

Los complejos clonales de alto riesgo CC2 y CC9 están ampliamente representados en cepas hospitalarias de *Enterococcus faecalis* aisladas en España

Patricia Ruiz-Garbajosa^a, Teresa M. Coque^a, Rafael Cantón^a, Rob J.L. Willems^b, Fernando Baquero^a y Rosa del Campo^a

^aServicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. España. ^bEijkman-Winkler Institute for Microbiology, Infectious Diseases and Inflammation. University Medical Center. Utrecht. Países Bajos.

INTRODUCCIÓN. El desarrollo de un esquema de *Multilocus sequence typing* (MLST) para *Enterococcus faecalis* ha permitido conocer los primeros datos de su estructura poblacional y epidemiología global. Se ha detectado la dispersión en Europa y América de dos complejos clonales (CC) de alto riesgo denominados CC2 y CC9 que están especialmente adaptados al medio hospitalario. El objetivo de este trabajo ha sido definir la presencia de ambos CC en cepas de *E. faecalis* aisladas en España.

MÉTODOS. Se han caracterizado por MLST 81 cepas de *E. faecalis* aisladas de diversos orígenes y correspondientes a diferentes años y regiones españolas. Debido a su importancia clínica y epidemiológica se han incluido cepas representativas de cada uno de los brotes hospitalarios por *E. faecalis* resistente a vancomicina descritos en España.

RESULTADOS. En el medio hospitalario se detectó la dispersión de CC2 y CC9. En estos CC se han agrupado las cepas de *E. faecalis* resistentes a vancomicina causantes de los brotes hospitalarios en La Coruña, Palma de Mallorca y Valencia, así como cepas de origen hospitalario sensibles a la vancomicina. La utilización del índice de asociación (I_a), que estima el equilibrio de ligamiento en la población estudiada, reveló una estructura poblacional epidémica cuya variabilidad genética es debida a procesos de recombinación.

CONCLUSIÓN. En España se han detectado los CC de alto riesgo CC2 y CC9, que han evolucionado localmente de forma diferente en función de la carga genética del entorno. Las medidas de control de la infección deberían ir encaminadas a la detección de estos CC de alto riesgo, ya que su presencia en los hospitales podrían predecir tendencias futuras en cuanto a la adquisición de determinadas resistencias como es el caso de la vancomicina.

Palabras clave: MLST. *Enterococcus faecalis*. Complejo clonal. Clones hospitalarios.

High-risk clonal complexes CC2 and CC9 are widely distributed among *Enterococcus faecalis* hospital isolates recovered in Spain

INTRODUCTION. Our previously described multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Enterococcus faecalis* has provided insight into the population structure and global epidemiology of this organism. Two high-risk complexes, CC2 and CC9, especially adapted to the hospital environment and widely distributed in Europe and America, were identified. The purpose of this study was to define the presence of CC2 and CC9 among *E. faecalis* strains isolated in Spain.

METHODS. A total of 81 *E. faecalis* isolates recovered from several sources and geographic areas of Spain were characterized using MLST. Because of their clinical and epidemiological interest, strains were included from each of the vancomycin-resistant *E. faecalis* hospital outbreaks described in Spain.

RESULTS. Among the isolates, CC2 and CC9 were detected in the hospital setting. Included in these CC were the vancomycin-resistant *E. faecalis* isolates causing hospital outbreaks in La Coruña, Palma de Mallorca and Valencia, as well as vancomycin-susceptible hospital isolates. The Index of Association (I_a), which measures linkage disequilibrium between alleles, revealed an epidemic population structure on a background of high recombination rates.

CONCLUSIONS. High-risk complexes (CC2 and CC9) particularly adapted to the hospital environment were detected in Spain. Evolution of these CC in different areas depended on the local gene pool. Future infection control policies should be orientated to detect high-risk CC with the aim of predicting potential trends toward acquisition of specific resistance, such as to vancomycin.

Key words: MLST. *Enterococcus faecalis*. Clonal complexes. Hospital-adapted clones.

Introducción

Enterococcus faecalis es un habitante comensal del tracto gastrointestinal humano y de animales, pero desde hace años se conoce también su papel como agente causante de

Correspondencia: Dra. P. Ruiz-Garbajosa. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal. Ctra. de Colmenar Viejo, km 9,100. 28034 Madrid. España. Correo electrónico: pruizg.hrc@salud.madrid.org

Manuscrito recibido el 20-11-2006; aceptado el 7-3-2007.

endocarditis infecciosa¹ y en la actualidad es un reconocido patógeno nosocomial². La importancia de *E. faecalis* desde un punto de vista clínico y epidemiológico se debe principalmente a su capacidad para adquirir elementos genéticos que codifican determinantes de virulencia y resistencia antibiótica que pueden mejorar su adaptación a ecosistemas complejos como es el hospitalario³. El paradigma de esta evolución y adaptación ha sido la aparición y diseminación de cepas de enterococos resistentes a vancomicina⁴.

Recientemente se ha definido la estructura poblacional de *E. faecium*^{5,6} y *E. faecalis*⁷ empleando la técnica de *Multilocus sequence typing* (MLST). Como ha sido demostrado, MLST es la técnica más adecuada para el estudio de la estructura poblacional y los mecanismos implicados en la generación de diversidad genética en las poblaciones bacterianas^{8,9}. Además, el empleo de la técnica de MLST aporta la ventaja de la globalización, ya que los datos obtenidos se almacenan fácilmente en bases de datos accesibles vía Internet¹⁰. Este hecho permite crear una nomenclatura común de consenso sobre los diferentes genotipos y clones detectados en diferentes países.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo, el desarrollo de un nuevo esquema de MLST para *E. faecalis* ha permitido obtener los primeros datos acerca de la epidemiología global y estructura poblacional de esta bacteria⁷. En dicho estudio, se detectó la presencia de dos importantes complejos clonales (CC) denominados CC2 y CC9 que incluían cepas de origen hospitalario con resistencia a vancomicina y causantes de brotes hospitalarios. Posteriormente, CC2 y CC9 han sido definidos como complejos clonales de alto riesgo¹¹ por su especial adaptación al ambiente hospitalario y su dispersión en diferentes países y continentes.

El objetivo del presente trabajo ha sido aplicar la técnica de MLST en cepas de *E. faecalis* sensibles y resistentes a la vancomicina aisladas en España para conocer su estructura poblacional y definir la posible presencia de ambos CC de alto riesgo en nuestro país.

Material y métodos

Cepas estudiadas

Se han incluido 81 cepas de *E. faecalis* procedentes de siete regiones españolas con diferentes orígenes y recogidas en distintos años (tabla 1). En esta colección también se han incluido cepas de *E. faeca-*

lis resistentes a la vancomicina causantes de los brotes hospitalarios descritos hasta la fecha en España¹²⁻¹⁵ debido a su gran relevancia clínica y epidemiológica. Para la identificación de la especie se emplearon los cebadores específicos para el gen que codifica la D-alanina: *D-alanina ligasa* (*ddl*)¹⁶.

Multilocus sequence typing

Se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fragmentos internos de 7 genes metabólicos muy conservados (*gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt* y *yqiL*), siguiendo el esquema previamente propuesto⁷ (<http://efaecalis.mlst.net>). Todos los productos de amplificación fueron finalmente secuenciados en ambas direcciones para su posterior análisis.

Análisis de los datos

A cada nueva secuencia o alelo identificado para cada uno de los 7 genes que componen el esquema se les asignó un número en función del orden de aparición y en concordancia con la base de datos de MLST para *E. faecalis* (<http://efaecalis.mlst.net>). Posteriormente, a las combinaciones de los siete alelos se les asignó un perfil alélico o tipo de secuencia (*sequence type* [ST]) utilizando los genes en el siguiente orden: *gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yqiL* (<http://www.mlst.net>).

La relación entre las diferentes ST se muestra en un dendrograma construido con el método UPGMA empleando el programa informático START (<http://www.mlst.net>). Las ST se agruparon en CC mediante el programa informático eBRUST¹⁷ (<http://www.mlst.net>). Los CC se definen como grupos de ST relacionadas entre sí que comparten al menos 5 de los 7 alelos con otras ST del mismo grupo. Además, los CC llevan implícito un concepto evolucionista ya que estas ST se han diversificado recientemente a partir de un antecesor común. El programa informático eBRUST permite determinar la ST que con mayor probabilidad representa el genotipo fundador de un CC. Se considera como posible ST fundadora de un CC a aquella que presenta un mayor número de ST dentro del mismo grupo que se diferencian entre sí en un solo alelo (*single locus variants* [SLV]). Por último, las ST que no pueden asignarse a ningún CC se denominan *singletons*.

Evaluación de la recombinación

El índice de asociación (I_a)¹⁸ estima el equilibrio de ligamiento entre los diferentes alelos de los 7 loci. El I_a se define como: $I_a = V_o/V_E - 1$, en el que V_o es la varianza observada de K y V_E es la varianza esperada de K, y K es el número de locus en el que se diferencian dos individuos. Cuando los alelos están en equilibrio de ligamiento el I_a tiene un valor próximo a cero y, por tanto, es una población en la que la recombinación es frecuente. Por el contrario, una población clonal se caracteriza por presentar un I_a que se desvía significativamente de cero. Para calcular el I_a se utilizó el programa informático START (<http://www.mlst.net>).

TABLA 1. Cepas de *Enterococcus faecalis* incluidas en el estudio

Origen	Ciudad	Resistencia a vancomicina	Número de aislados	Año de aislamiento	Referencia
Brotes hospitalarios	Valencia	+	1	1999	15
	La Coruña	+	1	2001	14
	Barcelona	+	1	2001	12
	Zaragoza	+	1	2001	12
	Palma de Mallorca	+	1	2003	13
Muestras clínicas	Madrid	-	28	2001-2003	Este trabajo
Colonización intestinal en pacientes hospitalizados	Madrid	-	29	2001	Este trabajo
Voluntarios sanos de la comunidad	Madrid	-	11	2001	27
Animal	Logroño	+	1	1998	18
	Logroño	-	6	2001	Este trabajo
Cepa de laboratorio (PB1)	Madrid	-	1	1999	Este trabajo

Resultados

Relación filogenética entre los distintos aislados de *E. faecalis*

Tras la caracterización de las 81 cepas de *E. faecalis* empleando MLST, se definieron un total de 42 ST. Las ST que agruparon un mayor número de aislados fueron: ST16 (12 aislados), ST9 (8 aislados) y ST17 (6 aislados) y ST26 (4 aislados), mientras que, por el contrario, 28 de las 42 ST se correspondieron con un único aislado. Las relaciones filogenéticas entre las 42 ST se han representado en un dendrograma mediante el método UPGMA (fig. 1). Empleando el programa eBRUST, las 42 ST se agruparon en 2 CC mayores, 7 CC menores y 18 *singletons*. Los CC mayores se designaron como CC9 (17 aislados) y CC21 (8 aislados) ya que en ambos complejos fue posible asignar a la ST9 y ST21 como fundadoras del grupo. De los 18 *singletons*, 8 agruparon más de un aislado, y fue la ST16 la que concentró a un mayor número de ellos ($n = 12$). En la representación gráfica de eBRUST se muestran todas las ST agrupadas en sus correspondientes CC y las relaciones que se establecen (SLV o *double locus variants* [DLV]) entre las mismas (fig. 2).

Epidemiología de los complejos clonales

Los aislados de *E. faecalis* caracterizados con este esquema de MLST se agruparon en CC independientemente de su origen epidemiológico y geográfico, y fue posible encontrar en un mismo complejo cepas de origen animal y hospitalario (fig. 1). Un ejemplo de esta situación es el *singleton* clon ST16 (12 aislados), en el que se concentran cepas procedentes de distintas regiones (Madrid [$n = 10$] y La Rioja [$n = 2$]) y diversos orígenes epidemiológicos (muestras clínicas [1], colonización intestinal de pacientes hospitalizados [6] y de voluntarios sanos de la comunidad [3], así como de animales [3]) (fig. 1). A pesar de que no parece existir una aparente relación específica entre ciertas ST y CC con determinados orígenes epidemiológicos, en un estudio previo se definieron dos complejos, denominados CC2 y CC9, especialmente adaptados al ambiente hospitalario⁷. En este trabajo, en el que se han analizado aislados procedentes de diversas regiones españolas, se ha detectado la presencia de CC9 que agrupó cepas de origen exclusivamente hospitalario (17 de 57, 28% de cepas aisladas a partir de muestras clínicas y colonización de pacientes hospitalizados), entre las que se incluían aislados de *E. faecalis* resistentes a vancomicina causantes de brotes hospitalarios en Palma de Mallorca¹³ y La Coruña¹⁴ (figs. 1 y 3). Por otra parte, la cepa resistente a glicopéptidos procedente de un brote hospitalario en Valencia¹⁵ se agrupó en la ST6 que pertenece a CC2, y los aislados procedentes de Zaragoza¹² y Barcelona¹² en la ST49 (figs. 1 y 3). La cepa de origen animal resistente a vancomicina B343¹⁹ se agrupó en el CC21 junto con otras cepas de origen animal y cepas procedentes de colonización intestinal de voluntarios sanos de la comunidad y pacientes hospitalizados, así como de origen clínico (fig. 1).

Evaluación de los procesos de recombinación en *E. faecalis*

Para conocer si la diversidad genética en *E. faecalis* se debe principalmente a procesos de mutación o bien de recombinación, se calculó el I_a para cuantificar el equilibrio de ligamiento entre los distintos alelos. En las poblaciones

de tipo clonal en las que la variabilidad genética es debida principalmente a procesos de mutación, se muestran asociaciones entre los alelos de los diversos *loci* (desequilibrio de ligamiento). Por el contrario, en las poblaciones donde predominan los fenómenos de recombinación se detectan bajos grados de asociación entre los alelos de los diferentes *loci* (equilibrio de ligamiento). Al calcular el I_a para las 81 cepas y las 42 ST se obtuvo un valor de 2,7 y 1,34, respectivamente, lo que indica que en la población existe un desequilibrio de ligamiento. Cuando se volvió a calcular I_a incluyendo únicamente las ST no relacionadas entre sí genéticamente (ST que se diferencian en 3 o 4 *loci* y pertenecen a distintos CC), se obtuvo un valor de I_a próximo a cero ($I_a = 0,42$). La caída del valor del I_a cuando se calcula sólo para los genotipos no relacionados entre sí, frente al valor obtenido cuando se calcula para toda la población o ST, es propio de una estructura poblacional de tipo epidémico.

Discusión

Recientemente se ha descrito un nuevo esquema de MLST para *E. faecalis* basado en la amplificación y posterior secuenciación de fragmentos internos de 7 genes que codifican enzimas implicadas en rutas metabólicas, también conocidos como genes *housekeeping*⁷. La caracterización de 81 cepas de *E. faecalis* aisladas en España empleando este esquema de MLST ha permitido definir la presencia y dispersión de los complejos CC2 y CC9 en nuestro país.

Estudios realizados en una especie estrechamente relacionada como es *E. faecium* pusieron de manifiesto que en su estructura poblacional existía un fenómeno descrito como especificidad de origen, es decir, cepas aisladas a partir de determinados orígenes epidemiológicos se agrupaban en líneas genéticas concretas⁶. Por el contrario, este fenómeno no ha sido detectado en *E. faecalis*, de tal manera que cepas de diversos orígenes pueden agruparse en una misma ST y/o CC, como sucede en el caso de la ST16 y el CC21, que están presentes tanto en el medio hospitalario como en la comunidad colonizando a humanos y animales.

A pesar de la falta de especificidad de origen en *E. faecalis*, los primeros datos sobre su estructura poblacional pusieron de manifiesto la presencia de dos CC denominados CC2 y CC9 especialmente adaptados al medio hospitalario y muy diseminados por diversos países y continentes^{7,20}. Estos complejos han sido descritos como CC de alto riesgo²⁰, ya que en ellos se agrupan aislados de gran importancia clínica y epidemiológica, como es el caso de la cepa secuenciada de *E. faecalis* V583, de todas las cepas descritas hasta el momento productoras de betalactamasa⁷, así como de la mayor parte de las cepas resistentes a glicopéptidos causantes de brotes hospitalarios en diversos países y continentes (Ruiz-Garbajosa et al, datos no publicados). En España, entre los aislados de origen hospitalario analizados se han detectado ambos complejos, y existe una mayor representación de CC9 frente a CC2. Los aislados resistentes a vancomicina causantes de los brotes hospitalarios en Palma de Mallorca¹³ y La Coruña¹⁴ se agrupan en CC9, mientras que el aislado procedente del brote en Valencia¹⁵ se agrupa en CC2 (fig. 3). Por otra parte, en la ST49 se agruparon los aislados resistentes a glicopéptidos pertenecientes a un clon diseminado en Zara-

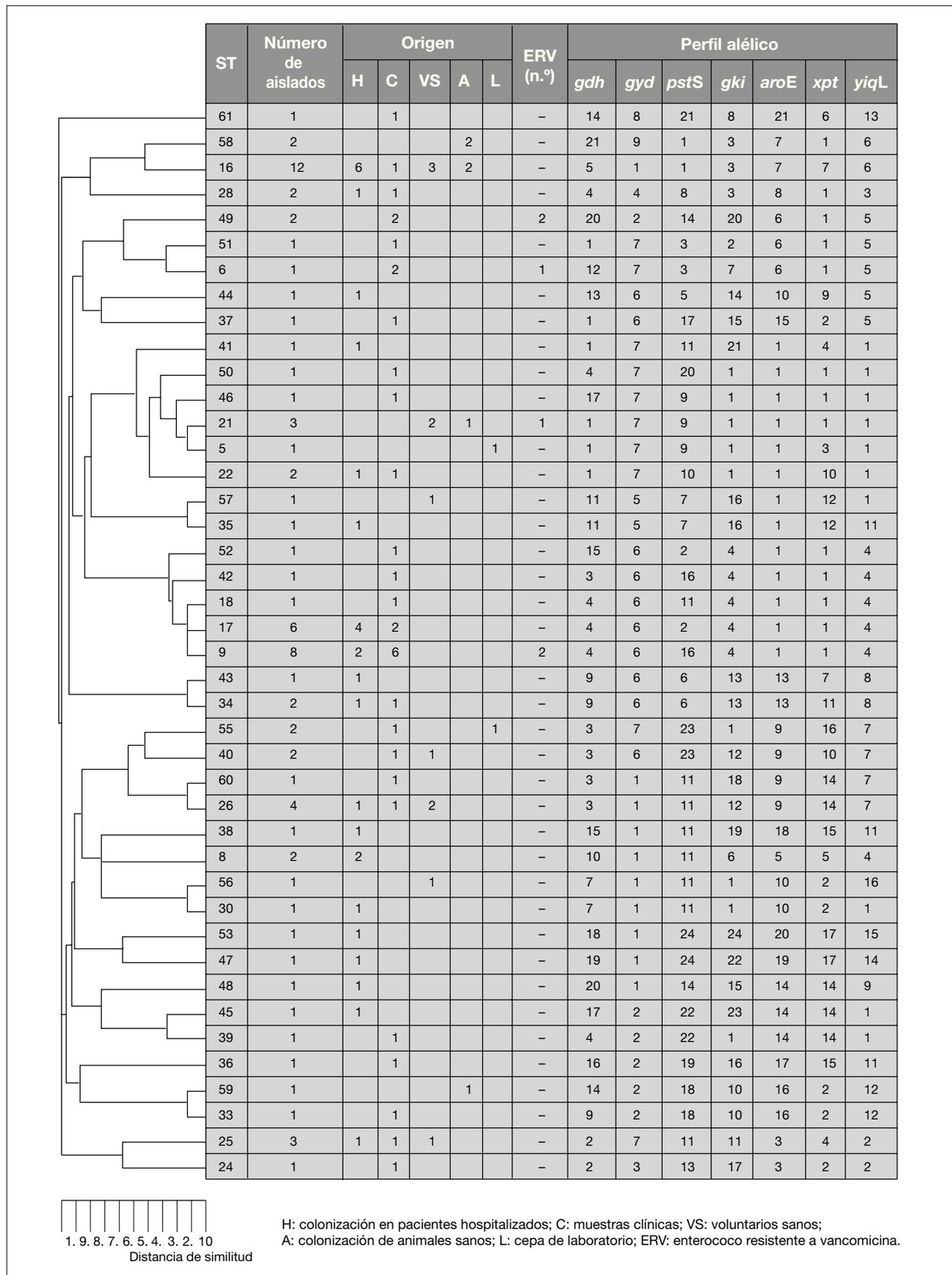


Figura 1. Relación filogenética entre los 42 ST (tipos de secuencia) representados en un dendrograma mediante el método UPGMA.

Figura 2. Representación de los complejos clonales mediante eBURST. Los números corresponden a cada ST. El área de cada círculo se corresponde con el número de cepas que se agrupan en cada ST. Las líneas grises finas conectan ST que se diferencian en un alelo (SLV) y las líneas grises gruesas conectan ST que se diferencian en dos alelos (DLV). Las flechas señalan las posibles ST antecesoras de CC9 y CC21. Los complejos clonales mayoritarios en la población de *E. faecalis* estudiada en España (CC9 y CC21), así como los de alto riesgo hospitalario (CC2 y CC9), aparecen señalados en la figura.

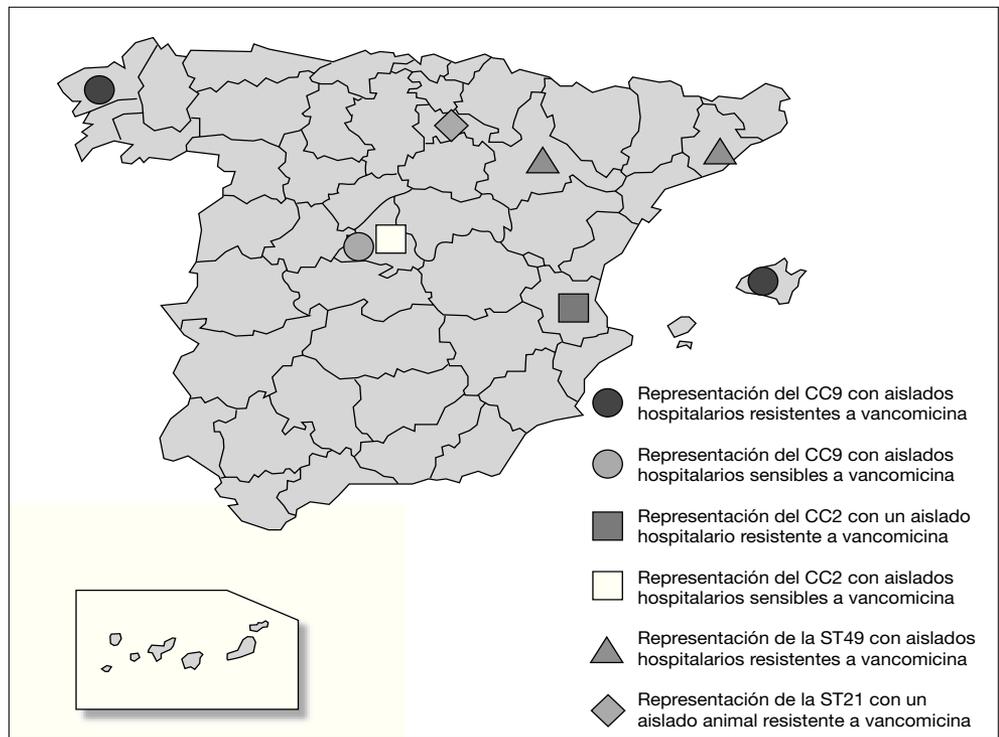
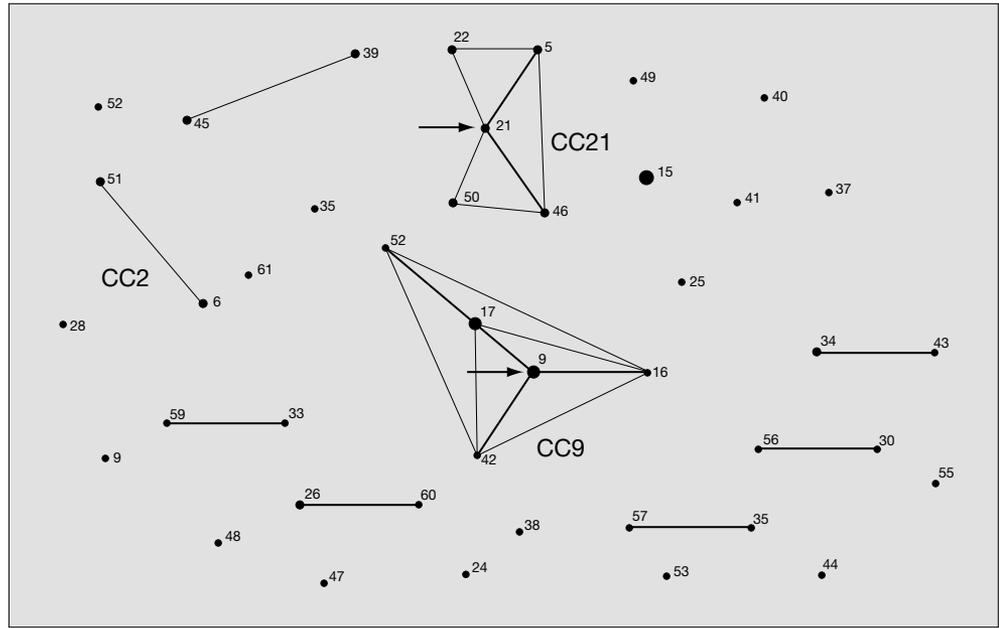


Figura 3. Representación de la localización en España de los complejos clonales de alto riesgo hospitalario CC2 y CC9 y de las ST que no pertenecen a estos CC y que representan cepas resistentes a la vancomicina.

goza y Barcelona¹². La ST49 comparte 3 alelos con las ST agrupadas en CC2, lo que podría indicar una posible relación con este CC (fig. 1).

Es importante destacar la presencia de CC9 y CC2 en Madrid, que agrupa aislados hospitalarios sensibles a vancomicina (fig. 3). Este hecho cobra gran importancia, ya que en numerosos estudios se ha postulado que ciertos clones endémicos²¹⁻²⁵ pueden servir de sustrato para la posterior adquisición de la resistencia a vancomicina. Por ejemplo, en *E. faecium* se ha descrito el CC17 como complejo clonal de alto riesgo en el que se agrupan los aislados re-

sistentes a vancomicina causantes de brotes hospitalarios. Además, los aislados sensibles que se agrupan en él se van a caracterizar por presentar resistencia a ampicilina y contener una isla de patogenicidad con el gen *esp6*; ambas características se comportan como mecanismos adaptativos. En el caso de *E. faecalis* CC2 y CC9, al igual que ocurre con CC17 en *E. faecium*, son complejos que han ido adquiriendo de forma secuencial mecanismos adaptativos como la resistencia a antibióticos y factores de virulencia. Todo ello favorece su persistencia en el medio y, a su vez, facilitan la adquisición de nuevos mecanismos. Este proceso se conoce

como capitalismo genético²⁶ y su resultado es una población seleccionada muy adaptada al ambiente hospitalario. Por otra parte, la adquisición de la resistencia a vancomicina es un paso más en este proceso de adaptación y puede tratarse de un fenómeno local relacionado con el consumo de antibióticos en cada hospital o área de estudio. De esta forma, los complejos clonales, como ha sucedido en España, pueden evolucionar de manera independiente en cada ambiente (hospital, comunidad, etc.), dependiendo de la disponibilidad genética en los mismos y de la presión selectiva ejercida por la utilización de antibióticos²⁶.

Los procesos de recombinación han sido evaluados mediante el cálculo del I_a . La obtención de un valor del I_a próximo a cero cuando se calcula para los genotipos de la población no relacionados entre sí, frente a un valor más elevado cuando en el estudio se incluyen todas las ST o los 81 aislados, es característico de una población de tipo epidémico. En estas poblaciones la diversidad genética es generada por procesos de recombinación, pero en determinadas circunstancias emergen ciertos complejos clonales (como en este caso CC9) que, por una ventaja selectiva, se comienzan a expandir haciendo que estos genotipos predominen sobre el resto y creando una falsa apariencia de clonalidad en la población. El gran potencial de recombinación en *E. faecalis* puede favorecer y potenciar el capitalismo genético de estos complejos de alto riesgo. Además, aumenta la posibilidad de transmisión a otros CC, facilitando la dispersión de las resistencias. Por este motivo la resistencia a vancomicina puede también encontrarse en líneas genéticas no relacionadas entre sí, como sucede con la cepa de origen animal B434¹⁸, que se agrupa en el CC21.

La aplicación del esquema de MLST para *E. faecalis* nos ha permitido conocer los primeros datos acerca de su estructura poblacional en España y su relación en el ámbito de una epidemiología global y a largo plazo. Se ha detectado la presencia en nuestra geografía de dos CC, como son CC2 y CC9, dispersos también en otros países^{7,11,20} y de alto riesgo hospitalario, que localmente pueden evolucionar de forma diferente dependiendo de la carga genética del entorno al que se encuentren sometidos. En el futuro, las estrategias para el control de la infección en los hospitales deberían ir encaminadas a la detección precoz de los CC de alto riesgo epidemiológico. Esta actitud puede ayudar a predecir tendencias futuras en la aparición de resistencias, como el caso de la resistencia a vancomicina.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente con los proyectos LSHM-CT-2007-037410 de la Unión Europea y PI061141 del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo de España.

Patricia Ruiz-Garbajosa está contratada (CM04/00013) a través del programa post-MIR (Formación en Investigación para Profesionales con Formación Sanitaria Especializada) del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo de España. Parte de este trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. R. Willems, en Utrecht (Países Bajos), gracias a una beca para estancias en el extranjero de la SEIMC.

Agradecemos a los Drs. G. Bou, A. Oliver, C. Torres, B.E. Murray y M. Zervos el envío de parte de las cepas incluidas en este estudio.

Bibliografía

- Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev. 1990; 3:46-65.

- Moellering RC Jr. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Infect Dis. 1998; 26:1196-9.
- Malani PN, Kauffman CA, Zervos MJ. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. En: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB, editors. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington DC: ASM Press; 2002. p. 385-408.
- Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2000;13:513-22.
- 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 RJ, Top J, Van Santen M, Robinson DA, Coque TM, F Baquero, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. Emerg Infect Dis. 2005;11:821-8.
- Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. J Clin Microbiol. 2006;44:2220-8.
- Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 2003;11:479-87.
- Vázquez JA, Berrón S. Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2004;22:113-20.
- Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. Nucleic Acids Res. 2005;33 Web Server issue:W728-33.
- Leavay HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol. 2006;9:454-60.
- 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.
- Maciá MD, Juan C, Oliver A, Hidalgo O, Pérez JL. Molecular characterization of a glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* outbreak in an intensive care unit. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:460-3.
- Velasco D, Pérez S, Domínguez MA, 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.
- Peset V, Tallón P, Sola 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.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol. 1995;33:24-7.
- Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol. 2004;186:1518-30.
- Smith, JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:4384-8.
- Robredo B, Torres C, Singh KV, Murray BE. Molecular analysis of *Tn1546* in vanA-containing *Enterococcus* spp. isolated from humans and poultry. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2588-9.
- Kawalec M, Pietras Z, Danilowicz E, Jakubczak A, Gniadkowski M, Hryniewicz W, et al. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: the characterization of epidemic clones. J Clin Microbiol. 2006;8:12. (En prensa).
- Coque TM, Willems RJ, Fortún 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.
- Novais C, Coque TM, Sousa JC, Baquero F, Peixe L; Portuguese Resistance Study Group. Local genetic patterns within a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clone isolated in three hospitals in Portugal. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:3613-7.
- Supplola JP, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M. vanA and vanB incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality. J Clin Microbiol. 1999;37:3934-9.
- 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.
- Francia MV. Glycopeptide-resistant *Enterococcus* in Europe: an increasing nosocomial problem. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:457-9.
- Baquero F, Coque TM, Cantón R. Antibiotics, complexity, and evolution. ASM news. 2003;69:547-52.
- Del Campo R, Ruiz-Garbajosa 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.