

# *Enterococcus* resistentes a glucopéptidos en Europa: un problema hospitalario creciente

María Victoria Francia

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

Los enterococos han atraído una gran atención en los últimos años como una causa importante de infecciones nosocomiales debido al aumento de su resistencia a gran variedad de agentes antimicrobianos, entre ellos los glucopéptidos<sup>1</sup>. Los enterococos resistentes a vancomicina (ERV), o más genéricamente a glucopéptidos, se aislaron primero en Europa en 1986 y poco después en Estados Unidos<sup>2,3</sup>. En los últimos 10 años se han descrito ERV como causantes de infecciones nosocomiales, sobre todo en Estados Unidos, donde los ERV constituyen un problema particularmente grave<sup>3-6</sup>.

Los posibles factores asociados a la aparición de resistencia a vancomicina son el uso de antibióticos en veterinaria y la adición de los mismos a los piensos animales como promotores de crecimiento y el aumento significativo en el uso de la vancomicina a causa de una mayor incidencia de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en la mayoría de los hospitales<sup>1,3,7,8</sup>.

Hoy en día los ERV se han convertido en un problema clínico importante debido a su rápida diseminación, posibilidades terapéuticas limitadas y la posible transferencia de la resistencia a vancomicina a patógenos más virulentos, como de hecho ya ha ocurrido. Se han publicado tres aislados esporádicos de SARM resistente a vancomicina, en dos de los cuales un ERV se aisló del mismo foco de infección, lo que sugiere transferencia de la resistencia a vancomicina directamente desde el enterococo<sup>9-13</sup>.

Actualmente, se conocen seis tipos de resistencia a vancomicina, cada uno asociado con un gen ligasa diferente (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* y *vanG*)<sup>3,8</sup>. La resistencia proporcionada por *vanC* (bajo nivel de resistencia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina) es una propiedad intrínseca pero no transferible de *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus/flavescens*, relacionada con la presencia de genes específicos *vanC1* y *vanC2/C3*, respectivamente. El resto de los tipos son adquiridos, presumiblemente transferibles, inducibles y codificados por operones de genes. Los enterococos con fenotipo VanA son típicamente resistentes a vancomicina y teicoplanina mientras que los tipos VanB y los recientemente descritos VanD, VanE y VanG están asociados con niveles entre moderados y altos de resistencia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina<sup>8</sup>. Los fenotipos VanA y VanB son los más comunes y representan el 60 y el 40% respectivamente de los aislados de ERV en Estados Unidos<sup>3,7,8</sup>. Ambos fenotipos se han encontrado entre enterococos aislados de muestras clínicas, veterinarias y productos alimenticios para consumo humano.

El gen *vanA* se localiza en un transposón denominado *Tn1546* o en elementos relacionados referidos en la literatura médica como *Tn1546-like*<sup>8,14</sup>. El *Tn1546* está frecuentemente localizado en plásmidos y puede diseminarse fácilmente entre especies de enterococos e incluso se ha demostrado transferencia de enterococos a *S. aureus*<sup>13</sup>. Asimismo, se ha documentado la transferencia *in vivo* de este transposón en el tracto intestinal de mamíferos, lo que indica que la resistencia codificada por cepas de ERV de animales (que colonizan temporalmente el tracto gastrointestinal humano tras su ingestión) podría diseminarse a cepas de enterococos sensibles de la flora intestinal humana residente<sup>15</sup>. El gen *vanB* reside normalmente en el transposón *Tn1547* (transposón compuesto de 64 kb flanqueado por dos secuencias de inserción, *IS256-like* y *IS16*) o en el transposón *Tn5382* (transposón conjugativo frecuentemente insertado cerca del gen *pbp5* que confiere resistencia a penicilina)<sup>14,16</sup>. Se ha demostrado cotransferencia de resistencia a vancomicina y ampicilina entre cepas de *E. faecium* asociada con elementos aún no caracterizados que exceden de 130 kb de tamaño<sup>17</sup>. Un elemento relacionado, el transposón *Tn1549* (o *Tn5382-like*) se ha encontrado insertado en un plásmido conjugativo de respuesta a feromonas similar a pAD1<sup>14</sup>. Actualmente, no se dispone de datos acerca de la localización genética de los operones VanD, VanE y VanG.

Entre las especies de enterococos más comunes, la resistencia a glucopéptidos está fundamentalmente diseminada entre aislados de *E. faecium*, que han causado numerosos brotes de infecciones hospitalarias<sup>5,8,18</sup>. Se han detectado también cepas de *E. faecalis* resistentes a glucopéptidos, pero su prevalencia es generalmente baja y sólo muy ocasionalmente se han descrito brotes nosocomiales por esta especie<sup>5,19,20</sup>.

La epidemiología de ERV depende de la situación geográfica<sup>6</sup>. Se ha sugerido que en Europa los ERV pueden haber aparecido en la comunidad como consecuencia del uso frecuente y casi generalizado de avoparcina en animales, mientras que en Estados Unidos podría estar más asociado al amplio uso de vancomicina oral en los hospitales<sup>15,21,22</sup>. La colonización fecal por ERV es bastante frecuente en algunas áreas de Europa, pero casi inexistente en individuos en la comunidad en Estados Unidos. Por el contrario, los grados de colonización e infección con ERV en hospitales son mucho mayores en ese país, donde constituyen uno de los principales problemas de resistencia a los antimicrobianos que incluso han llegado a establecerse endémicamente en muchos hospitales<sup>3,6</sup>.

Varios estudios multicéntricos indican que en España los aislados de ERV son todavía infrecuentes representando el 1,8% de todos los aislados de enterococos hospitalarios<sup>23-25</sup>. Esta situación es similar a la obtenida para el resto de Europa, donde en general la frecuencia de cepas hospitalarias

Correspondencia: Dra. M.V. Francia.  
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.  
Avda. Marqués de Valdecilla, s/n. 39008 Santander. España.  
Correo electrónico: mvfrancia@humv.es

Manuscrito recibido el 1-6-2005; aceptado el 10-6-2005.

de ERV es baja (< 5%) y estas cepas no suelen ser multirresistentes<sup>24,26</sup>. Sin embargo, esta situación está cambiando<sup>22,24</sup>. Los estudios realizados por el Sistema Europeo de Vigilancia de Resistencias a Antibióticos (EARSS) en los años 2001, 2002 y 2003 (<http://www.earss.rivm.nl>), y diferentes trabajos multicéntricos, muestran una clara tendencia creciente de aislados clínicos de ERV<sup>27-29</sup>. Así, valores promedio del 6,7% obtenidos recientemente para el norte y 4,5% para el sur de Europa<sup>27</sup>, respectivamente, representan un aumento significativo en los grados de prevalencia de ERV en Europa que estaban en torno al 3% en 1999 y eran menores al 1% en 1995<sup>4,25,30</sup>. Incluso en algunos países europeos ya se describen proporciones de ERV epidémicas (> 10%)<sup>27,29</sup>. De forma interesante estos países se encuentran también entre los que informan un mayor grado de aislados de SARM (EARSS, 2002), lo que sugeriría una relación epidemiológica entre SARM y ERV (quizá debido al uso de la vancomicina como antibiótico de elección en sus hospitales). La coexistencia de estos patógenos en las mismas poblaciones es preocupante como se ha demostrado por la transferencia de la resistencia a vancomicina a *S. aureus* promovida en el caso de coinfección de pacientes con ambos gérmenes, ERV y SARM. Los estudios realizados por otros autores no muestran una distribución geográfica especial para la prevalencia de ERV en contraste a lo que observan con SARM<sup>26</sup>, por lo que siguen siendo necesarios nuevos estudios. Cuatro países europeos, Portugal, Italia, Grecia e Irlanda, presentan índices de resistencia a vancomicina altos, superiores al 15% (EARSS, 2003), debido a la aparición de brotes de ERV en varios hospitales<sup>27,29</sup>. Entre los ERV europeos, la especie predominante es *E. faecium*<sup>29</sup> (a diferencia de lo que sucede en las cepas sensibles, donde predomina *E. faecalis*) y el fenotipo más común es el VanA. Estas cepas, además, son con frecuencia resistentes a ampicilina y presentan alto nivel de resistencia a gentamicina y estreptomina. Esta situación es muy similar a la observada en muchos hospitales de Estados Unidos. A diferencia de lo que ocurre en ese país donde el problema de la resistencia a gluco péptidos en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) es especialmente grave (al menos la mitad de las infecciones por ERV han afectado a pacientes en UCI), la mayoría de los brotes en Europa han ocurrido en Unidades de Nefrología y Hematología y sólo unos pocos brotes han ocurrido en UCI<sup>29</sup>. En los estudios en los que se ha analizado la prevalencia de colonización gastrointestinal con ERV esta es mayor que la incidencia de infección por estos organismos.

A pesar que los modos exactos de transmisión nosocomial son difíciles de probar, la evidencia microbiológica y epidemiológica molecular sugiere fuertemente la diseminación entre pacientes, probablemente mediante las manos del personal sanitario o por instrumental médico contaminado y la diseminación entre hospitales, a través de pacientes con prolongada colonización intestinal<sup>3,31</sup>. Cuando se han analizado molecularmente los aislados de un brote por enterococos multirresistentes, más de la mitad implican aislados relacionados desde el punto de vista genético. En vista de la transmisión eficiente de ERV en un ambiente hospitalario y la dificultad de control efectivo una vez que la colonización con ERV se hace endémica (como se ha demostrado en los hospitales americanos), se requieren una serie de medidas para contener la diseminación de estos problemáticos organismos. Entre ellas destacan los cultivos de vigilancia en pacientes de alto riesgo

tras su admisión, el aislamiento de los pacientes ERV positivos y las políticas apropiadas de uso antibiótico<sup>3,20,31</sup>. Asimismo es interesante determinar la presencia de islas de patogenicidad que codifican varios factores de virulencia, como Esp (proteína de superficie de enterococos), en estos aislados como apunta el reciente estudio publicado por Willems et al<sup>32</sup>. Como ya se practica en algunos hospitales europeos, para realizar el control de diseminación sería preferible utilizar estrategias basadas en la genotipificación<sup>33</sup>. Si los responsables de la mayoría de los brotes epidémicos en diferentes continentes son en gran medida genotipos relacionados de ERV (como apuntan varios artículos recientes) se podrán desarrollar métodos de genotipificación fiables y rápidos que permitan implantar medidas de control de infección estrictas sólo para aquellos pacientes que porten estos clones específicos en vez de para todos los pacientes en los que se detecte cualquier cepa de ERV, lo cual abarataría mucho los gastos asociados del estudio. Sería aconsejable también que se adopte un consenso europeo sobre las medidas de control que se deben adoptar y sobre cómo abordar los brotes por ERV antes de que estas bacterias lleguen a hacerse endémicas<sup>33</sup>.

Hoy en día no hay datos suficientes con respecto a la colonización con ERV entre individuos sanos y pacientes hospitalizados en España. Específicamente, los enterococos resistentes a gluco péptidos todavía representan una experiencia poco común para la mayoría de los laboratorios clínicos de microbiología. Se ha descrito el aislado puntual en hospitales españoles de varias cepas de *E. faecium* con fenotipos VanA y VanB<sup>23,34,35</sup>. El resto de los aislados publicados en España pertenecen a cepas de *E. faecalis* VanA o VanB<sup>23,36-39</sup>, incluidos los dos brotes nosocomiales por ERV caracterizados hasta ahora (*E. faecalis* VanA)<sup>40,41</sup>. El primer brote nosocomial por *E. faecium* VanA ocurrido en un hospital español se ha presentado recientemente en el Congreso Internacional de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas<sup>42</sup>. A pesar de que el grado de resistencia en nuestro país es bajo, España es reconocida por la comunidad científica como uno de los países con rangos más amplios de resistencia a antibióticos, lo que indica la necesidad de controlar la aparición de nuevos tipos de resistencia<sup>43</sup>. Esto unido a la facilidad con la que ERV se disemina (sobre todo la línea clonal perteneciente al complejo 17<sup>32</sup>) y su propensión para la colonización crónica del tracto gastrointestinal, confiere un riesgo significativo que subraya la instauración de políticas de control de infección y la necesidad de vigilar y evitar la aparición de brotes nosocomiales de infección/colonización por ERV en España. En este sentido, es interesante el estudio que se incluye en este número de la revista sobre la caracterización molecular de un nuevo brote por ERV en un hospital español<sup>44</sup>. Maciá et al describen un brote de 8 casos de infección/colonización por *E. faecalis* resistente a gluco péptidos producido en la UCI del Hospital Universitario Son Dureta de Palma de Mallorca. Tras los primeros casos detectados, se instauraron medidas estrictas de control, a pesar de las cuales unos meses más tarde volvieron a aislarse ERV pertenecientes al mismo clon. Ello pone de manifiesto el grave problema epidemiológico que se avecina si estas situaciones no son controladas, tal y como los autores apuntan. Igualmente, se enfatiza la utilización de las técnicas de epidemiología molecular para la detección, seguimiento y control de los brotes, y la identificación del elemento de dise-

minación, bien la propagación de un mismo clon epidémico o la transferencia horizontal de genes de resistencia a través de elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones. Dependiendo de cada caso particular, serán aplicables diferentes medidas de control.

Los datos más recientes sugieren, pues, que la epidemiología en Europa, por lo menos en algunos países, está cambiando rápidamente y está evolucionando a una situación que asemeja la ocurrida en Estados Unidos. Parece necesario continuar realizando estudios de vigilancia de la resistencia a gluco péptidos en *Enterococcus*, con el fin de monitorizar las tendencias de dicha resistencia y, en su caso, limitar la aparición de ERV aplicando un uso racional de antibióticos en la práctica clínica y desarrollando programas locales para el control de las infecciones por estos agentes.

## Bibliografía

- Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant *enterococci*: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 2002;4:215-24.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988; 319:157-61.
- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant *enterococci*. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:686-707.
- 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. Emergence of vancomycin-resistant *enterococci*. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:183-7.
- Goossens H. The epidemiology of vancomycin-resistant *enterococci*. *Curr Opin Infect Dis.* 1999;12:537-41.
- Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, et al. Vancomycin-resistant *enterococci*: 15 years and counting. *J Hosp Infect.* 2003;53:159-71.
- 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.
- Bartley J. First case of VRSA identified in Michigan. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002;23:480.
- Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med.* 2003;348:1342-7.
- Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM, Brown WJ, Perri MB, Zervos MJ, et al. Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a *VanA* phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3954-9.
- Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:275-80.
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science.* 2003;302:1569-71.
- Woodford N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in *enterococci*. *Microb Drug Resist.* 2001;7:229-36.
- Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:329-35.
- Carias LL, Rudin SD, Donskey CJ, Rice LB. Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (*Tn5382*) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *J Bacteriol.* 1998;180:426-34.
- Hanrahan J, Høyen C, Rice LB. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:1349-51.
- Hayden MK. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant *enterococci*. *Clin Infect Dis.* 2000;31:1058-65.
- Biavasco F, Miele A, Vignaroli C, Manso E, Lupidi R, Varaldo PE. Genotypic characterization of a nosocomial outbreak of *VanA Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist.* 1996;2:231-7.
- Mundy LM, Sahn DM, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13:513-22.
- Méndez-Álvarez S, Pérez-Hernández X, Claverie-Martin F. Glycopeptide resistance in *enterococci*. *Int Microbiol.* 2000;3:71-80.
- Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant *enterococci*. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 3:13-21.
- Cisterna R, Ibarra K, Morla A, Basaras M, Cisterna C, Herreras A, et al. [Multicenter study of resistance in *enterococci*. The role of teicoplanin. Spanish Group for Study and Surveillance of Resistance]. *Rev Esp Quimioter.* 1999;12:237-43.
- Mutnick AH, Biedenbach DJ, Jones RN. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;46:63-8.
- Gruneberg RN, Hryniewicz W. Clinical relevance of a European collaborative study on comparative susceptibility of gram-positive clinical isolates to teicoplanin and vancomycin. *Int J Antimicrob Agents.* 1998;10:271-7.
- Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A. Prevalence of vancomycin-resistant *enterococci* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:816-22.
- Bouchillon SK, Johnson BM, Hoban DJ, Johnson JL, Dowzicky MJ, Wu DH, et al. Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24:119-24.
- Jones ME, Draghi DC, Thornsbury C, Karlowsky JA, Sahn DF, Wenzel RP. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit – A European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004;3:14.
- Goossens H, Jabes D, Rossi R, Lammens C, Privitera G, Courvalin P. European survey of vancomycin-resistant *enterococci* in at-risk hospital wards and *in vitro* susceptibility testing of ramoplanin against these isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 3:5-12.
- Felmingham D, Brown DF, Soussy CJ. European glycopeptide susceptibility survey of gram-positive bacteria for 1995. European Glycopeptide Resistance Survey Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1998;31:563-71.
- DeLisle S, Perl TM. Vancomycin-resistant *enterococci*: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest.* 2003;123:504S-18S.
- Willems RJJ, Top J, Van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global Spread of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Distinct Nosocomial Genetic Complex. *Emerg Infect Dis.* En prensa 2005.
- Ridwan B, Mascini E, Van Der Reijden N, Verhoef J, Bonten M. What action should be taken to prevent spread of vancomycin resistant *enterococci* in European hospitals? *BMJ.* 2002;324:666-8.
- Lorenzo-Díaz F, Delgado T, Reyes-Darías JA, Flores C, Méndez-Álvarez S, Villar J, et al. Characterization of the first *VanB* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in a Spanish hospital. *Curr Microbiol.* 2004;48:199-203.
- Maseda E, Una R, Ureta P, Royo C. [*Enterococcus faecium* cholangitis resistant to vancomycin and quinupristin-dalfopristin]. *Med Clin (Barc).* 2002;119:276-7.
- Balas D, Perea B, Wilhelmi I, Romanyk J, Alós JI, Gómez-Garcés JL. [Prevalence of antimicrobial resistance in *enterococci* isolated from blood in Madrid (1994-1995)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1997;15:22-3.
- Del Campo R, Tenorio C, Zarazaga M, Gómez-Lus R, Baquero F, Torres C. Detection of a single *vanA*-containing *Enterococcus faecalis* clone in hospitals in different regions in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:746-7.
- Pérez-Hernández X, Méndez-Álvarez S, Delgado T, Moreno A, Reyes-Darías 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.
- Aznar E, Buendía B, García-Penuela E, Escudero E, Alarcón T, López-Brea M. Community-acquired urinary tract infection caused by vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate. *Rev Esp Quimioter.* 2004;17:263-5.
- 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.
- 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, Calvo J, García C, Ugalde E, Monteagudo I, Campo AB, et al. 2005. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Spain with *vanA* genotype and apparent teicoplanin susceptibility. En: 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen.
- Baquero F. Antibiotic resistance in Spain: what can be done? Task Force of the General Direction for Health Planning of the Spanish Ministry of Health. *Clin Infect Dis.* 1996;23:819-23.
- Maciá MD, Juan C, Oliver A, Hidalgo O, Pérez JL. Caracterización molecular de un brote por *Enterococcus faecalis* resistente a los gluco péptidos en una unidad de cuidados intensivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005;23:460-3.