

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE UN BROTE POR
Enterococcus faecium RESISTENTE A LA VANCOMICINA EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO MAYOR-MÉDERI, BOGOTÁ 2016**

Investigador Principal: NANCY CAROLINA CORREDOR OBREGÓN
Centro de Investigaciones Méderi (CIMED), departamento de infecciones y
vigilancia epidemiológica (Hospital Universitario Mayor, Méderi) –
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC)

Tutor metodológico: GIOVANNI ANTONIO RODRÍGUEZ, MD, Ph.D
Hospital Universitario Mayor, Méderi –
Universidad del Rosario
giovanni.rodriguez@mederi.com.co

Tutor temático: LINA MARIA PRIETO, MD, M.Sc.
Hospital Universitario Mayor, Méderi –
Universidad el Bosque
lina.prieto@mederi.com.co

UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
UNIVERSIDAD CES
Facultad de Medicina
Bogotá, Abril 2019

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DE UN BROTE POR
Enterococcus faecium RESISTENTE A LA VANCOMICINA EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO MAYOR-MÉDERI, BOGOTÁ 2016**

**Trabajo de investigación para optar al título de
MAGÍSTER EN EPIDEMIOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

NANCY CAROLINA CORREDOR OBREGÓN

Médico asistente de investigaciones – Médico del programa de Optimización de
antibióticos.

Hospital Universitario Mayor – Méderi

Tutor metodológico:

GIOVANNI ANTONIO RODRÍGUEZ, MD, Ph.D

Jefe de investigaciones, Hospital Universitario Mayor

Docente de postgrado de la Universidad del Rosario

Tutor metodológico

LINA MARIA PRIETO, MD, M.Sc.

Coordinadora de proceso de Infecciones y vigilancia epidemiológica, Hospital
Universitario Mayor

Docente de postgrado de la Universidad EL BOSQUE

**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO
Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
UNIVERSIDAD CES
Facultad de Medicina
Bogotá, Abril 2019**

Ficha Institucional

Universidad CES
Universidad del Rosario

Grupo de investigación donde se realiza la investigación

Centro de Investigaciones de Méderi (CIMED), Hospital Universitario Mayor
Laboratorio clínico de COMPENSAR
Departamento de Inmunología y biología molecular, Fundación Instituto de
Inmunología de Colombia
Departamento de microbiología de la Universidad Nacional

Instituciones donde se realiza la investigación

Centro de Investigaciones de Méderi (CIMED), Hospital Universitario Mayor
Laboratorio clínico de COMPENSAR
Departamento de Inmunología y biología molecular, Fundación Instituto de
Inmunología de Colombia
Departamento de microbiología de la Universidad Nacional

Fondo de financiación

Hospital Universitario Mayor – Méderi
Fundación Instituto de Inmunología de Colombia

Nota de Salvedad de Responsabilidad Institucional

Las Universidades del Rosario y CES no se hacen responsables de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velarán por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.

TABLA DE CONTENIDO

1.	RESUMEN	7
2.	ABSTRACT	8
3.	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	9
3.1.	Planteamiento del problema	9
3.2.	Justificación o relevancia del proyecto.....	10
3.2.1.	Figura 2. Número de aislamientos de <i>EfmRV</i> (línea gris) y número de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) (línea negra) por <i>EfmRV</i> en el Hospital Universitario Mayor, Méderi, entre junio de 2015 y septiembre de 2016.....	13
3.3	Pregunta de investigación.....	15
4.	MARCO TEÓRICO	16
4.1.	Definiciones	18
4.2.	Factores de riesgo	19
4.3.	Virulencia/patogenicidad	21
4.4.	Epidemiología	21
4.5.	Identificación microbiológica y molecular	23
4.6.	Resistencia	27
4.7.	Tratamiento.....	28
5.	HIPÓTESIS.....	30
6.	OBJETIVOS	31
6.1.	General	31
6.2.	Específicos:.....	31
7.	METODOLOGÍA	32
7.1.	Enfoque metodológico y tipo de investigación	32
7.2.	Tipo de estudio:	32
7.3.	Población blanco:.....	32
7.4.	Población elegible:.....	32
7.5.	Población de estudio:.....	32
7.6.	Diseño muestral:	33
7.7.	Criterios de selección:.....	33
7.8.	Hospital de estudio y recolección de datos	34

.....	36
Figura 3. Índice endémico.....	36
Figura 4. Respuesta a brote y gestión de incidentes.	37
7.9. Algoritmo tiempo – lugar – clonalidad.	37
7.10. Análisis estadístico	39
7.11. Control de errores y sesgos	39
7.12. Presupuesto.....	39
8. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	41
8.1. Identificación microbiológica	41
8.2. Tipificación molecular y detección del gen vanA.....	41
9. CONSIDERACIONES ÉTICAS	43
10. RESULTADOS.....	44
10.1. Respuesta al brote	44
10.2. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	46
Tabla 1. Susceptibilidad antimicrobiana cualitativa.....	47
10.3. Detección del gen vanA	47
Tabla 2a y tabla 2b. Perfiles clonales, datos clínicos y microbiológicos de los 33 aislamientos incluidos en el estudio.....	48
10.4. Tipificación molecular.....	51
Figura 3. Los perfiles clonales identificados entre mayo y septiembre de 2016.	52
10.5. Análisis de transmisión de acuerdo con el algoritmo modificado de Tiempo –Lugar– Clonalidad (TLC).....	53
Figura 4. Rutas de transmisión estimadas para los 16 pacientes del brote, utilizando el algoritmo modificado de tiempo-lugar-clonalidad (TLC).....	56
11. DISCUSIÓN	57
12. CONCLUSIÓN	60
13. ANEXOS	62
Archivo adicional en formato Excel. 1. Figura S1. Ruta de pacientes durante la hospitalización.	62
14. AGRADECIMIENTOS	64
15. BIBLIOGRAFÍA:	65

1. RESUMEN

Introducción. Este estudio describe el patrón de diseminación de los *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina entre abril a mayo de 2016, en el hospital de mayor capacidad de camas instaladas de Colombia, integrando estrategias clínicas y moleculares.

Métodos. Se adaptó un algoritmo de Tiempo - Lugar - Clonalidad para estimar las rutas de transmisión, a través del análisis multi-locus de número variable de repeticiones en tándem (MLVA) para la identificación clonal y la ruta de transferencia interna de los pacientes durante su hospitalización.

Resultados. Debido a dificultades en la reproducibilidad para VNTR-2, el análisis de agrupamiento de 5 VNTRs fue el método de elección para determinar clonalidad. Se identificaron cuatro perfiles clonales entre los 33 aislamientos recuperados, de los cuales, 13 fueron obtenidos de pacientes del brote. Los perfiles con mayor frecuencia identificados durante el brote fueron el A y el B: 9 y 2 pacientes, respectivamente (69,2% y 15,4%). En la mayoría de los casos, los pacientes compartieron piso (contacto indirecto), pero no habitación o cama de hospitalización (contacto directo), lo que sugiere una transmisión cruzada por medio del personal de salud.

Discusión. Tras el análisis de los resultados se pudo concluir que el brote tuvo un comportamiento dinámico, de fuente múltiple y origen policlonal, con una vía de transmisión indirecta a través del personal de salud. Dentro de los principales beneficios obtenidos a nivel local, fueron la optimización de los recursos en control de infecciones y la implementación de estrategias más eficaces en la prevención de futuros brotes, individualizadas a la institución.

Palabras clave: *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, vigilancia de brote, resistencia antimicrobiana, algoritmo tiempo-espacio-clonalidad.

2. ABSTRACT

Introduction. This study describes the dissemination pattern of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between April to May 2016, in the highest installed capacity hospital in Colombia, integrating clinical and molecular strategies.

Methods. A Time-Place-Clonality algorithm was adapted to estimate the transmission routes, through the multi-locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) for the clonal identification and the internal transfer route of the patients during their hospital stay.

Results. Due to difficulties in reproducibility for VNTR-2, the cluster analysis of 5 VNTRs was the method of choice to determine clonality. Four clonal profiles were identified among the 33 isolates recovered, 13 of which were obtained from outbreak patients. The profiles most frequently identified during the outbreak were A and B: 9 and 2 patients, respectively (69.2% and 15.4%). In most of cases, patients shared a floor (indirect contact), but not a room or hospitalization bed (direct contact), which suggests a cross transmission by health-care providers.

Discussion. After the analysis of the results, we concluded that the outbreak had a dynamic, multiple source and polyclonal behavior, with an indirect transmission route through the health personnel. Among the main benefits obtained locally, were the optimization of resources in infection control and the implementation of more effective strategies in the prevention of future outbreaks, individualized to the institution.

Keywords. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*, outbreak surveillance, antimicrobial resistance, time–place–clonality algorithm.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

3.1. Planteamiento del problema

Cada año, en Estados Unidos, al menos 2 millones de personas adquieren una infección severa por alguna bacteria multirresistente y al menos 23.000 personas mueren cada año como consecuencia directa a dicha infección (1-3). Los *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (ERV) se encuentran clasificados dentro de los agentes infecciosos de mayor relevancia en el ámbito intrahospitalario, siendo el género *Enterococcus spp.*, el quinto microorganismo más prevalente de las Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud (IAAS) según el reporte de 2011 a 2014 de la National Health care Safety Network (NHSN) del Center for Disease Control and Prevention (CDC) de Estados Unidos (4, 5). También forman parte de ESKAPE (*E. faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*), un grupo de bacterias con la capacidad de “escapar” a la mayor cantidad de antibióticos actualmente disponibles. De acuerdo a este documento, los *Enterococcus faecium* se encuentran asociados a un 3.7% de IAAS (3). El riesgo de colonización oscila entre 1.9% a 37% entre pacientes hospitalizados, dependiendo del tiempo exposición y proximidad, y de 0.4 a 11.8% en personas de la comunidad (6).

En cuanto a mortalidad, en un estudio realizado con 567 pacientes colonizados con ERV en Corea entre los años 2008 a 2010, se encontró que la tasa de mortalidad era mayor en pacientes colonizados (24.6%), en comparación con los pacientes sanos (no colonizados) que fue del 17.1 (OR, 2.35 IC 1.21- 4.56). (7) Adicionalmente, la tasa global de mortalidad encontrada en la literatura en pacientes infectados con diagnóstico de bacteriemia por ERV, varía entre el 10% al 70%, dependiendo de las características clínicas y demográficas de la población (8).

Su rápida diseminación mundial desde su primer aislamiento en Inglaterra y Francia en 1986, se vio facilitada por diferentes mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia, como su gran plasticidad genética para la diseminación y transmisión de elementos de resistencia antibiótica, que incluye no únicamente a bacterias de su misma especie, sino también a los *Staphylococcus* resistentes a la Meticilina, confiriéndoles actividad contra la vancomicina (SaRV) (6, 7, 9, 10). Su capacidad innata de resistencia antimicrobiana y supervivencia prolongada en ambientes adversos, así como su habilidad para colonizar de manera natural el tracto gastrointestinal, finalmente conllevan a la limitación terapéutica, en un contexto en donde la mayoría de pacientes infectados y afectados se encuentran en condiciones de vulnerabilidad inmunológica, empeorando el panorama de supervivencia (9, 11).

3.2. Justificación o relevancia del proyecto

En principio los *Enterococcus* spp. se consideran parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de seres humanos y algunos animales, con bajo potencial infeccioso en pacientes inmunocompetentes, sin embargo, el aumento acelerado de sus tasas de resistencia alrededor del mundo durante los últimos años, ha sido desencadenante de brotes intrahospitalarios inesperados, con tasas de morbimortalidad considerables.

Como antecedente histórico de los *Enterococcus faecium* en nuestro hospital, es importante conocer que el primer aislamiento documentado fue de fenotipo sensible a la vancomina y se realizó en enero del 2001. Posteriormente, en agosto del mismo año, se obtuvo una muestra clínica proveniente de orina, de fenotipo resistente a la vancomicina.

Durante los siguientes más de 10 años y de acuerdo con los datos de la microbiología intrahospitalaria proporcionados por el departamento de Infecciones y vigilancia epidemiológica, el comportamiento de este microorganismo fue casi inocuo y no contribuyó a las principales causas de IAAS. Es por esto y para ilustrar la situación mediata e inmediata previa al brote, que se realizó un análisis del comportamiento epidemiológico de los *Efm* en el hospital. Es preciso anotar que los datos previos al 2015 e incluso los incluidos hasta mediados de ese año, no son de alta confiabilidad debido a múltiples factores como registro manual de los datos y las historias clínicas, así como la transición de un nuevo líder en ese departamento.

Los datos observados fueron representados en la figura 1. Todos los datos utilizados tuvieron como fuente el software WHONET (tomando siempre como filtro inicial primer aislamiento por paciente) y datos de IAAS consolidados por el departamento de Infecciones y vigilancia epidemiológica del hospital. Se calcularon las tasas de incidencia por 1000 pacientes/año de aislamiento por *E. faecium* entre los años 2012 a 2016. Esta tasa se mantuvo menor a 1 hasta el 2015, año en el cual esta cifra llegó a 1.65 por 1000 pacientes/año. Para el 2016, esta cifra tuvo un aumento cercano al doble, con un número de 2,9 por 1000 pacientes/año. En cuanto a los fenotipos de resistencia, los *E. faecium* sensibles a la vancomicina fueron previos al 2015 los microorganismos que se aislaron con mayor frecuencia (frente a los *Efm* sensibles). A partir de ese año, la proporción de *Efm* sensibles/resistentes casi que se igualó, con un excedente de casos resistentes sobre los sensibles, y ya para el año 2016, se observó una franca ventaja en el número de los *Efm* resistentes a la vancomicina.

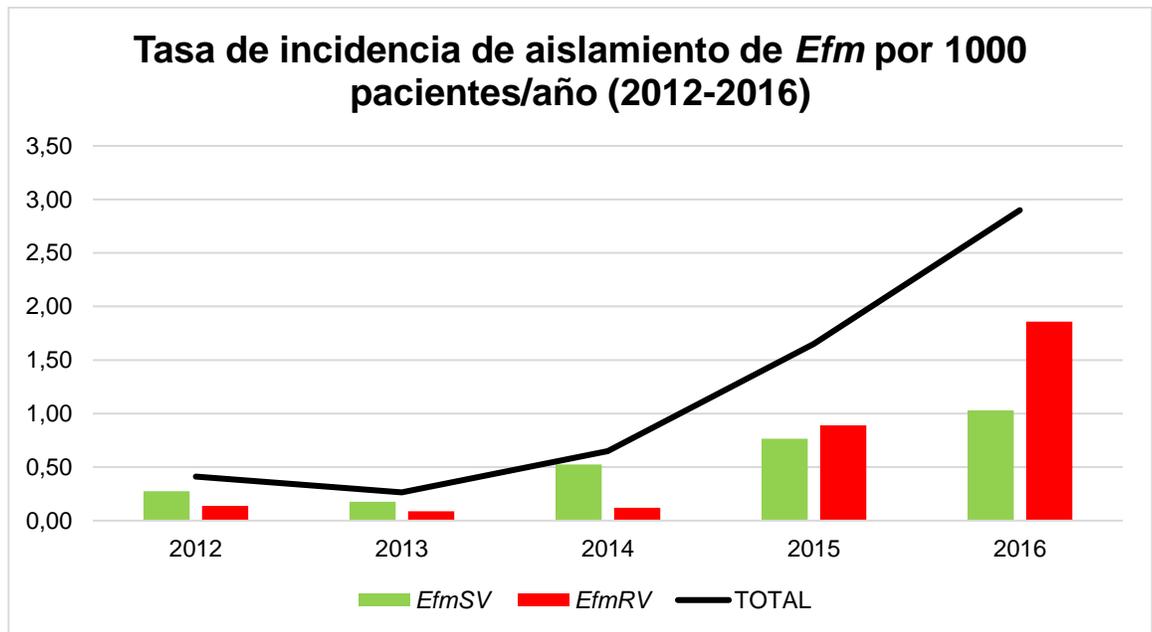


Figura 1. Tasa de incidencia de aislamiento de *Efm* por 1000 pacientes/año (2012-2016) en el Hospital Universitario Mayor – Méderi.

Un segundo punto evaluado fue la frecuencia de los *Enterococcus* frente a los demás microorganismos en el ámbito intrahospitalario. Se encontró como primer hallazgo, que los dos primeros microorganismos con mayor frecuencia aislados de las muestras clínicas de los pacientes admitidos en el Hospital Universitario Mayor-Méderi entre los años 2014 a 2015, fueron gramnegativos. En cuanto a los *Enterococcus faecium* (independiente del fenotipo de resistencia), se observó un aumento gradual de su incidencia anual dentro de los pacientes entre las fechas mencionadas, ocupando el puesto número 17 (1% de la totalidad de los aislamientos bacterianos) para el año 2014, el puesto 14 para el año 2015 (1.4%) y finalmente para el año 2016, se consolidó como dentro de los 10 microorganismos con mayor frecuencia aislados de los pacientes admitidos a quienes se les tomó alguna muestra clínica (2.3%).

En el contexto de impacto clínico y potencial infeccioso, se incluyeron los datos disponibles entre junio de 2015 y septiembre de 2016. Se comparó el número de aislamientos de *EfmRV* con el número de infecciones observadas, es decir, colonizaciones e infecciones. Los datos se presentan en la figura 2.

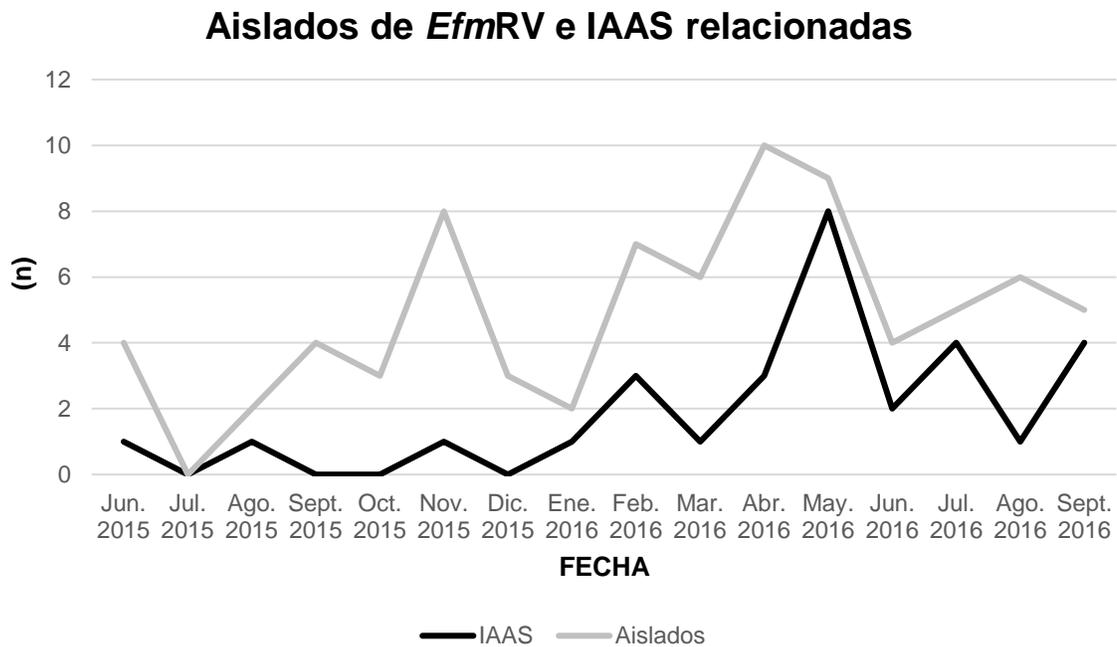


Figura 2. Número de aislamientos de *EfmRV* (línea gris) y número de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) (línea negra) por *EfmRV* en el Hospital Universitario Mayor, Méderi, entre junio de 2015 y septiembre de 2016.

La efectividad y la eficacia del control de brote intrahospitalario por un agente infeccioso depende de la implementación de las medidas correctas de acuerdo con la fuente y el modo de transmisión. Es así, que en casos donde la ruta de trasmisión del brote fuera por contacto directo, es decir, un paciente portador (colonizado ó infectado) de un microorganismo lo transmite a otro previamente sano (no portador), las medidas de

control de brote se deben enfocar hacia las precauciones de aislamiento de contacto, cohortización de los pacientes infectados/colonizados y el reforzamiento de las medidas de limpieza y desinfección de superficies. Por el contrario, en casos en que la ruta de transmisión del brote es debido a contaminación cruzada, por ejemplo, a través de personal de la salud, el reforzamiento de adherencia al lavado de manos y adecuada manipulación de equipos médicos comunes, debe ser la prioridad. Sin embargo, frente a la presentación de un brote de IAAS, generalmente todas estas estrategias son llevadas a cabo de forma simultánea debido a la falta de certeza del modo y fuente de transmisión. Adicionalmente, debido a que ambos modos de transmisión no son mutuamente excluyentes y ambas rutas pueden identificarse en un mismo brote.

Frente a la sospecha y confirmación de brote de IAAS, la institución afectada debe notificar una alerta epidemiológica a la Secretaría de Salud Distrital (SDS) y las cepas recuperadas a partir de pacientes involucrados en el brote deben ser enviadas para estudio de tipificación molecular. La técnica elegida por la SDS para la determinación de los grupos clonales fue la rep-PCR (rep: secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas). La evidencia que apoya la implementación de esta técnica ha sido favorable para brotes por *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* spp., y *Escherichia coli*. Dentro de los beneficios y ventajas de la ejecución de esta técnica son los relativos bajos costos, la practicidad y obtención de resultados en tiempo corto. Sin embargo, y con base en estudios realizados en brotes intrahospitalarios por *Enterococcus* en Asia y Europa, se pudo concluir que, a pesar de que los resultados obtenidos por la rep-PCR mostraron una correlación significativa ($P < 0.001$) con los obtenidos por otras técnicas consolidadas para tipificación de brotes por *Efm*, como el Gel de Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE por sus siglas en inglés) y Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST por sus

siglas en inglés), la rep-PCR tiene un menor poder discriminativo y puede sobreestimar las relaciones genéticas de las cepas a estudio. Por lo tanto, la recomendación final de estas investigaciones es que siempre se realice un segundo método de tipificación para la confirmación de los resultados (13-16). La poca aplicabilidad en tiempo real de métodos adicionales de tipificación molecular para la determinación de perfiles clonales, debido a los altos costos en personal y reactivos, conlleva a que en la mayoría de los hospitales en Colombia no los incluyan como parte del protocolo en tiempo real de manejo de brotes. Sin embargo, consideramos que la implementación de estas técnicas como confirmación molecular de las hipótesis clínicas, genera una mayor confianza en la toma de decisiones sobre la distribución de recursos que de forma general en Colombia, son limitados.

3.3 Pregunta de investigación.

¿Cuál es el patrón de diseminación de los aislamientos de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina relacionados con un brote intrahospitalario por durante los meses mayo a septiembre de 2016 en el Hospital Universitario Mayor-Méderi?

4. MARCO TEÓRICO

El grupo de *Enterococcus spp.* fue descrito por primera vez hace más de un siglo, considerándose dentro de microorganismos que forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de los humanos y de algunos animales, siendo usados incluso en campos agropecuarios por su capacidad de secretar sustancias que inhiben el crecimiento de otras bacterias.

El primer aislamiento de un *Enterococcus* resistente a la vancomicina fue de la subespecie *E. faecium* en el año 1986, en Francia e Inglaterra, seguido por el aislamiento en los Estados Unidos en el año 1987, perteneciente a la subespecie *E. faecalis*. En Europa el aislamiento del ERV se dio principalmente entre la la comunidad, mientras en Norteamérica de forma intrahospitalaria, con unas diferencias epidemiológicas marcadas en las distintas áreas geográficas, mostrando un patrón de diseminación variable. (19)

Sin embargo, pese a su variabilidad de diseminación geográfica, este microorganismo se ha consolidado dentro de los patógenos intrahospitalarios más importantes en el mundo, siendo considerado a finales de los años 1980s, el microorganismo más frecuentemente aislado de pacientes con IAAS. Los *Enterococcus* son considerados colonizadores prolíficos por excelencia, poseen una gran plasticidad genómica que les permite persistir de manera prolongada en ambientes y superficies hospitalarias, facilitándose así su diseminación. Al tener un comportamiento en principio no infeccioso, la tasa de pacientes portadores supera casi 10 veces la tasa de pacientes infectados, siendo estos últimos la punta del iceberg de este problema. (4, 11) El porcentaje de pacientes con infección clínicamente activa es mayor en pacientes vulnerables, especialmente aquellos hospitalizados en UCI y con terapia inmunosupresora, quienes están mayor riesgo de recibir

manejo poliantimicrobiano, favoreciendo el crecimiento acelerado del patógeno oportunista resistente. Las manifestaciones clínicas típicas incluyen bacteriemia, endocarditis, infecciones abdominales y pélvicas, infecciones del tracto urinario, piel y de tejidos blandos, y en menor medida, infecciones del Sistema Nervioso Central. (9, 19-21)

Se clasifican clásicamente como bacterias grampositivas, catalasa negativa, no formadoras de esporas, anaerobias facultativas, pertenecientes a un grupo de microorganismos conocidos como bacterias Ácido Lácticas (LAB) que producen bacteriocinas; esta es una toxina que inhibe el crecimiento de bacterias contiguas. Sus capacidades de supervivencia le permiten proliferar en ambientes hostiles, como en temperaturas extremas que van de los 5 a los 65 grados centígrados (30 minutos a 60 grados), pH 4.5 a 10 (con un óptimo de 7.5) y en altas concentraciones de sales biliares incluso del 40%. (19) A pesar de tener una gran cantidad de subespecies, las más frecuentemente descritas en la literatura han sido *E. faecalis* y *E. faecium*, con una diferencia en la tasa de aislamiento en Estados Unidos de 1.6:1, respectivamente; *E. faecalis* con mayor tasa de colonización y *E. faecium* con mayores tasas de resistencia, componiendo estos últimos la mayoría de las infecciones por ERV. (10, 19)

Se ha observado que el comportamiento de los aislamientos intrahospitalarios expresa una menor diversidad que la encontrada en los aislamientos de la comunidad. (22) Un estudio realizado en Dinamarca reveló que la tasa de aislamiento de *E. faecalis* en pacientes hospitalizados fue del 57%, mientras en individuos sanos había una ocurrencia de entre el 39 al 40%. (23) La incidencia de infección por este microorganismo es mayor en pacientes hospitalizados que en aquellos de la comunidad, no sólo por la mayor presencia de factores de virulencia en las cepas intrahospitalarias, sino también debido a que el hospital en sí mismo, es considerado como un punto clave para la infección, ya que en este puede sobrevivir durante varios días. (24) Las infecciones por ERV se han asociado a un aumento

en la morbilidad, la mortalidad, costos de cuidado de la salud y duración de la estancia hospitalaria en comparación con las infecciones por cepas de *Enterococcus* sensibles.(25)

4.1. Definiciones

Las definiciones empleadas en la construcción de este estudio son tomadas por los criterios del Centro para Control y Prevención de enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés), el Ministerio de Salud de Colombia y la Secretaría de Salud de Bogotá, adoptados por el proceso de Infecciones y Vigilancia Epidemiológica del Hospital Universitario Mayor – Méderi.

- **ERV:** *Enterococcus* resistentes a la vancomicina, el medicamento que se usa con frecuencia para tratar las infecciones causadas por cocos grampositivos con expresión de resistencia a la metilina.
- **EfmRV:** *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina.
- **IAAS:** Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Los actuales sistemas de salud emplean diferentes tipos de dispositivos invasivos y procedimientos para tratar a los pacientes y ayudarlos a mejorar en su condición clínica. Las infecciones pueden asociarse con estos dispositivos usados en los procedimientos médicos, tales como los catéteres o ventiladores. Estas infecciones incluyen: infecciones del torrente sanguíneo asociados a Catéter Central (ITSACC), Infecciones del Tracto Urinario Asociado a Catéter (ITUAC) y neumonía Asociada al Ventilador (NAV). Pueden ocurrir también en localización quirúrgica, conocidas como Infecciones del Sitio Operatorio.

- **Colonización:** Presencia de un microorganismo en alguna muestra biológica en ausencia de sintomatología infecciosa.
- **Infección:** Presencia de un microorganismo con expresión de signos y/o síntomas de infección.
- **Brote:** es la ocurrencia de un número más alto de casos de la enfermedad o evento respecto del número usual ocurridos durante un período de tiempo específico en un área determinada o dentro de un grupo de personas específicas. Se define como brote por IAAS como la ocurrencia de un número de casos de infecciones asociadas a la atención en salud mayor que el esperado (aumento a partir de un caso), aparición de un nuevo caso por un microorganismo (parasito, virus, bacterias y hongos) no frecuente en el servicio y/o en la institución o cambio de la resistencia, de acuerdo con la endemia de la institución con una relación de lugar, momento y población dados.

4.2. Factores de riesgo

En la literatura se han descrito diferentes factores de riesgo asociados a diferentes escenarios clínicos. Existen factores de riesgo para colonización o para infección, así como para la adquisición del *EfmRV* previo y durante la estadía en UCI. De forma general se han asociado dos factores predictivos independientes para el desarrollo de infección por *EfmRV*: la colonización previa por *Enterococcus* (independientemente de su patrón de resistencia) y el uso previo de antibióticos, especialmente los glicopéptidos. (1) Otros factores asociados a infección son la administración de cefalosporinas de tercera o cuarta generación (p : 0.020; OR: 4.8; CI 1.3–17.8) y uso previo de corticoides (p : 0.014; OR: 7.4; CI 1.5–36.7) (4, 7, 9)

Para la colonización por *Enterococcus* se describen los citados previamente para infección, más los siguientes: hospitalización prolongada, comorbilidades (diabetes, falla renal, puntuaciones altas en APACHE II, inmunosupresión, malignidad hematológica, trasplante de órganos, infección concomitante, falla cardíaca crónica, malignidad y diabetes insulino-dependiente), proximidad a pacientes infectados/colonizados y ser transferido de otra institución (4, 20). La tasa global de colonización descrita oscila entre 0 al 45% (4, 20) con una posibilidad de colonización que oscila entre 1.9% a 37% entre pacientes hospitalizados, y de 0.4 a 11.8% en personas de la comunidad (6). El tiempo promedio de adquisición fue de 25 días tras la exposición (4, 26).

La mayoría de los casos de colonización ocurren en el Tracto Gastrointestinal (TGI), pero también pueden encontrarse en menor medida en piel, Tracto Genito- Urinario (TGU) y cavidad oral (9). Una vez dada la colonización del tejido, esta puede persistir durante varios meses a años y los intentos para la descolonización son generalmente transitorios, con recurrencia de aislamiento tras algunos días o semanas. En algunos estudios realizados en los Estados Unidos(27, 28) se encontró que sólo en un aproximado del 50% de los pacientes portadores rectales de ERV se logró una erradicación con una duración media libre del microorganismo de 50 días. Adicionalmente, a pesar de que los cultivos arrojen resultados negativos, el paciente puede persistir colonizado a nivel gastrointestinal. Las manos de los trabajadores de la salud son el recurso de transmisión descrito más consolidado. El ERV puede persistir hasta por 60 minutos en las manos y hasta 4 meses en las superficies. La vía más común de contagio de ERV es por contacto de persona a persona o la exposición a objetos contaminados.

4.3. Virulencia/patogenicidad

La mayoría de las infecciones por ERV se consideran de causa endógena por translocación bacteriana intestinal, causando diseminación linfática y hematológica sistémica. (19)

A la fecha, los mecanismos de resistencia de los *Enterococcus faecium* involucran 7 genes principales que contienen el locus de resistencia a la vancomicina (29). Además de su plasticidad genómica, representada principalmente por los elementos genéticos móviles, se han descrito otros factores facilitadores de infección como la habilidad de adhesión a gran cantidad de proteínas de matriz extracelular de diferentes epitelios (19), la presencia de proteína extracelular *Esp* y sustancias de agregación (*Agg*), principalmente asociadas a la formación de biopelícula y evasión del sistema inmune (12, 19). Debido a los múltiples mecanismos de resistencia encontrados en VRE, las opciones terapéuticas son limitadas. Los *EfmRV* producen además sustancias enzimáticas que pueden ser secretadas a las células del huésped y causar su muerte, tales como la citolisina (también llamada hemolisina), hialuronidasas, gelatinasas y serinoproteasas, aparentemente asociadas a la diseminación del *Enterococcus* al lesionar el tejido conectivo. El papel principal de la gelatinasa y la serinoproteasa en la patogénesis del *Enterococcus* al parecer es proporcionando nutrientes a la bacteria al degradar el tejido del huésped, así como contribuir en la formación de la biopelícula. (19)

4.4. Epidemiología

Para el 2013 el Sistema Europeo de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana (EARSS) reportó una prevalencia de ERV en toda Europa de tan sólo el 4%. Sin embargo, esta cifra es dependiente del país de estudio, siendo menor del 1% en Francia, España y Suecia, más del 20% en Grecia, Irlanda, Portugal y el Reino Unido. (9) Las tasas más altas de ERV se han encontrado en Norteamérica, de acuerdo con NHSN (National Healthcare Safety

Network). Entre los años 2009 y 2010 el 35.5% de las IAAS por *Enterococcus* eran provocadas por cepas resistentes a la vancomicina, siendo clasificados como la segunda causa más común de infecciones intrahospitalarias en Estados Unidos. (9) En Asia, específicamente en Corea, el primer aislamiento fue en 1992, con una tasa de aislamiento que ha venido en rápido ascenso del 9.7% al 51.9% en pacientes en UCI. (7, 20) Según un estudio realizado en ese país, la edad promedio de los pacientes colonizados fue de 62 años y 60% fueron hombres. De los 398 pacientes de la cohorte, 199 colonizados y 199 no colonizados, 83 murieron durante la hospitalización: 49 de los 199 pacientes colonizados y 34 de los no colonizados, con una tasa de mortalidad de 24.6% vs 17.1% y una mortalidad atribuible de 11%. OR, 2.35; $p=0.12$. El total de duración de días en UCI fue de 7.6 en pacientes colonizados frente 8.8 días en pacientes no colonizados, una diferencia no significativa, sin embargo, se observó un número total de días de hospitalización mayor en pacientes colonizados, estimando una asociación con un incremento promedio ajustado de 5.4 días. El costo total en UCI en EEUU en el 2014 para pacientes colonizados por ERV fue de 6065 dólares, mientras en no colonizados fue de 5.298, un incremento ajustado de 1166 dólares estadounidenses (ME, 1.22: $p=.029$). (7, 20) Viéndose en pacientes un incremento en 2.35 veces la posibilidad de mortalidad, 1.25 veces la posibilidad de días totales de hospitalización y 1.22 veces el costo de UCI. Los resultados de este estudio proveen una razón fundamental para ejercer intervenciones específicas para minimizar el impacto de la colonización por ERV, medidas tales como tamizaje de pacientes en riesgo y la importancia del aislamiento temprano preventivo en pacientes con factores de riesgo para colonización. (7)

En Irlanda e Inglaterra, las tasas de infecciones del torrente sanguíneo causadas por ERV aumentaron del 16% al 24% entre los años 2010 y 2014, (25) con un riesgo de muerte descrito para el 2007 del 75% en pacientes infectados con cepas resistentes a la

vancomicina, en comparación con el 45% de la mortalidad en pacientes con cepas susceptibles.(19) En Australia, un estudio de especies de *Enterococcus* causantes de enfermedades entre pacientes adultos de 17 instituciones, se observó que la prevalencia de la resistencia a la vancomicina en el *E. faecium* ha tenido un ascenso mayor a dos veces, de 7.2% en el 2005 a 15.4% en el 2007. (30)

En cuanto a la persistencia sobre las superficies hospitalarias, la supervivencia en barandas de cama es de 24 horas, en teléfonos de 60 minutos y estetoscopios de 30 minutos. Se ha demostrado que los ERV son tan sensibles a los agentes desinfectantes comunes como lo son las cepas sensibles. (27)

Los factores que facilitan la diseminación intrahospitalaria son: presión selectiva antimicrobiana en pacientes con manejo antimicrobiano de amplio espectro, problemas con los reportes por parte del laboratorio clínico, falta de reconocimiento de pacientes asintomáticos portadores, contaminación ambiental y su supervivencia, transferencia intra e interhospitalaria de pacientes colonizados y baja adherencia inadecuada al lavado de manos y elementos de protección personal (EPP). (27)

4.5. Identificación microbiológica y molecular

La implementación de técnicas de tipificación molecular a nivel intrahospitalario, ha contribuido con el mejoramiento de la vigilancia y detección de brotes por agentes infecciosos. mejoran contribuyen al aumento de la confiabilidad y precisión de los datos proporcionando mediciones más sensibles y específicas que facilitan las actividades epidemiológicas, incluyendo vigilancia de enfermedades, investigaciones de brotes, identificación de patrones de transmisión y factores de riesgo en casos aparentemente dispares, caracterización de interacciones huésped-patógeno, Proporcionando pistas para

posibles causas infecciosas de cáncer y otras enfermedades crónicas, y proporcionando una mejor comprensión de la patogénesis de la enfermedad a nivel molecular.

Actualmente, la secuenciación genómica completa (WGS por sus siglas en inglés) es considerada la técnica de tipificación molecular más confiable a nivel de investigaciones clínicas locales e internacionales y ha sido implementada en estudios de brote en algunos países de Europa, Asia y Estados Unidos. Sin embargo, esta técnica es todavía muy compleja, que requiere gran cantidad de tiempo e información para su ejecución, y cuenta con dificultades para la su aplicabilidad e integración con datos clínicos. Para los *Enterococcus faecium*, clásicamente y en orden cronológico, las principales técnicas moleculares (previas a la WGS) descritas en la literatura como estándar de oro para la determinación de relaciones clonales han sido: Gel de Electroforesis de Campo Pulsado (PFEG) y Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST). Sin embargo, en el año 2004 *Top y colaboradores* publicaron un nuevo esquema de tipificación para evaluar relaciones genéticas y epidemiológicas entre los aislamientos de *Enterococcus faecium*. (31)

A continuación, se hará una descripción de cada una de estas 3 técnicas utilizadas para la detección de brotes y vigilancia epidemiológica de *Enterococcus faecium*, abordando principalmente sus ventajas y desventajas, así como sus capacidades de comparabilidad multicéntrica. El abordaje molecular por WGS fue descartada desde el inicio del estudio debido a sus altos costos, a la complejidad de ejecución y a las dificultades para su aplicabilidad clínica en el análisis del brote. (13-16, 18, 29, 32-34)

PFGE

Para su ejecución, una muestra de ADN genómico bacteriano altamente purificado se escinde con una endonucleasa de restricción que reconoce los sitios de restricción que ocurren con poca frecuencia en el genoma de las respectivas especies bacterianas. Los

fragmentos de restricción resultantes, que son en su mayor parte grandes, se pueden separar en un gel de agarosa mediante electroforesis de "campo pulsado". Allí, la orientación del campo eléctrico a través del gel se cambia periódicamente. Los fragmentos de ADN separados se pueden visualizar en el gel como bandas, que forman un patrón particular en el gel, el patrón PFGE. Los fragmentos de restricción grandes se separan así de una manera dependiente del tamaño y el método produce relativamente pocas bandas en el gel, lo que facilita el análisis de los resultados. Los aislamientos que difieren en ≤ 6 bandas, se asignan dentro del mismo grupo clonal, y los aislamientos que difieren en ≥ 7 bandas, se asignan en grupos clonales diferentes.

Dentro de las principales ventajas de este método se encuentran: el abordaje de una gran porción del genoma investigado ($>90\%$), excelente capacidad de discriminación, alta concordancia epidemiológica y reproducibilidad intralaboratorio. En cuanto a las desventajas se describen la alta exigencia de la técnica, el tiempo que requiere, la falta de resolución de las bandas y la subjetividad en el análisis final, lo que dificulta el intercambio de datos entre laboratorios.

MLST

Los métodos de tipificación molecular con base en los múltiples locus dispersos en el cromosoma, como lo son la MLST y el MLVA, pueden ser usado para la confirmación de la identificación de especies y la determinación de la relación genética de los aislamientos de *EfmRV*. Tiene como base la identificación de alelos a partir de secuencias de ADN de fragmentos internos de 7 genes constitutivos, resultado en un perfil alélico numérico. A cada perfil se le asigna un tipo de secuencia (ST).

Dentro de las ventajas, se encuentran la calidad de los datos con una nomenclatura estandarizada a nivel internacional y su alta reproducibilidad intra e interlaboratorios. Sus

desventajas son los altos costos de ejecución, laboriosidad y consumo de gran cantidad de tiempo.

MLVA

Tiene como base las diferencias en los números variables de repeticiones en tándem (VNTRs) en múltiples locus del cromosoma bacteriano, que pueden ser rápidamente detectados por PCRs con cebadores o iniciadores específicos en las regiones críticas de las repeticiones en tándem. Los VNTRs se definen como las regiones de un genoma donde una secuencia de nucleótidos se repite varias veces, de lado a lado, y donde el número de repeticiones varía entre individuos. Para este análisis en *Enterococcus faecium*, se describieron 6 VNTRs.

Debido a que los grupos o tipos de acuerdo a lo obtenido por el MLVA se discriminan por la ganancia o pérdida de repeticiones discretas, este tipo de análisis proporciona una asignación y nomenclatura precisa de los genotipos, permitiendo su comparabilidad con los datos obtenidos por otros laboratorios. Otras ventajas descritas es que es una técnica sencilla, rápida y económica. No requiere un equipo de electroforesis sofisticado. Sus desventajas son el requerimiento de diseño de cebadores específicos para cada microorganismo y su análisis no es 100% objetivo.

En la tabla 1 se resumen las características evaluadas en nuestra investigación, a partir de evidencia científica, para la elección del método de tipificación molecular para determinación de los grupos clonales.

Característica	PFGE	MLST	MLVA
Poder de discriminación	0.83/0.97	0.91	0.84
Intervalo de confianza del 95%	[0.951–0.992]	[0.877–0.943]	[0.79–0.893]
Duración del procedimiento	3 días	2 días	2 días
Duración de la asignación de grupos clonales	Horas	Horas	Horas
Costo estimado por aislamiento	\$ 10	\$ 60	\$ 11
Requerimiento de equipo especial	Sí	No	No

Tabla 1. Resumen comparativo de las principales características evaluadas entre las técnicas de tipificación molecular PFGE, MLST y MLVA, con base en la literatura.

4.6. Resistencia

Una vez instaurada la infección por *EfmRV*, esta suele ser de difícil manejo dada la capacidad de resistencia natural de los *Enterococcus* a gran cantidad de antibióticos, incluyendo cefalosporinas, aminoglucósidos, clindamicina y trimetropin sulfametoxazol. (38, 39)

Resistencia a glicopéptidos. Las paredes celulares de las bacterias se encuentran fortalecidas por los peptidoglicanos que se forman a partir de precursores terminales d-Ala-dAla. Los glicopéptidos, como la vancomicina y la teicoplanina, son agentes activos contra la pared celular, ejerciendo su efecto antibacteriano por la unión de alta afinidad por esos precursores d-Ala-dAla del pentapéptido, inhibiendo la síntesis del peptidoglicano y así debilitando la pared celular bacteriana. La resistencia antibiótica se da cuando ocurren cambios en los precursores originales, ya sea por cambios a d-Ala-d-**Lac** o a d-Ala-d-**Ser**, disminuyéndose entonces la afinidad del antibiótico por la bacteria. A la fecha, se han descrito 8 variantes fenotípicas de resistencia adquirida a glicopéptidos (*VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanE*, *VanG*, *VanL*, *VanM*, and *VanN*), siendo *VanC* un tipo de resistencia intrínseca exclusiva para *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Cambios en los precursores a d-Ala-d-**Lac** (*VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanM*), causan una disminución en la afinidad por la vancomicina de 1000 veces, y cambios a d-Ala-d-**Ser** (*VanC*, *VanE*, *VanG*, *VanL*, *VanN*), causan una disminución de la afinidad de 7 veces. *VanA* es el responsable de casi todos los casos de VRE en humanos en el mundo, la mayoría en *E. faecium*, excepto en Australia donde el fenotipo más prevalente es el *VanB*, siendo *VanA* distinguido de los demás por su actividad de resistencia a la Teicoplanina. (32, 33, 40-46)

4.7. Tratamiento

Las opciones terapéuticas actualmente disponibles y con mayor uso clínico para las infecciones por *EfmRV* son linezolid, daptomicina, quinupristin/dalfopristina y tigeciclina, así como algunos esquemas biconjugados. La elección de la antibioticoterapia depende de los efectos adversos individualizados al paciente, el tipo y lugar de la infección, el tiempo de duración del tratamiento, interacciones medicamentosas y perfiles farmacocinéticos. Recientemente, han salido al mercado nuevos medicamentos como el tedizolid, telavacina,

dalbavacina y prítavacina, pero se requieren más estudios para determinar su impacto clínico. (9, 35)

5. HIPÓTESIS

Ho: Los *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina aislamientos entre los meses de mayo y septiembre de 2016 en el Hospital Universitario Mayor- Méderi, presentan un patrón de transmisión directo y de única clonalidad que se puede comprobar clínica y molecularmente.

Ha: Los *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina aislamientos entre los meses de abril y septiembre de 2016 en el Hospital Universitario Mayor- Méderi, presentan un patrón de transmisión cruzada y policlonal que se puede comprobar clínica y molecularmente.

6. OBJETIVOS

6.1. General

Describir el patrón de diseminación de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina, provenientes de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Mayor-Méderi durante los meses mayo a septiembre de 2016, integrando estrategias de epidemiología hospitalaria y molecular, a través de un algoritmo de Tiempo – Lugar – Clonalidad (TLC).

6.2. Específicos:

1. Determinar el comportamiento del brote tras la implementación de las medidas control, pautadas por el departamento de epidemiología del hospital.
2. Describir los fenotipos (perfiles) de susceptibilidad antibiótica de las cepas de *EfmRV* provenientes de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Mayor-Méderi durante los meses mayo a septiembre de 2016 a través de técnicas automatizadas y manuales (confirmatorias).
3. Identificar la presencia del gen de resistencia *vanA* de los aislamientos procesados.
4. Describir los grupos o perfiles clonales observados por medio la tipificación molecular.
5. Determinar cuál(es) son el(las) probables vías de transmisión intrahospitalaria de *EfmVR* de acuerdo con el algoritmo de Tiempo – Lugar – Clonalidad (TLC).

7. METODOLOGÍA

7.1. Enfoque metodológico y tipo de investigación

Estudio observacional, descriptivo, de corte transversal. Tuvo como objetivo la descripción del patrón de diseminación de un brote intrahospitalario por *EfmRV*, a través de un algoritmo modificado de Tiempo- Lugar- Clonalidad. El estudio tuvo una duración de 5 meses, entre los meses de mayo a septiembre de 2016, en el que se incluyeron cepas del periodo de brote y posterior al brote.

7.2. Tipo de estudio:

Epidemiología clínica y molecular.

7.3. Población blanco:

Cepas bacterianas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina (*EfmRV*) provenientes de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Mayor – Méderi.

7.4. Población elegible:

Cepas bacterianas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina (*EfmRV*) provenientes de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Mayor – Méderi entre los meses de abril a septiembre de 2016.

7.5. Población de estudio:

29 cepas bacterianas no duplicadas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina (*EfmRV*), provenientes de 29 pacientes hospitalizados durante los meses de abril a septiembre de 2016, de los cuales, 16 pertenecieron al brote por *EfmRV*.

Se estudiaron además 4 muestras de superficies de ambiente para el estudio medioambiental de brote.

7.6. Diseño muestral:

Nuestra investigación tuvo como objetivo describir el patrón de diseminación (rutas de transmisión) de *EfmRV* durante un brote asociado a la atención en salud, estimado a través de componentes complementarios entre la epidemiología molecular y la epidemiología hospitalaria. El propósito y alcance de la investigación no fue dirigido hacia la obtención de inferencias estadísticas como asociación y causalidad, ya que estos factores han sido ampliamente descritos en la literatura. Por lo tanto, los 16 pacientes del brote fueron incluidos (muestra no representativa con muestro a conveniencia).

7.7. Criterios de selección:

7.7.1. Criterios de inclusión

- Cepas bacterianas de *EfmRV* procedentes de pacientes hospitalizados y de muestras de superficie del Hospital Universitario Mayor- Méderi entre los meses abril a septiembre de 2016.
- Primer aislamiento obtenido del paciente del que proviene.

7.7.2. Criterios de exclusión

- Ausencia del reporte del perfil de susceptibilidad (antibiograma).
- Aislamientos provenientes de consulta externa o de pacientes que no hayan sido hospitalizados en la Institución.

7.8. Hospital de estudio y recolección de datos

El estudio se realizó en un hospital universitario con una capacidad instalada de 802 camas, en Bogotá, Colombia. El hospital se conforma por dos sedes, el Hospital Universitario Mayor y el Hospital Barrios Unidos, siendo el primero, el más grande (506 camas) y donde el brote tuvo lugar. Esta sede cuenta con 118 camas en la unidad de cuidados intensivos (UCI), 10 camas en la unidad de cuidados coronarios (UCC), 22 camas en la unidad de cuidados intermedios para adultos (UCIM) y 25 camas en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN). Los *Enterococcus faecium* habían sido considerado como endémicos en la institución desde su primer aislamiento en 2001, con un bajo número de IAAS asociadas hasta el año 2016 (Figura 1). En el mes de febrero de ese año, hubo un aumento abrupto del número de *EfmRV* aislamientos de pacientes, lo que provocó que el Departamento de Epidemiología del hospital iniciara una investigación de brote de IAAS y se confirmara un brote relacionado con *EfmRV* para mayo de 2016, que fue controlado para el siguiente mes. Sin embargo, para el estudio de brote se incluyeron además casos de finales de abril y principios de junio, de acuerdo con el análisis propuesto por el departamento de epidemiología, dada la dificultad de determinar con certeza el caso índice (microorganismo endémico desde el 2001). La confirmación del brote se basó en el índice de infecciones relacionadas con *EfmRV* en comparación con la cantidad de pacientes dados de alta por mes, en al menos 24 meses (Figura 2). Este índice estaba por encima de la tercera desviación

estándar (SD) permitida y se confirmó un brote siguiendo los criterios establecidos por la Secretaría de Salud del Distrito de Bogotá:

1. Un incremento en la incidencia de una infección, mayor a lo esperado, ó
2. La ocurrencia de un incremento en el número de casos, en relación con caso índice, y/o
3. La presentación de un agente emergente (primer caso) o modificaciones en el perfil de susceptibilidad antimicrobiana en lugar, tiempo y población específica.

Este índice también confirmó el control del brote en junio de 2016, tras la implementación de intervenciones multidisciplinarias (Figura 3). Se realizó además un estudio posterior al brote como seguimiento.

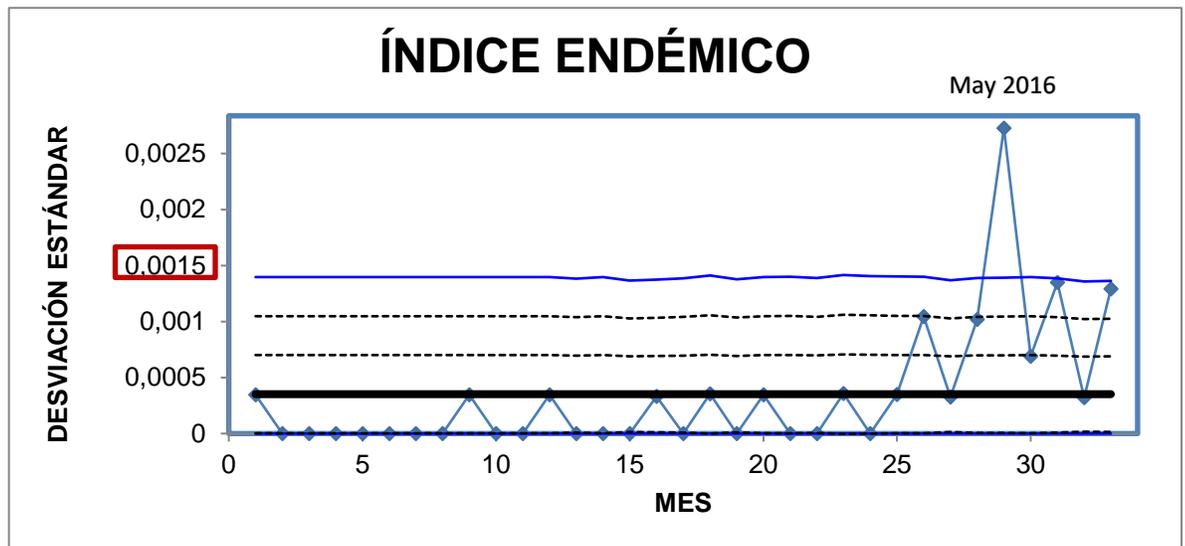


Figura 3. Índice endémico.

Índice endémico entre las infecciones relacionadas al *EfmRV* y el número de egreso de pacientes por mes, durante los meses de junio de 2014 (mes 0) y octubre de 2016 (mes

33).

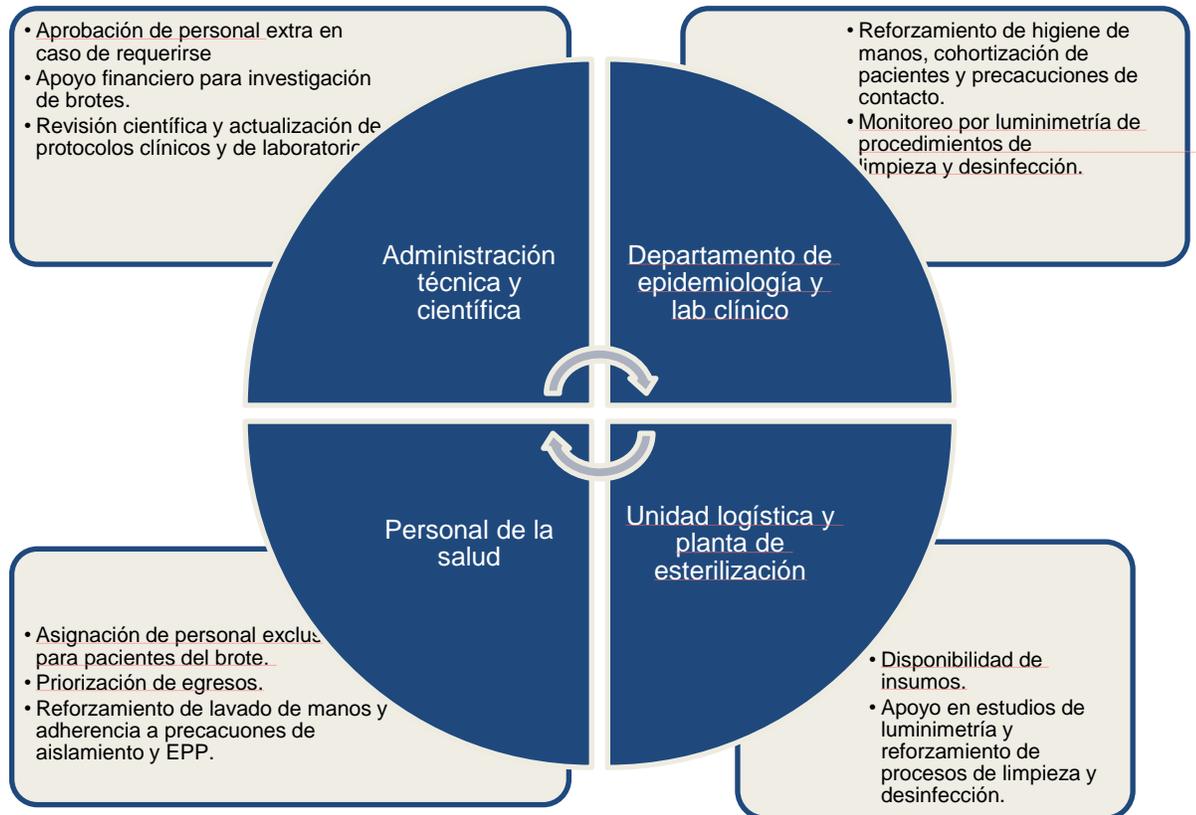


Figura 4. Respuesta a brote y gestión de incidentes.

La figura muestra los departamentos involucrados y las intervenciones realizadas durante el brote por *EfmRV*.

7.9. Algoritmo tiempo – lugar – clonalidad.

El análisis de la transmisión se realizó mediante la modificación y adaptación de un algoritmo descrito previamente para un brote de *Pseudomonas aeruginosa* en Alemania entre 2002 y 2015 (48), habiendo identificado con éxito las rutas de transmisión. Las modificaciones implicaron el uso del análisis por agrupamiento de VNTRs en lugar de la secuenciación del genoma completo (WGS) para evaluar la clonalidad.

La transmisión se consideró si *VREfm* se detectó por primera vez en el paciente "A" antes de ser detectado por primera vez en el paciente "B". Se combinaron los datos de seguimiento epidemiológico de los pacientes (camas por los cuales los pacientes estuvieron hospitalizados), así como los perfiles clonales detectados de los aislamientos obtenidos durante el brote. Así, se establecen cuatro criterios: el criterio 1 se cumple si los pacientes A y B se encontraron en el mismo piso del hospital (solapamiento mínimo de 24 horas antes de que *VREfm* se detectara por primera vez en el paciente B). Criterio 2, se cumple si el paciente B estuvo hospitalizado en la misma habitación en la que estuvo hospitalizado el paciente A, con un máximo de 2 semanas previas al ingreso del paciente B a esa habitación. El criterio 3 se cumple cuando tanto al paciente A como al paciente B permanecieron hospitalizados en la misma habitación, mínimo por 24 horas previo al aislamiento del *EfmVR* en el paciente B. Criterio 4 se refiere a una estrecha relación genética entre los aislamientos de *EfmVR* de los pacientes A y B.

Se consideró una **transmisión posible** cuando se cumplió el criterio 1. La transmisión fue **probable** cuando se cumplieron los criterios 2 o 3, así como el cumplimiento de solo el criterio 4. La **transmisión predecible** se determinó cuando se cumplieron el criterio 4 (criterio molecular) en combinación con cualquiera de los tres criterios epidemiológicos (1, 2 o 3); si no se cumplía ninguno de los criterios, la probabilidad de transmisión se consideró **desconocida**.

Este abordaje permitió la presunción de algunas deficiencias con respecto a la limpieza y la desinfección. La transmisión posible (criterio 1 – mismo piso) podría indicar que la transmisión ocurrió a través del personal de atención médica (los pacientes que cumplen con este criterio nunca compartieron una habitación sino la misma sala, recibiendo atención médica del mismo personal de atención médica). La transmisión probable (criterio 2, 3 - misma habitación o criterio 4 - relación genética) podría haber

ocurrido por contacto directo o contaminación ambiental. La transmisión predecible (combinación de cualquier criterio epidemiológico y relación genética) incluyó las explicaciones previas.

7.10. Análisis estadístico

Este estudio, debido a la metodología escogida, no contará con un análisis estadístico a través de una plataforma convencionalmente empleada para los estudios de tipo analítico. Sin embargo, el abordaje propuesto por el algoritmo modificado de TLC, requiere de un análisis descriptivo y presuntivo de los hallazgos de los resultados de epidemiología hospitalaria y molecular, expuesta en las definiciones (transmisión posible, probable y predecible).

7.11. Control de errores y sesgos

Sesgo de información. La Historia clínica es un elemento que puede prestarse a confusiones por ser operador dependiente. Sin embargo, SERVINTE es un software para el diligenciamiento electrónico de historias clínicas que cuenta con espacios diferentes para el diligenciamiento por el personal médico, de enfermería y de laboratorio clínico, por lo cual se verificará y comparará la información entre ellos.

7.12. Presupuesto

RUBROS	VALOR
PERSONAL	-

EQUIPOS NUEVOS	-
	16.088.038
EQUIPOS EXISTENTES	
SOFTWARE	-
VIAJES Y VIÁTICOS	-
	45.132.973
MATERIALES Y SUMINISTROS	
SALIDAS DE CAMPO	-
MATERIAL BIBLIOGRÁFICO	-
	10.000.000
PUBLICACIONES Y PATENTES	
	10.920.000
SERVICIOS TÉCNICOS	
CONSTRUCCIONES	-
MANTENIMIENTO	-
ADMINISTRACIÓN	-
	2.086.589
IMPREVISTOS	
TOTAL	84.227.600

8. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

8.1. Identificación microbiológica

La especie de *Enterococcus faecium* fue identificada por el espectrómetro de masas del sistema Vitek 2 (versión de software 1.02, bioMérieux). La susceptibilidad in vitro de los aislamientos a los medicamentos antimicrobianos se determinó mediante la tarjeta Vitek 2XLS automatizada, según los criterios del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) 2016 (49) para *Enterococcus*. El E-test fue el método manual de confirmación para la identificación de resistencia a vancomicina. El Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia realizó una microdilución manual adicional para cuantificar las concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) para la resistencia a la vancomicina y la teicoplanina. Se utilizó la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (NCTC 12697) como cepa de control y se usó CLSI M100-S24 para interpretar los resultados.

8.2. Tipificación molecular y detección del gen *vanA*

Se realizó la detección del gen *vanA* y la tipificación molecular en las 33 cepas recuperadas. Por medio de PCR en tiempo real, se realizó la detección del gen *vanA*. Las primeras secuencias se basaron en los genes publicados para *Efm* (35, 50). Las reacciones se realizaron con una enzima hotstart ADN polimerasa (AmpliTaq Gold) con buffer I (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Los fragmentos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 2%.

La tipificación molecular implicó que los aislamientos de *EfmRV* se cultivaran en caldo LB durante una noche, con suplemento de dextrosa (5 g/L) a 37 ° C con agitación. Se

utilizó un kit de purificación de ADN Wizard Genomic (Madison, Wisconsin, Estados Unidos) para la extracción del ADN, siguiendo el protocolo para bacterias grampositivas. Se utilizaron 120 µl de lisozima (10 mg / ml) para la lisis celular.

Finalmente, el análisis de agrupamiento de 5 VNTRs (Variable Number Tandem Repeats) VNTR-1, VNTR-7, VNTR-8, VNTR-9 y VNTR-10 fue el método de elección para determinar los perfiles clonales ya que no hubo resultados consistentes y / o reproducibles para VNTR-2 (requerido para el análisis de Multilocus Variable Number Tandem Repeat- MLVA) (17, 18, 50). Los 5 loci VNTR se procesaron según lo descrito por Top et al. para MLVA, con algunas modificaciones menores (17).

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Es un estudio de carácter observacional sin ninguna intervención en el paciente, por lo cual, y de acuerdo con lo establecido en la resolución 008430 de 1993 (“Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”), este estudio se clasifica como una “investigación sin riesgo”. Se cumplirá con lo establecido por el Ministerio de Protección Social colombiano (antiguo Ministerio de Salud), la ley 84 de 1989 y la ley 2381 de 1993.

Además, los investigadores conducirán este proyecto acogiéndose a la normatividad vigente de acuerdo a la Declaración de Helsinki 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, Octubre 2008 y a la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos.

Se aclara que debido al carácter universitario del hospital centro de nuestro estudio, todos los pacientes que son admitidos a hospitalización firman un consentimiento informado sobre la posible participación de sus datos de manera anonimizada. La confidencialidad de la identidad y datos clínicos de los pacientes de donde provienen las cepas bacterianas se garantizará al ingresar exclusivamente a la base de datos identificadores con códigos.

Este estudio fue aprobado por el comité de ética en Investigaciones de la Universidad del Rosario, a través de la resolución DVO005–1-143-CEI851, el 8 de septiembre del 2017.

10. RESULTADOS

Treinta y tres aislamientos no duplicados de *EfmRV* fueron recuperados en un periodo de 5 meses (mayo a septiembre de 2016), provenientes de 29 pacientes, y otros 4 provenientes de superficies medioambientales. Trece de los 29 aislamientos de pacientes y los 4 de superficies se obtuvieron durante el periodo del brote. Los otros 16 aislamientos fueron obtenidos de pacientes durante un periodo posterior al brote (julio a septiembre de 2016), incluyendo aislamientos de pacientes infectados y colonizados. Las muestras clínicas de las cuales fueron obtenidas los aislamientos fueron: 18 de orina (62.1%), 7 de heridas quirúrgicas (21.4%), 3 de sangre (10.34%) y una de secreción orotraqueal (3.44%). Las muestras de superficies medioambientales fueron tomadas de 2 barandas de camas diferentes de servicios de hospitalización general y una de una bomba de infusión de la UCI. Tres de los 29 aislamientos clínicos (10.3%) (uno perteneciente al brote y dos recuperados en el periodo posterior al brote) fueron considerados como adquiridos previo al ingreso de la institución, es decir, extrainstitucionales.

10.1. Respuesta al brote

Como se observa en la figura 2, el brote se confirmó en mayo de 2016, sin embargo, se incluyeron pacientes con aislamientos de *EfmRV* a finales de abril, mayo y principios de junio, de acuerdo con el análisis realizado por el departamento de infecciones y vigilancia epidemiológica del hospital. Se implementaron diferentes estrategias de control de brotes, de acuerdo con los lineamientos y recomendaciones de la secretaría

de salud de Bogotá y la Sociedad para Epidemiología hospitalaria de América (SHEA).
(5, 51)

El brote involucró 16 pacientes. Debido a que se realizó un segundo análisis y verificación de los diagnósticos por el servicio de infectología de forma retrospectiva, ajustándose a los criterios de la CDC para definición de caso (52), cuatro aislamientos fueron reclasificadas como relacionadas a colonización y no a infección. Uno de los aislamientos provenientes de pacientes infectados durante el brote, fue identificada como adquirida antes del ingreso al hospital.

Durante el brote 6 pacientes murieron y 4 de esas muertes fueron atribuibles a la infección por *EfmRV*. En junio de 2016, tras la identificación de la disminución de los casos (2 infecciones), se logró el control de brote como se logra apreciar en las figuras 1 y 2. Sin embargo, y dadas las recomendaciones nacionales e internacionales para el abordaje de brote y la verificación de la efectividad de las intervenciones realizadas, se extendió el estudio hasta septiembre de 2016. Dieciséis aislamientos recuperados de pacientes hospitalizados entre junio y septiembre de 2016 fueron conservados para este propósito.

Las muestras medioambientales fueron obtenidas como control de calidad de la limpieza y desinfección de superficies durante el brote. Se evaluaron 33 superficies en junio 2 de 2016, incluyendo las manos de personal de salud, barandas de camas, bombas de infusión, equipo de monitoreo, teclados de computadores de los servicios y botones para llamado de personal de enfermería dispuestos en las camas de los pacientes. Estos cultivos revelaron el crecimiento de *EfmRV* en 3 superficies: 2 barandas de camas de diferentes habitaciones de hospitalización general, y uno de la bomba de infusión en la UCI. Se reforzaron, por lo tanto, los procedimientos de limpieza y desinfección en todo el hospital y en especial en estas superficies, y se realizó un

seguimiento 11 días después. Se encontró que 2 de las 3 superficies fueron negativas, pero una de las barandas de las camas de hospitalización general (quinto piso) persistía con el crecimiento del *Enterococcus*. Esta superficie fue nuevamente reforzada en los procedimientos de limpieza y desinfección, con un seguimiento negativo (no crecimiento bacteriano) a los 7 días.

10.2. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a la totalidad de los aislamientos, pero solo los 29 aislamientos obtenidos de muestras biológicas se incluyeron dentro análisis. Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) automatizadas para ampicilina, ciprofloxacina, estreptomina y gentamicina de carga alta, linezolid, quinupristina-dalfopristina, tetraciclina, vancomicina y teicoplanina. Se realizó una microdilución manual para determinar las CMIs de vancomicina y teicoplanina. Todos los aislamientos (100%) se confirmaron como resistentes a vancomicina y ciprofloxacina, susceptibles a linezolid, gentamicina de alta carga y quinupristina-dalfopristina; todos menos uno (es decir, 28 aislamientos) se identificaron como resistentes a teicoplanina y ampicilina de forma simultánea. Veinticuatro tenían resistencia a la estreptomina de carga alta y 21 eran resistentes a la tetraciclina. Se identificaron cuatro patrones cualitativos de susceptibilidad a los antibióticos (Tabla 1); los métodos manuales revelaron que 26 aislamientos (89.6%) tenían un alto nivel de resistencia a vancomicina (CMI > 128 µg/dL), y 28 aislamientos (96%) fueron resistentes a la teicoplanina. Un aislamiento fue susceptible a la ampicilina y la teicoplanina, un patrón inusual para este tipo de bacterias. (9, 53, 54)

Perfil fenotípico	TEC	AMP	CIP	STH	GEH	LNZ	QDA	TCY	n	%
1	S	S	R	R	S	S	S	R	1	3.45
2	R	R	R	R	S	S	S	R	20	68.97
3	R	R	R	R	S	S	S	S	3	10.34
4	R	R	R	S	S	S	S	S	5	17.24

Tabla 1. Susceptibilidad antimicrobiana cualitativa.

(R) resistente y (S) sensible. TEC Teicoplanina, AMP ampicilina, CIP ciprofloxacina, STH estreptomycin de alta carga, LNZ linezolid, QDA quinupristin-dalfopristina, TCY tetraciclina. N número de aislamientos expresando el perfil. % porcentaje aislamientos expresando el perfil descrito.

10.3. Detección del gen *vanA*

Por PCR se identificó el gen *vanA* en 26 de los 29 aislamientos clínicos y en 4 de los aislamientos recuperados de superficies medioambientales; la detección del gen *vanA* se relacionó con niveles medios y altos de resistencia a la vancomicina (CMI entre 64 y >512 µg/mL) y resistencia heterogénea a la teicoplanina (CMI de 8 a <256 µg/mL). (35, 37, 40, 54); sin embargo, uno de estos 26 aislamientos clínicos con detección del gen *vanA* fue identificado como la única cepa susceptible a la ampicilina y la teicoplanina. En cuatro aislamientos que expresaron un fenotipo alto nivel de resistencia a vancomicina de alto nivel, no se amplificó el gen *vanA* (Tabla 2).

Tabla 2a y tabla 2b. Perfiles clonales, datos clínicos y microbiológicos de los 33 aislamientos incluidos en el estudio.

Paciente	Mortalidad	Lugar de	Estado clínico	Ubicación	Fecha	Muestra clínica	Teico CMI	Van CMI	Nivel de R a	Vanco	gen vanA
1	x	I	INF	7	ABR	HQ					
2	x	I	INF	3	ABR	S					
3		I	CL	4	ABR	O					
4	x	I	INF	2	MAY	HQ	64	256	H		x
5		I	INF	6	MAY	HQ	128	>512	H		x
6		I	INF	5	MAY	O	32	256	H		x
7	x	I	INF	5	MAY	HQ	32	>512	H		x
8		I	INF	4	MAY	HQ	32	>512	H		x
9		I	INF	6	MAY	O	64	256	H		x
10		I	CL	8	MAY	O	64	256	H		x
11	x	I	INF	2	MAY	O	32	256	H		x
12		E	INF	URG	MAY	O	8	64	M		x
13		I	CL	7	JUN	O	32	>512	H		x
14		I	CL	6	JUN	O	16	256	H		x
15	x	I	INF	5	JUN	O	32	256	H		x
16		I	INF	2	JUN	SOT	32	256	H		x
17	x	I	INF	2	JUL	S	16	256	H		x

<i>Paciente</i>	<i>Mortalidad</i>	<i>Lugar de infección</i>	<i>Estado clínico</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Fecha</i>	<i>Muestra clínica</i>	<i>Teico CMI</i>	<i>Van CMI</i>	<i>Nivel de Ra</i>	<i>Yanco gen vanA</i>
18		I	INF	5	JUL	O	32	256	H	x
19		I	CL	2	JUL	O	16	128	M	x
20	x	I	INF	8	JUL	S	>256	256	H	x
21		I	INF	6	JUL	HQ	32	256	H	x
22		I	CL	4	AGO	O	32	256	H	x
23		I	CL	6	AGO	O	16	256	H	x
24	x	I	CL	5	AGO	S	32	256	H	x
25		E	INF	2	AGO	O	16	256	H	
26		E	CL	URG	AGO	O	32	128	H	x
27		I	CL	6	AGO	HQ	32	256	H	x
28		I	CL	URG	SEP	O	32	256	H	x
29		I	INF	URG	SEP	O	32	256	M	x
30	x	I	INF	5	SEP	O	64	256	H	
31		I	INF	2	SEP	HQ	16	256	H	
32		I	INF	URG	SEP	O	64	512	H	

Tablas 2a. Los colores de la primera columna representan los perfiles clonales identificados y denominados con letras. Lila: perfil clonal "A", rosado: perfil clonal "B", amarillo: perfil "C" y verde perfil "D". Gris: no se realizó tipificación molecular. "P": Pacientes. Mortalidad: muerte del paciente durante la hospitalización. Lugar de infección:

ubicación estimada desde donde un paciente adquirió la infección; I: institucional, E: externo. Estado clínico. INF: infección clínica, CL: colonización bacteriana. Ubicación: sala del hospital donde se obtuvo un aislamiento. URG: urgencias. El segundo piso (2) se refiere a UCI, el tercero a UCIM, 4 a cuarto piso, 5 a quinto piso, 6 a sexto piso, 7 a séptimo piso y 8 octavo piso. Fecha: mes en que se obtuvo el primer aislamiento de *EfmRV*. Muestra clínica de la cual se recuperó un aislamiento: herida quirúrgica (HQ), orina (O), muestra de secreción orotraqueal (SOT), sangre (S). Las columnas Teico CMI y Vanco MIC, se refieren a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Concentración Mínima Inhibitoria, CIM) a esos agentes, realizadas a cada una de las muestras a través de técnicas de microdilución manual. Teico: Teicoplanina. Van: Vancomicina. Nivel de R a Van: nivel de resistencia a la vancomicina, según la CMI, clasificado como alto (H) y medio (M). Gen *vanA*: los pacientes con aislamientos de *EfmRV* con detección del gen *vanA*, se encuentran marcados con una (x).

Superficie MA	Habitación	Evaluación #1	Evaluación #2	Evaluación #3	Teico CMI	Van CMI	Nivel de R a Vanco	gen vanA
ES1	207	POS	NEG		32	512	H	X
ES2	546	POS	POS	NEG	32	256	H	X
ES3	550	POS	NEG		16	512	H	X

Tabla 2b. Estudio medioambiental. Se muestran las 3 superficies que tuvieron crecimiento de *EfmRV* durante el estudio de limpieza y desinfección de superficies. Superficie MA:

superficies medioambientales: ES2 y ES3 corresponden a barandas de camas (diferentes) y ES1 a una bomba de infusión. Habitación: habitaciones en las que se identificó *EfmRV* (207 en la UCI, 546–550 en el quinto piso). Las columnas Teico CMI y Vanco MIC, se refieren a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (Concentración Mínima Inhibitoria, CIM) a esos agentes, realizadas a cada una de las muestras a través de técnicas de microdilución manual. Teico: Teicoplanina. Van: vancomicina. Nivel de R a Van: nivel de resistencia a la vancomicina, según la CMI, clasificado como alto (H) y medio (M). Gen *vanA*: las superficies con aislamientos de *EfmRV* con detección del gen *vanA*, se encuentran marcados con una (x).

10.4. Tipificación molecular

La tipificación molecular tuvo como base la agrupación de los VNTR-1, VNTR-7, VNTR-8, VNTR-9 y VNTR-10 y se realizó para los 33 aislamientos de *EfmRV* recuperados (incluidas las muestras ambientales). En la figura 3 se observan ejemplos de los diferentes VNTR. Se identificaron cuatro perfiles clonales (A, B, C y D) a partir de los aislamientos. El perfil con mayor frecuencia identificado en todas las cepas clínicas (29 aislamientos) fue el "A", en 17 de las cepas. El segundo en frecuencia fue el perfil "B", en 10 de las cepas y los perfiles "C" y "D" se identificaron en una cepa, cada una. De los 13 aislamientos obtenidos de pacientes del brote, en 9 se identificó el perfil clonal "A" (69,2%), en 2 el perfil clonal "B" (15,4%), y las clonalidades "C" y "D" se identificaron en un solo aislamiento cada uno (7,7% y 7,7%). El perfil "C" también se identificó de un aislamiento proveniente del estudio medioambiental la baranda de la cama 550. El perfil "D" se identificó solo en un paciente y la fuente de infección fue extrainstitucional. Esta última cepa fue la que presentó el nivel más bajo de resistencia a la vancomicina, con susceptibilidad a teicoplanina y la ampicilina). Los perfiles clonales "A" y "B" fueron

los únicos que se identificaron en las muestras clínicas de pacientes hospitalizados en el periodo posterior al brote (16 cepas), 8 para el perfil clonal "A" (50%) y 8 para el perfil clonal "B" (50%). La figura 3 muestra el número de aislamientos que muestran cada perfil clonal, distribuidos por mes de mayo a septiembre de 2016.

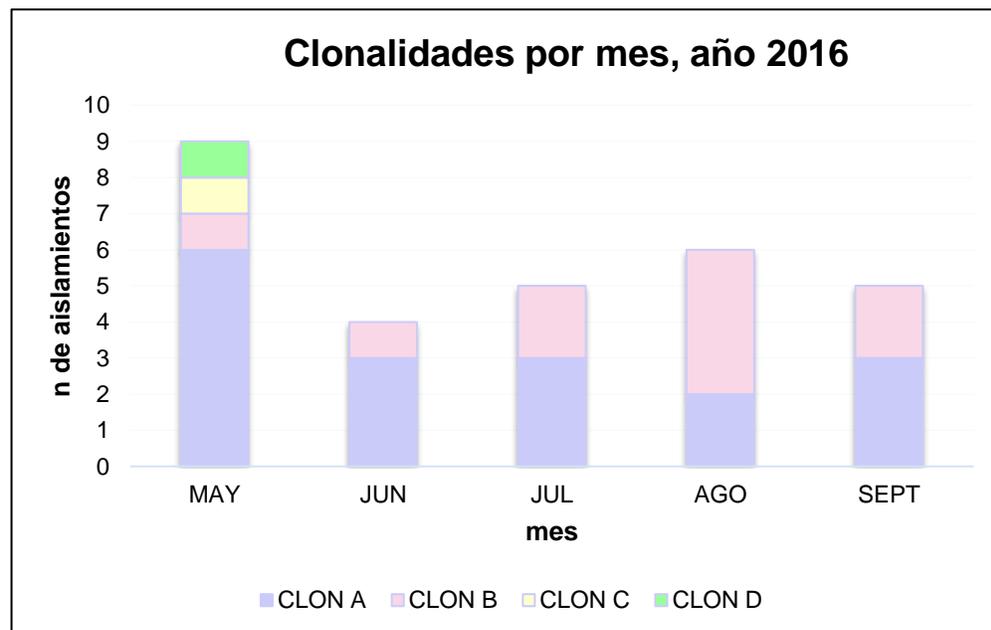


Figura 3. Los perfiles clonales identificados entre mayo y septiembre de 2016.

El perfil clonal "A" se identificó con mayor frecuencia en los aislamientos clínicos de mayo, junio, julio y septiembre. El perfil "B" fue el más identificado en agosto; sin embargo, en septiembre de ese año, el perfil "A" fue una vez más el de mayor identificación entre las cepas recuperadas de *EfmRV*.

10.5. Análisis de transmisión de acuerdo con el algoritmo modificado de Tiempo–Lugar– Clonalidad (TLC)

Se adaptó un algoritmo TLC (descrito anteriormente para *Pseudomonas aeruginosa*) (48) para evaluar las rutas de transmisión (transmisión directa o transmisión cruzada) en los pacientes provenientes del brote (16 pacientes). Datos clínicos (diagnósticos infecciosos), microbiológicos (fecha de toma de muestra donde se aisló por primera vez el *EfmRV*) y la trazabilidad de transferencia durante la estadía intrahospitalaria (ruta de pacientes), se analizaron de forma conjunta para la evaluación inicial de los criterios epidemiológicos propuestos en este algoritmo para la estimación de transmisión posible o probable. Posteriormente y con la información obtenida a partir de la tipificación molecular, se evaluó la relación genética, definida como una transmisión predecible. Sin embargo, esta relación genética se evaluó únicamente en 13 de los 16 pacientes del brote, ya que no se logró la recuperación de muestras provenientes de los 3 primeros pacientes.

El análisis por el algoritmo TLC fue realizado para la determinación de las rutas de transmisión entre los pacientes del brote. Los criterios epidemiológicos de transmisión posible y probable fueron evaluados en los 16 pacientes del brote, mientras que la relación de los criterios epidemiológicos + la relación genética, solo pudo ser evaluada en 13 de ellos. El paciente 1 (P1) fue el primer paciente identificado durante el brote, pero el paciente 2 (P2) fue el que transmitió el *EfmRV* al mayor número de pacientes, según la trazabilidad de transferencia de pacientes durante su estancia intrahospitalaria. La implementación del algoritmo TLC tuvo como objetivo investigar si la relación genética basada por agrupación de VNTRs (clonalidades) podía mejorar la identificación de las rutas de transmisión, en comparación con la vigilancia epidemiológica convencional. Esta ruta epidemiológica típicamente involucra tiempo

(curva epidémica), espacio (ruta de pacientes) y paciente (verificación de diagnósticos).

(51) En la figura 4a se muestra la representación de la transmisión posible (criterio 1) y probable (criterios 2 y 3); en la Figura 4b se muestra la representación de la transmisión predecible (criterio 4 + 1 ó 2 ó 3). De acuerdo con el algoritmo, cuatro de las posibles rutas de transmisión que fueron clasificadas como posibles por criterios epidemiológicos (1, 2 y 3), pudieron ser identificadas posteriormente como transmisiones predecibles al evaluarse en conjunto con la relación genética o clonalidad (criterio 4). De estos últimos 4 casos vale la pena anotar que los pacientes estuvieron hospitalizados en el mismo piso y ala de forma simultánea, pero no compartieron habitación. El paciente 4 probablemente contagió a los pacientes 7 y P14, el paciente 5 probablemente contagió al paciente 11 y el paciente 7 probablemente contagió al paciente 16. Con base en estos hallazgos proporcionados por el algoritmo, se puede estimar que la principal ruta de transmisión de *EfmRV* durante el brote, fue a través de contaminación cruzada por el personal de salud (Fig. 4b). El paciente 9, en quien se identificó un perfil clonal único y se diagnosticó una Infección Asociada a la Atención en Salud, no estuvo expuesto a pacientes previamente infectados de acuerdo con el algoritmo. (Fig. 4b).

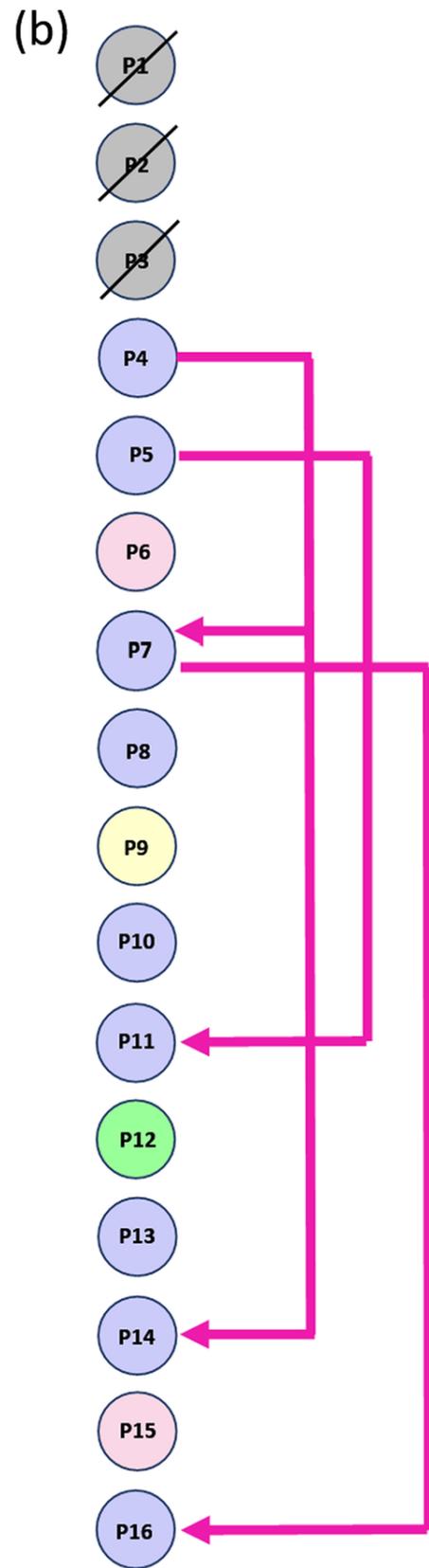
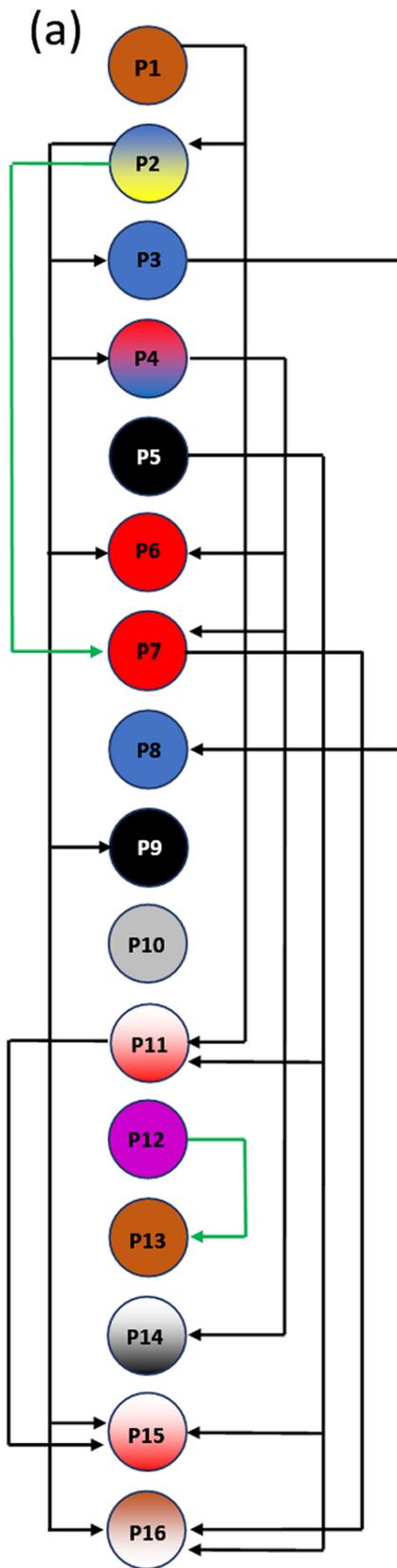


Figura 4. Rutas de transmisión estimadas para los 16 pacientes del brote, utilizando el algoritmo modificado de tiempo-lugar-clonalidad (TLC).

Los colores de las flechas reflejan la probabilidad de transmisión estimada entre dos pacientes. Los criterios 1 a 4 se describen brevemente como: criterio 1, hospitalización simultánea en el mismo piso y ala; criterio 2, misma habitación de forma consecutiva dentro de un periodo de 14 días; criterio 3, misma habitación de forma simultánea; y criterio 4, estrecha relación genética (misma clonalidad). Cada paciente se perfila como un círculo. La figura 4 (a) muestra la probabilidad de transmisión según los tres criterios epidemiológicos: criterio 1 (flechas negras), criterio 3 (flecha verde). No se representa en la figura el criterio 2, ya que no fue observado durante el análisis. El color del círculo indica la ubicación del paciente en la fecha de primer aislamiento de *EfmRV*: blanco representa la sala 2 (UCI), amarillo representa la sala 3 (Unidad de Cuidados Intermedios), azul representa la sala general 4, rojo representa la sala general 5, negro representa la sala general 6, verde representa la sala general 7, gris para el pabellón general 8 y púrpura significa la sala de emergencias (URG). Cuatro pacientes (P2, P4, P11, P16), requirieron traslado en más de una ocasión entre diferentes pisos el mismo día donde se tomó la primera muestra donde se aisló el *EfmRV*. De manera similar, los pacientes P14 y P15 no habían completado 24 h de permanencia en un piso cuando se detectó el primer aislamiento; todos ellos están representados con 2 colores. La Figura 4 (b) muestra la probabilidad de transmisión basada en los tres criterios epidemiológicos en combinación con el criterio de relación genética (flechas rosadas). Los colores de los círculos representan los perfiles clonales: lila es el perfil clonal "A", rosado es el perfil "B", amarillo el "C" y verde el "D".

11. DISCUSIÓN

Por medio de este estudio, pudimos evaluar las posibles rutas de transmisión de los aislamientos de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina involucrados en un brote intrahospitalario en el hospital con mayor capacidad instalada de Colombia, el hospital Universitario Mayor-Méderi, en un periodo de seguimiento de 5 meses.

Se pudo comprobar a nivel local los beneficios de la integración de las herramientas de epidemiología molecular y los métodos convencionales de la epidemiología hospitalaria. Con las técnicas de tipificación molecular, específicamente agrupamiento de VNTRs se pudo evaluar la relación genética entre aislamientos bacterianos, información que fue contrastada con la trazabilidad de las rutas de transferencia de todos los pacientes del brote, a través de todos los servicios y camas del hospital. Este abordaje, reflejado en el algoritmo TLC, permitió además determinar la probabilidad de estas rutas (posible, probable o predictiva) y formular las hipótesis de las vías de transmisión involucradas (transmisión directa o indirecta). Tras el análisis de los resultados obtenidos a través del algoritmo TLC, se pudo concluir que el brote tuvo un comportamiento dinámico, de fuente múltiple y origen policlonal. A pesar del hallazgo de que la mayoría de los pacientes no compartieron habitación o cama, pero sí piso o servicio de hospitalización, (lo que indicaría una vía de transmisión indirecta a través de personal de la salud o limpieza), pudo encontrarse en pocos casos, otras dificultades relacionadas con los procesos de la limpieza y desinfección de superficies y la falta de cohortización de los pacientes del brote, con la alta transferencia de los mismos por diferentes servicios camas y servicios.

Los resultados de la tipificación molecular identificaron la presencia de 4 perfiles clonales distintos: A, B, C y D (Fig. 3), siendo los perfiles A y B los que se identificaron con mayor frecuencia en los aislamientos provenientes del brote epidemiológico. Este comportamiento puede respaldar lo previamente descrito por la literatura como una mayor habilidad patogénica de algunos grupos clonales en desencadenar brotes epidemiológicos. Sin embargo, la caracterización de estos complejos clonales asociados a brote ha sido descrito por medio de la técnica MLST (35, 37, 56) y por lo tanto, no pudo ser comprobado en nuestro estudio. Además, el seguimiento cronológico de la incidencia de los perfiles clonales sugirió una diseminación transicional del perfil "A" al perfil "B" durante los meses de mayo a julio, pero con una mayor incidencia del perfil "A" en el último mes del estudio. Este último hallazgo indica que, a pesar del control exitoso del brote y la modificación del comportamiento de los *EfmRV* de epidémicos a endémicos, es necesario mantener una vigilancia activa y adherencia a los protocolos del programa de control y prevención de infecciones, así mismo, como el planteamiento de la necesidad de tamización activa de pacientes para evitar focos asintomáticos de diseminación.

Como se mencionó en el marco teórico, a la fecha se han descrito 8 variantes fenotípicas de resistencia a glicopéptidos (*VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanE*, *VanG*, *VanL*, *VanM*, and *VanN*), que se correlacionan directamente con la presencia de genes (genotipos) denominados con los mismos nombres (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, y *vanN*). Para los fenotipos *VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanM*, se han descrito los mayores niveles de resistencia, con una disminución en la afinidad por la vancomicina de aproximadamente 1000 veces. Para el resto de casos, (*VanC*, *VanE*,

VanG, *VanL*, *VanM*), se ha descrito de forma general, una disminución de la afinidad de 7 veces. Teniendo en cuenta esto, es importante resaltar las inconsistencias encontradas entre los perfiles genotípicos y fenotípicos de resistencia en algunos aislamientos de *EfmRV*. En un aislamiento con presencia del gen *vanA*, se observó un patrón fenotípico de susceptibilidad a teicoplanina y ampicilina; por el contrario, en 3 cepas con altos niveles de resistencia a vancomicina, no se identificó el gen *vanA*. Una de las principales razones pudo ser la presencia de alguno de los otros genes descritos con perfiles fenotípicos de alta resistencia, así como dificultades en la técnica. Sin embargo, en algunos trabajos descritos principalmente en Asia, estas discrepancias ya se han reconocido y pueden ser debidas a problemas en la técnica de identificación del gen, o la presencia de dos o más genes en una misma cepa, con expresión fenotípica de solo uno de los dos. (42, 45, 46, 55). Se recomienda, además, evaluar la presencia de los 8 genes de resistencia y su reproducibilidad.

12. CONCLUSIÓN

Este estudio demostró que el abordaje de brote por medio de un modelo epidemiológico integrado por estrategias clínica y moleculares, permitió la descripción del patrón de diseminación a través de las posibles rutas de transmisión y la comprobación de múltiples fuentes. Como consecuencia, dentro de los principales beneficios obtenidos a partir de la identificación local de oportunidades de mejora, fueron la optimización en la inversión de los recursos en las prácticas de control y prevención de infecciones y la aplicación de estrategias más eficaces para la prevención de brotes, individualizadas a la institución. La principal limitación de este estudio radicó en la falta de tamización rectal como estrategia de búsqueda activa de los casos de colonización por *EfmRV*, ya que los pacientes colonizados son un reservorio oculto que facilita la transmisión, diseminación y presentación de brotes por *EfmRV*.

Los beneficios de los modelos epidemiológicos integrados por estrategias clínicas y moleculares implementados en tiempo real se han podido demostrar en la literatura a través de diferentes estudios de brote por enfermedades infecciosas, principalmente en países con altos índices de capital humano como Alemania, de donde se adaptó el modelo del algoritmo implementado en nuestra investigación (15, 48, 57, 58).

Este estudio fue el resultado del primer trabajo en conjunto tras el convenio pactado entre el Hospital Universitario Mayor – Méderi y la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia. Pese a no ser este un estudio correctamente descrito como de tipo traslacional, la experticia y los aportes brindados por cada una de las instituciones implicadas permitieron dos logros destacables. La confirmación molecular de las hipótesis clínicas, lo cual genera tranquilidad en la toma de decisiones sobre la distribución de recursos en el hospital, así como el enriquecimiento en el abordaje de

manejo de brotes intrahospitalarios. Tras la experiencia de esta investigación, esperamos con los resultados encontrados primero, motivar de forma contundente al personal médico y de salud la importancia a la adherencia y buena técnica de lavado de manos y segundo, que el próximo estudio no sea la descripción retrospectiva de un brote, sino la identificación de aumento de casos de una infección y su adecuado control para la prevención de un brote. El conocimiento de las fuentes de infección, así como la determinación de la ruta de transmisión, que para nuestro caso fue de fuente múltiple con contaminación cruzada por vía personal de la salud como principal ruta de diseminación, permite destacar la importancia de la medida epidemiológica más antigua y rentable para la prevención de infecciones: la adherencia al lavado de manos.

13. ANEXOS

Archivo adicional en formato Excel. 1. Figura S1. Ruta de pacientes durante la hospitalización.

Teniendo en cuenta la alta movilidad de los pacientes del brote entre los diferentes servicios, algunos de ellos con más de 4 transferencias de habitación durante su estancia hospitalaria, la representación de una curva epidemiológica con la ruta de pacientes no fue posible. Sin embargo, se realizó un mapa detallado con la trazabilidad de la ruta de cada uno de ellos por el hospital. Anexo 1.

El eje X corresponde al tiempo, representado en días, entre el 1ro. de abril y 30 de junio de 2016. El eje Y corresponde a los pisos y camas donde estuvieron hospitalizados los pacientes. Solo las camas ocupadas por pacientes del brote fueron incluidas por cada piso. Los pacientes se representan con los números del 1 al 16. Los colores representan los perfiles clonales, como se describen en la tabla 2 y en la figura 4. El perfil de clonal no fue identificado en los primeros 3 pacientes del brote, por lo tanto, se representan con el color gris. El sombreado más claro de cada uno de los colores (que representan los perfiles clonales) corresponde al periodo previo del primer aislamiento de *EfmRV*. El color negro indica el día en el que se realizó la confirmación del primer aislamiento de *EfmRV*. El sombreado más oscuro indica el periodo posterior a la confirmación. El color rojo se representa los días en dos pacientes compartieron habitación.

Como publicaciones, presentaciones en congresos y reconocimientos producto de la investigación, se mencionan en orden cronológico:

Presentación de 3 trabajos de investigación en formato poster (primera autora) en eventos nacionales e internacionales:

1. “*Comportamiento epidemiológico de Enterococcus faecium resistente a la vancomicina en el Hospital Universitario Mayor- Méderi, 2014-2016*” en el primer encuentro de investigaciones del Hospital Universitario Mayor, Méderi. Diciembre de 2016. Bogotá, Colombia. Ganadora del tercer puesto de trabajos en formato poster.
2. “*Trend analysis between Vancomycin consumption and incidence of Vancomycin-resistant Enterococcus faecium between a local hospital and Colombian data, from 2013 to 2016*”. EPIDEMICS6. Sixth International Conference on Infectious Disease Dynamics. Noviembre de 2017. Sitges, España.
3. “*Molecular epidemiological analysis of an outbreak of Vancomycin-resistant Enterococcus faecium in a university hospital, Bogotá, 2016.*” EPIDEMICS6. Sixth International Conference on Infectious Disease Dynamics. Noviembre de 2017. Sitges, España.

Publicación de artículo en la revista BMC Infectious Diseases:

Corredor, N. C., López, C., Aguilera, P. A., Prieto, L. M., Rodríguez-Leguizamón, G., Leal, A. L., ... Patarroyo, M. A.(2019). *An epidemiological and molecular study regarding the spread of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in a teaching hospital in Bogotá, Colombia 2016. BMC Infectious Diseases, 19(1), 258.* <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3877-7>

14. AGRADECIMIENTOS

Inicialmente agradezco a Dios y a mi familia por permitirme vivir esta gran oportunidad, en donde el crecimiento personal fue tan importante como el académico.

Al hospital Universitario Mayor - Méderi y laboratorio clínico de COMPENSAR, principalmente a los Dres. Juan Mauricio Pardo, Lina Maria Prieto, Leidy Robayo, Claudia Chica y Giovanni Rodríguez, de quienes desde el primer y de forma diaria aprendí.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia, en especial al Dr. Manuel Alfonso Patarroyo y Carolina López quienes tuvieron el coraje y la paciencia de enseñarme una pequeña parte del mundo de la biología molecular.

A la doctora Aura Lucía Leal por todo su apoyo y paciencia en la ejecución de este trabajo.

Me gustaría agradecer además al Dr. César A. Arias y al Dr. Jinnethe Reyes de la Unidad de Genética Molecular y Resistencia a los Antimicrobianos, Centro Internacional de Genómica Microbiana, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia, por proporcionarnos la cepa ATCC de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. También a la Dra. Janetta Top por su asesoramiento técnico en técnicas moleculares y su disposición de respuesta pese a no conocernos de forma personal.

Así como a los evaluadores por tomarse el tiempo para la lectura y mejoramiento del proyecto.

A mis amigos, familiares y profesores y compañeros, de quienes siempre tuve un apoyo incondicional.

15. BIBLIOGRAFÍA:

1. CDC. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013. Disponible en <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf#page=67>. Acceso 27 de Octubre 2016.
2. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med.* 2014;370(13):1198-208.
3. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016;37(11):1288-301.
4. Papadimitriou-Olivgeris M, Drougka E, Fligou F, Kolonitsiou F, Liakopoulos A, Dodou V, et al. Risk factors for enterococcal infection and colonization by vancomycin-resistant enterococci in critically ill patients. *Infection.* 2014;42(6):1013-22.
5. Yokoe DS, Anderson DJ, Berenholtz SM, Calfee DP, Dubberke ER, Ellingson KD, et al. A compendium of strategies to prevent healthcare-associated infections in acute care hospitals: 2014 updates. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35 Suppl 2:S21-31.
6. Cohen MJ, Adler A, Block C, Gross I, Minster N, Roval V, et al. Major Article: Acquisition of vancomycin-resistant enterococci in internal medicine wards. *AJIC: American Journal of Infection Control.* 2009;37:111-6.
7. Jung E, Byun S, Lee H, Moon SY. Vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization in the intensive care unit: clinical outcomes and attributable costs of hospitalization. *Am J Infect Control.* 2014;42(10):1062-6.

8. Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006;81(4):529-36.
9. O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist.* 2015;8:217-30.
10. Borgmann S, Schulte B, Wolz C, Gruber H, Werner G, Goerke C, et al. Discrimination between epidemic and non-epidemic glycopeptide-resistant *E. faecium* in a post-outbreak situation. *J Hosp Infect.* 2007;67(1):49-55.
11. Cilo BD, Agca H, Efe K, Sinirtas M, Celebi S, Ozkan H, et al. Investigation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* outbreak in neonatal intensive care unit. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(12):5342-7.
12. Lee SC, Lee CW, Shih TC, See LC, Chu CM, Liu YC. Identification of subclinical transmission of vancomycin-resistant enterococcus within an intensive care unit in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;49(5):749-59.
13. Werner G, Fleige C, Neumann B, Bender JK, Layer F, Klare I. Evaluation of DiversiLab(R), MLST and PFGE typing for discriminating clinical *Enterococcus faecium* isolates. *J Microbiol Methods.* 2015;118:81-4.
14. Chuang YC, Wang JT, Chen ML, Chen YC. Comparison of an automated repetitive-sequence-based PCR microbial typing system with pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(8):2897-901.
15. Nutman A, Marchaim D. How to: molecular investigation of a hospital outbreak. *Clin Microbiol Infect.* 2018.
16. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk J, Laurent F, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill.* 2013;18(4):20380.

17. Top J, Schouls LM, Bonten MJ, Willems RJ. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4503-11.
18. Werner G, Klare I, Witte W. The current MLVA typing scheme for *Enterococcus faecium* is less discriminatory than MLST and PFGE for epidemic-virulent, hospital-adapted clonal types. *BMC Microbiol.* 2007;7:28.
19. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009;155(Pt 6):1749-57.
20. Ulu-Kilic A, Ozhan E, Altun D, Percin D, Gunes T, Alp E. Is it worth screening for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* colonization?: Financial burden of screening in a developing country. *Am J Infect Control.* 2016;44(4):e45-9.
21. Schouls LM, van der Ende A, Damen M, van de Pol I. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Neisseria meningitidis* yields groupings similar to those obtained by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2006;44.
22. Mutters NT, Mersch-Sundermann V, Mutters R, Brandt C, Schneider-Brachert W, Frank U. Control of the Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci in Hospitals Epidemiology and Clinical Relevance. *DEUTSCHES ARZTEBLATT INTERNATIONAL.* 2013;110(43):725-1.
23. 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.
24. Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):415-39.
25. Brodrick HJ, Raven KE, Harrison EM, Blane B, Reuter S, Torok ME, et al. Whole-genome sequencing reveals transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a healthcare network. *Genome Med.* 2016;8(1):4.

26. . !!! INVALID CITATION !!! {}.
27. Martone WJ. Spread of vancomycin-resistant enterococci: why did it happen in the United States? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998;19(8):539-45.
28. Faron ML, Ledebner NA, Buchan BW. Resistance Mechanisms, Epidemiology, and Approaches to Screening for Vancomycin-Resistant Enterococcus in the Health Care Setting. *J Clin Microbiol.* 2016;54(10):2436-47.
29. 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(6):1963-71.
30. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM, Schlebusch S, Tilse MH, Urbanski T, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2918-31.
31. Top J, Schouls LM, Bonten MJM, Willems RJL. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004;42.
32. Pinholt M, Lerner-Svensson H, Littauer P, Moser CE, Pedersen M, Lemming LE, et al. Multiple hospital outbreaks of vanA *Enterococcus faecium* in Denmark, 2012-13, investigated by WGS, MLST and PFGE. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(9):2474-82.
33. Panesso D, Reyes J, Rincon S, Diaz L, Galloway-Pena J, Zurita J, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1562-9.
34. Akpaka PE, Kisson S, Wilson C, Jayaratne P, Smith A, Golding GR. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Bermuda. *PLoS One.* 2017;12(3):e0171317.

35. Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, Jensen LB, Novais C, Peixe L, et al. Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J Antimicrob Chemother.* 2016.
36. Karden-Lilja M, Vuopio J, Koskela M, Tissari P, Salmenlinna S. Molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system compared with pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *Scand J Infect Dis.* 2013;45(5):350-6.
37. Yang JX, Li T, Ning YZ, Shao DH, Liu J, Wang SQ, et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. *Infect Genet Evol.* 2015;33:253-60.
38. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988;319.
39. Moemen D, Tawfeek D, Badawy W. Healthcare-associated vancomycin resistant *Enterococcus faecium* infections in the Mansoura University Hospitals intensive care units, Egypt. *Braz J Microbiol.* 2015;46(3):777-83.
40. Galloway-Pena JR, Nallapareddy SR, Arias CA, Eliopoulos GM, Murray BE. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J Infect Dis.* 2009;200(10):1566-73.
41. Willems RJ, Top J, van SM, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis.* 2005;11.
42. Santona A, Paglietti B, Al-Qahtani AA, Bohol MF, Senok A, Deligios M, et al. Novel type of VanB2 teicoplanin-resistant hospital-associated *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(2):156-9.

43. Naas T, Fortineau N, Snanoudj R, Spicq C, Durrbach A, Nordmann P. First nosocomial outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing a VanD-like phenotype associated with a vanA genotype. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):3642-9.
44. Panesso D, Ospina S, Robledo J, Vela MC, Pena J, Hernandez O, et al. First characterization of a cluster of VanA-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium*, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):961-5.
45. 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;61(4):838-44.
46. Song JY, Cheong HJ, Seo YB, Kim IS, Heo JY, Noh JY, et al. Clinical and microbiological characteristics of vancomycin-resistant enterococci with the VanD phenotype and vanA genotype. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(1):1-5.
47. PÚBLICA. SDDSDVSDVES. LINEAMIENTO PARA LA INVESTIGACION DE BROTES DE INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCION EN SALUD (IAAS). 2015.
48. Willmann M, Bezdan D, Zapata L, Susak H, Vogel W, Schroppel K, et al. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(5):1322-30.
49. Arendrup MC, Prakash A, Meletiadis J, Sharma C, Chowdhary A. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for *Candida auris* and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6).
50. Wardal E, Markowska K, Zabicka D, Wroblewska M, Giemza M, Mik E, et al. Molecular analysis of vanA outbreak of *Enterococcus faecium* in two Warsaw hospitals: the importance of mobile genetic elements. *Biomed Res Int.* 2014;2014:575367.

51. Secretaria-Distrital-de-Salud-de-Bogota, Subdireccion-de-Vigilancia-en-Salud-Publica. Lineamiento para la Investigacion de Brotes de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS). 2015.
52. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008;36(5):309-32.
53. Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infect Dis Clin North Am*. 2016;30(2):415-39.
54. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *EXPERT REVIEW OF ANTI-INFECTIVE THERAPY*. 2014;12(10):1221-36.
55. Mirzaei B, Babaei R, Asiabar AP, Bameri Z. Detection of both vanA & vanB genes in vanA phenotypes of Enterococci by Taq Man RT-PCR. *Braz J Microbiol*. 2015;46(1):161-5.
56. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):266-78.
57. Halachev MR, Chan JZ, Constantinidou CI, Cumley N, Bradley C, Smith-Banks M, et al. Genomic epidemiology of a protracted hospital outbreak caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Birmingham, England. *Genome Med*. 2014;6(11):70.
58. Jiang Y, Wei Z, Wang Y, Hua X, Feng Y, Yu Y. Tracking a hospital outbreak of KPC-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* with whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(11):1001-7.