

Resistencia a Vancomicina en Cepas de *Enterococcus faecium* Aisladas en un Hospital Universitario

Vancomycin Resistance in Enterococcus faecium Strains Isolated at a University Hospital

**Perozo Mena, Armino José¹;
Castellano González, Maribel Josefina²;
Ginestre Pérez, Messaria María³;
Rincón Villalobos, Gresleida Coromoto⁴**

¹Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio autónomo Hospital
Universitario de Maracaibo. Dirección Postal: Edificio Ciencia y Salud,
Planta Baja Laboratorio de Bacteriología. Facultad de Medicina LUZ.

E-mail: aperozomena@cantv.net; aperozomena@interlink.net.ve;

²Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Dirección Postal: Edificio Ciencia y Salud, Planta Baja Laboratorio
de Bacteriología. Facultad de Medicina LUZ.

E-mail: maribelcast@interlink.net.ve; maribeljo@cantv.net;

³Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Dirección Postal: Edificio Ciencia y Salud, Planta Baja Laboratorio
de Bacteriología. Facultad de Medicina LUZ.

⁴Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Dirección Postal: Edificio Ciencia y Salud, Planta Baja Laboratorio
de Bacteriología. Facultad de Medicina LUZ.

Resumen

Las especies que conforman el género *Enterococcus*, son cocos Gram positivos, que usualmente habitan el tracto intestinal de humanos y animales, pero que también pueden ser aislados de fuentes ambientales. Son capaces de sobrevivir a un amplio rango de condiciones ambientales adversas de estrés, lo que les permite colonizar un amplio rango de nichos, incluidos los ambientes hospitalarios. La patogenicidad nosocomial de los enterococos ha emergido en los últimos años, así como su incrementada resistencia a los antibióticos glicopéptidos. El presente estudio intenta

determinar la resistencia a vancomicina de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas en un hospital universitario en el período enero-diciembre del año 2009, así como caracterizar el determinante genético responsable de la resistencia. Para ello se utilizaron los métodos para determinar susceptibilidad a glicopéptidos descritos por el CLSI, adicionalmente se determinó el elemento genético responsable de la resistencia mediante la reacción en cadena de la polimerasa. El 48,81% de las cepas de *E. faecium* estudiadas fueron resistentes a vancomicina y el PCR demostró la presencia del gen *vanA* que confiere altos niveles de resistencia a glicopéptidos. Debido al elevado número de aislados resistentes a vancomicina dentro de la institución se sospecha de la presencia de un brote nosocomial producido por este microorganismo; esta cepa epidémica poseedora del gen *vanA* posiblemente está dispersa en los diferentes servicios de la institución, por lo que se sugiere realizar estudios epidemiológicos para determinar el rol que este microorganismos juega en la producción de infecciones nosocomiales en la institución estudiada.

Palabras clave: *Enterococcus faecium*, vancomicina, resistencia, *vanA*.

Abstract

Genus *Enterococcus* species are gram positive cocci, usually inhabitants of human and animal intestinal tracts, but can also be isolated from their environmental sources. They are able to survive a wide range of adverse environmental stress conditions, allowing them to colonize a wide range of niches, including hospital environments. Nosocomial pathogenicity of enterococci has emerged in recent years, as well as their increased resistance to glycopeptide antibiotics. This study attempts to determine the resistance to vancomycin of *Enterococcus faecium* strains isolated in a university hospital during the January-December period of 2009, as well as to characterize the genetic determinant responsible for its resistance. Methods to determine susceptibility to glycopeptides described by CLSI were used; additionally, the genetic elements responsible for resistance were identified using the polymerase chain reaction. Of the *E. faecium* strains studied, 48.81% were resistant to vancomycin, and PCR showed presence of the *vanA* gene that confers high levels of resistance to glycopeptides. Due to the large number of isolates resistant to vancomycin, the presence of a nosocomial outbreak produced by this microorganism was suspected; this epidemic strain possessing a *vanA* gene is possibly scattered in different services of the institution; therefore, epidemiological studies should be performed to determine the role this microorganism plays in the production of nosocomial infections in the institution under study.

Key words: *Enterococcus faecium*, vancomycin, resistance, *vanA*.

Introducción

Los miembros del género *Enterococcus* se caracterizan por ser cocos Gram positivos en pares o cadenas cortas, catalasa negativa, anaerobios facultativos (1-3). El hábitat principal de estos microorganismos es el tracto gastrointestinal de humanos y animales como parte de la flora intestinal normal (3), lo que representa un importante reservorio

de cepas de enterococos asociadas con enfermedades, ya que a partir de este migran para causar infección o diseminarse a otros hospedadores o al medio ambiente; adicionalmente poseen varias características intrínsecas que les confieren habilidad para crecer y sobrevivir bajo condiciones adversas, lo cual contribuye a su persistencia en los ambientes hospitalarios (3, 4).

Estos microorganismos poseen poco potencial patogénico en el hospedador normal, sin embargo, son patógenos oportunistas, particularmente en ancianos con enfermedades subyacentes y en paciente inmuno-comprometidos hospitalizados por largos períodos, que han recibido terapia antimicrobiana de amplio espectro o sometidos a instrumentación invasiva. La incidencia de las diferentes especies de enterococos en infecciones, probablemente, es el reflejo de su distribución en el tracto gastrointestinal (3). *E. faecalis* se aísla con mayor frecuencia produciendo procesos infecciosos que *E. faecium* (5). Entre las infecciones producidas por los miembros de este género se encuentran principalmente las infecciones complicadas del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis, infecciones pélvicas e intraabdominales, infecciones de heridas y tejidos blandos, infecciones del tracto respiratorio, endoftalmitis, sepsis neonatal y raramente, meningitis (6, 7).

En las últimas décadas, los enterococos se han convertido en importantes agentes de infección nosocomial, siendo la segunda o tercera causa de infección nosocomial del tracto urinario, infecciones de heridas y bacteriemia en los EEUU (3, 6, 8). Otro factor especialmente preocupante es el incremento en el número de aislamientos de enterococos resistentes a Vancomicina (ERV) (9-12). En América Latina, un estudio colaborativo de Resist-Net determinó la presencia de ERV en diferentes países, con una prevalencia de 1% a 3%, por otra parte el programa SENTRY encontró una prevalencia de 2,9% entre los enterococos responsables de bacteriemias intrahospitalarias (13, 14).

En cuanto a la resistencia a vancomicina en Suramérica, Venezuela fue el primer país latinoamericano en reportar resistencia a este antibiótico (15), un estudio realizado por Contreras y col. (16), demuestra que la resis-

tencia es baja y se mantuvo alrededor del 1% entre 1988 y 1994, a diferencia de lo demostrado en los diferentes estudios de vigilancia de la resistencia realizados a nivel mundial, donde se evidencia un rápido aumento de las tasas de resistencia (17, 18); en el caso de Venezuela, la estabilidad en la tasa de resistencia quizás se deba a que la utilización de vancomicina se mantuvo restringida a aquellas infecciones que no responden a la antibioterapia inicial y a su escaso uso como droga de primera línea. Sin embargo, para el año 2008, el programa venezolano de vigilancia de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos (PROVENRA) reporta un aumento de la resistencia a vancomicina en cepas de *E. faecium*, ubicándose en un 8,07% (12).

El presente estudio intenta determinar el porcentaje de cepas de ERV presentes en un hospital universitario entre el período enero-diciembre del año 2009, así como su distribución en las salas de hospitalización, y el determinante genético responsable de la resistencia a vancomicina presente en estos aislados.

Materiales y Métodos

En este estudio, se analizaron todas las cepas de *E. faecium* aisladas a partir de los cultivos de rutina realizados a los pacientes reclusos en un hospital universitario entre enero-diciembre de 2009. La identificación y aislamiento de las cepas fue realizada por el personal del Centro de Referencia Bacteriológica del SAHUM (CRB-SAHUM); utilizando para ello metodologías convencionales (3, 7) y el sistema automatizado VITEK (BioMérieux). Debido a que *E. faecalis* y *E. faecium* representan más del 95% de los aislamientos clínicos de enterococos (19), se incluyó un primer específico para la identificación de estas dos especies, basado en la amplificación

por PCR de un fragmento interno del gen *ddl* que codifica la ligasa D-ala-D-ala (Tabla 1).

Una vez aislada e identificada la cepa, se procedió a determinar la susceptibilidad a vancomicina mediante el método de Baüer-Kirby (20), para la interpretación de los resultados se siguieron las recomendaciones del CLSI (21, 22); adicionalmente se realizó el test para la detección de resistencia a vancomicina descrito por el CLSI (21, 22), utilizando una placa de agar BHI suplementado con 6µg/ml de vancomicina.

La determinación de los genes de resistencia a vancomicina se realizó mediante un ensayo de PCR múltiple. Los cebadores utilizados fueron descritos por Depardieu y col. (23), con base en la secuencia de alineamiento de los genes de resistencia *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*, para detectar y amplificar fragmentos internos con tamaños que van desde 430 hasta 941 pb (Tabla 1).

Para la extracción del ADN, se utilizó un método de lisis alcalina de extracción rápida (24), para ello se sembró el microorganismo en estudio en una placa de agar sangre de carnero al 5%, se incubó de 18 a 24 horas a 35°C ± 1°C. Posteriormente, se tomaron 10 colonias y se resuspendieron en buffer de lisis (10mM Tris HCl [pH 8,0]; 1mM EDTA [pH 8,0]; 10µg/µl de lizozima), se incubó a 35°C por 1h, luego se agregó SDS al 10% y proteínasa K (250ng/µl), se incubó por 1h a 50°C; se realizó una extracción con una mezcla 1:1 de fenol/cloroformo, se mezcló en vortex, se centrifugó, se separó la fase acuosa y se precipitó toda la noche a -20°C con etanol absoluto. Al día siguiente, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante, se agregó etanol al 70%, se centrifugó y se decantó el etanol por inversión, se dejó secar al aire; luego, se resuspendió el sedimento con 50µl de buffer TE (10mM Tris HCl pH 8; 1mM EDTA

pH 8) y se guardó en congelación a -20°C hasta el momento de la amplificación.

Para la amplificación, se utilizó una PCR-múltiple (23), en la cual se amplificó de forma conjunta parte del fragmento del gen *ddl* específico de especie y parte de los seis genes *van* específicos de los seis genotipos de resistencia (Tabla 1). Los primers oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron suministrados por Eurogentec®. Para la amplificación, se utilizaron 3µl de ADN total en 100µl de mezcla de reacción conteniendo buffer de PCR 1X (10mM Tris-HCl [pH 9,0]; 50mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1% Triton X-100; 0,2 mg de albúmina bovina sérica por mililitro), 50µM de cada desoxinucleótido trifosfato, 40 pmol de cada uno de los pares de primers (Tabla 1) y 2 U de Taq polimerasa (Promega). La amplificación se realizó con el siguiente perfil de ciclos térmicos: 3 minutos a 94°C y 30 ciclos de amplificación consistentes de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 54°C y 1 minuto a 72°C, con 7 minutos a 72°C para la extensión final. Los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y buffer Tris-Borato-EDTA 0,5X; el gel se coloreó con bromuro de etidio.

Los fenotipos y la presencia de los genes de resistencia a vancomicina se expresan en porcentajes y la asociación o independencia entre las diferentes variables se determinó mediante el uso del estadístico Ji-cuadrado, con un nivel de significancia del 95%.

Resultados

En este estudio se aislaron 293 cepas de *E. faecium* en los cultivos de rutina realizados a los pacientes en el período en estudio, 30,72% de las cepas se aislaron de las unidades de cuidados intensivos (UCI), mientras que el 69,28% restante se aislaron de los ser-

Tabla 1 Primers Deoxinucleotidos Utilizados Para la Detección de Genes de Resistencia a Vancomicina e Identificación de Especie.

Primers ^a	Secuencia (5' → 3')	Gen	Posiciones ^b	Tamaño del producto del PCR (pb)	Número de acceso GenBank
EA1(+)	GGGAAAACGACAATTGC	<i>vanA</i>	176-192	732	M97297
EA2(-)	GTACAATGCCGCGCTTA		907-891		
EB3(+)	ACGGAATGGGAAGCCGA	<i>vanB</i>	169-185	647	U00456/ AF550667
EB4(-)	TGCACCCGATTTTCGTTC		815-799		
EC5(+)	ATGGATTGGTAYTKGTAT ^c	<i>vanC1/2</i>	133-150/142-159	815/827	AF162694/ L29638
EC8(-)	TAGCGGGAGTGMICYMGTAAC ^c		947-929/968-950		
ED1(+)	TGTGGATGCGATATTCAA	<i>vanD</i>	357-375	500	AF130997/ AY082011
ED2(-)	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA		856-837		
EE1(+)	TGTGGTATCGGAGCTGCAG	<i>vanE</i>	364-382	430	AF430807
EE2(-)	ATAGTTTAGCTGGTAAC		793-777		
EG1(+)	CGGCATCCGCTGTTTTTGA	<i>vanG</i>	68-86	941	AY271782
EG2(-)	GAACGATAGACCAATGCCTT		1008-989		
DD13(+)	CACCTGAAGAAACAGGC	<i>ddl</i> (<i>E. faecalis</i>)	206-222	475	U00457
DD3-2(-)	ATGGCTACTTCAATTCACG		681-661		
FAC1-1(+)	GAGTAAATCACTGAACGA	<i>ddl</i> (<i>E. faecium</i>)	1-18	1091	U39790
FAC2-1(-)	CGCTGATGGTATCGATTCAT		1091-1072		

^a (+) primer con sentido; (-) primer antisentido.

^b La numeración de los nucleótidos comienza en el codón de iniciación del gen.

^c K = G o T; M = A o C; Y = C o T.

vicios de hospitalización. La Tabla 2 muestra la distribución de las cepas de *E. faecium* de acuerdo al tipo de muestra. No se observó diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre el aislamiento de *E. faecium* y el tipo de muestra.

De las 293 cepas de *E. faecium* aisladas a partir de muestras clínicas, 143 (48,81%) fueron resistentes a vancomicina, mientras que las 150 restantes (51,19%) fueron sensi-

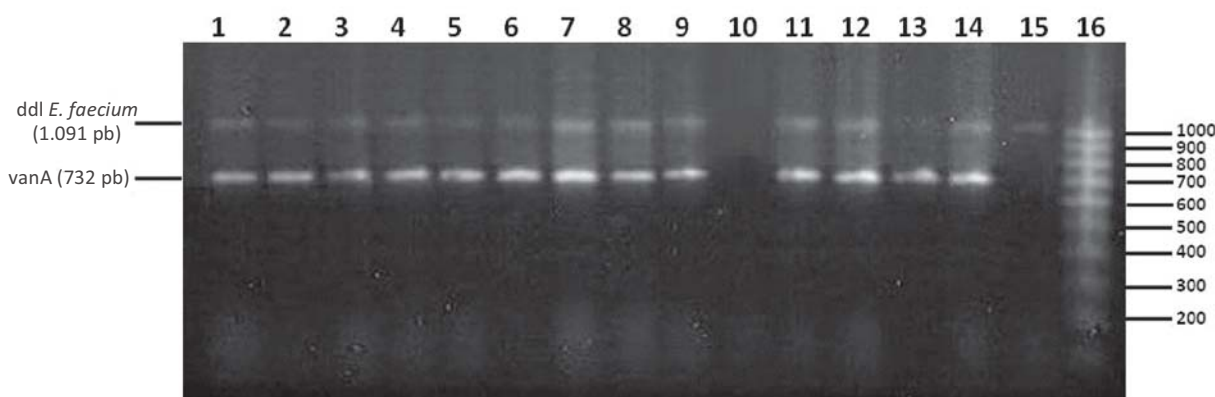
bles a este antimicrobiano. Todas las cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina fueron resistentes a teicoplanina cuando se les realizó el método del disco (no presentaron halo de inhibición), dieron positivo el agar screening suplementado con 6 µg/ml de vancomicina. Todo esto indica una resistencia de alto nivel que se corresponde con el fenotipo VanA, el cual confiere resistencia a vancomicina y teicoplanina.

Tabla 2 Distribución de las cepas de *E. faecium* de acuerdo al tipo de muestra.

Tipo de Muestra	Porcentaje de Aislamiento
Sangre	18,75%
Orina	18,75%
Secreciones	12,50%
Úlceras	8,33%
Catéter de vía central	6,25%
Líquido cefalorraquídeo	6,25%
Heridas quirúrgicas	4,17%
Secreciones de pie diabético	4,17%
Quemaduras	4,17%
Secreciones traqueales	4,17%
Líquido ascítico	2,08%
Abscesos	2,08%
Heridas no quirúrgicas	2,08%

En cuanto a la detección de los genes de resistencia a vancomicina (*van*), las 143 cepas estudiadas amplificaron el fragmento de 732 pb (Figura 1), por lo que poseen el gen *vanA* que confiere altos niveles de resistencia a vancomicina y teicoplanina, lo que concuerda con lo observado en la detección fenotípica de resistencia a glicopéptidos. Este genotipo (*vanA*), es uno de los más frecuentemente involucrados en casos de brotes nosocomiales a nivel mundial (25-28).

Las 143 cepas identificadas como *E. faecium* por métodos fenotípicos tradicionales amplificaron el fragmento de 1.091 pb, lo que confirma genotípicamente su identificación, por lo que, podría decirse que existe bastante correlación entre los métodos de caracterización fenotípica tradicionales y los métodos genotípicos.



Cariltes del 1 al 9 y del 11 al 14 aislados clínicos de *E. faecium*, obsérvese la amplificación del fragmento de 732 pb (*vanA*) y de 1.091 pb (*ddl E. faecium*); carril 10, control negativo de amplificación; carril 15 cepa control (*E. faecium* CVC432); carril 16 marcador de peso molecular (100 pb).

Figura 1. Identificación a Nivel de Especie y Detección del Genotipo de Resistencia a Vancomicina Mediante PCR Múltiple.

Discusión

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

En cuanto a la distribución de los aislados por tipo de muestra, se observa concordancia con lo reportado en varios estudios, donde se considera al género *Enterococcus* como el principal productor de infecciones complicadas del tracto urinario, bacteriemia y endocarditis, adicionalmente se ha descrito la producción de infecciones intra-abdominales y pélvicas, de heridas y tejidos blandos, infecciones del tracto respiratorio y en muy pocas ocasiones de cuadros de meningitis (6, 7). La prevalencia de estos microorganismos como patógenos nosocomiales es frecuente, siendo una de las principales causas de bacteriemia e infecciones urinarias nosocomiales en los EEUU (3, 6, 8).

La aparición y extensión de la resistencia a glicopéptidos 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. Los laboratorios de microbiología juegan un papel importante en esta prevención, ya que, la detección rápida y precisa de ERV constituye la primera línea de defensa, tanto para establecer el tratamiento apropiado para el paciente como para tomar las debidas medidas de control epidemiológico.

co. La resistencia a glicopéptidos se viene registrando en la última década en hospitales de distintas partes del mundo, presentándose en muchos de ellos en forma de brotes (8, 30-38). Se han descrito diferentes fenotipos de resistencia a glicopéptidos en *Enterococcus*, los fenotipos VanA y VanB son los más frecuentes; sin embargo, el fenotipo VanA es el que se encuentra más ampliamente difundido y está asociado a brotes nosocomiales en instituciones de salud (1, 26, 39).

Por otra parte, entre los genotipos de resistencia a glicopéptidos, es importante diferenciar aquellos que son adquiridos y transferibles (*vanA* y *vanB*) de los intrínsecos y no transferibles (*vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*). Los primeros presentan altos niveles de resistencia y hasta la fecha son los que se han implicado en la mayoría de los brotes hospitalarios, por lo que su presencia implica la rápida toma de medidas de control. La importancia clínica y epidemiológica de los que poseen resistencia intrínseca está menos clara, tanto porque presentan niveles bajos o intermedios de resistencia a vancomicina como porque hasta el momento no han estado implicados en brotes, aunque pueden causar infecciones graves (40).

La importancia de realizar pruebas genotípicas a todos los ERV detectados en un hospital ha sido ya recomendada por algunos autores (41), debido a que, aunque esporádicamente, se han aislado cepas de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* que llevan conjuntamente los genotipos *vanC* y *vanA* o bien *vanC* y *vanB* (42, 43). Recientemente Schouten y cols. (44), han informado sobre el aislamiento de una cepa de *E. casseliflavus* (CIM para vancomicina de 16 ug/ml y CIM 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 elemen-

tos móviles que codifiquen para la resistencia de alto nivel a glicopéptidos. Es necesario realizar un ensayo de PCR para asegurar que tales enterococos no son portadores de los genes *vanA* o *vanB* además de *vanC* (42).

En el presente trabajo se ha utilizado una PCR-Múltiple descrito por Depardieu y cols. (23) que permite tanto la identificación a nivel de género como la identificación de los genes de resistencia involucrados. Este ensayo múltiple permite realizar de forma simultánea la identificación a nivel de especie y el genotipo de resistencia, 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 los genes *ddl* permitió la precisa identificación de los aislados de *Enterococcus* a nivel de especie y el uso de los cebadores van condujo a la detección de los genes de resistencia a glicopéptidos. La PCR- Múltiple ha sido por tanto un método capaz de identificar simultáneamente los aislados clínicos a nivel de especie y detectar los genotipos de resistencia a glicopéptidos presentes, acortando significativamente el tiempo de obtención de los resultados. Debido a que, *E. faecalis* y *E. faecium* representan más del 95% de los aislamientos clínicos de enterococos (19), se incluyó en este estudio un primer específico para la identificación de estas dos especies, basado en la amplificación de un fragmento interno del gen *ddl* que codifica la ligasa D-ala-D-ala; esto permitirá corroborar los resultados fenotípicos obtenidos por los métodos tradicionales.

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 coloniza-

dos (39, 45, 46). Existen numerosas evidencias que relacionan éste hecho con el uso de la avoparcina (glicopéptido) como promotor del crecimiento animal (47, 48). La avoparcina puede haber seleccionado enterococos con alto nivel de resistencia a glicopéptidos aumentando por tanto el reservorio de genes de resistencia (49) que al estar codificados por elementos móviles (plásmidos y transposones) pueden transmitirse a otras especies (50).

También se ha especulado sobre la posible dispersión de cepas resistentes en el 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 (51). Por éste motivo, en 1995, se prohibió el uso de éste antibiótico glicopéptido en las granjas de la Unión Europea (52). A pesar de esta prohibición, en el año 2000, se efectuó un trabajo en Dinamarca para conocer el impacto de ésta medida así como de la suspensión a partir de 1995 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 (53).

Este estudio demuestra la presencia de cepas de *E. faecium* resistentes a glicopéptidos debido a la presencia del gen *vanA*, el alto número de cepas aisladas presume la presencia de un brote dentro de la institución, por lo que se recomienda realizar estudios epidemiológicos y detección del estado de portador en el personal de salud para controlar la diseminación de estos microorganismos dentro de la institución.

Referencias Bibliográficas

- (1) Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009 Jun 1; 155(6):1749-57.
- (2) Pompei R, Lampis G, Berlutti F, Thaller MC. Characterization of yellow-pigmented enterococci from severe human infections. *J Clin Microbiol* 1991 Dec; 29(12):2884-6.
- (3) Texeira L, Siqueira M, Facklam R. *Enterococcus*. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press; 2007. p. 430-42.
- (4) Endtz HP, van den BN, van BA, Goessens WH, Kreft D, Stroebel AB, et al. Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 1998 Feb; 36(2):592-4.
- (5) Amyes SGB. Enterococci and streptococci. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007 May; 29 (Supplement 3): S43-S52.
- (6) Hancock L, Gilmore M. Pathogenicity of Enterococci. In: Fischetti V, Novick R, Ferretti J, Portnoy D, Rood J, editors. *Gram-Positive Pathogens*. Washington DB USA: ASM Press; 2000. p. 251-8.
- (7) Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. *Diagnóstico Microbiológico*. Quinta Edición ed. Editorial Médica Panamericana; 1999.
- (8) Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990 Jan 1; 3(1): 46-65.
- (9) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2001, issued August 2001. *Am J Infect Control* 2001 Dec; 29(6):404-21.
- (10) Mendez-Alvarez S, Perez-Hernandez X, Claverie-Martin F. Glycopeptide resistance in enterococci. *Int Microbiol* 2000 Jun; 3(2):71-80.
- (11) Pineda M, Bonilla X, Perozo-Mena A. Boletín Sobre Etiología y Resistencia Bacteriana. 2007. Centro de Referencia Bacteriológica SAHUM.
- (12) Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos. Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos. 2009. 10-9-2009.
- (13) 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 May 15;32 Suppl 2: S133-S145.
- (14) SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Gram Positive Pathogens Susceptibility Report. 2009. 10-8-2009.
- (15) Carmona O, Guzmán M, Martín G. Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos en Venezuela. *Sociedad Venezolana de Microbiología*; 2002.
- (16) Contreras R, Texeira G, Inciarte L, Sanz L, Carmona O, Grupo Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana. Resistencia de *Enterococcus* a los antimicrobianos en Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 1995; 15(1):11-5.
- (17) Frieden TR, Munsiff SS, Low DE, Willey BM, Williams G, Faur Y, et al. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City. *Lancet* 1993 Jul 10; 342(8863): 76-9.
- (18) Manso E, De SG, Biavasco F, Varaldo PE, Sambo G, Maffei C. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1993 Sep 4; 342(8871): 616-7.
- (19) Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000 Oct 1; 13(4):686-707.
- (20) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966 Apr; 45(4):493-6.
- (21) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, editor. M100-S20[30]. 2010. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- (22) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard Tenth Edition. Clinical and Laboratory

- Standards Institute, editor. MO2-A10[29]. 2009. Clinical And Laboratory Standard Institute.
- (23) 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 Microbiol* 2004 Dec; 42(12):5857-60.
- (24) 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 Jan; 33(1):24-7.
- (25) Biavasco F, Foglia G, Paoletti C, Zandri G, Magi G, Guaglianone E, et al. VanA-Type Enterococci from Humans, Animals, and Food: Species Distribution, Population Structure, Tn1546 Typing and Location, and Virulence Determinants. *Appl Environ Microbiol* 2007 May 15; 73(10):3307-19.
- (26) Khan MA, van der Wal M, Farrell DJ, Cossins L, van Belkum A, Alaidan A, et al. Analysis of VanA vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Saudi Arabian hospitals reveals the presence of clonal cluster 17 and two new Tn1546 lineage types. *J Antimicrob Chemother* 2008 Aug 1; 62(2):279-83.
- (27) Paoletti C, Foglia G, Princivalli MS, Magi G, Guaglianone E, Donelli G, et al. Co-transfer of vanA and aggregation substance genes from *Enterococcus faecalis* isolates in intra- and interspecies matings. *J Antimicrob Chemother* 2007 May 1; 59(5):1005-9.
- (28) Song JH, Ko KS, Suh JY, Oh WS, Kang CI, Chung DR, et al. Clinical implications of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) with VanD phenotype and vanA genotype. *J Antimicrob Chemother* 2008 Apr 1; 61(4):838-44.
- (29) Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000 Oct 1; 13(4):513-22.
- (30) Abele-Horn M, Vogel U, Klare I, Konstabel C, Trabold R, Kurihara R, et al. Molecular Epidemiology of Hospital-Acquired Vancomycin-Resistant Enterococci. *J Clin Microbiol* 2006 Nov 1; 44(11):4009-13.
- (31) Ergani-Ozcan A, Naas T, Baysan BO, Ogunc D, Inan D, Colak D, et al. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric unit at a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2008 May 1; 61(5):1033-9.
- (32) Fica A, Jemenao MI, Bilbao P, Ruiz G, Sakurada A, Perez de AE, et al. [Emergency of vancomycin-resistant *Enterococcus* infections in a teaching hospital in Chile]. *Rev Chilena Infectol* 2007 Dec; 24(6):462-71.
- (33) Ofner-Agostini M, Johnston BL, Simor AE, Embil J, Matlow A, Mulvey M, et al. Vancomycin-resistant enterococci in Canada: results from the Canadian nosocomial infection surveillance program, 1999-2005. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008 Mar; 29(3):271-4.
- (34) Yildirim M, Sencan I, Ozdemir D, Oksuz S, Yilmaz Z, Sahin I. [Vancomycin and high-level aminoglycoside resistant *Enterococcus* carriage and the risk factors related to resistance in hospitalized patients]. *Mikrobiyol Bul* 2007 Apr; 41(2):271-7.
- (35) Yeh KM, Siu LK, Chang JC, Chang FY. Vancomycin-resistant enterococcus (VRE) carriage and infection in intensive care units. *Microb Drug Resist* 2004;10(2):177-83.
- (36) 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 Dec; 26(6):563-8.
- (37) Thal L, Donabedian S, Robinson-Dunn B, Chow JW, Dembry L, Clewell DB, et al. Molecular analysis of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates collected from Michigan hospitals over a 6-year period. *J Clin Microbiol* 1998 Nov; 36(11): 3303-8.
- (38) 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 Apr; 22(4):217-9.
- (39) Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 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 Jun; 37(2):127-37.
- (40) Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the vanC genotype). *J Clin Microbiol* 1997 Dec 1; 35(12):3166-70.
- (41) Coombs GW, Kay ID, Steven RA, Pearman JW, Bertolatti D, Grubb WB. Should genotypic testing be done on all phenotypically vancomycin-resistant enterococci detected in hospitals? *J Clin Microbiol* 1999 Apr; 37(4):1229-30.
- (42) 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 Jul; 38(7):1675-7.
- (43) Lu JJ, Wu JC, Chiueh TS, Perng CL, Chi WM, Lee WH. Characterization of a highly glycopeptide-resistant *Enterococcus gallinarum* isolate. *J Formos Med Assoc* 2000 Apr; 99(4):305-10.
- (44) Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000 Nov; 19(11):816-22.
- (45) 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 Feb; 36(2):437-42.
- (46) Jordens JZ, Bates J, Griffiths DT. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother* 1994 Oct; 34(4):515-28.
- (47) Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother* 1994 Oct; 34(4):507-14.
- (48) Stobberingh E, van den BA, 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 animals to humans? *Antimicrob Agents Chemother* 1999 Sep; 43(9):2215-21.
- (49) Aarestrup FM. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. *Microb Drug Resist* 1995; 1(3):255-7.
- (50) French GL. Enterococci and vancomycin resistance. *Clin Infect Dis* 1998 Aug; 27 Suppl 1: S75-S83.
- (51) Bostic GD, Perri MB, Thal LA, Zervos MJ. Comparative in vitro and bactericidal activity of oxazolidinone antibiotics against multidrug-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998 Feb; 30(2):109-12.
- (52) Seid J, Asrat D. Occurrence of extended spectrum [beta]-lactamase enzymes in clinical isolates of *Klebsiella* species from Harar region, eastern Ethiopia. *Acta Tropica* 2005 Aug; 95(2):143-8.
- (53) Dutka-Malen S, Leclercq R, Coutant V, Duval J, Courvalin P. Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1990 Oct; 34(10):1875-9.