

M. González¹
O. Afonso²
M. T. Tejedor³

Susceptibilidad a antimicrobianos y tipificación molecular de *Enterococcus faecium* aislados de muestras de origen humano, animal y ambiental en Gran Canaria

¹Área de Microbiología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

²Área de Microbiología
Hospital Universitario Insular de Gran Canaria

³Área de Microbiología
Facultad de Veterinaria
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

El estudio comparativo de los perfiles de sensibilidad frente a antimicrobianos y la tipificación molecular de los aislados de *Enterococcus* de diferentes orígenes pueden proporcionar información importante para el análisis epidemiológico de las infecciones causadas por este género bacteriano. Se estudiaron aislados clínicos y se tomaron muestras de heces de humanos (personas hospitalizadas y voluntarios sanos), heces de aves y muestras ambientales. Se obtuvieron 68 aislados de *E. faecium*, de los cuales 43 procedían de humanos, 5 de aves y 20 de aguas. Se estudiaron los patrones y los mecanismos de resistencia a antibióticos y se caracterizaron los aislados mediante sus perfiles al aplicar electroforesis en campo pulsante (PFGE). Se usó la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para detectar la presencia de ocho genes de resistencia a antibióticos aminoglicósidos. Se observaron diferencias en los porcentajes de resistencia a antimicrobianos en las muestras clínicas y no clínicas. Todos los aislados fueron sensibles a vancomicina y teicoplanina. Se detectaron cuatro genes de resistencia a aminoglicósidos, siendo los más frecuentes *ant(6)-Ia* y *aph(3')-IIIa*. La presencia de aislados resistentes a gentamicina en los que no se detectaron genes de resistencia mediante RCP sugiere que pueden existir otros genes de resistencia adicionales. La alta frecuencia de aislados resistentes a ampicilina entre los enterococos procedentes de muestras clínicas, y el hecho de que varios aislados compartan el mismo perfil de PFGE parece sugerir la presencia de una cepa de *E. faecium* resistente a ampicilina endémica en nuestro hospital.

Palabras clave:

Resistencia a antimicrobianos. *E. faecium*. Reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Electroforesis en campo pulsante (PFGE).

Rev Esp Quimioter 2009;22(3):120-126

Antimicrobial susceptibility and molecular typing of *Enterococcus faecium* isolated from humans, chickens and environment in Canary Islands (Spain)

Comparative studies on antimicrobial susceptibility patterns and molecular typing of *Enterococcus* isolates of different origins provides valuable information concerning the epidemiology of enterococcal infections. We analyzed clinical isolates and we surveyed faecal samples of humans (hospitalised patients and healthy volunteers), faecal samples of poultry and environmental samples. A total of 68 *E. faecium* isolates were obtained: 43 from humans, 5 from poultry and 20 from water. We compared the antibiotic resistance patterns and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) profiles of these strains. We used polymerase chain reaction (PCR) to examine them for the presence of 8 aminoglycoside resistance genes. Differences among percentages of antimicrobial resistance between clinical and non clinical isolates were found. All enterococci were susceptible to vancomycin and teicoplanin. Four aminoglycoside resistance genes were detected, most frequently *ant(6)-Ia* and *aph(3')-IIIa*. Presence of isolates resistant to gentamicin but negative for all genes tested suggest that additional resistance genes may exist. VRE are still rare inside and outside hospitals in Gran Canaria (Spain). The high frequency of ampicillin resistance among clinical enterococci and the fact that several isolates share the same PFGE type were isolated from different wards of our hospital suggest that ampicillin-resistant *E. faecium* are endemic in our Hospital.

Key words:

Antimicrobial resistance. *E. faecium*. Polymerase chain reaction (PCR). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

INTRODUCCIÓN

Enterococcus faecium está considerado como una causa importante de infecciones nosocomiales¹. La resistencia a antimicrobianos en esta especie ha ido aumentando y en la actualidad incluye antibióticos aminoglicósidos, penicilinas y glicopéptidos.

Correspondencia:

M.ª Teresa Tejedor Junco
Área de Microbiología
Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Apartado de Correos 550
35080 Las Palmas de Gran Canaria
Correo electrónico: mtejedor@dcc.ulpgc.es

Los reservorios de enterococos resistentes a antibióticos no han sido completamente establecidos. Diversos autores²⁻⁵ proponen como fuentes de aislados clínicos resistentes a animales, humanos, alimentos o ambiente. El estudio de las relaciones genéticas entre los aislados de enterococos procedentes de muestras humanas y de otros orígenes podría proporcionar información de interés sobre la epidemiología de las infecciones enterocócicas.

El objetivo de nuestro estudio es detectar la presencia de *E. faecium* en muestras de origen humano, animal y ambiental, analizar sus patrones de resistencia a antibióticos, los mecanismos implicados y sus perfiles de PFGE y comprobar si existe correlación entre los resultados obtenidos y el origen de los aislados.

MÉTODOS

Microorganismos

Se recogieron muestras de heces de personas sanas, hospitalizadas y aves, utilizando hisopos. Las muestras se sembraron directamente en Agar m-Enterococcus (mE, Difco). Las placas se incubaron a 37 °C y se examinaron a las 24 y 48 h. Las colonias con apariencia de enterococos en este medio y que estaban formadas por cocos grampositivos que no poseían catalasa, y crecían en medios con 6,5% de NaCl se consideraron presuntivamente enterococos.

En el estudio se incluyeron también 20 aislados de *E. faecium* obtenidos a partir de muestras clínicas: orina (6), abscesos (7), sangre (6) y catéter (1).

Se analizaron muestras de aguas depuradas y agua de playa. Para la detección de enterococos fecales en estas muestras, se filtraron 100 mL de agua y los filtros fueron incubados en Agar Slanetz (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) a 37 °C durante 48 h. Se contaron las colonias rojas y rosas y se transfirieron a tubos con Agar Kanamicina-Esculina-Azida (KAA, Difco). Las colonias negras en KAA y que estaban formadas por cocos grampositivos, catalasa negativos se consideraron presuntivamente enterococos.

Los aislados se conservaron en Agar Brain Heart Infusion (BHI, Difco) y una colonia de cada muestra se inoculó en 5 mL de Caldo Todd-Hewitt y se incubó con agitación a 35 °C durante 18 h. Estos cultivos en caldo se utilizaron como inóculos en las pruebas de identificación.

Identificación bioquímica

La identificación bioquímica se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Facklam y Collins⁶, y añadiendo la prueba de metil- α -D-glucopiranosido⁷.

Las siguientes cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) se usaron como controles: *E. avium* CECT 968, *E. durans* CECT 411, *E. hirae* CECT 279, *E. gallinarum* CECT 970,

E. casseliflavus CECT 969, *E. faecium* CECT 410, *E. malodoratus* CECT 971.

Sensibilidad a antimicrobianos

Para detectar los enterococos resistentes a vancomicina (ERV) los filtros se colocaron también en Agar m-Enterococcus con 6 μ g de vancomicina por mL y las muestras de heces fueron inoculadas en Caldo Kenner Fecal (KF-broth, Difco) con 6 μ g de vancomicina por mL. Los tubos que viraban a amarillo se sembraron en Agar m-Enterococcus con 6 μ g de vancomicina por mL.

La resistencia de alto nivel (HLR) a aminoglicósidos se determinó mediante siembra en agar BHI con 2.000 μ g de estreptomina (SM2000) (Laboratorios Normon, Madrid, España) por mL y agar BHI con 500 μ g de gentamicina (GM500) por mL. La resistencia a vancomicina (V) se comprobó mediante resiembra en agar BHI con 6 μ g de vancomicina por mL. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para vancomicina (V), teicoplanina (TEC), ampicilina (AM), penicilina (P), gentamicina (GM) y estreptomina (SM) se determinaron siguiendo las metodologías propuestas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards⁸. La sensibilidad a cloranfenicol (C), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT), fosfomicina (FOS), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), ciprofloxacino (CIP), eritromicina (E), rifampicina (RA), tetraciclina (TE), linezolid (LZD) y levofloxacino (LEV) se determinaron mediante el método de difusión de disco.

E. faecalis ATCC29212 y *E. faecalis* ATCC51299 se usaron como cepas de referencia.

Determinación de betalactamasas

En las cepas de enterococos cuyas CMI para penicilina y/o ampicilina eran ≥ 8 mg/L se estudió la presencia de β -lactamasas utilizando discos de Nitrocefina (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Caracterización genética de la resistencia de alto nivel a aminoglicósidos

Se llevó a cabo la RCP, tal como la han descrito diversos autores, para amplificar los genes *aph(2'')-Ia-acc(6')-Ie*, *aph(3'')-IIIa*, *ant(4'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, y *aph(2'')-Id*⁹ y *ant(6'')-Ia* y *ant(3'')-Ia*¹⁰. Los controles positivos utilizados en la RCP fueron: *E. faecium* SF11770 (*aph(2'')-Ib*), *E. gallinarum* SF9117 (*aph(2'')-Ic*) y *E. casseliflavus* VC73 (*aph(2'')-Id*).

PFGE de ADN genómico

Se utilizó una modificación del método de Donabedian et al.¹¹ para preparar el ADN genómico. Las bacterias se inocu-

laron en 10 ml de caldo BHI, se dejaron crecer durante 18 h y se recogieron mediante centrifugación. El sedimento fue re-suspendido en 2 ml de tampón PIV (1 M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,6) y se mezcló con 2 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1,6% a 55 °C. La mezcla se transfirió a moldes para insertos (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) y se refrigeró durante 1 h. Los insertos se incubaron a 37 °C durante 18 h en 2 ml de tampón de lisis (6 mM Tris, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% ácido deoxicólico, 0,5% sarcosina, 20 mg de RNAsa por ml, 1 mg de lisozima por ml, pH 7,6), se incubó a 55 °C durante 48 h en 2 ml de solución ESP (0,5 mM EDTA pH 9-9,5, 1,0% sarcosina, 50 mg de proteínaasa K por ml), se incubó a temperatura ambiente durante 24 h con 10 ml de TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,5), se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 1 h con 10 ml de TE nuevos y se almacenó en TE a 4 °C. Un cuarto de cada molde de muestra se digirió con 30 U de *Sma*I (Amersham Pharmacia Biotech) durante toda la noche. Los fragmentos de ADN se separaron en un gel de agarosa al 1% (agarose Serva) usando un equipo CHEF-DR® II System (Bio-Rad Laboratories, CA USA) con pulsos de 5-15 s durante 12 h seguidos de pulsos de 15-40 s durante 10 h (temperatura 14°C, 6 V/cm). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron con luz UV. Los patrones de bandas se interpretaron tal como describen Tenover et al.¹².

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se han incluido un total de 68 *E. faecium* aislados de humanos (43), gallinas (5) y agua (20). Veintitrés de los 43 aislamientos de humanos fueron obtenidos de la microbiota normal de voluntarios sanos (9) y hospitalizados (14). Los restantes 20 aislados eran los causantes de la infección en diversos pacientes de nuestro hospital y fueron obtenidos de orina (6), abscesos (7), sangre (6) y catéter (1). Cinco aislados se obtuvieron de heces de gallina. Los 20 aislados ambientales fueron obtenidos de agua de playa (15) y aguas depuradas (5).

En la tabla 1 se presentan los datos de sensibilidad para vancomicina, teicoplanina, ampicilina, penicilina, gentamicina, estreptomycin, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, fosfomicina, amoxicilina/ácido clavulánico, ciprofloxacino, eritromicina, rifampicina, tetraciclina, linezolid y levofloxacino.

El número de aislados clínicos resistentes a penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico SM2000, GM500, ciprofloxacino, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol y levofloxacino fue superior al de aislados no clínicos. Por el

Tabla 1	Sensibilidad a antimicrobianos de <i>Enterococcus faecium</i>																		
	Clínicos n = 20						No clínicos (totales) n = 48						Humanos (portadores) n = 23			No clínicos n = 48			
										Gallinas (portadores) n = 5			Agua n = 20						
Antimicro- bianos	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
P	75		25	8,3		91,7	13		87			100	6,7		93,3			100	
AM	70		30	2,1		97,9	4,3		95,7			100			100			100	
AMC	60		40	2,1		97,9	4,3		95,7			100			100			100	
V	0	5,3	94,7	0		100			100			100			100			100	
TEC	0		100	0		100			100			100			100			100	
GM500	21		79	6,2		93,8			100	20		80	13,3		86,7			100	
SM2000	79		21	20,8		79,2	13		87	100		100	13,3		86,7			100	
CIP	66,7	19	14,3	48	30	22	52,2	26	21,8	80	20		53,3		46,7			20	80
E	90,4	4,8	4,8	61,2	30,6	8,2	63,6	31,8	4,6	100			60		40	40	20	40	40
FOS	19		81	61,4	13,6	25	60,9	8,7	30,4	20	40	40	53,3	20	26,7	75		25	25
SXT	47,6		52,4	10,2	2	87,8	13		87			100	6,7		93,3	20	20	60	60
RA	33,3	38,1	28,6	44	8	48	30,4	4,3	65,3	100			53,3	13,3	33,4	20		80	80
TE	35	5	60	38		62	21,7		78,3	100			53,3		46,7			100	100
C	10		90	10,2	8,2	22	8,7	17,4	73,9			100	20	6,7	73,3			100	100
LZD	0		100	0		100			100			100			100			100	100
LEV	35	10	55	2,1	4,2	93,7			100			100	7,7	7,7	84,6			100	100

P: penicilina; AM: ampicilina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; V: vancomicina; TEC: teicoplanina; GM500: Alto nivel de resistencia a gentamicina; SM2000: Alto nivel de resistencia a estreptomycin; CIP: ciprofloxacino; E: eritromicina; FOS: fosfomicina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; RA: rifampicina; TE: tetraciclina; C: cloranfenicol; LZD: linezolid; LEV: levofloxacino.

contrario, el número de aislados no clínicos resistentes a fosfomicina, rifampicina y tetraciclina fue superior al de aislados clínicos.

Más del 90% de los aislados clínicos de enterococos fueron resistentes a la eritromicina y el porcentaje de aislados resistentes a este antibiótico fue también alto (61,2%) en cepas no clínicas. El uso de tilosina (un análogo estructural de la eritromicina) como promotor del crecimiento y el uso de eritromicina en medicina humana y veterinaria podrían haber facilitado la aparición y diseminación de *Enterococcus* resistentes a este antibiótico.

Las diferencias más importantes entre aislados clínicos y no clínicos se observaron en la resistencia a penicilina y ampicilina. Entre los aislados clínicos la resistencia a penicilina y ampicilina fue del 75% y 70% respectivamente y en aislados no clínicos fue 8,3% y 2,1%. En ninguna de las cepas resistentes a ampicilina se detectaron betalactamasas. En *E. faecium* es frecuente una alta prevalencia de cepas resistentes a penicilina y ampicilina^{2,13}. Diversos autores han descrito diferencias similares entre aislados clínicos y no clínicos y una baja prevalencia de cepas resistentes a penicilina y/o ampicilina en aislados no clínicos de *E. faecium*^{5,14}.

El 61,4% de los aislados no clínicos fue resistente a fosfomicina mientras que sólo el 19% de los aislados clínicos lo eran. La resistencia a tetraciclina y rifampicina era mucho más frecuente en enterococos aislados de muestras de agua y animales que en los aislados de humanos, probablemente debido al amplio uso veterinario de estos antibióticos.

Todos los aislados de enterococos incluidos en este estudio eran sensibles a vancomicina y teicoplanina. La baja prevalencia de enterococos resistentes a vancomicina (ERV) en aislados clínicos de las Islas Canarias ha sido descrita por diversos autores^{15,16}. Nuestros resultados contrastan con los obtenidos por otros autores en diversos países europeos^{2,17,18} incluyendo otros estudios españoles¹⁹. Sin embargo, en dos estudios, uno en Suecia²⁰ y otro en Hong Kong²¹, los autores encontraron que la prevalencia de ERV en pacientes hospitalizados y externos era prácticamente cero. Decelis et al.²² en Malta, obtuvieron una prevalencia de ERV muy inferior a la descrita en la mayoría de los países europeos. Estos datos sugieren una situación muy diferente en cuanto a los enterococos resistentes a glicopéptidos en las Islas Canarias si la comparamos con la existente en otras zonas de España y en otros países de Europa¹⁷.

En cuanto al linezolid y el levofloxacino, el linezolid presentaba los mejores resultados frente a los enterococos de todos los orígenes, lo que coincide con los resultados de diversos autores²³⁻²⁵, aunque se han descrito *E. faecium* multirresistentes y resistentes a linezolid sin exposición previa a dicho antibiótico²⁶. Por otra parte, el 35% de los enterococos de muestras clínicas eran resistentes a levofloxacino frente a un 2,1% de los aislados no clínicos. El incremento del uso de fluoroquinolonas se ha asociado con un au-

mento de la resistencia en *Enterococcus* spp. a este grupo de antimicrobianos.

El 79% de los aislados clínicos mostraban HLR a SM mientras que sólo el 21% presentaban HLR a GM. En los aislados no clínicos, la HLR a aminoglicósidos fue inferior a la de los aislados clínicos. Se analizaron los genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglicósidos mediante RCP. Identificamos el gen *aph(3')-III* en 25 aislados, incluyendo 17 aislados clínicos, 2 portadores humanos, 2 aves y 4 aislados de agua. El gen *ant(4')-Ia* sólo se detectó en un aislado clínico.

El gen *aph(2'')-Ia-acc(6')-Ie* se detectó en 4 de 5 aislados clínicos con HLRGM, además de en 1 aislado de aguas entre los 3 no clínicos que presentaban HLRGM. Los genes *ant(3'')-Ia*, *aph(2'')-b*, *aph(2'')-c* y *aph(2'')-d* no fueron detectados en este estudio. A pesar de que la diseminación mundial de enterococos HLRGM se ha debido principalmente a la transmisión del gen del enzima bifuncional, se han descrito los nuevos genes de resistencia a GM (*aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* y *aph(2'')-Id*) en aislados de *E. gallinarum*²⁷, *E. casseliflavus*²⁸, y diversos aislados clínicos de *E. faecium*^{28,29}. En un estudio con gallinas³⁰ se detectaron enterococos que contenían genes no identificados de resistencia a aminoglicósidos. En nuestro estudio, los mecanismos moleculares que originan HLRGM en las tres cepas en las que no se detectó ningún gen, pueden deberse a la presencia de genes no descritos o a diferencias en la región iniciadora del primer utilizado en la RCP.

El gen *ant(6)-Ia* se detectó en 26 aislados, incluyendo 13 clínicos, 7 portadores humanos, 3 gallinas y 3 aislados de aguas. El gen *ant(6)-Ia* fue detectado en 13 aislados clínicos aunque uno de ellos se consideró sensible a SM. Cuatro aislados eran HLRSM pero no presentaban *ant(6)-Ia* o *ant(3'')-Ia*; La CMI de estos aislados era 4.000 u 8.000 mg/ml por lo que HLRSM no es probable que se deba a alteraciones en los ribosomas.

Diferentes estudios en enterococos han demostrado que las cepas pueden portar varios genes que codifican enzimas modificadores de aminoglicósidos^{27,30}. Hemos encontrado cuatro combinaciones de genes (tabla 2), siendo la más frecuente *aph(3')-III - ant(6)-Ia*, detectada en 8 aislados. La combinación *aph(3')-III - ant(6)-Ia - aac(6')+aph(2'')*, que causa resistencia a SM y GM aparecía en 4 (20%) de los aislados clínicos. Esta combinación de genes es importante desde el punto de vista clínico porque se pierde el sinergismo entre aminoglicósidos y agentes que inhiben la síntesis de la pared bacteriana.

Encontramos aislados multirresistentes en todos los tipos de muestras analizadas. Diecisiete aislados clínicos (85%) mostraban resistencia a cuatro o más de los antibióticos ensayados y 15 (75%) eran resistentes a seis antibióticos o más. No se detectó un patrón de resistencias repetido en los aislados. Entre los aislados no clínicos, 38 enterococos (75%) eran resistentes a cuatro o más antibióticos y 12 (25%) eran resis-

Combinaciones de genes	N.º aislados	Combinaciones de genes de enzimas modificadores de aminoglicósidos	
		Aislados clínicos n.º (%) n = 20	Aislados no clínicos n.º (%) n = 48
<i>aph(3')-III / ant(6)-Ia - ant(4')-Ia</i>	1	1 (5%)	
<i>aph(3')-III / aac(6')+aph(2'')</i>	1		1 (agua) (2%)
<i>aph(3')-III / ant(6)-Ia</i>	8	7 (35%)	1 (gallinas) (2%)
<i>aph(3')-III / ant(6)-Ia / aac(6')+aph(2'')</i>	4	4 (20%)	

tentes a seis o más de los antimicrobianos ensayados. Al igual que en los aislados clínicos, no existía un patrón de multirresistencia que se repitiera significativamente. Tanto en los aislados clínicos como en los no clínicos, la resistencia a SM2000 iba acompañada en la mayoría de los casos por resistencia a E y CIP, lo que sugiere la existencia de genes asociados.

En infecciones nosocomiales se han descrito con frecuencia aislados multirresistentes de *E. faecium*. En nuestro estudio, la aparición de cepas multirresistentes es relativamente común, tanto en cepas clínicas como en no clínicas (proce-

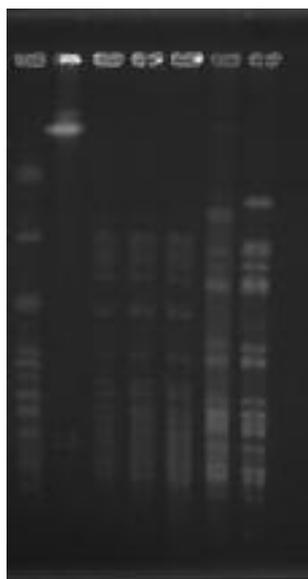


Figura 1 | Electroforesis en campo pulsante de cinco aislados de *E. faecium* resistentes a ampicilina. Las líneas 3, 4 y 5 son idénticas y las líneas 6 y 7 están muy relacionadas.

dentes de humanos, animales y ambiente). La presencia de enterococos con HLR a aminoglicósidos ha sido descrita por otros autores³¹. Dado que en nuestra área las playas son utilizadas con frecuencia para actividades recreativas, la presencia de genes de enzimas modificadores de aminoglicósidos en los aislados de *E. faecium* de muestras de agua de playa parece indicar que el agua puede ser vehículo o reservorio para la transmisión de enterococos resistentes.

Todos los aislados de *E. faecium* fueron genotipados mediante PFGE para analizar la posible relación clonal entre los aislados de diferentes orígenes. Entre los métodos moleculares utilizados para la tipificación molecular, la electroforesis en campo pulsante se considera el más fiable debido a su poder de discriminación, sensibilidad y reproducibilidad^{32,33}. Observamos una amplia variabilidad genotípica entre los aislados clínicos y no clínicos, lo que coincide con lo descrito por otros autores^{2,3,11,34,35}. En 3 de los aislados clínicos se encontró un pulsotipo idéntico (E_{fm} -A) (figura 1). Estos 3 aislados presentaban también un patrón similar de resistencia a antimicrobianos, siendo HLRGM, HLRSM y resistentes a penicilina, ampicilina, ciprofloxacino, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, rifampicina y levofloxacino. En los 3 aislados se detectó el gen *aac(6')+aph(2'')*. Otros 2 aislados clínicos compartían un patrón de PFGE muy similar al anterior, al que denominamos E_{fm} -B. Ambos aislados presentaban HLRSM y eran resistentes a penicilina, ampicilina, ciprofloxacino, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, rifampicina y levofloxacino. Los 5 aislados procedían de muestras de pacientes ingresados en el Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, aunque en diferentes Servicios.

En conclusión, los aislados de *E. faecium* en nuestro entorno muestran una amplia variabilidad genética. Por otra parte, no se detectan enterococos que presenten resistencia a glicopéptidos ni en aislados clínicos ni en los procedentes de otros tipos de muestras. Por el contrario, la alta frecuencia de aislados clínicos de enterococos resistentes a ampicilina y el hecho de que varios de los aislados compartan patrones de PFGE similares, parece indicar que existe una cepa endémica de *E. faecium* ampicilina-resistente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al personal del Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria su inestimable colaboración en la recogida de aislados clínicos de enterococos. Este estudio ha sido subvencionado en parte por el Proyecto del Gobierno de Canarias PI 1999/158 y por el Proyecto FUNCIS PI 7/00.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wade JJ. *Enterococcus faecium* in Hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997;16:113-9.

2. Dicuonzo G, Gherardi G, Lorino G, Angeletti S, Battistoni F, Bertuccini L et al. Antibiotic resistance and genomic characterization by PFGE of clinical and environmental isolates of enterococci. *FEMS Microbiol Lett* 2001;201:205-11.
3. Hammerum AM, Fussing V, Aarestrup FM, Wegener HG. Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:677-80.
4. Lu H, Weng XH, Yin YK, Pang MY, Tang YW. *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans. *J Clin Microbiol* 2002;40:913-7.
5. Van den Bogaard AE, Willems R, London N, Topenicillin J, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:497-505.
6. Facklam RR, Sham DF, Teixeira LM. *Enterococcus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (editores). *Manual of Clinical Microbiology* 7th edition. American Society for Microbiology. Washington DC, 1999;297-305.
7. Chen DK, Pearce L, McGeer A, Low DE, Willey BM. Evaluation of D-Xylose and 1% Methyl- α -D-Glucopyranoside fermentation test for distinguishing *Enterococcus gallinarum* from *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3652-5.
8. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth Informational Supplement. Document M100-S12. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
9. Van de Klundert JAM, Vliegthart JS. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ (editores). *Diagnostic Molecular Microbiology, Principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993;547-52.
10. Udo EE, Al-Sweith N, John P, Chugh TD. Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:233-8.
11. Donabedian SM, Chow JW, Boyce JM, McCabe RE, Markowitz SM, Coudron PE et al. Molecular typing of Ampicillin-Resistant, non-lactamase-producing *Enterococcus faecium* isolates from diverse geographic areas. *J Clin Microbiol* 1992;30:2757-61.
12. 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 Microbiol* 1995;33:2233-9.
13. Miranda G, Lee L, Kelly C, Solorzano F, Leanos B, Muñoz O et al. Antimicrobial resistance from enterococci in a Pediatric Hospital. Plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin and streptomycin resistance. *Archiv Med Res* 2001;32:159-63.
14. Picazo JJ, Betriu C, Rodríguez-Avial I, Culebras E, Gómez M; Grupo VIRa. Vigilancia de resistencia a los antimicrobianos: estudio VIRa 2004. *Enferm Infecc Microbiol Clín* 2004;22: 517-25.
15. González-Martín M, de Miguel I, Cañas A, Martín-Sánchez AM. Resistencia a antibióticos en aislamientos clínicos del género *Enterococcus*. *Rev Esp Quimioter* 2000;13:412-6.
16. Pérez-Hernández X, Méndez-Álvarez S, Delgado T, Moreno A, Reyes-Darias A, Sierra-López A et al. Low prevalence of vancomycin-resistant enterococci in clinical samples from hospitalized patients of the Canary Islands, Spain. *Int Microbiol* 2002;5:117-20.
17. Gamboroto K, Ploy MC, Turlure P, Grelaud C, Martin C, Bordessoule D et al. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol* 2000;38:620-4.
18. Novais C, Sousa JC, Coque TM, Peixe LV and the Resistance Study Group. First report of the activity of linezolid against Portuguese enterococci from human, animal and environmental sources. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1314-5.
19. Del Campo R, Ruiz-Garbosa P, Sánchez-Moreno MP, Baquero F, Torres C, Cantón R et al. Antimicrobial resistance in recent fecal enterococci from healthy volunteers and food handlers in Spain: genes and phenotypes. *Microb Drug Resist* 2003;9:47-60.
20. Torell E, Cars O, Olsson-Liljequist B, Hoffman BM, Lindbäck J, Burman LG. The Enterococcal-Study Group. 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;37:3509-13.
21. Boost M, Lai L, O'Donoghue M. Drug resistance in fecal enterococci in Hong Kong. *J Infect Chemother* 2004;10:326-30.
22. Decelis S, Borg MA, Cuschieri P. Absence of carriage of glycopeptide-resistant enterococci by at-risk hospitalised patients in Malta. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:861-2.
23. Ballou CH, Jones RN, Biedenbach DJ. North American ZAPS Research Group. A multicenter evaluation of linezolid antimicrobial activity in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:75-83.
24. Muller-Serieys C, Drugeon HB, Etienne J, Lascols C, Leclercq R, Nguyen J et al. Activity of linezolid against Gram-positive cocci isolated in French hospitals as determined by three in-vitro susceptibility testing methods. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:242-6.
25. Ruiz-Garbajosa P, Del Campo R, Coque TM, Sánchez-Moreno MP, Cantón R, Baquero F. Sensibilidad a linezolid en poblaciones de *Enterococcus* aisladas en flora fecal de individuos sanos en la comunidad. *Rev Esp Quimioter* 2001;14 (Supl. 1):108.
26. Raad II, Hanna HA, Hachem RY, Dvorak T, Arbuckle RB, Chaiban G et al. Clinical-use-associated decrease in susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* to linezolid: a comparison with Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3583-5.
27. Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD et al. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:511-4.
28. Tsai SF, Zervos MJ, Clewell DB, Donabedian SM, Sham DF, Chow JW. A new high-level gentamicin resistance gene, *aph(2'')-Ia*, in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1229-32.
29. Kao SJ, You I, Clewell DB, Donabedian SM, Zervos MJ, Petrin J et al. Detection of the high-level aminoglycoside resistance gene *aph(2'')-Ib* in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2876-9.
30. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB, Ladely SR. Genetic relatedness of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry carcasses. *Avian Dis* 2004;48:100-7.
31. Rice EW, Messer JW, Johnson CH, Reasoner DJ. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates of enterococci. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:374-6.

32. Nallapareddy SR, Duh RW, Singh KV, Murray BE. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2002;40:868-76.
33. Erice CS, Huynh H, Paule S, Hollis RJ, Noskin GA, Pfaller MA et al. Comparison of an automated ribotyping system to restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis for differentiating vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol* 2002;40:1858-61.
34. Simonsen GS, Småbrekke L, Monnet DL, Sorensen TL, Moller JK, Kristinsson KG et al. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:323-31.
35. Vancanneyt M, Lombardi A, Andrietto C, Knijff E, Torriani S, Bjorkroth KJ et al. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:1381-91.