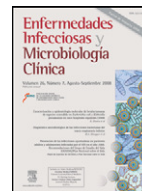




Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

Enterococcus faecium resistente a glucopéptidos en un hospital del norte de España. Caracterización molecular y epidemiología clínica

Eva Torres^a, Sonia Pérez^b, Ana Vindel^c, Jesús Rodríguez-Baño^d, Vanesa Camba^e, Rosa Villanueva^a, Teresa M. Coque^{f,g} y Germán Bou^{a,h,*}

^a Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, La Coruña, España

^b Servicio de Microbiología, Hospital Meixoeiro, Vigo, España

^c Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid, España

^d Unidad Enfermedades Infecciosas, Hospital Virgen Macarena, Sevilla, España

^e UCI, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, La Coruña, España

^f Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España

^g CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, España

^h Laboratorio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña-INIBIC, La Coruña, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 27 de junio de 2008

Aceptado el 18 de septiembre de 2008

On-line el 23 de mayo de 2009

Palabras clave:

Enterococcus faecium

Vancomicina

Gen *vanA*

Factores de riesgo

RESUMEN

Introducción: La resistencia a glucopéptidos en las especies de *Enterococcus* spp. es un problema clínico importante debido a su rápida diseminación, a la posible transferencia de la resistencia a vancomicina a patógenos más virulentos, como *Staphylococcus aureus*, y a las limitadas posibilidades terapéuticas de las infecciones causadas por estos microorganismos. En este estudio se caracterizaron 10 cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina (ERV) de 10 pacientes distintos, aisladas en este hospital entre 2004 y 2005.

Métodos: Se determinó el gen implicado en la resistencia a glucopéptidos mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. El análisis molecular de los aislados clínicos se determinó mediante electroforesis en campo pulsante (ECP). Se estudió la presencia de genes previamente asociados a epidemias y virulencia (*esp*, *hyl*, *asa1*, *gel*, *cyl*). Se realizó un estudio de casos y controles para analizar los factores de riesgo.

Resultados: Se detectó de manera mayoritaria el gen *vanA*. El análisis mediante ECP reveló 5 genotipos distintos (A-E). Resultaron mayoritarios los genotipos A (n = 3) y B (n = 3). Se detectó en todas las cepas la presencia de los genes *esp* (proteína de superficie) e *hyl* (hialuronidasa) excepto en los genotipos B y D. En todas las cepas se demostró la presencia del alelo *purK1* asociado al complejo clonal 17.

Conclusión: La administración previa de cefalosporinas, aminoglicósidos y vancomicina (solos o en combinación) se asocia significativamente a la colonización e infección por ERV.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital in northern Spain. Molecular characterization and clinical epidemiology

ABSTRACT

Keywords:

Enterococcus faecium

Vancomycin

vanA gene

Risk factors

Introduction: Glycopeptide resistance in *Enterococcus* spp. is a clinical problem because of the rapid dissemination of these microorganisms, possible transfer of vancomycin resistance to more virulent pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, and the limited therapeutic possibilities for the infections they cause. In this study, 10 strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from 10 different patients in our hospital during 2004 to 2005 were characterized.

Methods: PCR was used to analyze the gene implicated in glycopeptide resistance. Molecular analysis of clinical isolates was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The presence of genes previously associated with epidemicity/virulence (*esp*, *hyl*, *asa1*, *gel*, *cyl*) was also studied. Risk factors were determined in a case-control study.

Results: The most commonly detected gene was *vanA*. PFGE analysis revealed 5 different genotypes (A-E), with a predominance of genotype A (n = 3) and B (n = 3). The *esp* (surface protein) and *hyl* (hyaluronidase) genes were detected in all strains, with the exception of genotypes B and D. The *purK1* allele, associated with clonal complex 17 was demonstrated in all strains.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: germanbou@canalejo.org (G. Bou).

Conclusion: Prior administration of cephalosporins, aminoglycosides and vancomycin alone or in combination was significantly associated with colonization/infection by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

En los últimos años, los *Enterococcus* spp. han llegado a ser una causa importante de infección nosocomial debido a la selección de clones resistentes a la mayoría de los agentes antimicrobianos disponibles en el arsenal terapéutico¹. Los enterococos resistentes a vancomicina (ERV), o más genéricamente resistentes a glucopéptidos, se aislaron inicialmente en 1986 en Francia y el Reino Unido y, poco después, en Estados Unidos². Desde entonces, se han descrito ERV como causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo, aunque con una incidencia variable según el área geográfica y las instituciones hospitalarias^{2–6}. Debido a su rápida diseminación, la posible transferencia de la resistencia a vancomicina a otros patógenos de mayor impacto clínico, como *Staphylococcus aureus*⁷, y las posibilidades terapéuticas limitadas para el tratamiento de las infecciones causadas por ERV éstos se han convertido en un problema clínico importante.

Actualmente se conocen 5 tipos de resistencia adquirida a vancomicina, cada uno asociado a un gen ligasa diferente (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG*)^{2,6}. Los enterococos con genotipo *vanA* son generalmente resistentes a vancomicina y teicoplanina mientras que los genotipos *vanB*, *vanD*, *vanE* y *vanG* suelen asociarse a grados moderados de resistencia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina⁶. Los genotipos *vanA* y *vanB* son los más comunes y están ampliamente diseminados en Estados Unidos, Europa y Australia^{2,6}. Ambos fenotipos se han identificado en enterococos aislados de muestras clínicas, veterinarias y productos alimenticios para consumo humano.

La resistencia a glucopéptidos en *Enterococcus* es más frecuente en aislados de *Enterococcus faecium* que en otras especies del género y ha causado numerosos brotes de infecciones hospitalarias en distintas áreas geográficas^{5,6}. Aunque en menor proporción, se han descrito brotes causados por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus raffinosus* resistentes a glucopéptidos^{5,8}.

El estudio de la estructura poblacional de *E. faecium* y *E. faecalis* ha revelado la asociación de determinados complejos clonales, como el CC17 de *E. faecium* y los CC2, CC9, CC87 y CC21 de *E. faecalis*, a distintos huéspedes y nichos ecológicos. La mayoría de los aislados clínicos resistentes a antibióticos descritos están asociados a estos complejos clonales⁹. Aunque la patogénesis de las infecciones enterocócicas no se ha demostrado, se han descrito algunos genes que pueden contribuir a la virulencia de estas especies y que están asociados a la epidemividad de estos clones^{9–13}. En *E. faecalis* estos factores incluyen la sustancia de agregación (asa), implicada en los fenómenos de conjugación y que facilita la adhesión e internalización y supervivencia en las células humanas¹⁴, una gelatinasa (gel), una metaloproteasa extracelular dependiente de zinc, una citolisina (*cyl*) con actividad tóxica en células eucariotas¹⁵ y una proteína de superficie (*esp*) que favorece la adhesión a células epiteliales, la formación de biofilms y la evasión de la respuesta inmune y que está codificada por un gen localizado en una isla de patogenicidad^{12,15–17}.

Los factores asociados a la epidemividad o virulencia de *E. faecium* son una proteína con homología a la hialuronidasa (*hyl*) involucrada en procesos de virulencia en otras especies, y una proteína de superficie análoga a la de *E. faecalis* pero codificada por un gen localizado en una isla de patogenicidad diferente^{17,18}. Ambos se han identificado exclusivamente en CC17, con lo que se ha establecido una asociación entre la presencia de *esp* y clones causantes de brotes nosocomiales^{13,18–20}.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecular y epidemiológicamente los aislados clínicos de *E. faecium* resistentes

a glucopéptidos identificados en este hospital durante el período de 2004 a 2005 y determinar las variables significativas asociadas a infección y colonización por ERV.

Material y métodos

Cepas bacterianas

Se analizaron 10 aislados clínicos de *Enterococcus* spp. resistentes a glucopéptidos correspondientes a 10 pacientes que ingresaron en este hospital durante el período de junio de 2004 a diciembre de 2005. Se seleccionó un aislado por paciente (el primer aislamiento en todos los casos, y de adquisición nosocomial). Se identificaron todas las cepas mediante la utilización del sistema comercial semiautomatizado MicroScan Walk-Away y los paneles “Positive Combo Panel 22S” (Dade Internacional Inc., West Sacramento, CA, EE. UU.) y API 20 STREP (BioMerieux, Marcy l’Etoile, Francia) y se emplearon como cepas control *E. faecalis* CECT 407 y *E. faecium* CECT 4931 y 410.

Susceptibilidad antimicrobiana

Se estudiaron todas las cepas por microdilución en MicroScan Walk-Away con los paneles “Positive Combo Panel 22S” (Dade Internacional Inc., West Sacramento, CA, EE. UU.). La sensibilidad a los glucopéptidos vancomicina y teicoplanina y a linezolid y ciprofloxacino se confirmó por la técnica de difusión en disco y mediante la utilización de tiras de E-test. La sensibilidad a eritromicina, clindamicina, rifampicina, synercid y cotrimoxazol se confirmó por la técnica de difusión en disco. Se siguieron las normas del Clinical Laboratory Standards Institute (documentos M2 y M7)²¹ y se emplearon como cepas control *E. faecalis* CECT 407 y *E. faecium* CECT 4931 y 410.

Caracterización de los genes *Van* y confirmación de la identificación en cuanto a la especie

El ácido desoxirribonucleico (ADN) de las cepas estudiadas utilizado como molde en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtuvo mediante la técnica de *boiling*, resuspendiendo colonias en 500 µl de agua destilada y manteniendo esta suspensión en ebullición durante 10 min para posteriormente separar por centrifugación (5 min a 13.000 rpm) el sobrenadante que contiene el ADN. Se usaron los pares de oligodesoxinucleótidos que amplifican los genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanC3*, *ddl_{E.faecalis}* y *ddl_{E.faecium}* de acuerdo con las condiciones experimentales descritas para cada caso^{22,23}. Como controles positivos para la amplificación de los genes *vanA*, *vanB*, *vanC1* y *vanC2/C3* se utilizaron las cepas control *E. faecalis* resistente a glucopéptidos portador del gen *vanA*²⁴, *E. faecium* CKU12, *Enterococcus gallinarum* CECT 970, *Enterococcus casseliflavus* CECT 969 y *Enterococcus flavescens* CECT 4481, respectivamente.

Análisis de la clonalidad

La relación clonal entre los aislados se estableció mediante el análisis de los perfiles de macrorestricción del ADN cromosómico obtenidos por electroforesis de campo pulsante (ECP) tras

digestión enzimática con la enzima *smaI* (New England Biolabs, Boston, MA, EE. UU.), según los procedimientos y criterios previamente publicados^{25,26}.

La identificación de la secuencia de *purK* (uno de los 7 genes utilizados en el esquema de *multilocus sequence typing*) se realizó mediante la utilización de los pares de oligodesoxinucleótidos *purK1* (5'-GCA GAT TGG CAC ATT GAA AGT-3') y *purK2* (5'-tac ata aat ccc gcc tgt tty-3) y las condiciones de PCR descritas previamente¹⁸. El gen *purK* codifica la subunidad fosforibosilaminoimidazol carboxilasa adenosintrifosfatasa y su alelo 1 se considera marcador de *E. faecium* CC17^{13,19}.

Detección de genes de virulencia

Los genes de virulencia *esp*, *asa1*, *gelE*, *cyl* e *hyl* se amplificaron mediante la utilización de los oligonucleótidos descritos previamente y las siguientes condiciones de PCR: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min; 40 ciclos a 94 °C durante 1 min, 56 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min; y extensión a 72 °C durante 10 min²⁷. Se utilizaron como cepas control *E. faecalis* OG1RF (*esp*-, *asa1*-, *gelE*+, *cyl*-, *hyl*-) y *E. faecalis* TX400 (*esp*-, *asa1*+, *gelE*-, *cyl*-, *hyl*-), cedidas por B. E. Murray; *E. faecalis* MMH594 (*esp*+, *asa1*+, *gelE*+, *cyl*+, *hyl*-), cedida por N. Shankar, University of Oklahoma, y *E. faecalis* C68 (*esp*+, *asa1*-, *gelE*-, *cyl*-, *hyl*+), cedida por L. B. Rice, University of Cleveland.

Estudio de casos y controles

Por cada caso se eligieron aleatorizadamente al menos 2 controles entre los pacientes que ingresaron durante el período de estudio en el mismo servicio que el caso correspondiente, a los que se les hubiera tomado una muestra igual o similar en origen (anatómica y microbiológica) a la que fue positiva para ERV en el caso y con una estancia hospitalaria previa a la toma de la muestra similar a la del caso.

Estudio de variables para el análisis estadístico

Se estudiaron las siguientes variables tanto para los casos como para los controles: edad, sexo, enfermedad de base (enfermedad autoinmune, enfermedad hematológica, diabetes mellitus, tumor sólido, trasplante, enfermedad digestiva, enfermedad cardiovascular y enfermedad pulmonar obstructiva crónica), índice APACHE, índice de comorbilidad de Charlson, presencia de sonda nasogástrica, presencia de sonda vesical o catéter urinario, presencia de catéter intravenoso, nutrición parenteral, ventilación mecánica, cirugía previa, fallecimiento, tratamiento inmunosupresor, tratamiento antibiótico previo (betalactámicos, cefalosporinas, carbapenémicos, vancomicina, quinolonas, aminoglicósidos, antifúngicos) y días de estancia previos al aislamiento.

Análisis estadístico

Este estudio incluye el análisis univariante y de regresión logística condicional múltiple para determinar variables significativas asociadas a colonización e infección por ERV resistente a glucopéptidos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos para $p < 0,05$. Las variables cuantitativas se expresan como media \pm desviación típica. Las variables cualitativas se expresan como valor absoluto y porcentaje. La comparación de variables continuas se realizó por medio del test de la U de Mann-Whitney. La asociación de variables cualitativas entre sí se estimó por medio del test estadístico de la χ^2 y el cálculo, a su vez, de la *odds ratio* (OR) con su intervalo de confianza (IC) del 95%. Para determinar las variables asociadas de manera independiente a la

adquisición de ERV se realizó un análisis de regresión logística condicional. En este análisis se utilizaron como covariables aquellas variables que en el análisis univariado definían un caso, o aquellas variables consideradas clínicamente relevantes. El tamaño muestral de este estudio (10 casos y 22 controles) permite con una seguridad del 95%, un poder estadístico del 80%, una OR mayor o igual a 2 ante una frecuencia de exposición de los casos del 70%, y una exposición de los controles del 18%.

Resultados

Cepas bacterianas y sensibilidad a antibióticos

La tasa de ERV en este hospital durante el período de 2001 a 2007 se mantuvo desde el brote del año 2001 (entre mayo y septiembre) por debajo del 1% para *E. faecalis*, y ha aumentado del 0 al 6% para *E. faecium*; se observó un pico de incidencia del 21% en 2005, año del aislamiento de las cepas del estudio. Los 10 aislados clínicos de *E. faecium* se identificaron a partir de muestras de orina ($n = 4$), catéteres intravenosos ($n = 3$) y líquidos orgánicos (peritoneal, ascítico y drenaje peritoneal, $n = 3$). En la mayoría de los aislados (8 de 10) se amplificó el gen *vanA*; en 2 aislados se amplificó el gen *vanB*, y en ninguno de ellos se amplificaron los genes *vanC1* y *vanC2/C3*.

Uno de los aislados estudiados (aislado número 2, en *tabla 1*), correspondiente a una muestra de heces de un paciente infectado con ERV, fue sensible a vancomicina y teicoplanina y no contenía ninguno de los genes *van*. Las cepas identificadas como portadoras del gen *vanA* exhibieron resistencia a vancomicina y teicoplanina (concentración mínima inhibitoria [CMI] superior o igual a 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mientras que las 2 cepas portadoras del gen *vanB* fueron resistentes a vancomicina (CMI superior o igual a 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y sensibles a teicoplanina (CMI $< 8 \mu\text{g}/\text{ml}$). Todas las cepas fueron resistentes a penicilina, ampicilina, eritromicina, clindamicina, rifampicina y ciprofloxacino y sensibles a linezolid. Todas fueron sensibles a synercid, excepto la cepa 8, y sensibles a cotrimoxazol, excepto las cepas 4 y 8 (genotipo *vanB*). La mayoría de los aislados presentaban alto grado de resistencia a gentamicina y estreptomina, excepto las cepas 5, 7 y 8 que presentaron bajo grado de resistencia a gentamicina y las cepas 5, 7, 9 y 11 que presentaron bajo grado de resistencia a estreptomina. Las características de los aislados se exponen en la *tabla 1*.

Análisis de clonalidad

Se identificaron 5 genotipos distintos correspondientes a los 10 ERV estudiados: A ($n = 3$, subtipos A1 y A3), B ($n = 3$, subtipos B1 y B2), C ($n = 1$), D ($n = 2$) y E ($n = 1$) mediante la técnica de ECP (*tabla 1* y *fig. 1*). En un paciente se obtuvieron 2 aislados con diferente sensibilidad a glucopéptidos. La cepa 1 fue resistente a glucopéptidos y portadora del gen *vanA* (subtipo A1) mientras que la cepa 2 fue sensible a glucopéptidos y no amplificó para ninguno de los genes de resistencia estudiados (subtipo A2).

Los subtipos B1 y B2 correspondían a aislados de distintos pacientes con los genotipos *vanA* y *vanB*, respectivamente. El alelo *purK-1*, específico de *E. faecium*-CC17, fue identificado en todos los aislados estudiados (datos no mostrados).

Factores de epidemidad o virulencia

Se demostró la presencia de *esp* y de *hyl* para todos los aislados de los genotipos A, B y E (cepas 1–3, 6, 8–11). Los aislados del genotipo C (cepa 4) amplificaron solamente *esp* y los del genotipo D (cepas 5 y 7) no amplificaron ninguno de los genes analizados

Tabla 1
Aislamientos de *Enterococcus faecium* implicados en este estudio y resultados de los datos de sensibilidad antibiótica, genes de resistencia a glucopéptidos, tipificación mediante electroforesis de campo pulsante y detección de los genes de virulencia

Cepa ^a	Servicio	Muestra	Fecha aislamiento	CMI ^b AMP	CMI CIP	CMI ^c GEN	CMI VAN	CMI TEI	CMI LZD	CMI ^d SYN	Genotipo	PGFE	esp	hyl	cyl	gelE	asa
1	UCI	Orina	27/04/2005	>8	>32	>256	>256	48	2	>21(S)	vanA	A1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
2	UCI	Heces	18/05/2005	>8	>32	>256	1,5	1,5	2	>21(S)	vanA	A2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	UCI	Orina	14/06/2005	>8	>32	>256	>256	48	2	>21(S)	vanA	B1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	Reanimación	Drenaje	17/06/2005	>8	>32	>256	32	1,5	1,5	>21(S)	vanB	C	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	UCI	Catéter	13/01/2005	>8	>32	8	>256	24	1,5	>21(S)	vanA	D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6	UCI	Catéter	24/01/2005	>8	>32	>256	>256	32	2	>21(S)	vanA	A2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
7	UCI	Catéter	28/01/2005	>8	>32	8	>256	32	2	>21(S)	vanA	D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	Nefrología	Orina	14/03/2005	>8	>32	8	>256	2	2	<10(R)	vanB	B2	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
9	Reanimación	Orina	20/06/2004	>8	>32	>256	>256	32	1,5	>21(S)	vanA	E	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
10	Cirugía General	Líquido	05/12/2005	>8	>32	>256	96	24	1,5	>21(S)	vanA	B1	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
A		peritoneal															
11	Reanimación	Líquido ascítico	30/11/2005	>8	>32	4	>256	32	2	>21(S)	vanA	A3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacino; CMI: concentración mínima inhibitoria; GEN: gentamicina, LZD: linezolid; SYN: synercid; TEI: teicoplanina; UCI: unidad de cuidados intensivos; VAN:vancomicina.

^a Cepas 1 y 2 se aislaron del mismo paciente.

^b Concentración mínima inhibitoria en mg/l.

^c Bajo grado de resistencia a gentamicina: cepas 5, 7 y 8. Bajo grado de resistencia a estreptomycinina: cepas 5, 7, 9 y 11.

^d Concentración mínima inhibitoria en mm (interpretación).

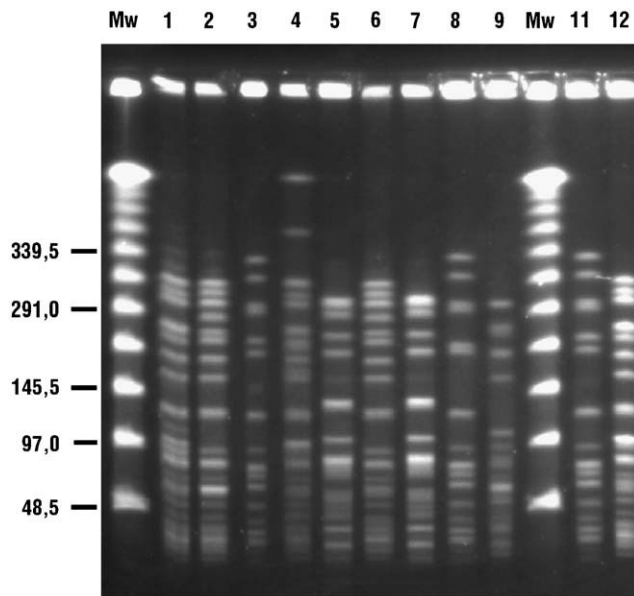


Figura 1. Estudio mediante electroforesis en campo pulsante de las cepas de enterococo resistente a la vancomicina detalladas en la tabla 1. Se indica cada cepa con el número sobre el gel Mw, marcadores de peso molecular.

(tabla 1). Todos los aislados fueron negativos para los genes *cyl*, *gelE* y *asa*.

Análisis estadístico y de regresión logística múltiple

La media de edad de los 10 pacientes estudiados (11 cepas) fue de 45,2 años, con una media de estancia previa al aislamiento de ERV de 35 días. La media de edad de los 22 pacientes control que ingresaron durante el mismo período en el que se aislaron las cepas del estudio fue de 62 años, con una media de ingreso previo al aislamiento de 52 días. Las características de los casos y los controles se muestran en la tabla 2. No se encontraron diferencias entre casos y controles en referencia a la enfermedad de base. Ninguno de los casos presentó como enfermedad de base diabetes mellitus, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad

cardiovascular, enfermedad digestiva o enfermedad hematológica, y aproximadamente el 40% de los casos y controles presentaron enfermedad hepatorrenal o tumor sólido. La inmunosupresión no fue una variable estadísticamente significativa (tabla 2). Cabe resaltar que 2 de los casos presentaron politraumatismo frente a ninguno de los controles.

Sí hubo diferencias significativas entre los casos y los controles respecto al tratamiento previo con los antibióticos vancomicina, cefalosporinas y aminoglucósidos y la asociación entre ellos. Se encontró una mayor asociación con la exposición previa a cefalosporinas (OR de 10,5; IC del 95%, rango de 1,86 a 59,4), seguida de la exposición previa a vancomicina o aminoglucósidos. En ambos casos la OR fue de 7 (IC del 95%, rango de 1,19 a 41,36). La combinación entre vancomicina y aminoglucósidos presentó la mayor asociación (OR de 15; IC del 95%, rango de 2,18 a 103).

Discusión

La incidencia de ERV en los hospitales de Europa ha aumentado en los últimos años con tasas de resistencia superiores al 10% en 6 países (<http://www.rivm.nl/earss>). La prevalencia de ERV en España, al igual que en algunos estados europeos, permanece baja, con valores inferiores al 5% (2,2% de *E. faecium* resistente a vancomicina en España en 2006), aunque se han descrito de forma esporádica brotes monoclonales y policlonales causados por *E. faecalis* y *E. faecium* de los genotipos *vanA* o *vanB* en Valencia, Santander, Palma de Mallorca, La Coruña, La Rioja y Soria, y todos estos han sido autolimitados²⁸⁻³³. En este hospital, la tasa de ERV en el período de 2001 a 2007 aumentó del 0 a 6% a expensas de *E. faecium* (fig. 2) y se observó un pico de incidencia del 21% en 2005, correspondiente al año del aislamiento de las cepas del estudio y que, de forma análoga a lo descrito en otras instituciones, no se ha mantenido en el tiempo.

Distintos clones de *E. faecium*-purk1 de los genotipos *vanA* y *vanB*, aislados en distintas áreas del hospital causaron el aumento de casos de *E. faecium* resistente a vancomicina que se describe en el presente estudio; la mayoría de estos clones presentaron factores de epidemidad o virulencia (7 de 10, genotipos A, B y E). La mayor parte de las cepas de ERV causantes de brotes hospitalarios descritas pertenecen a CC17 y las características asociadas son resistencia a ampicilina y ciprofloxacino, el gen de virulencia *esp* y a veces también *hyl*^{9,13}. La heterogeneidad

Tabla 2
Características de los pacientes del estudio (estudio de casos y controles)

Variable	Casos (n = 10)	Controles (n = 22)		p	OR (IC del 95%)
	Media (DT)	Media (DT)	p		
Edad	45,5 (22,9)	62,1 (16,4)		0,058	
Días de ingreso	34,8 (16,4)	51,95 (72,3)		0,889	
Índice APACHE	11,20	12,77		0,37	
Índice de comorbilidad de Charlson	4,5 (2,4)	4,6 (2,4)		0,92	
	n (%)	n (%)		p	
Sexo				0,47	1,75 (0,4–7,9)
Varón	5 (26,3)	14 (73,7)			
Fallecimiento (Sí)	4 (40,0)	9 (40,9)		0,96	0,96 (0,2–4,4)
Cirugía	3 (30)	10 (45,5)		0,41	0,5 (0,1–2,53)
Tratamiento previo	10 (100)	22 (100)		–	–
Vancomicina	8 (80)	8 (36,4)		0,022	7 (1,19–41,36)
Aminoglucósidos	8 (80)	8 (36,4)		0,022	7 (1,19–41,36)
Betalactámicos	3 (30)	12 (54,5)		0,197	0,36 (0,07–1,75)
Cefalosporinas	7 (70)	4 (18,2)		0,004	10,5 (1,86–59,4)
Carbapenémicos	6 (60)	12 (54,5)		0,773	1,25 (0,27–5,7)
Quinolonas	1 (10)	4 (18,2)		0,555	0,5 (0,049–5,15)
Antifúngicos	4 (40)	4 (18,2)		0,186	3 (0,57–15,87)
Cefalosporinas+aminoglucósidos	5 (50)	3 (13,6)		0,028	6,33 (1,11–35,9)
Vancomicina+aminoglucósidos	6 (60)	9 (9,1)		0,002	15 (2,18–103)
Vancomicina+cefalosporinas	5 (50)	2 (9,1)		0,009	10 (1,48–67,55)
Inmunosupresión	4 (40)	4 (18,2)		0,186	3 (0,57–15,87)
Catéter urinario/sonda vesical	7 (70)	14 (63,6)		0,725	1,33 (0,27–6,65)
Sonda nasogástrica	8 (80)	15 (68,2)		0,49	1,87 (0,31–11,19)
Catéter intravenoso	10 (100)	20 (90,9)		0,325	1,5 (0,12–44,30)
Ventilación mecánica	5 (50)	10 (45,5)		0,81	1,2 (0,27–5,36)
Nutrición parenteral	7 (70)	11 (50)		0,29	2,33 (0,48–11,44)

DT: desviación típica; IC: intervalo de confianza; OD: odds ratio.

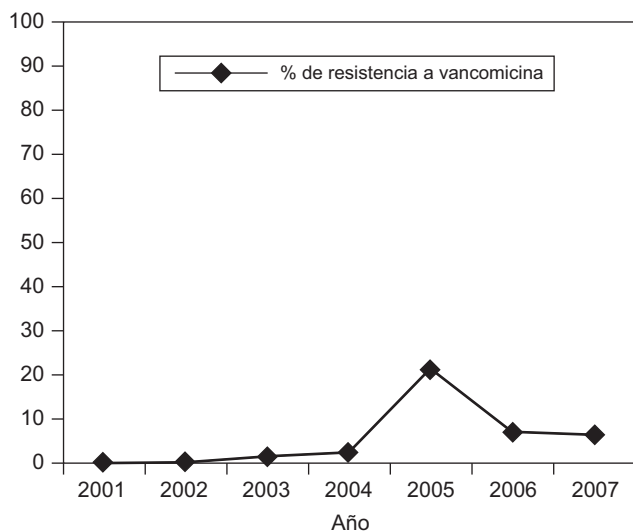


Figura 2. Evolución de la resistencia a vancomicina (en %) de los aislamientos de *Enterococcus faecium* en este hospital durante los últimos 6 años.

observada en el presente estudio puede reflejar la selección endógena a partir de la propia flora del paciente debido al tratamiento antibiótico recibido. Sin embargo, otros estudios han descrito que la mayoría de las cepas adquiridas a partir de la flora de los pacientes hospitalizados son sensibles a los antibióticos ampicilina, aminoglucósidos y quinolonas y no presentan factores de virulencia¹³. Otra posibilidad es la adquisición de elementos genéticos de resistencia a glucopéptidos por parte de cepas epidémicas o endémicas de CC17-*E. faecium* resistentes a

ampicilina y sensibles a glucopéptidos, productoras de esp como se ha descrito en otras instituciones de países con altas y bajas tasas de ERV, como Portugal y Polonia o España, Holanda, Finlandia y Noruega, respectivamente^{13,34–36}. Aunque la población de *E. faecium* resistentes a antibióticos en esta institución no se ha analizado, la selección de clones predominantes de CC17 resistentes a ampicilina no puede descartarse. La identificación de aislados productores de factores de epidemidad con un variable contenido de genes *van*, como los subtipos A1 (*vanA*) y A2 (sensible a glucopéptidos y no portador de genes *van*), o los subtipos B1 (*vanA*) y B2 (*vanB*), reflejan la adquisición de distintos elementos genéticos por parte de cepas determinadas y la importancia de la transferencia horizontal en la diseminación y persistencia de ERV en el ámbito hospitalario.

En relación con la presencia de genes de epidemidad o virulencia, todas las cepas del presente estudio amplificaron para el gen *esp*, excepto el genotipo D. La presencia de los genes *esp* se ha visto asociada a brotes hospitalarios y a la capacidad de formar biofilms^{10,11,13,17,19}, aunque este gen no es exclusivo de cepas epidémicas^{11,18,37–40}. Además, la presencia variable del gen *esp* dentro de clones ampliamente distribuidos puede explicarse por la transferencia horizontal de la isla de patogenicidad en la que se encuentra localizado^{13,18,38}. El gen *hyl* asociado a cepas implicadas en brotes hospitalarios de América y Europa^{5,13} fue identificado en todas las cepas, excepto en las de genotipo C y D. Los demás factores de virulencia, como los genes *asa* y *cyl*, sólo se han descrito para *E. faecalis*, y el *gelE* puede estar presente en cepas de *E. faecium*, pero ninguno de ellos se relaciona directamente con resistencia a glucopéptidos o brotes hospitalarios^{11,13}.

El estudio de los factores de riesgo de la infección o colonización, a pesar del bajo número de casos analizados (que limita de manera considerable la detección de otros factores de

riesgo), reveló una asociación estadísticamente significativa de la adquisición de cepas ERV con el uso previo de antimicrobianos pertenecientes a 3 familias distintas, solos o administrados de forma conjunta, en confirmación con otros estudios^{11,13}. Los casos y los controles son similares en edad, días de ingreso, índice APACHE e índice de comorbilidad. Aunque entre los casos es más frecuente la presencia de inmunosupresión, catéter urinario o sonda vesical, sonda nasogástrica, catéter intravenoso, traqueotomía o intubación y nutrición parenteral, las diferencias respecto a los controles no alcanzan la significación estadística. Tras ajustar por diferentes covariables (edad, índice APACHE, vancomicina, aminoglucósidos, cefalosporinas, inmunosupresión), la variable que tuvo un efecto independiente de todas las demás para predecir por sí misma el hecho de infección o colonización por *E. faecium* resistente a vancomicina en el presente estudio fue la utilización previa de cefalosporinas. Se trata de un factor de riesgo bien conocido para la adquisición e infección por cepas de ERV, como han mostrado otros estudios, y que subraya la importancia de estos antimicrobianos como potenciales coselectores de estos patógenos^{28,40}.

En resumen, los autores de este artículo describen un aumento en el número de aislamientos de *E. faecium*-purk1 de los genotipos *vanA* y *vanB*, mayoritariamente productores de *esp* durante el período de 2004 a 2005. La identificación de ERV y de cepas sensibles de genotipo similar a alguno de los ERV enfatiza no sólo el posible papel de determinados marcadores como *esp* en la virulencia o epidemidad de la especie estudiada sino también la posible presencia de cepas endémicas sensibles a glucopeptidos que podrían servir como sustratos para la adquisición de ERV. Los datos que se recogieron en el presente estudio ponen también de relieve el papel del tratamiento antibiótico de amplio espectro en la selección de cepas ERV del área hospitalaria y la importancia de una correcta política de antibióticos para evitar la selección de determinados clones epidémicos y probablemente la adquisición de determinantes de resistencia por parte de los éstos.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008).

Bibliografía

- Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant enterococci: The mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 2002;4:215–24.
- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:686–707.
- Goossens H. The epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Curr Opin Infect Dis.* 1999;12:537–41.
- Low DE, Keller N, Barth A, Jones RN. 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 2:133–45.
- Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis.* 2003;187:508–12.
- Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* 2003;88:269–90.
- Severin A, Tabei K, Tenover F, Chung M, Clarke N, Tomasz A. High level oxacillin and vancomycin resistance and altered cell wall composition in *Staphylococcus aureus* carrying the staphylococcal *mecA* and the enterococcal *vanA* gene complex. *J Biol Chem.* 2004;279:3398–407.
- Kawalec M, Kedzierska J, Gajda A, Sadowy E, Wegrzyn J, Naser S, et al. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:893–901.
- Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: Global dispersion and antibiotic resistance. *Current Op Microbiol.* 2006;9:454–60.
- Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis.* 1995;171:1223–9.
- Leavis HL, Willems RJL, Top J, Spalburg E, Mascini EM, Fluit AC, et al. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1108–14.
- Biavasco G, Foglia C, Paoletti C, Zaudri G, Magi G, Guaglianone E, et al. *VanA* type Enterococci from humans, animals and food: Species distribution, population structure, Tn 1546 typing and location and virulence determinants. *App Env Micro.* 2007;33:3307–19.
- Coque TM, Willems RJL, Fortun J, Top J, Diz S, Loza E, et al. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish University Hospital: Setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:2693–700.
- Sussmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun.* 2000;68:4900–6.
- Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore M. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature.* 2002;417:746–50.
- Tendolcar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, *Esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2004;72:6032–9.
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al. The enterococcal surface protein, *Esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:4538–45.
- Leavis HL, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, Van Embden J, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol.* 2004;186:672–82.
- Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1963–71.
- Willems RJL, Homan W, Topo J, et al. Variant *Esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet.* 2001;357:853–5.
- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighteenth informational supplement. M100-S18; vol. 28. No.1. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007.
- 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 Microbiology.* 1995;133:24–7.
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by Multiplex PCR. *J Clin Microbiology.* 2004;42:5857–60.
- Velasco D, Perez S, Peña F, Domínguez MA, Cartelle M, Molina F, et al. Lack of correlation between phenotypic techniques and PCR-based genotypic methods for identification of *Enterococcus* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;49:151–6.
- Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Despau E, et al. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J Clin Microbiol.* 1994;32:301–5.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Micro.* 1995;33:2233–9.
- Vankerckhoven V, Autgaerden TV, Vael C, Lammens Ch, Chapelle S, et al. Development of a Multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Micro.* 2004;42:4473–9.
- Peset V, Tallon P, Solá C, Sánchez E, Sarrión A, Pérez-Belles C, et al. Epidemiological, microbiological, clinical, and prognostic factors of bacteremia caused by high-level vancomycin-resistant *Enterococcus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:742–9.
- Maciá MD, Juan C, Oliver A, Hidalgo O, Pérez JL. Caracterización molecular de un brote por *Enterococcus faecalis* resistente a los glucopeptidos en una unidad de cuidados intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23:460–3.
- Velasco D, Pérez S, Ángeles Domínguez M, Villanueva R, Bou G. Description of a nosocomial outbreak of infection caused by a *vanA*-containing strain of *Enterococcus faecalis* in La Coruña, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:892–3.
- Francia MV, Castro J, García C, Ugalde E, Monteagudo I, Campo AB, et al. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Spain with *vanA* genotype and apparent teicoplanin susceptibility [abstract 228]. En: 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2005, Copenhagen; 2005. p. 228.
- Álvarez MJ, Marco F, Torres C, López M, Sáenz Y, Almela M, et al. Caracterización genotípica de un brote intrahospitalario por *Enterococcus faecium* resistente a glucopeptidos [abstract 58]. Congreso SEIMC, A Coruña, Mayo 2007. A coruña; 2007. p. 22.

33. Nebreda T, Oteo J, Aldea C, García-Estébanez C, Gastelu-Iturri J, Bautista V, et al. Hospital dissemination of a clonal complex 17 *vanB2*-containing *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;22:806–7.
34. Ruiz-Garbajosa P, Cárdenas Zurita G, Santos Faria ME, Cantón R, Baquero F, Coque TM. Adquisición esporádica de resistencia a glicopéptidos por clones persistentes y endémicos de *Enterococcus faecium* resistente a ampicilina en un mismo hospital durante un período de diez años [abstract 46]. XIII Congreso SEIMC, Madrid, Mayo 2008. Madrid; 2008. p. 19.
35. Top J, Willems R, Van der Velden S, Asbroek M, Bonten M. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2008;46:214–9 Epub 2007 Oct 31.
36. 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;6:19–28.
37. Coque TM, Willems RJ, Cantón R, Del Campo R, Baquero F. High occurrence of esp among ampicillin resistant and vancomycin susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:1035–8.
38. Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M, Ozorowski T, Konopka L, Hryniewicz W. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: Probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1781–7.
39. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, esp, among isolates of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54:232–5 Epub 2004 Jun 10.
40. Edmond MB, Ober JF, Weinbaum DL, Pfaller MA, Hwang T, Sanford MD, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: Risk factors for infection. *Clin Infect Dis.* 1995;20:1126–33.