipo porcentual, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.5g y en la Figura 5.1.5g.

**Tabla 5.1.5g Sensibilidad a ciprofloxacina.**

| CIPROFLOXACINA     |                    |        |       |        |                   |        |       |        |                   |       |       |  |
|--------------------|--------------------|--------|-------|--------|-------------------|--------|-------|--------|-------------------|-------|-------|--|
| HOSPITAL DE ORIGEN | <i>E. faecalis</i> |        |       |        | <i>E. faecium</i> |        |       |        | Otros enterococos |       |       |  |
|                    | S                  |        | I-R   |        | S                 |        | I-R   |        | S                 | I-R   |       |  |
| HUC                | 40                 | 46,5%  | 46    | 53,5%  | 1                 | 11,1%  | 8     | 88,9%  |                   |       |       |  |
| HUNSC              | 15                 | 53,6%  | 13    | 46,4%  |                   |        | 3     | 100,0% | 1                 | 50,0% |       |  |
| HUN                | 3                  | 100,0% |       |        |                   |        | 1     | 100,0% |                   |       |       |  |
| HUI                |                    |        | 3     | 100,0% | 1                 | 100,0% |       |        |                   |       |       |  |
| TOTAL              | 58                 | 48,3%  | 62    | 51,6%  | 2                 | 14,3%  | 12    | 85,7%  | 1                 | 50,0% |       |  |
| N° PRUEBAS         | 120                |        | 33,5% |        | 14                |        | 35,0% |        | 2                 |       | 25,0% |  |

**Figura 5.1.5g Sensibilidad a Ciprofloxacina.**



Fuente: Tesis doctoral. Base de datos.  
Elaboración: Propia.



### **5.1.6 Producción de $\beta$ -lactamasa.**

Durante el período de estudio la prueba de  $\beta$ -lactamasa sólo se realizó en el HUN. De 28 aislados probados (6,9% del total de aislados con significación clínica), 23 aislados correspondían a *E. faecalis* (82.14%) y 5 (17,8%) a *E. faecium*, resultando todos ellos negativos para ésta prueba.

### **5.2 Fenotipo de los aislados clínicos [Detección de la resistencia a vancomicina según métodos automatizados y de crecimiento en ABE sin y con vancomicina ( 6 $\mu$ g /ml)].**

Del total de 406 aislados clínicos recibidos, 405 fueron identificados como cepas de enterococos sensibles a vancomicina (0,5-4  $\mu$ g /ml) y a teicoplanina (4-8  $\mu$ g /ml) por los métodos automatizados utilizados en los respectivos hospitales de origen. El aislado restante correspondiente a la cepa UIE-478 fue identificado por éstos métodos como *E. faecalis* resistente a vancomicina ( $\geq 32$   $\mu$ g/ml) y a teicoplanina ( $\geq 32$   $\mu$ g/ml ).

De éstos 406 aislados, el 100% creció a las 24 horas de incubación en ABE sin vancomicina y dos crecieron en ABE con vancomicina (6 µg/ml): *E. faecalis* UIE-478 previamente identificado como resistente a vancomicina y teicoplanina por los métodos automatizados ya mencionados, y además el aislado UIE-470 identificado por los métodos automatizados como *E. faecium* sensible a vancomicina (0,5 µg/ml) y teicoplanina (4 µg/ml). Tabla 5.2.

### **5.3 Genotipo de los aislados clínicos.**

Los resultados del estudio genotípico se describen a continuación.

#### **5.3.1 DNA obtenido por extracción rápida.**

Utilizando el protocolo de extracción de DNA de lisis por calor se obtuvo un buen DNA diana para la amplificación por PCR, dando lugar a cantidades apropiadas de los fragmentos de PCR esperados, comparables a las obtenidas al utilizar otros métodos de extracción más complicados, costosos y que consumen más tiempo, como por ejemplo la extracción con equipos comerciales previo tratamiento enzimático con lisozima y lisostafina (ver IV Material y métodos).

**Tabla 5.2 Fenotipo de los aislados clínicos [Detección de la resistencia a vancomicina según métodos automatizados y de crecimiento en ABE sin y con vancomicina ( 6 µg /ml)].**

| <b>Fenotipo</b>             |  |                                    |   |
|-----------------------------|--|------------------------------------|---|
|                             | <b>M é t o d o s<br/>automatizados</b> | <b>A B E S I N<br/>vancomicina</b> | <b>ABE con vancomicina<br/>(6µg/ml)</b> |
| <b>Aislados sensibles</b>   | <b>405</b>                             | <b>406</b>                         | -                                       |
| <b>Aislados resistentes</b> | <b>1*</b>                              | -                                  | <b>2**</b>                              |

- *E. faecalis* UIE-478.
- *E. faecalis* UIE-478 y *E. faecium* UIE-470.

**Fuente:** Tesis doctoral. Resultados experimentales.  
**Elaboración:** Propia.

### 5.3.2 Fragmentos de DNA obtenidos a través de PCRs.

A continuación se describe el resultado de las PCRs utilizadas.

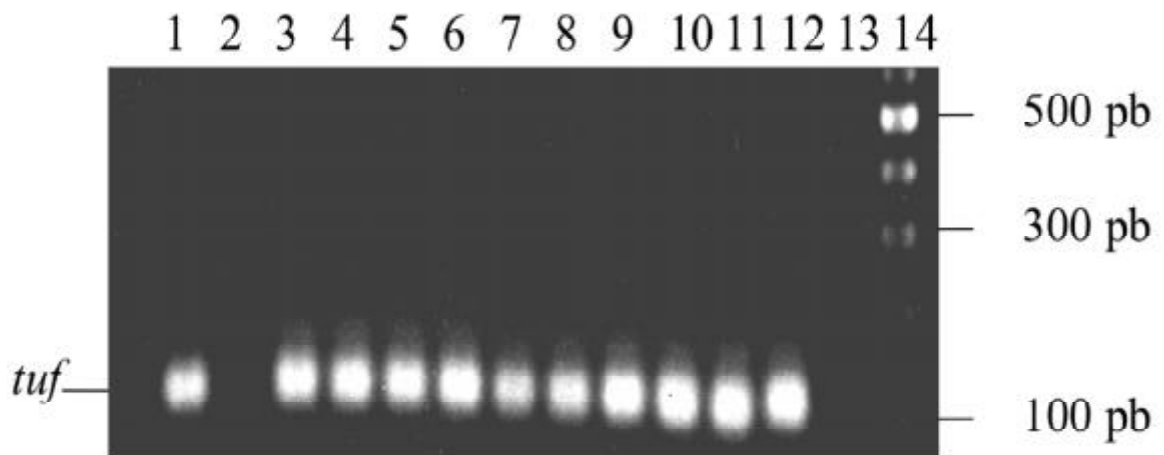
#### 5.3.2a PCR para la identificación a nivel de género.

Utilizamos en primer lugar el protocolo descrito por Ke y cols (128) según el cuál se amplifica un fragmento del gen *tuf* de 112 pares de bases, que codifica para un factor de elongación específico del género *Enterococcus* ( Figura 5.3.2a).

Este fragmento amplificó al utilizar DNA de la cepa de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 (lFigura 5.3.2a, línea 1) así como en las cepas de referencia *E. gallinarum* BM 4174 *vanC1* (línea 3), *E. faecium* BM 4174 *vanA* (línea 4), *E. faecalis* V 583 *vanB* (línea 5), *E. casseliflavus* ATCC 25788 *vanC2/C3* (línea 6), así como en diversos aislados clínicos correspondientes a distintas especies de *Enterococcus* (Líneas de 9 a 12 ). Por el contrario, este fragmento no amplificó al utilizar DNA de la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 29213 (Línea 2), ni de aislados clínicos de *S. agalactiae* ATCC 13813 ni de *S. anginosus* ATCC 33397 (resultados no mostrados). No se obtuvo ninguna banda de amplificación en el tubo control sin DNA (línea 11).



**Figura 5.3.2a Gel de electroforesis de los fragmentos de DNA obtenidos a través de la PCR para la identificación a nivel de género *Enterococcus*.**



**Figura 5.3.2a Gel de electroforesis de los fragmentos de DNA generados a través de la PCR para la identificación a nivel de género *Enterococcus*. Línea 1 *E. faecalis* ATCC 29212; 2, *S. aureus*; 3, *E. gallinarum* BM4174 (*vanC1*); 4, *E. faecium* BM 4147 (*vanA*); 5 *E. faecalis* V583 (*vanB*); 6, *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*vanC2/C3*); 7, *E. faecalis* UIE-31; 8, *E. faecalis* UIE-45; 9, *E. faecium* UIE-72; 10, *E. faecalis* UIE-77; 11, *E. faecalis* UIE-105; 12, *E. faecalis* UIE-107; 13, Control sin DNA; 14, marcador de peso molecular XIV, (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).**

Fuente: Tesis doctoral. Resultados experimentales.

Elaboración: Propia.

### **5.3.2b PCR para la identificación de los genotipos de resistencia a glucopeptidos.**

En segundo lugar, se puso igualmente a punto la PCR descrita por Dutka-Malen y cols. (127), en la cuál se amplifican los cuatro fragmentos que corresponden a los cuatro genotipos de resistencia más frecuentes: *vanA* (732 pb), *vanB* (635 pb), *vanC1* (822 pb) y *vanC2/3* (439 pb). (Figura 5.3.2b).

Utilizando ésta PCR se obtuvieron los fragmentos esperados para la cepas de referencia *E. gallinarum* BM 4174 *vanC1* (Figura 5.3.2b, línea 1), *E. faecium* BM 4174 *vanA* (línea 2), *E. faecalis* V 583 *vanB* (línea 3), *E. casseliflavus* ATCC 25788 *vanC2/C3* (línea 4), mientras que no se obtuvo ningún fragmento cuando se utilizó DNA de las cepas de referencia *E. faecalis* ATCC 29212 sensible a vancomicina (línea 5), *S. aureus* ATCC 29213 (línea 6) ni de varios aislados clínicos de distintas especies de *Enterococcus* (líneas 7, 8, 9, 12 y 14). Se muestran además fragmentos específicos de varios genotipos de resistencia obtenidos a partir del DNA de varios aislados clínicos (línea 10, *vanA*; líneas 11 y 12, *vanC1*). No se obtuvo ninguna banda de amplificación en el tubo control sin DNA (línea 15).

### 5.3.2b Gel de electroforesis de los fragmentos de DNA obtenidos a través de la PCR para la identificación a nivel de genotipos de resistencia a gluco péptidos.

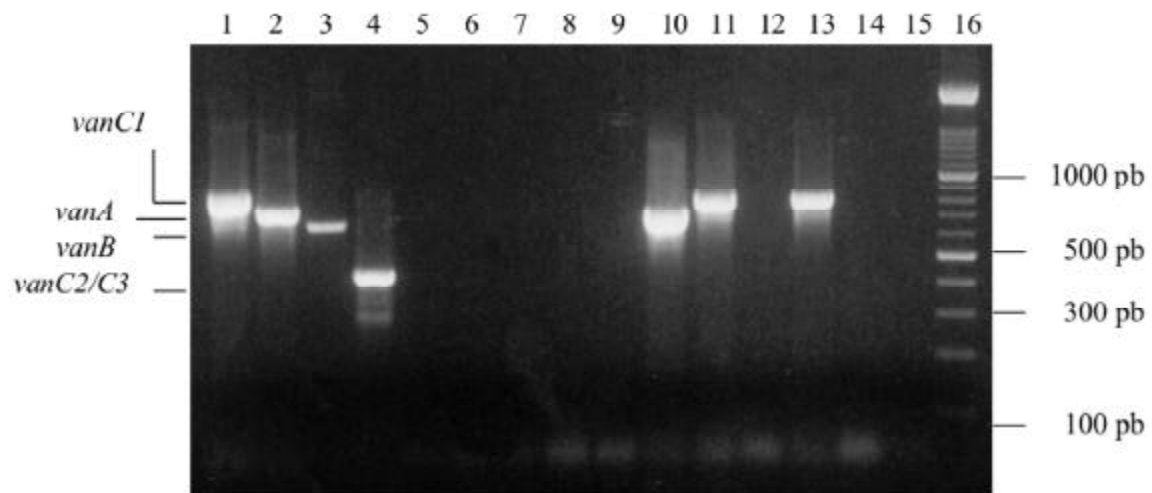


Figura 5.3.2b. Gel de electroforesis de los fragmentos de DNA generados a través de la PCR para la identificación a nivel de genotipo de resistencia a gluco péptidos. Línea 1, *E. gallinarum* BM4174 (*vanC1*); 2, *E. faecium* BM 4147 (*vanA*); 3 *E. faecalis* V583 (*vanB*); 4, *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*van C2/C3*); 5, *E. faecalis* ATCC 29212; 6, *S. aureus* ATCC 29213 (control negativo); 7, *E. faecium* UIE-486; 8, *E. faecium* UIE-218; 9, *E. durans* UIE-226; 10 *E. faecalis* UIE-478 (*vanA*); 11, *E. faecium* UIE-298 (*vanC1*); 12 *E. avium* UIE-533; 13, *E. species* UIE-470 (*vanC1*); 14, *E. faecalis* UIE-196; 15 Control sin DNA; 14, marcador de peso molecular XIV, (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Fuente: Tesis doctoral. Resultados experimentales.

Elaboración: Propia.

### **5.3.2c PCR-Múltiple para la rápida identificación de ERV.**

En tercer lugar, se desarrolló una PCR-Múltiple (167) en la cuál se amplifica de forma conjunta parte del fragmento del gen *tuf* específico de género y parte de los cuatro fragmentos *van* específicos de los cuatro genotipos de resistencia ya mencionados. Para optimizar esta PCR-Múltiple se probaron distintas condiciones de reacción, con el fin de asegurar que todas las secuencias diana amplificaran apropiadamente, así como evitar la presencia de amplificaciones inespecíficas. Las condiciones ensayadas se refirieron al volumen de suspensión de DNA utilizado, temperatura de anillamiento, concentración de los cebadores y tiempo de extensión.

Las condiciones finales adoptadas y que permitieron los óptimos resultados se describen en la sección de Material y métodos.

A través de esta PCR-Múltiple y al utilizar DNA tanto de las cepas de referencia con genotipo resistente (*vanA*, *vanB*, *vanC1* y *van C2/C3*)y sensible ya señaladas, como de varios aislados clínicos de distintas especies de *Enterococcus spp* (Figura 5.3.2c) se obtuvo una banda de 112 pb correspondiente a parte del gen *tuf*

### Figura 5.3.2c Estudio de los aislados clínicos a través de PCR-Múltiple.

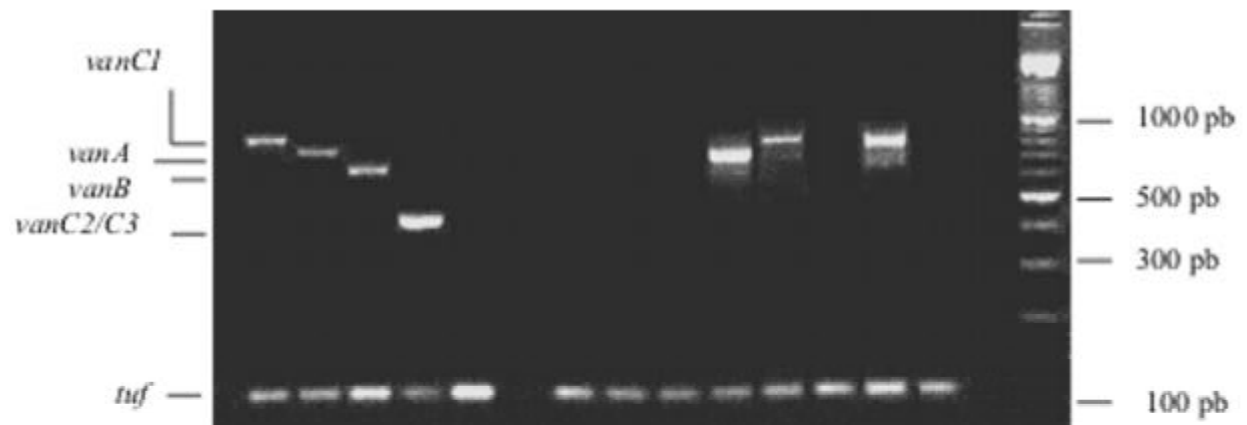


Figura 5.3.2c. Gel de electroforesis de los fragmentos de DNA generados a través de la PCR para la identificación a nivel de género *Enterococcus* y de genotipo de resistencia a gluco péptidos (PCRM). Línea 1, *E. gallinarum* BM4174 (*vanC1*); 2, *E. faecium* BM 4147 (*vanA*); 3 *E. faecalis* V583 (*vanB*); 4, *E. casseliflavus* ATCC 25788 (*van C2/C3*); 5, *E. faecalis* ATCC 29212; 6, *S. aureus* ATCC 29213 (control negativo); 7, *E. faecium* UIE-486; 8, *E. faecium* UIE-218; 9, *E. durans* UIE-226; 10 *E. faecalis* UIE-478 (*vanA*); 11, *E. faecium* UIE-298 (*vanC1*); 12 *E. avium* UIE-533; 13, *E. species* UIE-470 (*vanC1*); 14, *E. faecalis* UIE-196; 15 Control sin DNA; 14, marcador de peso molecular XIV, (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Fuente: Tesis doctoral. Resultados experimentales.

Elaboración: Propia.

específico de éste género (Figura 5.3.2c, líneas de 1 a 5 y 7 a 14). Al estudiar los 406 aislados clínicos incluidos en este estudio a través de la PCR-Múltiple, todos ellos amplificaron el fragmento de 112 PB correspondiente a parte del gen *tuf*, específico del género *Enterococcus*. Además, tres aislados amplificaron fragmentos específicos de genotipo de resistencia (línea 10, *E. faecalis* UIE-478 *vanA*, línea 11 *E. faecium* UIE-298 *vanC1* y línea 13 *E. species* UIE-470 *vanC1*) (Tabla 5.3.2c). No se encontró ningún genotipo *vanB*.

#### **5.4 Características de los aislados clínicos ERV.**

##### **5.4.1 Origen de aislamiento y sensibilidad a otros antibióticos.**

El aislado *E. faecalis* UIE-478 (*vanA*), procedía de una muestra de sangre de una paciente diagnosticada de cáncer de mama y hospitalizada en el Servicio de Hematología del HUNSC por haber recibido un trasplante de células madre. La paciente había sido tratada con vancomicina por siete días y a la dosis de 1 mg./día. Este aislado presentó, sensibilidad a penicilina (2 µg/ml), ampicilina (0,5 µg/ml), imipenem ( $\leq 1\mu\text{g/ml}$ ) y resistencia a vancomicina ( $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ) y a teicoplanina ( $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ) (métodos automatizados).

**Tabla 5.3.2c Estudio de los aislados clínicos a través de PCR-Múltiple.**

| PCR          |                          |                         |
|--------------|--------------------------|-------------------------|
| PCR-Múltiple | Fragmento gen <i>tuf</i> | Genotipo de resistencia |
| Nº aislados  | 406                      | 3*                      |

\* *E. faecalis* UIE-478 genotipo *vanA*, *E. faecium* UIE-470 genotipo *vanC1* y *Enterococcus species* UIE-298 genotipo *vanC1*.

Fuente: Tesis doctoral. Resultados experimentales.  
Elaboración: Propia.

Se probó por el método de dilución en agar (166) frente a alto nivel de gentamicina y de estreptomicina, resultando sensible a ambos. Después de recibir tratamiento alternativo, la paciente fue dada de alta.

El aislado *E. gallinarum* UIE-470 (*vanC1*), procedía de un exudado de absceso (pus y heridas) de un paciente hospitalizado en la Unidad de Rehabilitación del HUNSC. Presentó resistencia a penicilina (R), a ampicilina (R), y sensibilidad (S) a vancomicina y teicoplanina (por métodos automatizados),

El aislado *E. gallinarum* UIE-298 (*vanC1*), procedía de un exudado ótico (pus y heridas) de un paciente hospitalizado en la Unidad de Neonatos del HUNSC y presentó resistencia a penicilina (R), a ampicilina (R), y sensibilidad (S) a vancomicina y teicoplanina (por métodos automatizados).

#### **5.4.2 Confirmación de la identificación a través de pruebas bioquímicas.**

A través de pruebas bioquímicas la identificación obtenida de los aislados ERV fue la siguiente (Tabla 5.4.2):



**Tabla 5.4.2 Aislados ERV. Identificación por pruebas bioquímicas.**

| <b>IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA</b> |                                    |                           |
|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
|                                  | Especie* y genotipo**              | Identificación bioquímica |
| UIE-478                          | <i>E. faecalis vanA</i>            | <i>E. faecalis</i>        |
| UIE-470                          | <i>E. faecium vanC1</i>            | <i>E.gallinarum</i>       |
| UIE-298                          | <i>Enterococcus especies vanC1</i> | <i>E. gallinarum</i>      |

**\*Identificación de especies a través de métodos automatizados.**

**\*\*Identificación de genotipo a través de PCR-Múltiple.**

**Fuente:** Tesis doctoral. Resultados experimentales.  
**Elaboración:** Propia.

- ◆ el aislado *E. faecalis* UIE-478 ( genotipo *vanA*): confirmado como *E. faecalis*.
  
- ◆ el aislado *E. faecium* UIE-470 (genotipo *vanC1*): identificado como *E. gallinarum*.
  
- ◆ el aislado *Enterococcus especies* UIE-298 (genotipo *vanC1*): identificado como *E. gallinarum*.

#### **5.4.3 Determinación de la CMI a antibióticos glucopéptidos a través del método de dilución en agar.**

Utilizando el método de la dilución en agar (166), se determinó la CMI a vancomicina y teicoplanina en cada uno de los aislados identificados como ERV a través de la PCR-Múltiple, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 5.4.3):

**Tabla 5.4.3 Aislados ERV. Determinación de la CMI a través del método de dilución en agar.**

| <b>CMI a través del método de dilución en agar</b> |  |   |
|--|--|---|
|  | <b>CMI a vancomicina<br/>(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> | <b>CMI a teicoplanina<br/>(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b> |
| <i>E. faecalis</i> UIE-478( <i>van A</i> )         | 128  | 128   |
| <i>E. gallinarum</i> UIE-470<br>( <i>vanC1</i> )   | 8  | 1   |
| <i>E. gallinarum</i> UIE-298<br>( <i>vanC1</i> )   | 0,5  | 4   |

**Fuente:** Tesis doctoral. Resultados experimentales.  
**Elaboración:** Propia.

◆el aislado *E. faecalis* UIE-478 (*vanA*):  
presentó una CMI de 128  $\mu\text{g/ml}$  tanto para  
vancomicina como para teicoplanina.

◆el aislado *E. gallinarum* UIE-470 (*vanC1*):  
presentó una CMI para vancomicina de 8  $\mu\text{g/ml}$   
y para teicoplanina de 1  $\mu\text{g/ml}$ .

◆el aislado *E. gallinarum* UIE-298 (*van C1*):  
presentó una CMI para vancomicina de 0.5  
 $\mu\text{g/ml}$  y para teicoplanina de 4  $\mu\text{g/ml}$ .

## **5.5 Fenotipo y genotipo de los aislados de colonización.**

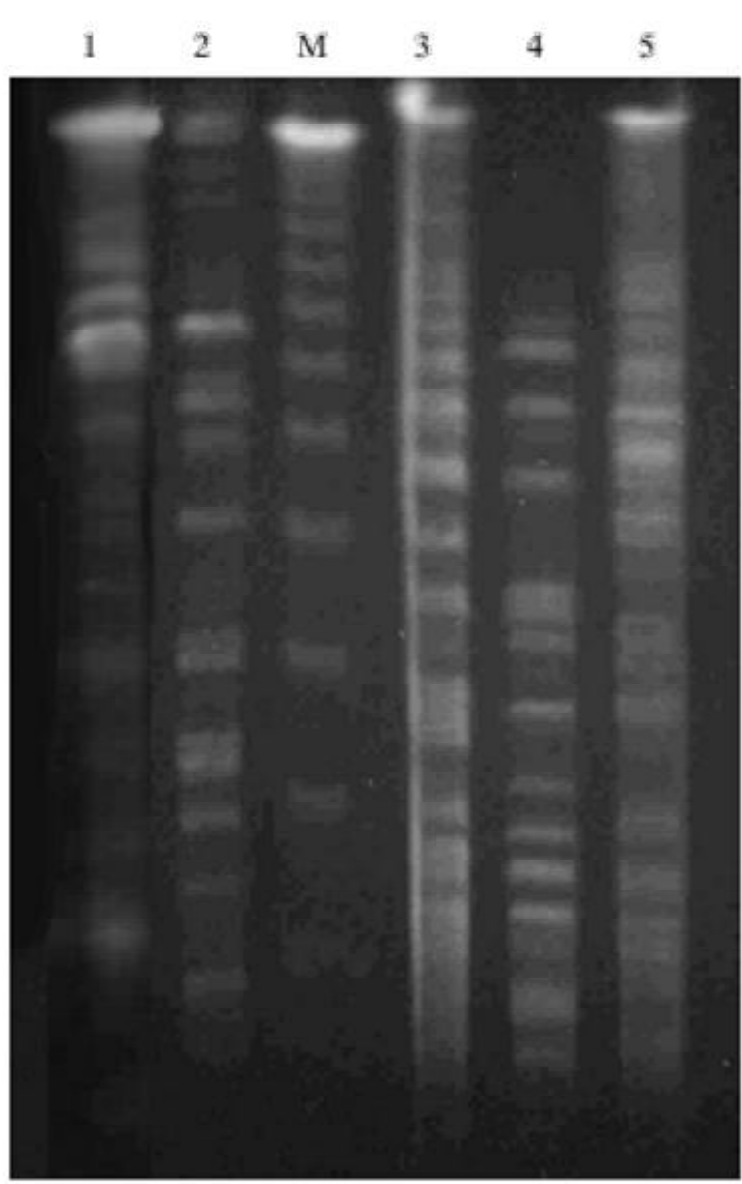
No se aisló ningún ERV a partir de las 31 muestras de hisopado rectal procesadas según el protocolo descrito en Material y métodos.

## **5.6 Relación clonal entre los aislados ERV de genotipo *vanA*.**

Al comparar a través de electroforesis de campo pulsado el aislado de ERV *E. faecalis vanA* (UIE-478) (Figura 5.6, línea 1) encontrado en éste estudio, con el aislado de *E. faecalis vanA* 203325, previamente identificado en el HUN y confirmado a través de PCR-múltiple (línea 2), se observó que pertenecen a clones que no están relacionados (presentan siete ó más bandas de diferencia (142), (Figura 5.6).

Asímismo, al comparar a través de esta técnica los aislados de *E. faecium* de fenotipo *vanA* (322300, 415307, 309302) previamente identificados en el HUN y confirmados a través de PCR-múltiple (Figura 5.6, líneas 3, 4 y 5 respectivamente), se encontró que pertenecen a clones no relacionados (presentan siete ó más bandas de diferencia) (142).

**Figura 5.6 Relación clonal entre los aislados ERV de genotipo *vanA*.**



**Electroforesis de campo pulsado de los aislados ERV. Línea 1, *E. faecalis* UIE-478 (*vanA*); 2, *E. faecalis* 203325 (*vanA*); M, marcador de peso molecular (Fago Lambda); 3, *E. faecium* 322300 (*vanA*); 4, *E. faecium* 415307 (*vanA*); 5, *E. faecium* 309302 (*vanA*).**

Fuente: Tesis doctoral. Resultados experimentales.  
Elaboración: Propia.

### **5.7 Características de los aislados ERV de genotipo vanA previamente identificados en el HUN. Origen de aislamiento y sensibilidad a otros antibióticos.**

A continuación se describen las características de cada uno de los aislados de ERV previamente identificados en el HUN y que se compararon a través de electroforesis de campo pulsado con el aislado de ERV encontrado en este estudio.

***E. faecalis* 203325:** aislado en Febrero de 1998 a partir de una muestra de orina procedente de una paciente hospitalizada en el Servicio de Traumatología del HUN y que presentaba una infección urinaria. Presenta alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina, es moderadamente sensible a ampicilina y a penicilina G, y sensible a alto nivel de aminoglucósidos. La paciente había recibido tratamiento previo con cefalosporinas de tercera generación y posteriormente al aislamiento del ERV recibió tratamiento alternativo y fue dada de alta.

***E. faecium* 415307:** aislado en Julio de 1996 a partir de varias muestras de sangre y de catéter, procedentes de un paciente

ingresado en el Servicio de Oncohematología del hospital de Lanzarote. Presenta alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina, es resistente a ampicilina, penicilina, y alto nivel de gentamicina y estreptomina. El paciente presenta una leucemia y había estado ingresado previamente en el hospital La Paz de Madrid, donde había recibido tratamiento con vancomicina. El paciente muere a las dos semanas después de realizado el aislamiento del ERV.

***E. faecium* 309302:** aislado en Septiembre de 1998 a partir de una muestra de heces (estudio de colonización), procedente de un paciente hospitalizado en el Servicio de Oncohematología. Presenta alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina, es resistente a ampicilina y a penicilina G, y sensible a alto nivel de aminoglucósidos. El paciente presenta una leucemia mieloide aguda, había ingresado para estudio de pretrasplante de médula ósea el 24 de Agosto de 1998. La detección del ERV tiene lugar después de 16 días de ingreso, y habiendo recibido en los 9 días previos tratamiento con ceftazidima.

***E. faecium* 322300:** aislado en Abril de 1999 a partir de una muestra de orina y luego en heces, procedentes de una paciente



hospitalizada en el Servicio de Medicina Interna del HUN. Presenta alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina, es resistente a ampicilina y a penicilina G, y sensible a alto nivel de aminoglucósidos. La paciente había recibido tratamiento previo con vancomicina, posteriormente al aislamiento del ERV recibió tratamiento alternativo y fue dada de alta.



## 6. DISCUSIÓN.

### **6.1 Estudio descriptivo.**

Antes de la identificación de las primeras cepas multi-resistentes a finales de los años setenta, los enterococos eran considerados microorganismos relativamente inocuos. Sin embargo, en las dos últimas décadas los enterococos se han convertido en importantes agentes de infección nosocomial, aumentando tanto su frecuencia como patógenos como su resistencia a los antibióticos de uso común (7).

Actualmente los enterococos son considerados gérmenes de difícil tratamiento, especialmente cuando son causa de infecciones graves.

Hasta donde sabemos, ninguno de los estudios sobre enterococos publicados en Canarias habían incluido aislados procedentes de más de un Hospital y de las dos provincias de la Comunidad (48), (49), (50). Es más, hasta el momento de iniciar éste estudio, no se disponía en Canarias de las técnicas moleculares para el estudio de la resistencia a glucopéptidos en enterococos, ni se había publicado el aislamiento de cepas ERV.

En el presente trabajo, hemos estudiado la prevalencia de aislamientos intrahospitalarios de especies de enterococos, entre el primero de Abril y el treinta de Noviembre de 2000 en los cuatro mayores hospitales de la Comunidad Autónoma de Canarias. Tal como se había planteado en los objetivos, se han analizado algunas características de éstos aislamientos, incluyendo sus patrones de sensibilidad a antibióticos, y se ha investigado la resistencia a gluco péptidos utilizando para ello tanto métodos tradicionales como técnicas de biología molecular, aportando el desarrollo de una nueva PCR- Múltiple.

Se ha recibido una media de 120 aislados por hospital, exceptuando al HUI el cual sólo envió 46 aislados. Teniendo en cuenta que los cuatro hospitales que participaron en el estudio pertenecen al mismo nivel de organización y atienden a un número semejante de habitantes, la baja prevalencia de aislamientos encontrada en el HUI probablemente está subestimada. En un trabajo publicado en Diciembre de 2000 por Martín y cols (50), se presenta la prevalencia de resistencias en 114 cepas de enterococos aislados de muestras clínicas del HUI, seleccionadas al azar entre los aislados de 1998, por lo que es poco probable que durante el período de nueve meses del presente estudio, sólo se hayan aislado las 46 cepas recibidas.

Debido a este pequeño tamaño muestral correspondiente al HUI, las pruebas de significación estadística se han realizado incluyendo sólo a los tres hospitales restantes. En general, estas pruebas se mencionarán en adelante sólo cuando se hayan obtenido diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,005$ ).

La distribución según tipo de muestra de los aislados con significación clínica (Tabla y Figura 5.1.3) coincide con lo ya publicado para éste tipo de gérmenes (53), siendo las infecciones urinarias las más frecuentes (44%). Se sabe que la prevalencia de las infecciones por *Enterococcus* del tracto urinario está aumentando en muchos hospitales (171), (172). Entre los pocos factores de virulencia descritos en enterococos, se encuentra su capacidad de adherirse a las células epiteliales renales y aunque la naturaleza de las estructuras moleculares responsables de ésta capacidad no se conocen bien, existen evidencias de que la adherencia se llevaría a cabo a través de una sustancia de agregación producida en respuesta a feromonas, y que podría contribuir a la habilidad de las cepas productoras para causar infecciones urinarias (7), (173).

En cuanto a la distribución según especies y hospital de origen (Tabla y Figura 5.1.4), predominaron *E. faecalis* (entre

80 y 94%), y *E. faecium* (6 a 14%) mientras que las otras especies (*E. avium*, *E. durans* y *E. gallinarum*) representaron sólo un pequeño porcentaje (2 a 6%), sin que se encontraran aislados de éstas especies ni en el HUC ni en el HUN. Estos datos concuerdan con lo ya descrito en la literatura, donde *E. faecalis* aparece como la especie más representativa causante de procesos infecciosos, tanto hospitalarios como de la comunidad (5), (174), (175). El mayor porcentaje de *E. faecium* se presentó el HUNSC (14%) y el menor en el HUN (6%). Este es un dato importante desde el punto de vista de la terapia y de la vigilancia de la resistencia, ya que en general *E. faecium* presenta mayores problemas de resistencia y particularmente dos de los más problemáticos perfiles de resistencia como son la resistencia a ampicilina y a vancomicina se presentan con mucha mayor frecuencia en *E. faecium* que en *E. faecalis* (176), (177).

Una de las características más importantes de los enterococos es la resistencia que presentan frente a la mayoría de los antibióticos que habitualmente se utilizan para el tratamiento de infecciones producidas por Gram-positivos. Debido a su capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia, los patrones de sensibilidad están sujetos a considerables variaciones tanto temporales como geográficas

(174), (178). A continuación se analizarán los resultados de sensibilidad a antibióticos obtenidos en cada uno de los hospitales participantes, a través de métodos automatizados ó de difusión en disco-placa, cuyo resultado nos ha sido enviado conjuntamente con cada uno de los aislamientos. No todos los aislados han sido probados frente a todos los antibióticos, (las cifras con relación a éste punto se reflejan en cada una de las tablas de resultados) y éste hecho debe ser tenido en cuenta cuando hagamos referencia a estudios de prevalencia realizados tanto en España como en otros países del mundo, y en los cuáles las pruebas de sensibilidad se realizan por igual a todos los aislados, utilizando para ello el método de dilución en agar recomendado por la NCCLS (Doc. M7-A4, 1997), (166). En relación con las especies menos frecuentes, la mayoría de los antibióticos que se comentan a continuación sólo se probaron en uno de los aislados, por lo que no comentaremos estos resultados.

Todos los enterococos, incluyendo aquellas poblaciones que no han sido tratadas con antibióticos, exhiben cierta resistencia a los  $\beta$ -lactámicos. *E. faecalis* es típicamente de 10 a 100 veces menos sensible a la penicilina que la mayoría de los estreptococos, mientras que *E. faecium* es de 4 a 16 veces

menos sensible que *E. faecalis*. La resistencia a la penicilina se debe a la producción de proteínas de unión a las penicilinas (PBP) de baja afinidad, especialmente de PBP5 en *E. faecium* y en *E. faecalis* (6). Debido a ésta resistencia intrínseca a agentes que inhiben la síntesis de la pared celular, la terapia combinada con aminoglucósidos constituye el tratamiento de elección en infecciones graves por enterococos. Pero además de ésta resistencia intrínseca, los enterococos pueden presentar resistencia adquirida a altas concentraciones de  $\beta$ -lactámicos mediante dos mecanismos: la alteración de las PBP ó la producción de  $\beta$ -lactamasas (51). El aumento de la resistencia adquirida a penicilina ó a ampicilina en todo el mundo supone un problema importante, debido a que el efecto bactericida que se logra con la asociación a aminoglucósidos se pierde en presencia de alto nivel de resistencia en cualquiera de estos dos fármacos. Entre los aislados probados en este estudio (69% del total), la resistencia a penicilina ( $\text{CMI} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ ) en *E. faecalis* fue baja (entre el 7,1 y el 18,8%), mientras que entre el 57,1% y el 88,9% de los aislados probados de *E. faecium* presentaron resistencia a éste fármaco (Tabla y Figura 5.1.5a). Esto concuerda con lo comentado anteriormente sobre la menor sensibilidad a penicilina de *E. faecium* con respecto a *E. faecalis*. Aunque ninguno de los aislados probados en el HUI presentó



resistencia a penicilina, datos anteriormente publicados de ese hospital confirman la misma tendencia, con el 1,9% de resistencia a penicilina en *E. faecalis* y el 62,5% en *E. faecium* (50).

Como se ha dicho, los enterococos pueden además presentar alto nivel de resistencia a penicilina ( $\text{CMI} \geq 128 \mu\text{g/ml}$ ), resistencia que hace inefectiva la terapia combinada con aminoglucósidos, y que en *E. faecium* está mediada por alteraciones adicionales de la PBP5 ó bien por la hiperproducción de la misma (179). Si bien no se detectó alto nivel de resistencia a penicilina ( $\text{CMI} \geq 128 \mu\text{g/ml}$ ) en ninguno de los aislados probados, siete aislados de *E. faecium* del HUC presentaron las mas altas CMI a penicilina de todas las informadas.

Al igual que la penicilina, la ampicilina es un antibiótico betalactámico de elección en el tratamiento de la mayoría de las infecciones por enterococos, sólo ó en terapia combinada con algún aminoglucósido. La resistencia a ampicilina se presenta con mayor frecuencia en *E. faecium* que en *E. faecalis* y ello se debe principalmente a la producción de proteínas de unión de baja afinidad (PBP5) (176). Entre los aislados con significación clínica incluidos en éste estudio y probados frente a ampicilina,

sólo un aislado de *E. faecalis* presentó bajo grado de resistencia a ampicilina (CMI  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) entre los probados en el HCU (Tabla y Figura 5.1.5b), mientras que en *E. faecium* la resistencia a ampicilina se situó entre el 37,5% de los aislados probados en el HUN y el 90% de los probados en el HCU, entre los cuáles se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,043$ ). La resistencia a ampicilina en *E. faecium* se ha convertido en un grave problema clínico, ya que con frecuencia su aparición precede a la detección de resistencia a vancomicina (7) y porque se ha visto que en *E. faecium* existe ligamiento genético entre PBP5 y resistencia a vancomicina (180). Este ligamiento parece no ocurrir en *E. faecalis*, lo que explicaría la menor frecuencia de resistencia a vancomicina en ésta especie (6). Por ello constituye un dato preocupante la alta frecuencia de resistencia a ampicilina entre los aislados de *E. faecium* probados en el HUC. Todos los aislados probados del HI fueron sensibles, pero en el estudio de González y cols ya mencionado (50) se informa que mientras el 1,9% de los aislados de *E. faecalis* fue resistente a ampicilina, éste porcentaje se elevó al 50% entre los aislados de *E. faecium*, mostrando por tanto una respuesta similar a la encontrada entre los aislados probados de los otros hospitales en el presente estudio.

La prueba de  $\beta$ -lactamasa se realizó en 28 aislados procedentes de infecciones graves, todos del HUN: 23 aislados de *E. faecalis* y 5 de *E. faecium*, resultando todos negativos. Dado que la mayoría de los enterococos no producen  $\beta$ -lactamasa y que los que lo hacen sólo sintetizan de forma constitutiva una pequeña cantidad de ésta enzima, pueden comportarse como sensibles *in vitro* cuando se utilizan pruebas convencionales de detección. Por ésta razón, los laboratorios deben realizar, como ocurre en éste caso, la prueba de la detección de la  $\beta$ -lactamasa que utiliza un inóculo elevado en todos los aislados de *E. faecalis* procedentes de infecciones graves (NCCLS, Doc M7-A4, 1997), (166). Por último y con relación a éste punto, hay que destacar que se han descrito muy pocas cepas de *E. faecium* productoras de  $\beta$ -lactamasa (6), (181).

Es importante conocer, entre los aislados resistentes a ampicilina, cuál es el grado de resistencia para prever una respuesta a la terapia combinada. Los aislados con bajo grado de resistencia (CMI= 16-32  $\mu$ g/ml) pueden responder al tratamiento con ampicilina y un aminoglucósido si no presentan alto grado de resistencia a aminoglucósidos (AGRA); en cambio, los aislados

con alto grado de resistencia (CMI  $\geq$  a 64  $\mu\text{g/ml}$ ), es improbable que clínicamente respondan a la terapia combinada (181). De los 305 aislados con significación clínica probados para ampicilina, ninguno presentó alto grado de resistencia la misma. De ellos, a 97 se les realizó conjuntamente las pruebas de sensibilidad a ampicilina, gentamicina y estreptomicina (Tabla y Figura 5.1.5f), y sólo un aislado de *E. faecalis* procedente del HUC presentó resistencia a los tres fármacos, por lo que es de suponer que el resto de los probados podría responder a la terapia combinada.

Resumiendo, la resistencia a ampicilina se presentó con mayor frecuencia en *E. faecium*, hecho que se constata en otros estudios (43), (177), presentando el HUC el mayor porcentaje de resistencia en ésta especie y existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre éste hospital y el HUN.

En los enterococos pueden presentarse dos tipos de resistencia a estreptomicina: moderada (MIC entre 62 y 500  $\mu\text{g/ml}$ ) y la resistencia de alto nivel (MIC  $\geq$  a 2000  $\mu\text{g/ml}$ ). La primera es debida a una baja permeabilidad que puede compensarse asociando una penicilina que incrementa la entrada en la célula del aminoglucósido. La segunda puede ser

debida a mutación ribosomal ó bien deberse a la producción mediada por plásmidos de enzimas que inactivan el aminoglucósido, siendo éste último mecanismo el más frecuente en enterococos (182), (183). Los enterococos con alto nivel de resistencia a estreptomicina son relativamente comunes (6), tal como se ha encontrado en éste estudio (55% del total) donde entre el 40 y el 63,6% de los aislados probados en los distintos hospitales de *E. faecalis* y entre el 20 y el 57,1% de *E. faecium* mostraron resistencia a estreptomicina (Tabla y Figura 5.1.5d), sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre hospitales. Aunque en el HUI no se probó ningún aislado de *E. faecium*, en el estudio previo ya mencionado el 50% de las cepas de *E. faecium* fue resistente a alto nivel de estreptomicina (50).

A diferencia de lo que ocurre con la resistencia a alto nivel de estreptomicina, la resistencia a alto nivel de gentamicina (MIC  $\geq$  a 500  $\mu\text{g/ml}$ ) sólo está mediada a través de enzimas que modifican el aminoglucósido, siendo la más frecuente la 6'-acetiltransferasa-2'-fosfotransferasa, que también produce resistencia frente a otros aminoglucósidos de uso clínico como tobramicina, netilmicina, amikacina y kanamicina. Por lo tanto la resistencia a alto nivel de gentamicina es un buen predictor de la

resistencia a otros aminoglucósidos, excepto a la estreptomicina (57). La resistencia a alto nivel de gentamicina en enterococos se ha convertido en un problema sólo a partir de los años ochenta, cuando comenzaron a aumentar los aislamientos de cepas con ésta característica (174). Entre los aislados del presente estudio que se sometieron a prueba en éste estudio (55% del total), la resistencia a alto nivel de gentamicina se presentó entre el 19,6% y el 58,3% en *E. faecalis*, existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,002$ ) entre el HUC y el HUN (Tabla y Figura 5.1.5c). Si bien en el HUI se presentó un alto porcentaje de resistencia, recordemos que éste hospital no se sometió a la prueba comparativa estadística por el bajo número de aislados que aportó al estudio. De los aislados de *E. faecium* sometidos a prueba, sólo presentó alto nivel de resistencia a gentamicina el 14,3% de los probados en el HUN. Aunque en el HUI no se probó ningún aislado de *E. faecium*, en el estudio previo ya mencionado el 12,5% de las cepas de *E. faecium* fue resistentes a alto nivel de gentamicina (50). A la luz de éstos datos puede decirse que en la muestra sometida a ésta prueba, la resistencia a gentamicina es más frecuente en *E. faecalis*, mientras que sólo un bajo porcentaje de los aislados de *E. faecium* probados en el HUN se muestra resistente, lo cual es un dato favorable. Si consideramos conjuntamente ambas

especies en los tres hospitales que enviaron un mayor número de aislados, la resistencia a alto nivel de gentamicina entre los aislados probados oscila entre el 19 y el 40%, situándose dentro de los límites europeos (35).

La resistencia conjunta a alto nivel de gentamicina y estreptomycinina sólo se presentó entre el 22,5 y el 63,5% de los aislados de *E. faecalis* probados en los distintos hospitales (Tabla y Figura 5.1.5e) mientras que todos los aislados de *E. faecium* probados resultaron sensibles. Dado que el sinergismo entre  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos no se produce en presencia de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos, la terapia combinada no sería efectiva en éste grupo de aislados de *E. faecalis*. El fallo en la respuesta clínica y las recaídas posteriores al tratamiento combinado en pacientes con infecciones graves con cepas de enterococos de éstas características es un hecho que se repite cada vez con más frecuencia en los hospitales de todo el mundo (183).

En general, con respecto a la respuesta a alto nivel de aminoglucósidos puede decirse que a pesar de que en términos generales *E. faecium* se considera más resistente a los antibióticos, en la muestra aquí estudiada se observó que la

resistencia de alto nivel a aminoglucósidos fue mayor en *E. faecalis* que en *E. faecium*, sobre todo frente a la estreptomicina, lo cuál coincide con lo publicado en España por otros autores (17), (37), (45), (46), así como en otros lugares del mundo (35), (36).

Aunque entre los antibióticos del grupo de las quinolonas la ciprofloxacina ha presentado en un principio una buena actividad *in vitro*, especialmente en *E. faecium*, se ha observado que cuando se usa en monoterapia induce rápidamente la aparición de resistencia (184). Así, presentaron sensibilidad intermedia (CMI=2 µg/ml) ó resistencia (CMI≥4 µg/ml) frente a ciprofloxacina entre el 46,4 y el 100% de los aislados de *E. faecalis* probados siendo sensibles todos los aislados de ésta especie probados en el HUN, y entre 88,9 y el 100% de los aislados de *E. faecium* probados en los otros hospitales, excepto los del HUI que se mostraron todos sensibles (Tabla y Figura 5.1.5g). Hay que destacar que tanto en el HUI como en el HUN sólo se probaron cuatro aislados frente a éste antibiótico por lo que los resultados tienen poco valor estadístico. La baja respuesta a ciprofloxacina observada en el grupo sometido a prueba probablemente refleja el uso abusivo de este antibiótico



en los últimos años, lo cuál se ha informado previamente en otras series (17), (35), (36), (45).

## **6.2 Estudio de la resistencia a gluco péptidos.**

La aparición y extensión de la resistencia a gluco péptidos en todo el mundo es un tema preocupante que ha dado lugar a numerosos estudios y para el que se han publicado recomendaciones especiales a objeto de prevenir su diseminación (185). Los laboratorios de microbiología juegan un papel importante en esta prevención ya que, a través de la detección rápida y precisa de ERV, constituyen la primera línea de defensa tanto a la hora de establecer el tratamiento apropiado del paciente como de tomar las debidas medidas de control epidemiológico.

Se han realizado diversos trabajos con el fin de conocer la capacidad de detección de ERV de los distintos métodos automatizados. La mayoría han informado sobre la existencia de problemas en la detección de los ERV con genotipo *vanB*, *vanC1* y *vanC2* (123), (186, (187). Es más, casi todos éstos sistemas clasifican *E. gallinarum* como *E. faecium*, creando confusión entre los microbiólogos clínicos a la hora de informar los

resultados (148). Se ha propuesto como un método alternativo en la detección de ERV el uso de placas de agar con vancomicina a distintas concentraciones (188). Si bien el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS,1997), (166), recomienda el uso de placas de agar BHI con vancomicina a 6 ug/ml para confirmar la resistencia a vancomicina en colonias aisladas, hemos utilizado un medio selectivo como el agar bilis esculina que nos permitió la selección de colonias bilis esculina positivas a partir de placas de aislamiento primario ya que estas en algunos casos permanecían almacenadas por varias semanas y presentaban crecimiento de colonias contaminantes. El medio ABE con vancomicina (6 ug/ml) se ha utilizado en diversos estudios de colonización intestinal, obteniéndose buenos resultados (169), (189) y permite tanto el crecimiento de los ERV con alto nivel de resistencia (*vanA* y *vanB*) como los de resistencia de bajo nivel (*vanC*) (48).

Todos los aislados incluidos en el estudio y que habían sido identificados como *Enterococcus* por los sistemas automatizados crecieron a las 24 horas de incubación en ABE sin vancomicina, produciendo el característico oscurecimiento del medio debido a la producción de esculina a partir de la esculina en presencia de bilis. De éstos, 2 crecieron en ABE con vancomicina (UIE-470

y UIE-478) y de ellos sólo el aislado *E. faecalis* (UIE-478) resistente a vancimicina y teicoplanina, fue correctamente identificado por el sistema Vitek-1 (Tabla 5.2). Sin embargo, éste mismo sistema identificó erróneamente como *E. faecium* sensible a vancomicina y teicoplanina el aislado restante (UIE-470), y que en realidad correspondió a una cepa de bajo nivel de resistencia a vancomicina, *E. gallinarum vanC1*, tal como se confirmó posteriormente a través de PCR-Múltiple y pruebas bioquímicas convencionales .

El sistema alternativo de placa, económico y de fácil utilización, ha permitido por tanto la identificación presuntiva de todos lo aislados incluidos en el estudio como pertenecientes al género *Enterococcus* y la detección de una cepa de bajo nivel de resistencia omitida e incorrectamente identificada a nivel de especie por el sistema automatizado.

Aparte de la falta de exactitud, los métodos tradicionales adolecen del problema del tiempo que se requiere para obtener e informar un resultado. En condiciones normales, una vez obtenido el cultivo primario son necesarias entre 24 y 48 horas para emitir un resultado que incluya identificación a nivel de especie y antibiograma. Aún con la utilización de métodos

automatizados hay que esperar un mínimo de 24 horas, y a veces más, si se requieren pruebas adicionales para confirmar la identificación y/o las pruebas de sensibilidad.

El desarrollo de métodos moleculares basados en la amplificación de DNA a través de PCR, rápidos y sencillos, a mejorado notablemente tanto la rapidez como la precisión del diagnóstico microbiológico. En el caso que nos ocupa, en 1999 Ke y cols. (128) publicaron un método de PCR en el cuál utilizan cebadores especialmente diseñados para amplificar regiones altamente conservadas del gen *tuf*, específicas del género *Enterococcus*. El gen *tuf* codifica el factor de elongación EF-Tu que está implicado en la formación de la cadena peptídica y es un constituyente esencial de la célula bacteriana, lo cuál lo convierte en una diana de elección para propósitos de diagnóstico (190). Este método de PCR en particular es capaz de detectar 14 especies de *Enterococcus* entre las que se encuentran las de mayor importancia clínica (Figura 5.3.2a), excepto *Enterococcus solitarius*, que de hecho a través de estudios genéticos no aparece como miembro del género *Enterococcus* (138).

Por otra parte, entre los genotipos de resistencia a glucopéptidos, es importante diferenciar aquellos que son adquiridos y transferibles (*vanA* y *vanB*) de los intrínsecos y no transferibles (*vanC1*, *vanC2* y *vanC3*). Los primeros presentan altos niveles de resistencia y hasta la fecha son los únicos que han estado implicados en brotes hospitalarios, por lo que su presencia significa la rápida toma de medidas de control. La importancia clínica y epidemiológica de los segundos está menos clara, tanto porque presentan niveles bajos ó intermedios de resistencia a vancomicina como porque hasta el momento no han estado implicados en brotes, aunque pueden causar infecciones graves (191).

La importancia de realizar pruebas genotípicas a todos los ERV detectados en un hospital ha sido ya recomendada por algunos autores (192), debido a que, aunque esporádicamente, se han aislado cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* que llevan conjuntamente los genotipos *vanC* y *vanA* ó bien *vanC* y *vanB* (193), (194),(195). Recientemente Schouten y cols (35) han informado sobre el aislamiento de una cepa de *E. casseliflavus* (MIC para vancomicina de 16 ug/ml y MIC para teicoplanina de 1 ug/ml) que lleva sólo el genotipo *vanA*. Por lo tanto, cuando se aíslan éstas especies menos frecuentes no puede asumirse

que no sean portadoras de elementos móviles que codifiquen para la resistencia de alto nivel a glucopeptidos. Es necesario realizar un ensayo de PCR para asegurar que tales enterococos no son portadores de los genes *vanA* ó *vanB* además de *vanC* (193).

En 1995 Dutka-Malen y cols. (127) describieron un método de PCR que permite la identificación de los genotipos más frecuentes de resistencia a glucopeptidos a través de la utilización de cebadores dirigidos a secuencias específicas de los genes de resistencia que codifican para las ligasas: *vanA*, *vanB*, *vanC1*, y *vanC2/C3* (Figura 5.3.2b) y de los genes cromosómicos de la ligasa *ddl* (D-Ala:D-Ala) de *E. faecalis* y *E. faecium*. En 1999, Ke y cols. (128) desarrollaron un ensayo de PCR que permite la detección de enterococos a nivel de género, a través de la amplificación de parte del gen *tuf* (Figura 5.3.2a). Otros métodos de PCR han sido utilizado con éxito en la identificación de ERV (66), (130), (196). En el presente trabajo se ha desarrollado una nueva PCR-Múltiple que permite tanto la identificación a nivel de género como a nivel de ERV (Figura 5.3.2c). Para ello, se utilizan como dianas el gen *tuf* así como los genes de resistencia más frecuentes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, y

*vanC2/C3*, de modo que de forma simultánea podemos identificar tanto género como genotipo de resistencia.

Adicionalmente se ha incorporado un método rápido de obtención de DNA a través de lisis por calor, de modo que se puede realizar la prueba a partir de unas cuantas colonias del cultivo primario, acortando el tiempo de obtención de resultados a aproximadamente 4 horas, significativamente inferior al tiempo empleado por los métodos tradicionales, incluyendo los automatizados. La amplificación de parte del gen *tuf* permitió la precisa identificación de los aislados de *Enterococcus* a nivel de género y el uso de los cebadores *van* condujo a la detección de los genes de resistencia a glucopéptidos *vanA*, *vanB*, *vanC1*, y *vanC2/C3*. Dado que los genotipos de resistencia *vanD*, *vanE* y *vanG* sólo se han encontrado en unas pocas cepas (87), (88), (89), (90), no se han incluido los cebadores para su detección.

Utilizando ésta nueva PCR-Múltiple se analizaron todos los aislados clínicos incluidos en éste estudio, previamente identificados a través de métodos automatizados y procedentes de pacientes hospitalizados en cuatro de los mayores hospitales de la Comunidad Autónoma de Canarias (Figura 5.3.2c).

Igualmente se estudiaron las colonias aisladas en el medio selectivo (ABE con vancomicina) a partir de las muestras de colonización. Tanto los DNA de las cepas de referencia como todos los DNAs obtenidos a partir de los aislados clínicos incluidos en el estudio dieron lugar a un fragmento de PCR de 112 pb, correspondiente a una parte del gen *tuf* específica del género *Enterococcus*. En cuanto a los genotipos de resistencia, las cepas de referencia dieron el resultado esperado para cada una de ellas y se ha identificado además un genotipo *vanA* presente en un aislado clínico de *E. faecalis* (UIE-478), y dos *vanC1* (UIE-298 y UIE-470), todos procedentes del HUNSC. El genotipo *vanC1* (UIE-298) que no había sido detectado ni por el sistema Vitek-1 ni por el método de agar, correspondió a una cepa identificada de forma incompleta por el sistema automatizado Vitek-1 como *Enterococcus species* sensible a vancomicina y teicoplanina.

Realizadas las pruebas de sensibilidad a través del método de difusión en agar (según las normas de la NCCLS, Doc M7\_A4, 1997), (166), y las pruebas bioquímicas convencionales se confirma que el aislado UIE-298 pertenece a la especie *E. gallinarum* y que es sensible a vancomicina (CMI= 0,5 µg/ml) y a teicoplanina (CMI= 4 µg/ml) (Tablas 5.4.2 y 5.4.3). Por lo tanto



ésta cepa con genotipo de bajo nivel de resistencia se comporta fenotípicamente como sensible. Cepas de éste tipo ya han sido descritas en la literatura (35), (197).

La PCR-Múltiple ha sido por tanto el único de los tres métodos utilizados capaz de identificar simultáneamente todos los aislados clínicos como pertenecientes al género *Enterococcus* y de detectar todos los genotipos de resistencia a glucopéptidos presentes, acortando significativamente el tiempo de obtención de los resultados.

Los antibióticos glucopéptidos se utilizan en el ámbito hospitalario no sólo en el tratamiento de infecciones graves producidas por enterococos, sino también frente a infecciones por otros gérmenes de difícil tratamiento como los *S. aureus* resistentes a meticilina, y la aparición y diseminación de cepas resistentes representa un problema en todo el mundo. Por lo tanto, constituye una necesidad el disponer de métodos de laboratorio rápidos y sensibles para la segura y pronta detección de ERV. Esta nueva PCR-Múltiple sensible y fácil de realizar, combinada con los métodos tradicionales, puede resultar de gran ayuda en los laboratorios de microbiología clínica, tanto a la hora

de detectar y diferenciar los genotipos de resistencia de mayor importancia epidemiológica, como de identificar y controlar posibles brotes. Igualmente puede ser útil en los estudios de colonización gastrointestinal, especialmente recomendados en aquellos hospitales dónde los ERV aún no se han detectado ó se aíslan esporádicamente, como es el caso de nuestra comunidad en éstos momentos (192).

La resistencia a glucopéptidos se viene registrando en la última década en hospitales de distintas partes del mundo, presentándose en muchos de ellos en forma de brotes (198), (199), (200), (201).

La prevalencia de ERV en Europa es baja, situándose entre el 0,5 y el 5% si se toma en cuenta tanto la comunidad como los pacientes hospitalizados (26), (35), (36). En España, un estudio multicéntrico realizado por Cisterna y cols en 1997 (45), encontró que la resistencia a la vancomicina se situaba en el 1,8% y a la teicoplanina en el 1%. Por otra parte, se ha publicado la aparición de varios brotes en distintos hospitales (43), (46).

Como ya se ha mencionado, en el momento de iniciar éste estudio en la Comunidad Autónoma de Canarias no se había

publicado, hasta donde sabemos, la aparición de cepas de ERV y no se disponía de técnicas moleculares para el estudio de éste tipo de resistencia en ninguno de los hospitales. Utilizando la nueva PCR-Múltiple puesta a punto en nuestro laboratorio, hemos encontrado una prevalencia total de ERV del 0,7% en la muestra estudiada, incluyendo todos los genotipos encontrados (0,2% para el genotipo *vanA* y 0,5% para el genotipo *vanC1*), aunque sólo uno de los dos aislados *vanC1* era capaz de expresar la resistencia (202). No se encontró el genotipo *vanB* en ninguno de los aislados. Esta cifra es inferior al 2,2% (0,5% para el genotipo *vanA* ó *van B* y 1,7% para el genotipo *vanC*), encontrado en hospitales de Europa en un reciente estudio pan-europeo y en el que por otra parte no se encontró, entre los aislados enviados por España, ningún genotipo de alto nivel de resistencia (*vanA* ó *vanB*) (35).

Aunque con frecuencia la resistencia a glucopéptidos se presenta en cepas con resistencia múltiple a otros antibióticos, la mayoría de las cepas de *E. faecalis* son sensibles a la ampicilina (6). Este es el caso de la cepa de *E. faecalis vanA* (UIE-478) encontrada en éste estudio, que fue sensible además a alto nivel de estreptomicina y de gentamicina. Esta cepa fue aislada de un hemocultivo de una paciente que había recibido terapia con

vancomicina los siete días anteriores, y aunque se sabe que la terapia previa constituye un factor de riesgo para la adquisición de ERV (19) la sola administración del antibiótico no selecciona ERV si la bacteria resistente no se encuentra ya presente en el paciente ó si éste no se pone en contacto con ella.

Aún cuando el riesgo de adquisición nosocomial se incrementa por un largo período de hospitalización así como por la proximidad con pacientes colonizados, con enfermeras que traten a otros pacientes con ERV ó el contacto con objetos inanimados que estén contaminados (57), el perfil de sensibilidad de la cepa ERV encontrada sugiere más bien un origen extra-hospitalario.

El estudio de relación clonal a través de electroforesis de campo pulsado ha revelado que las cepas de *E. faecalis* de genotipo *vanA* aisladas hasta ahora en los hospitales de Canarias (*E. faecalis* UIE-478 aislada en Agosto de 2000 en el HUNSC y *E. faecalis* 203325 aislada en de 1998 en el HUN) pertenecen a clones diferentes (Figura 5.6), a diferencia de lo informado del Campo y cols (203), que encuentran un clon idéntico de *E. faecalis vanA* en hospitales de distintas regiones de España.

Igualmente, los 3 aislados de *E. faecium vanA* informados entre los años 1996 y 2000 en hospitales de la Provincia de Las Palmas tanto a partir de muestras clínicas (*E. faecium* 415307 aislado en 1996 en el hospital de Lanzarote, y *E. faecium* y 322300 aislado en 1999 en el HUN) como de muestras de colonización (*E. faecium* 309302 aislado en 1998 en el HUN) pertenecen a clones diferentes (Figura 5.6).

Estos resultados indican que hasta la fecha, la aparición de aislados tanto de *E. faecalis* como de *E. faecium* con genotipo *vanA* en los hospitales de Canarias ha sido el resultado de la selección individual y no de la dispersión de un clon particular. Al examinar los datos de tratamiento previo de éstos pacientes, esta selección podría atribuirse al uso previo de vancomicina ó de cefalosporinas de tercera generación, fármacos cuya actividad se ha demostrado previamente que facilita tanto la infección como la colonización por ERV (20), (204).

El hecho de que no se hayan registrado brotes a partir de éstos aislamientos esporádicos puede estar relacionado tanto con la puesta en práctica de las apropiadas medidas de control (185) como con el potencial de dispersión de los ERV seleccionados, que al parecer es diferente de unas cepas a otras (177). Se ha

demostrado que si casos esporádicos como los aquí encontrados no se controlan de forma rápida una vez detectados, pueden dar lugar a brotes monoclonales que pueden a su vez evolucionar hacia una endemidad policlonal (205).

En cuánto a la evolución de los pacientes afectados, todos excepto uno, recibieron tratamiento alternativo y fueron dados de alta. En éstos casos los ERV aislados eran sensibles tanto a  $\beta$ -lactámicos y como a alto nivel de aminoglucósidos ó sensibles únicamente a éstos últimos. Sólo el paciente del hospital de Lanzarote, que presumiblemente adquirió la infección por ERV en el hospital La Paz de Madrid, falleció a los quince días después de que se aislara a partir de repetidos hemocultivos la cepa de *E. faecium* tipo VanA que presentaba además multi-resistencia. No obstante hay que decir que para el momento del aislamiento ya el paciente se encontraba en estado grave. Puesto que las infecciones por ERV suelen presentarse en pacientes con serias enfermedades de base, es difícil establecer una relación entre infección por ERV y mortalidad. En este sentido, aunque los pacientes con bacteremia por ERV presentan mayores tasas de mortalidad que los pacientes con infección debida a aislados sensibles, la resistencia a vancomicina no es un predictor independiente de mortalidad sino que se comporta como un

marcador de la severidad de la enfermedad de base (206), (207).

En Europa, la alta frecuencia del genotipo *vanA* se ha asociado con el hallazgo de *E. faecium vanA* en productos de granja y que parecen provenir de las heces de animales colonizados (27), (108), (208). Existen numerosas evidencias que relacionan éste hecho con el uso de la avoparcina como promotor del crecimiento animal (32), (109). La avoparcina puede haber seleccionado enterococos con alto nivel de resistencia a glucopéptidos aumentando por tanto el reservorio de genes de resistencia (209) que al estar codificados por elementos móviles (plásmidos y trasposones) pueden transmitirse a otras especies (10). También se ha especulado sobre la posible dispersión de cepas resistentes a partir del medio hospitalario a través de la cadena alimenticia. Apoya la primera teoría el hecho de que en los países donde la avoparcina no se ha utilizado por mucho tiempo (por ejemplo en Suecia) la resistencia a vancomicina se detecta con menor frecuencia (210). Por éste motivo en 1995 se ha prohibido el uso de éste antibiótico glucopéptido en las granjas de la Unión Europea (101). A pesar de ésta prohibición, en el año 2000 se efectúa un trabajo en Dinamarca para conocer el impacto de ésta medida

así como de la suspensión a partir de 1999 del uso de agentes antimicrobianos como promotores del crecimiento animal, observándose que si bien es posible reducir los casos de resistencia cuando se retira la presión selectiva, se seguía aislando *E. faecium vanA* en aves y cerdos, indicando que puede necesitarse mucho tiempo antes de la desaparición de los ERV de las granjas (27).

Los ERV de genotipo *vanA* también se han aislado de aguas residuales (211). Con respecto a la presencia de éste tipo de ERV en el medio ambiente de Canarias, sólo hemos encontrado un estudio publicado y que se realizó en la isla de Gran Canaria en 1998 sobre la contaminación fecal en las aguas de piscinas y en la planta de tratamiento de aguas de Bañaderos (Aruca). En dicho estudio no se aisló ningún ERV (212). González y cols informaron en el último Congreso de la Sociedad Española de Microbiología la ausencia de enterococos con alto nivel de resistencia a glucopeptidos en aguas depuradas y de playas, así como en animales (gallinas y reptiles), en un estudio realizado también en la isla de Gran Canaria en el 2001. Sin embargo, en este mismo estudio se aislaron varios *E. gallinarum vanC1* a partir de heces de reptiles (213).



En cuanto a los aislados de *E. gallinarum vanC1* encontrados en el presente estudio, ambos proceden de exudados cuyas muestras estaban poli-infectadas (con *Escherichia coli* y *E. avium* respectivamente), por lo que su importancia como agentes causales de infección no está del todo clara. En todo caso, ambos eran sensibles a penicilina y a ampicilina por lo que es presumible no presenten problemas de tratamiento. Al igual que otras especies de enterococos, *E. gallinarum* forma parte de la flora gastrointestinal de humanos y animales y por lo tanto puede aislarse también a partir de muestras ambientales.

Aunque la epidemiología de los ERV no ha sido claramente dilucidada, existen ciertos grupos de pacientes con alto riesgo de ser colonizados ó infectados por ERV. Entre ellos estarían los pacientes con enfermedades graves ó con inmunosupresión, pacientes de unidades de cuidados intensivos ó de hemodiálisis, aquellos que han sido sometidos a cirugía abdominal ó cardioráxica, pacientes sondados ó con catéter y aquellos que han tenido una larga estancia hospitalaria ó bien han recibido terapia antimicrobiana múltiple así como los pacientes colonizados por ERV (30), (205), (214), (215). Es por ello que hemos querido complementar ésta investigación estudiando la posible presencia de colonización gastrointestinal en un grupo

de pacientes sometidos a hemodiálisis. Sin embargo, a pesar de utilizar un medio líquido de enriquecimiento y de que se aislaron algunas colonias BE positivas a partir del medio selectivo con vancomicina, al realizar la PCR-Múltiple no se obtuvieron productos de amplificación específicos del género *Enterococcus* ni de ninguno de los genotipos de resistencia. Esto es un dato positivo dado que la colonización por ERV constituye un riesgo de infección y de dispersión de éstas cepas, y por otra parte hace suponer el uso racional de la vancomicina en el grupo de pacientes estudiados. Queremos resaltar que la metodología utilizada ha facilitado enormemente el estudio de colonización, a menudo muy engorroso si se utilizan técnicas de identificación tradicionales, y nos ha permitido obtener resultados en sólo 24 horas a partir del momento de obtención de la muestra.

En respuesta al problema de la resistencia a vancomicina en enterococos, el *Hospital Infection Control Practices Advisory Committee* (HICPAC) publicó una serie de recomendaciones en Febrero de 1995 (185), entre las que se encuentran: i) uso prudente de la vancomicina ii) educación del personal hospitalario iii) uso efectivo del laboratorio de microbiología iv) implantación de medidas de control de la infección (incluyendo el uso de guantes y gorros, así como aislamiento ó seguimiento de

cohortes de pacientes). Para aquellos hospitales en los cuáles los ERV aún no se han detectado ó continúan siendo raros, como es el caso de los hospitales de Canarias en el momento actual, estas medidas incluyen probar la sensibilidad a vancomicina en todos los aislados de enterococos procedentes de muestras clínicas, vigilancia periódica en heces ó en hisopados rectales de pacientes de riesgo, por ejemplo pacientes de unidades de cuidado intensivo y de hemodiálisis, y vigilancia en las muestras de heces remitidas al laboratorio para la investigación de *Clostridium difficile*.

De estas medidas, la sensibilidad a vancomicina se prueba en todos los aislados de enterococos procedentes de muestras clínicas en todos los hospitales participantes en el estudio. Aunque con anterioridad a los datos aportados por este trabajo no se han publicado resultados sobre estudios de colonización, entre los meses de Agosto y Septiembre de 1998 se realizó un estudio de portadores fecales de ERV en el HUN en el que se estudiaron 60 pacientes hospitalizados en áreas de riesgo, aislándose una cepa de ERV en un paciente de oncohematología y que correspondió a un *E. faecium* con alto nivel de resistencia a vancomicina y resistente a teicoplanina (fenotipo VanA) (Rosa Elcuaz, datos no publicados). A través de PCR-múltiple hemos

confirmado que este aislado se trata de un enterococo genotipo *vanA*. El paciente había sido diagnosticado de un mieloma múltiple, llevaba 16 días ingresado y había recibido tratamiento con ceftazidima los nueve días anteriores al aislamiento del ERV. Según dicho trabajo, el porcentaje de portadores fecales de ERV en el HUN para esa fecha era del 1,7% lo que correlaciona con los datos obtenidos en otros hospitales en situaciones no epidémicas (216).

Por otra parte, en el año 2001 González y cols. estudiaron la presencia de colonización gastrointestinal en 73 muestras de heces enviadas al Servicio de Microbiología del hospital Insular. Estas muestras procedían tanto de pacientes hospitalizados como ambulatorios, y no se aislaron ERV a partir de ellas (213).

No cabe duda de que la medida más importante para evitar la aparición y diseminación de ERV es el uso prudente de la vancomicina. Sabemos que la prevalencia de *S. aureus* resistente a metilina en los cuatro hospitales participantes es elevada (217). Dado que la vancomicina es el tratamiento apropiado en las infecciones graves producidas por éste agente, es de suponer que dicho antibiótico deba utilizarse con la frecuencia que se presenten estas situaciones.

No sólo la vancomicina actúa en la selección de ERV. Varios estudios han demostrado que el uso de cefalosporinas de tercera generación y de agentes con actividad significativa frente a anaerobios constituye un factor de riesgo de colonización ó infección con ERV (30), (176). Las cefalosporinas de tercera generación predisponen a la colonización por ERV a través de su potente actividad frente a un gran número de bacterias mientras que carecen de actividad frente a los enterococos resistentes a ampicilina, mientras que los antibióticos anti-anaeróbicos parecen favorecer la persistencia de elevados niveles de colonización por medio de su acción frente a la flora competitiva (176).

También es importante tener en cuenta que la Comunidad Autónoma Canaria recibe anualmente miles de visitantes de otros países que pudieran en un momento dado introducir cepas de ERV entre la población, como ha ocurrido ya con una cepa de *Mycobacterium tuberculosis* de alta virulencia y asociada con la transmisión de resistencia, que ha sido introducida por un inmigrante liberiano en la isla de Gran Canaria (218). Estos hechos y la aparición de forma aislada de ERV en tres de los cuatro hospitales participantes en el estudio, ya que

recientemente se ha aislado una cepa de *E. faecium vanB* en el HUC (Teresa Delgado datos no publicados), así como el aislamiento de una cepa de ERV con multi-resistencia en el hospital de Lanzarote, presumiblemente adquirida en el hospital de La Paz de Madrid, indican que deben mantenerse las medidas de prevención y control seguidas hasta la fecha, así como llevar a cabo los estudios regulares de colonización recomendados por la HICPAC para situaciones de éstas características (185).

El funcionamiento apropiado de los sistemas de vigilancia epidemiológica repercute tanto en la reducción del gasto hospitalario como en la disminución de la mortalidad (205). Para llevar a cabo éstos objetivos, la puesta en práctica de la PCR-múltiple desarrollada en éste trabajo (167) asociada con el uso de métodos tradicionales, puede constituir una herramienta de trabajo muy útil ya que ofrece sensibilidad y rapidez en la obtención de los resultados, elementos necesarios tanto para el eficiente funcionamiento del sistema de vigilancia epidemiológica como para la toma de medidas de control ante posibles brotes por ERV.

## *VII Conclusiones*

## 7. CONCLUSIONES.

- 1) Durante el período de estudio, la prevalencia de aislamientos de *Enterococcus* spp. fue similar entre los hospitales HUC, HUNSC y HUN, con una media de 120 aislamientos por hospital.
- 2) Constituyen hallazgos de interés tanto el mayor porcentaje de *E. faecium* registrado en el HUNSC como las diferencias estadísticamente significativas que se presentaron entre el HUC y el HUN en cuanto a la resistencia a ampicilina en esta especie y a alto nivel de aminoglucósidos en *E. faecalis*, teniendo en cuenta las implicaciones que tienen estos hechos con respecto a la aparición de resistencia a vancomicina así como con las limitaciones de uso de la terapia combinada.
- 3) Hasta la fecha en la que se realizó el estudio se considera que ha existido un uso racional de la vancomicina en los pacientes estudiados sometidos a hemodiálisis, ya que no se han seleccionado portadores fecales de ERV.



- 4) La prevalencia de ERV encontrada durante el período de estudio en los hospitales de Canarias fue del 0,7% (0,2% para el genotipo *vanA* y 0,5% para el genotipo *vanC1*), cifra inferior al 2,2% registrado en Europa. Es la primera vez que se informa sobre la aparición de cepas ERV en los hospitales de ésta Comunidad.
- 5) Al igual que en otros estudios se ha encontrado que el sistema automatizado Vitek-1 presenta problemas en la detección de ERV con bajo nivel de resistencia, así como en la correcta identificación de las llamadas especies móviles.
- 6) El método de selección en placas de ABE sin y con vancomicina resultó útil en el estudio de los enterococos con fenotipo resistente, permitiendo la identificación presuntiva a nivel de género de todos los aislados incluidos en el estudio y detectando, además de la cepa de alto nivel de resistencia, una cepa de bajo nivel de resistencia omitida por el sistema automatizado Vitek-1.
- 7) La PCR-Múltiple desarrollada en el presente trabajo fue el único de los tres métodos utilizados capaz de detectar e identificar simultáneamente los tres aislados del género *Enterococcus* con

genotipo resistente encontrados en el estudio, además de permitir la identificación a nivel de género de todos los aislados estudiados, y ello en un tiempo significativamente inferior al requerido por los métodos convencionales.

- 8) Hasta el momento la resistencia de alto nivel a vancomicina en enterococos se ha presentado de forma esporádica en tres de los cuatro mayores hospitales de Canarias, y en un hospital de una isla menor, sin que exista relación clonal entre los distintos aislados del mismo genotipo.
  
- 9) Teniendo en cuenta éstos hechos, los métodos moleculares aquí empleados pueden constituir una herramienta útil, en especial en la vigilancia epidemiológica de la resistencia a glucopéptidos en enterococos. Igualmente, el uso combinado de métodos convencionales y moleculares, puede permitir la rápida toma de medidas de control ante la aparición de posibles brotes.



## **8. BIBLIOGRAFÍA.**

1. Tenover FC. Novel and emerging mechanisms of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. *Am J Med* 1991; 91:76S-81S.
2. Tenover FC. Development and spread of multi-resistant bacterial pathogens. *JAMA* 1966; 275(4):300-304.
3. Endtz HP, van den Braak N, Verbrugh HA, van Belkum A. Vancomycin resistance: status quo and quo vadis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:683-90.
4. Center for Disease Control and Prevention. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States 1989-1993. *Morb Mortal Weekly Rep.* 1993; 42:597-599 .
5. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(4):462-478.
6. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococcal infections. *New Engl J Med* 2000; 342(10):710-721.
7. Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 513-522.

8. Méndez-Álvarez S, Pérez-Hernández X, Claverie-Martín F. Glycopeptide resistance in enterococci. *Internatl Microbiol* 2000; 3:71-80.
9. Noble WC, Virani Z, Gee RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 93:195-198.
10. French, GL. Enterococci and vancomycin resistance. *Clin Infect Dis* 1998; 27(Suppl 1):S75-S83.
11. 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.
12. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin resistant enterococci. *Lancet*.1988; 1:57-58.
13. Clark NC, Cooksey RC, Hill BC, Swenson JM, and Ternover, FC. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:2311-2317.
14. Handwerger S, Skobe J, Dicotto LF, Pucci MJ. Heterogeneity of the *vanA* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:362-368.

15. Jones RN, Sader HS, Erwin ME; Anderson SC. Emerging multiple resistant enterococci among clinical isolates. Prevalence data from 97 medical center surveillance study in the United States. *Enterococcus* Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 2(12):85-93.
16. Coque MT, Tomayko JF, Ricke SC, Okhyusen PC, Murray B. Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial community and animal sources in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(11):2605-2609.
17. Erlada DE, Smulian AG, Cushion MT. Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of enterococci in Cincinnati Ohio: a prospective citywide survey. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2342-2347.
18. Fridkin SK, Yokoe DS, Whitney CG, Onderdonk A, Hooper DC. Epidemiology of a dominant clonal strain of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* at separate hospitals in Boston, Massachusetts. *J Clin Microbiol* 1998; 36:965-970.
19. Donskey J, Schreiber JR, Jacobs MR, Shekar R, Salata RA, Gordans S, Whalen CC, Smith F, Rice LB. A polyclonal outbreak of predominantly VanB vancomycin-resistant enterococci in northeast Ohio. *Clin Infect Dis* 1999; 29:573-579.

20. Boyle JF, Soumakis SA, Rendo A, Herrington JA, Gianarkis DG, Thuberg BE, Palnter BG. Epidemiologic analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 43:2161-2164.
21. Guiney M, Urwin G. Frequency and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:362-366
22. Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, Romulo RL, Fortna S, Medeiros AA. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable VanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol* 1994; 32:1148-1153.
23. Morrison D, Woodford N, Cookson BD. Epidemic vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in UK. *Clin Microbiol Infect* 1996; 1:146-147.
24. Dutka-Malen S, Leclercq R, Coutant V, Duval J, and Courvalin P. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1875-1879.
25. Descheemaeker PR, Chapelle S, Devriese LA, Butaye P, Vandamme P, Goosens H. Comparison of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates and glycopeptide

- resistance genes of human and animal origins. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2032-2037.
26. Vandamme P, Vercauteren E, Lammens C, Pensart N, Ieven M, Pot B, Leclercq R, Goossens H. Survey of enterococcal susceptibility patterns in Belgium. *J Clin Microbiol* 1999; 34:2572-2576.
27. Aarestrup FM, Agero Y, Gerner-Smith P, Madsen M, Jensen J. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37(2):127-137.
28. Beezhold DW, Slaughter S, Hayden MK, Matushek M, Nathan C, Trenholme GM, Weinstein RA. Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. *Clin Infect Dis* 1997; 24:704-706.
29. Wells CL, Juni SB, Cameron KR, Mason D, Dunn DL, Fernieri P, Rhome FS. Stool carriage, clinical isolation and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical/or surgical patients. *Clin Infect Dis* 1995; 21:45-50.
30. Montecalvo MA, Shay DK, Gedris C, Petrullo C, Uman J, Rodney K, Jayris WR, Worsmsen GP. A semiquantitative analysis of the fecal flora of patients with vancomycin-



- resistant enterococci: colonized patients pose an infection control risk. *Clin Infect Dis* 1997; 25:929-930.
31. Robredo B, Singh KV, Baquero F, Murray BE, Torres C. From *vanA Enterococcus hirae* to *vanA Enterococcus faecium*: a study of feed supplementation with avoparcin and tylosin in young chickens. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1137-43.
32. Stobberingh E, van den Bogaard A, London N, Driessen C, Top J, Willems R. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animal to humans? *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2215-2221.
33. Felmingham D, Brown D, Courvalin P. Members of the European Workshop on Glycopeptide resistance European glycopeptide susceptibility survey: quality assessment using five reference strains, abstr E34. In: Program and abstracts of the 35<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington D.C. 1995; p.91.
34. Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JA. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2542-2546.

35. Schouten MA, Hoogkamp-Korstaje AA, Meis JFG, Voss A. and the European VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:816-822.
36. Low DE, Keller N, Barth A, Jones N. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (Suppl 2):S133-S145.
37. Reina J, Llompart Y, Gómez J, Borrel N, Serra A. Susceptibility patterns and high-level aminoglycoside resistance analysis in 360 strains of *Enterococcus* genus isolated from clinical samples. *Rev Esp Quimioter* 1991; 4:62-68.
38. Yagüe G, Cámara M, Gómez C, Martín-Luengo F, Segovia M. In vitro susceptibility of clinical isolates of *Enterococcus* spp to several antimicrobial agents. *Rev Esp Quimioter* 1994; 7:309-312.
39. Pérez-Ramos S, Jesús de la Calle I, Rodríguez Iglesias MA. Evolución de la resistencia a vancomicina y teicoplanina en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* aislados de muestras clínicas durante dos años en un hospital andaluz.

- Abstract 185. VI Congreso Nacional de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia, 1994.
40. Torres C, Tenorio C, Zarazaga M, Lantero M. Detección de resistencia a vancomicina en *Enterococcus*. Abstract 186. VI Congreso Nacional de Microbiología Clínica, Valencia 1994.
41. Balas D, Perea B, Wilhelmi Y, Romanyk J, Alós JL, Gómez-Garcés JL. The prevalence of antimicrobial resistance in enterococci isolated from blood in Madrid, Spain, 1994-1995. *Enf Infect Microbiol Clin* 1996; 15:22-23.
42. Alonso-Echanove J, Robles B, Jarvis WR and The Spanish VRE Study Group. Proficiency of clinical laboratories in Spain in detecting vancomycin-resistant *Enterococcus spp.* *J Clin Microbiol* 1999; 37:2148-2152.
43. Peset V, Gutiérrez I, Sarrión A, Pérez Bellés C, Cantón E, Gobernado M. Study of antibiotic resistance of *Enterococcus* strains isolated from blood. *Rev Esp Quimioter* 1998; 10:314-317.
44. Robredo B, Singh KV, Baquero F, Murray BE, Torres C. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals food. *Int J Food Microbiol* 2000; 54(3):197-204.
45. Cisterna R, Ibarra K, Morla A, Basaras M, Cisterna C, Herreras A, Borja J, y Grupo Español de Estudio y Vigilancia de Resistencias. Estudio multicéntrico de resistencias en

- enterococos. Papel de la teicoplanina. Rev Esp Quimioter 1999; 12:237-243.
46. Peset V, Tallón P, Sola C, Sánchez E, Sarrión A, Pérez-Bellés C, Vindel A, Cantón E, Gobernado M. Epidemiological, microbiological, clinical, and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species. Eur J Clin Infect Dis 2000; 19:742-749.
47. Baquero F. Antibiotic resistance in Spain: what can be done? Task Force of the General Direction for Health Planning of the Spanish Ministry of Health. Clin Infect Dis 1996; 23:819-823.
48. Álamo I, González A. Detección de resistencia antibiótica en *Enterococcus sp.* Comparación entre GPS\_TA (BioMérieux-Vitek), Uniscept MIC-3 (BioMérieux-Vitek) y métodos convencionales. Enferm Infecc Microbiol Clin 1995; 13:516-521.
49. González M, Tejedor MT, Torres MM, Santan F, González Z. Sensibilidad de especies de estafilococos y enterococos a la vancomicina y a la teicoplanina. Rev Esp Quimioter 1993; 6:204-207.
50. González M, de Miguel I, Cañas A, Martín Sánchez A.M. Resistencia a antibióticos en aislamientos clínicos del género *Enterococcus*. Rev Esp Quimioter 2000; 13(4):412-416.



59. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol* 1996; 4:401-407.
60. Nicolau KC, Boddy CN, Brase S, Winssinger N. Chemistry, biology and medicine of the glycopeptide antibiotics. *Angew Chem Int* 1999; 15: 2096-21.
61. Bugg TDH, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. Molecular basis for vancomycin resistance in BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry* 1991; 30:10408-10415.
62. Dutka-Malen S, Courvalin P. Update on glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Newsl* 1992; 7:81-88.
63. Billot-Klein D, Shlaes D, Bryant D, Bell D, van Heijenoort J, Gutmann L. Peptidoglycan structure of *Enterococcus faecium* expressing vancomycin resistance of the VanB type. *Biochem J* 1996; 313:711-715.
64. de Jonge BLM, Handwerger S, Gage D. Altered peptidoglycan composition in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:863-869.
65. Miele A, Bandera M, and Goldstein BP. Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine *van* genotype in enterococci and to study gene organization in

- VanA isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1772-1778.
66. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill III FR. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 1997; 35:703-707.
67. Rosato A, Pierre J, Billot-Klein D, Buu-Hoi A, Gutmann L. Inducible and constitutive expression of resistance to glycopeptides and vancomycin dependence in glycopeptide-resistant *Enterococcus avium*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:830-833.
68. Gholizadeh Y, Courvalin P. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16:S11-S17.
69. Liassine N, Frei R, Jan I, Auckenthaler R. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from a Swiss hospital. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1853-1858.
70. Allen M, Hobbs Jr, Richardson JM, Riggin RM. Biosynthesis of modified peptidoglycan precursors by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 98:109-116.
71. Messer J, Reynolds PE. Modified peptidoglycan precursors produced by glycopeptide-resistant enterococci. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 94:195-200.

- 72.Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. J Bacteriol 1993; 175:117-127.
- 73.Arthur M, Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:1563-1571.
- 74.Wright GD, Molinas C, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT. Characterization of VanY, a DD-carboxypeptidase from vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* BM4147. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:1514-1518.
- 75.Arthur M, Depardieu F, Snaith HA, Reynolds PE, Courvalin P. Contribution of *vanY* D,D-carboxypeptidase to glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* by hydrolisis of peptidoglycan precursors. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:1899-1903.
- 76.Arthur M, Depardieu F, Cabanie L, Reynolds P, Courvalin, P. Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. Mol Microbiol 1998; 30:819-830.
- 77.Reynolds PE, Depardieu F, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P. Glycopeptide resistance mediated by



- enterococcal transposon Tn1546 requires production of vanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. *Mol Microbiol* 1994; 13:1065-1070.
- 78.Reynolds PE, Snaith HA, Maguire AJ, Dutka-Malen S, Courvalin P. Analysis of peptidoglycan precursors in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Biochem J* 1994; 301:5-8.
- 79.Evers S, Courvalin P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS<sub>B</sub>-VanR<sub>B</sub> two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol* 1996; 178:1302-1309.
- 80.Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine-D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene* 1992; 112:53-58.
- 81.Arias CA, Martín-Martínez M, Blundell TL, Arthur M, Courvalin P, Reynolds PE. Characterization and modelling of VanT: a novel, membrane-bound, serine racemase from vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Mol Microbiol* 1999; 31:1653-1664.
- 82.Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase related enzymes in *Enterococcus*

- casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:1788-1793 .
83. Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. Antimicrob Agents Chemother 1992; 36:2005-2008.
84. Teixeira LM, Carvalho GS, Merquior VLC, Steigerwalt AG, Teixeira MGM, Brenner DJ, Facklam R. Recent approaches on the taxonomy of the enterococci and some related microorganisms. Adv Exp Med Biol 1997; 418:397-400.
85. Evers S, Sham DF, Courvalin P. The *vanB* gene of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* V583 is structurally related to the genes encoding D-Ala-D-Ala ligases and glycopeptide resistance proteins VanA and VanC. Gene 1993; 124:143-144.
86. Park IS, Lin CH, Walsh CT. Bacterial resistance to vancomycin: overproduction, purification, and characterization of VanC2 from *Enterococcus casseliflavus* as a D-Ala-D-Ser ligase. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94:10040-10044.
87. Périchon B, Reynolds P, Courvalin P. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2016-2018.

88. Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sham DF, Courvalin P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2161-2164.
89. Mckessar ST, Berry AM, Bell JM, Turnidge JP, Paton JC. Genetic characterization of *van G*. A novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(11):3224-3228.
90. Ostrowsky BE, Clark NC, Thauvin-Eliopoulos C, Vankataraman L, Samore MH, Tenover FC, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Gold HS. A cluster of VanD vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: Molecular characterization and clinical epidemiology. *J Infect Dis* 1999; 180:1177-85.
91. Casadewall B, Courvalin P. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. *J Bacteriol* 1999; 181:3644-3648.
92. Patel, R. Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 185(1):1-7.
93. Arthur M, Molinas C, Courvalin P. The *vanS-vanR* two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 1992; 174:2582-2591.

94. Arthur M, Depardieu F, Holman T, Wu Z, Wright CT, Courvalin P. Regulation of glycopeptide resistance genes of enterococcal transposon Tn1546 by the VanR-VanS two component regulatory system. Two-component signal transduction. Ed by JA Hoch and TJ Silhary. ASM Press, Washington, DC. 1995; p.387-391.
95. Holman TR, Wu Z, Wanner BL, Walsh CT. Identification of the DNA-binding site for the phosphorylated VanR protein required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. Biochemistry 1994; 33:4625-4631.
96. Weiss V, Claverie-Martin F, and Magasanik B. Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:5088-5092.
97. Baptista M, Depardieu F, Reynolds P, Courvalin P, Arthur M. Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptide antibiotics in VanB-type enterococci. Mol Microbiol 1997; 25:93-105.
98. Rice LB. The theoretical origin of vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Newslett 1995; 17:189-192.
99. Marshall CG, Lessard IAD, Park I-S, Wright GD. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing

- organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2215-2220.
100. Rippere K, Patel R, Uhl JR, Piper KE, Steckelberg JM, Kleine BC, Cockerill III FR, Yousten AA. DNA sequence resembling *vanA* and *vanB* in the vancomycin-resistant biopesticide *Bacillus popilliae*. *J Infect Dis* 1998; 178:584-588.
101. Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis* 1998; 5:329-335.
102. Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. The historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(5):1303-1304.
103. Gould B, Freeman R. Nosocomial infection with microsphere beds. *Lancet* 1993; 342:241-242.
104. Slaughter SM, Hayden MK, Nathan C, Hu TC, Rice T, Van Voorhis J, Matushek M, Franklin C, Weinstein RA. A comparison of the effect of universal use of gloves and gowns with that of gloves alone on acquisition of vancomycin-resistant enterococci in a medical intensive care unit. *Ann Intern Med* 1996; 125:448-456.

105. Boyce JM. Vancomycin-resistant enterococcus: detection, epidemiology and control measures. *Infect Dis Clin Noth Am* 1997; 11:367-384.
106. Livonese LL Jr, Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor X, May P, Pitsakis P, Woods G, Kaye D, Levison ME, Jhonson CC. Hospital acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electric thermometers. *Ann Int Med* 1992; 117:112-116.
107. van den Braak N, van Belkum A, van Keulen M, Vliegenthart J, Verbrugh HA, Endtz HP. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci from hospitalized patients and poultry products in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1927-1932.
108. Jensen LB, Ahrens P, Dons L, Jones RN, Hammerum AM, Aarestrup FM. Molecular analysis of TN1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. *J Clin Microbiol* 1998; 36:437-442.
109. Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Agents* 1994; 34(14):507-514.
110. Das I, Fraise A, Wise R. Are glycopeptide-resistant enterococci in animals a threat to human beings?. *Lancet*. 1997; 349:997-998.

111. Donskey CJ, Rice LB. The influence of antibiotics on spread of vancomycin-resistant enterococci: the potential role of selective use of antibiotics as a control measure. *Clin Microbiol News* 1999; 21(8):57-65.
112. Schwalbe RS, McIntosh AC, Qaiyumi S, Jhonson JA, Morris JG Jr. Isolation of vancomycin-resistant enterococci from animal feed in USA. *Lancet* 1999; 353:722.
113. Marcineck H, Wirth R, Muscholl-Silberhorn A, Gauer M. *Enterococcus faecalis* gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants. *App Environm Microbiol* 1998; 64:626-632.
114. Handwerger S, Skobe J, Dicotto LF, Pucci MJ. Heterogeneity of the *vanA* gene cluster in clinical isolates of enterococci from the northeastern United States. *Antimicrob Agents chemother* 1995; 39:362-368.
115. Morris JG, Shay DK, Hebden JN, McCarter RJ, Perdue BE, Jarvis W, Jhonson JA, Dowling TC, Polish LB, Schwalbers RS. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin: establishment of endemicity in a university medical center. *Ann Intern Med* 1995; 123:250-259.
116. Mato R, de Lancestre H, Carraher M, Roberts RB, Tomasz A. Multiplicity of genetic backgrounds among vancomycin-

- resistant *Enterococcus faecium* isolates recovered from an outbreak in a New York city Hospital. *Microb Drug Resist* 1996; 2:309-317.
117. Dever LL, Smith SM, Handwerger S, Eng RHK. Vancomycin dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2770-2773.
118. van Bambeke F, Chauvel M, Reynolds PE, Fraimow HS. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis* clinical isolates and revertant mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:41-47.
119. Tierno PM, Inglima K, Mirza MA, Moen J. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecalis*. *Clinical Microbiology Newsletter* 1999; 21:197-198.
120. Fraimow HS, Jundkind DL, Lander DW, Delso DR, Dean JL. Urinary tract infection with *Enterococcus faecalis* isolated that requires vancomycin for growth. *Ann Intern Med* 1994; 121:22-26.
121. Green M, Shlaes JH, Barbadora K, Shlaes DM. Bacteremia due to vancomycin-dependent *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 712-714.
122. Sifaoui F, Gutmann L. Vancomycin dependence in a VanA-producing *Enterococcus avium* strain with a nonsense



- mutation in the natural D-Ala-D-Ala ligase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1409.
123. Tenover FC, Tokars J, Swenson J, Paul S, Spitalny K, Jarvis W. Ability of clinical laboratories to detect antimicrobial agents-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1695-1699.
124. van den Braak N, Goessens W, van Belkum A, Verbrugh HA, Endtz HP. Accuracy of the VITEK system to detect glycopeptide resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 2001; 39:351-353.
125. Cheng S, McCleskey FK, Gress MJ, Petroziello JM, Liu R, Namdari H, Beninga K, Salmen A, DeVechio VG. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1248-1250.
126. Clark NC, Teixeira LM, Facklam RR, Tenover FC. Detection and differentiation of *vanC-1*, *vanC-2* and *vanC-3* glycopeptide resistance genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2294-2297.
127. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33:24-27.

128. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3497-3503.
129. Bergeron MG, Ouellette M. Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2169-2172.
130. Jayaratne P, Rutherford C. Detection of clinically relevant genotypes of vancomycin-resistant enterococci in nosocomial surveillance specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6):2090-2092.
131. Ozawa Y, Courvalin P, Gaiimand M. Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for D-alanine:D-alanine ligase. *Syst Appl Microbiol* 2000; 23(2):230-237.
132. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35(9):2325-30.
133. Roger M, Faucher MC, Forest P, St-Antoine P, Coutlee F. Evaluation of a *vanA*-specific PCR assay for detection of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* during a hospital outbreak. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3348-3349.

134. Petrich AK, Luinstra KE, Groves D, Chernesky MA, Mahony. Direct detection of *vanA* and *vanB* genes in clinical specimens for rapid identification of vancomycin resistant enterococci (VRE) using multiplex PCR. *Mol Cell Probes* 1999; 13(4):275-81.
135. Monstein HJ, Quednau M, Samuelsson A, Ahrne S. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology* 1998; 144:1171-1179.
136. Monstein HJ, Johansson Y, Jonasson J. Detection of vancomycin-resistance genes combined with typing of enterococci by means of multiplex PCR amplification and multiple primer DNA sequencing. *APMIS* 2000; 10(1):67-73.
137. Angeletti S, Lorino G, Gherardi G, Battistoni F, De Cesaris M, Dicuonzo G. Routine molecular identification of enterococci by genomic PCR and 16S ribosomal DNA sequencing. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2):794-797.
138. Patel R, Piper KE, Rouse MS, Steckelberg JM, Uhl JR,, Khoner P, Hopkins MK, Cockerill III FR, Kline BC. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application of species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3399-3407.

139. Sechi L, Zanetti S, Dupre I, Delogu G, Mortesen JE, Daneo-moore L, Fadda G. Molecular epidemiology by ribotyping and PCR- ribotyping of *Enterococcus faecium* strains isolated from intercontinental areas. *New Microbiol* 1998; 21:113-122.
140. Behr T, Koob C, Schedl M, Mehlen A, Meier H, Knopp D, Schleifer K, Niessner R, Ludwig W. A nested array of rRNA targeted probes for detection and identification of enterococci by reverse hybridization. *Syst Appl Microbiol* 2000; 23(4):563-572.
141. Savor C, Pfaller MA, Kruszynski JA, Hollis RJ, Noskin GA, Peterson LR. Comparison of genomic methods for differentiating strains of *Enterococcus faecium*: assesment using clinical epidemiological data. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3327-3331.
142. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33(9):2233-2239.
143. Schwartz DC, Cantor C. Separation of yeast chomosome-sized DNAs by pulsed field gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37:67-75.

144. Carle GF, Olson MV. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 1984; 12(14):5647-5664.
145. Chu G, Vollrath D, Davies RW. Separation of large DNA molecules by countour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 1984; 234:1582-1585.
146. Descheemaeker P, Lammens C, Pot B, Vandamme P, Goossens H. Evaluation of arbitrary primed PCR analysis and pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47(2):555-561.
147. Kim WJ, Weinstein RA, Hayden MK. The changing molecular epidemiology and establishment of endemicity of vancomycin resistance in enterococci at over a 6-year period. *J Infect Dis* 1999; 179:163-171.
148. Tenover FC. Laboratory methods for surveillance of vancomycin resistant enterococci. *Clin Microbiol Newslett* 1998; 20:1-5.
149. Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Glenn M, Sulakvelidze A. Improved Pulsed-Field Gel Electrophoresis for typing vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11):4244-4245.

- 150.Linden PK. Treatment options for vancomycin-resistant enterococcal infections. *Drugs* 2002; 62(3):425-441.
- 151.van Tiel FH, van den Bogaard TE. In vitro susceptibility to LY333328 of vancomycin-resistant enterococci isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40(5):733-734.
- 152.Samner EA, Reynolds PE. Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramoplanin. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:413-419.
- 153.Nadler H, Dowzicky MJ, Feger C, Pease MR, Prokocimer P. Quinupristin/dalfopristin: a novel selective-spectrum antibiotic for the treatment of multi-resistant and other Gram-positive pathogens. *Clinical Microbiol Newslett* 1999; 21(13):103-112.
- 154.Eliopoulos GM, Wennerstern CB, Gold HS, Schulin T, Souli M, Farris MG, Cerwinka S, Nadler HL, Dowzicky M, Talbot Gh, Moellering RC Jr. Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from the United States and their susceptibility in vitro to dalfopristin-quinupristin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1088-1092.
- 155.Linden PK, Moellering RC, Wood CA, Rehm SJ, Flaherty J, Bompert F, Talbot GH and Synercid study group. Treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infections with quinupristin/dalfopristin. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1816-1820.

156. Dowzicky M, Talbot GH, Ferger C, Prokocimer P, Etienne J, Leclercq R. Characterization of isolates associated with resistance to quinupristin/dalfopristin (Synercid) during a worldwide clinical program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 37(1):57-62.
157. Aeschlimann JR, Zervos MJ, Rybak MJ. Treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with RP 59500 (quinupristin-dalfopristin) administered by intermittent or continuous infusion, alone or in combination with doxycycline, in an *in vitro* pharmacodynamic infection model with simulated endocardial vegetations. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 334:2710-2717.
158. Bostic GD, Perri MB, Thal LA. Comparative *in vitro* and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multidrug-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 30(2):109-112.
159. Daly, JS, Eliopoulos GM, Willey S, Moellering RC Jr. Mechanism for action and *in vitro* activities of S-6123, a new oxazolidone compound. *Antimicrob agents Chemother* 1988; 32:1341-1346
160. Baltch A, Smith RP, Bopp LH. Comparison of inhibitory and bactericidal activities and post-antibiotic effects of LY33328 and ampicillin used singly and in combination againsts

- vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:25-64-2568.
161. Bartolini A, Colao MG, Orsi A, Dei R, Giganti E, Parenti F. *In vitro* activity of vancomycin, teicoplanin, daptomycin, MDL 62873 and other agents against staphylococci, enterococci and *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother 1990; 26:627-633.
162. Biavasco F, Manso E, Veraldo PE. *In vitro* activities of ramoplanin and four glycopeptide antibiotics against clinical isolates of *Clostridium difficile*. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:195-197.
163. Wong MT, Kauffman CA, Standiford HC, Linden P, Fort G, Fuchs HJ, Porter SB, Wenzwl P, and Ramoplanin VRE2 clinical study group. Effective suppression of vancomycin-resistant *Enterococcus* species in asymptomatic gastrointestinal carriers by a novel glycodepsipeptide, ramoplanin. Clin Infect Dis 2001; 33:1476-1480.
164. Cormican MG, Marshall SA, Jones RN. Preliminary interpretive criteria for disk diffusion testing of SCH 27899, a compound in the everninomicin class of antimicrobial agents. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 23(4):157-160.
165. Felmingham D. Towards the ideal glycopeptide. J Antimicrob Chemother 1993; 32:663-666.



166. Methods for dilution of antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4 th ed. Vol 17 (Publication no. M7-A4). Villanova, Pa: National Committee for Clinical Laboratory standards. 1997; p:1-29.
167. Pérez-Hernández X, Méndez-Álvarez S, Claverie-Martín F. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42(4):273-277.
168. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. In: *Molecular cloning, a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; p.6.1-6.62.
169. Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P, Van Laer F, Goossens H. Comparison of direct plating and broth enrichment culture for the detection of intestinal colonization by glycopeptide-resistant enterococci among hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1436-1440.
170. Statistical package for social sciences (SPSS). Version 10.0 for Windows, Chicago, Illinois. Licencia Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín.
171. Morrison AJ Jr, Wensel RP. Nosocomial urinary tract infections due to *Enterococcus*: ten years experience at a university hospital. *Arch Intern Med* 1986; 146:1549-1551.

- 172.Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991; 91 (Suppl 3B):3B72S-3B75S.
- 173.Kreft B, Marre R, Schamm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992; 60:25-30.
- 174.Moellering RC. The specter of glycopeptide resistance: current trends and future considerations. *American J Med* 1998; 104:3S-6S.
- 175.Moellering RC Jr. *Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* and *Leuconostoc* species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Disease*. Fifth edition. Churchill Livingstone, Philadelphia. 2000; p.2147-2156.
- 176.Rice LB. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 2001; 2:183-187.
- 177.Harthug S, Digranes A, Hope O, Kristiansen BE, Allum AG, Langeland N. Vancomycin resistance emerging in a clonal outbreak caused by ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6(1):19-28.
- 178.Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992; 14:1173-1178.

179. Rybkine T, Minardi JL, Sougakoff W, Collatz E, Gutmann L. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of  $\beta$ -lactam resistance. *J Infect Dis* 1998; 178:159-163.
180. Suppola JP, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M. *vanA* and *vanB* Incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3934-3939.
181. Bush, LM, Calmon J, Cherney CL, Wendeler M, Pitsakis P, Poupard J, Levison ME, Jhonson CC. High-level penicillin resistance isolates of enterococci. *Ann Med Int* 1989; 110:515-520.
182. Moellering RC Jr, Weinberg AN. Studies on antibiotic synergism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on uptake of <sup>14</sup>C-labelled streptomycin by enterococci. *J Clin Investig* 1971; 50:2580-2584.
183. Herman DJ, Gerding DN. Screening and treatment of infectious cause by resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:215-219.
184. Spera RV, Farber BF. Multiply-resistant *Enterococcus faecium*. *JAMA* 1992; 268(18):2563-2564.

185. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. Recommendation for preventing the spread of vancomycin resistance: HICPAC. *Am J Infect Control* 1995; 23:87-94.
186. Endtz HP, van den Braak N, van Belkum, Goessens D, Stroebel AB, Verbrugh HA. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1998; 36:592-594.
187. Kohner PC, Patel R, Uhl JR, Garin KM, Hopkins MK, Wegener LT, Cockerill FR 3<sup>rd</sup>. Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk dilution and automated Vitek methods for testing susceptibility of *Enterococcus spp.* *J Clin Microbiol* 1997; 35:3258-3263.
188. Willey BM, Kreiswirth A, Simor AE, Williams G, Scriver SR, Philips A, Low DE. Detection of vancomycin resistance in *Enterococcus* species. *J Clin Microbiol* 1992; 30(7):1621-1624.
189. Barton AL, Doern GV. Selective media for detecting gastrointestinal carriage of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 23:119-122.
190. Grunberg-Manago, M. Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter,

- & H. E. Umbarger (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: celular and molecular biology, 2<sup>nd</sup> ed.. Washington, DC: ASM Press. 1996; p.1432-1457.
191. Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiologic significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the *vanC* genotype). *J Clin Microbiol* 1997; 35:3166-3170.
192. Coombs GW, Kay ID, Steven RA, Pearman JW, Bertolatti D, Grub WB. Should genotypic testing be done on all phenotypically vancomycin-resistant enterococci detected in hospitals?. *J Clin Microbiol* 1999; 37(4):1229-1230.
193. Dutka-Malen S, Blaimont B, Wauters G, Courvalin P. Emergence of high-level resistance to glycopeptides in *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:1675-1677.
194. Yoshikazu I, Ohno A, Kashitani S, Iwata M, Yamaguchi K. Identification of *vanB*-type vancomycin-resistance in *Enterococcus gallinarum* from Japan. *J Infect Dis* 1996; 2:102-105.
195. Lu JJ, Wu JC, Chiuch TS, Perng CL, Chi WM, Lee WH. Characterization of highly glycopeptide-resistant *Enterococcus gallinarum* isolate. *Formos Med Assoc* 2001; 99(4):305-310.

- 196.Kariyama R, Mitsuata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. Simple and reliable multiplex PCR assay for vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8):3092-3095.
- 197.Sahm DF, Free L, Handwerker S. Inducible and constitutive expression of *vanC1*-encoded resistance to vancomycin in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1480-1484.
- 198.Pearce CL, Evans MK, Peters SM, Cole MF. Clonal diversity of vancomycin-resistant enterococci from an outbreak in a tertiary care university hospital. *Am J Infect Control* 1998; 26(6):563-568.
- 199.Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:46-65.
- 200.Thal L, Donabedian S, Robinson-Dun MI, Chow JW, Dembry L, Clewell DB, Alshab D, Zervos MJ. Molecular analysis of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from Michigan hospitals over a 6-year period. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3303-3308.
- 201.Hanna H, Umphrey J, Tarrand J, Mendoza M, Raad I. Management of an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in the medical intensive care unit of a cancer center. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; 22(4):217-219.

202. Pérez-Hernández X, Méndez-Alvarez S, Delgado T, Moreno A, Reyes-Darias JA, Sierra López A, Villar J, González A, Martín Sánchez AM, Macía M, Claverie-Martín F. Low prevalence of vancomycin-resistant enterococci in clinical samples from hospitalized patients of Canary Islands, Spain. *Internatl Microbiol* (in press).
203. del Campo R, Tenorio C, Zarazaga M, Gómez-Lus R, Baquero F, Torres C. Detection of a single *vanA* containing *E. faecalis* clone in hospitals in different regions in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2001; 84(5):746-747.
204. Tornieporth NG, Roberts RB, Jhon J, Hafner A, Riley LW. Risk factors associated with vancomycin-resistant *E. faecium* infection or colonization in 145 matched case patients and control patients. *Clin Infect Dis* 1996; 23:767-772.
205. Hayden MK. Insights into the epidemiology and control infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis* 2000; 31(4):1058-1065.
206. Lautenbach E, Bilker WB, Brennan PJ. Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin-resistance and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20(5):318-23.
207. Bhavnani SM, Drake JA, Forrest A, Deinhart JA, Jones RN, Biedenbach DJ, Ballow CH. A nationwide, multicenter, case-

- control study comparing risk factors, treatment and outcome for vancomycin-resistant and susceptible enterococcal bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 36(3):145-158.
208. Jordens JZ, Bates J, Griffiths DT. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 1994; 34:529-544.
209. Aarestrup FM. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist* 1995; 1:255-257.
210. Torell E, Cars O, Olsson-Liljequist B, Hoffman BM, Lindback J, Burman LG. Near absence of vancomycin-resistant enterococci but high carriage rates of quinolone-resistant ampicillin-resistant enterococci among hospitalized patients and nonhospitalized individuals in Sweden. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11):3509-3513.
211. Torres C, Reguera JA, Sanmartin MJ, Pérez-Díaz JC, Castanares MJ, Baquero F. *vanA*-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in sewage *J Antimicrob. Chemother* 1994; 33:553-561.
212. Tejedor MT, Gonzalez M, Pita ML, Lupiola P, Martín JL. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci



- isolated from water samples. *Int J Hyg Environ Health* 2001; 203:363-368.
213. González M, Tejedor MT, Martín JL, de Miguel I. Sensibilidad de enterococos aislados de portadores fecales humanos y animales y de aguas. Abstract 170, X Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Sevilla 2002.
214. Cohen M. Antimicrobial resistance: prognosis for public health. *Trends Microbiol* 1994; 2:125-128.
215. Murray BE. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis* 1998; 4:37-47.
216. Endtz HP, van den Braak N, van Belkum A, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, Voss A, Weersink AJ, Vandembroucke-Grauls CM, Buiting AG, van Duin A, Verbrugh HA. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997; 35(12):3026-3031.
217. Pérez-Roth E, Claverie-Martín F, Batista N, Moreno A, Méndez-Alvarez S. Mupirocin resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in a Spanish hospital. Co-application of multiplex PCR assay and conventional microbiology methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43 (in press).

218. Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, Rodríguez JC, García I, Cabrera P, Lafoz C, Samper S, Takiff H, Afonzo O, Pavon JM, Torres MJ, von Soolingen D, Enarson DA, Martin C. Epidemiological evidence of the spread of a Mycobacterium tuberculosis strain of the Beijing genotype on Gran Canaria Island. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164(7):1165-1170.