

Curso 2011/12
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/3
I.S.B.N.: 978-84-15287-92-6

SILVIA CAMPOS GUTIÉRREZ

**Estudio epidemiológico de los enterococos
resistentes a la vancomicina
en el Hospital Universitario de Canarias (2001-2009)**

Directores

**ANTONIO SIERRA LÓPEZ
M.ª ISABEL MONTESINOS HERNÁNDEZ
MARÍA LECUONA FERNÁNDEZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Sierra López le quiero dedicar mi más especial agradecimiento por su apoyo constante, por su gran capacidad de trabajo, por su profesionalidad y generosidad, por las incontables horas dedicadas a la tesis, sin todo ello, no hubiera sido posible este trabajo.

A la Dra. M. Isabel Montesinos Hernández por su apoyo y generosidad, por compartir sus conocimientos, vitales para este trabajo y para mi formación.

A la Dra. María Lecuona Fernández, por su apoyo, cariño, y por el valioso tiempo dedicado a este trabajo.

A los compañeros del Servicio de Microbiología y Medicina Preventiva del Hospital Universitario de Canarias, por su apoyo, cariño y por tantas horas de trabajo compartidas.

A Alejandro Jiménez Sosa, responsable de Bioestadística y Metodología de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Canarias, por el análisis estadístico.

Agradecer a los compañeros del Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria y del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria su colaboración aportando cepas al estudio.

A la Dra. Patricia Ruiz Garbajosa del Hospital Universitario Ramón y Cajal por su colaboración en este estudio con el análisis por MLST y detección de genes *esp* e *hyl*.

A mi familia y a todos mis amigos, por creer en mí y por su amor, fundamental para llevar a cabo este trabajo.

A todos, gracias.

ÍNDICE

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
II. REVISIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
II. 1. Aspectos históricos de la resistencia de los enterococos frente a la vancomicina.	6
II. 2. Mecanismos de resistencia antibiótica.....	8
II.2.1. Resistencia a β -lactámicos	8
II.2.2. Resistencia los Aminoglucósidos	8
II.2.3. Resistencia a los glucopéptidos	9
II.2.4. Los criterios del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y del EUCAST (European Comité on Antimicrobial Susceptibility Testing):	13
II.3. Epidemiología de los enterococos resistentes a la vancomicina.....	14
II.3.1. Descripción de la situación epidemiológica en los Estados Unidos	16
II.3.2. Descripción de la situación epidemiológica en Europa	17
II.3.3. Descripción de la situación epidemiológica en España	25
II.4. Cadena epidemiológica.....	26
II.4.1. Reservorio.....	26
II. 4.2. Mecanismos de transmisión.....	29
II.4.3. Sujeto susceptible	31
II.5. Vigilancia y control de enterococos resistentes a los glucopéptidos.	33
II.5.1. Medidas administrativas.	34
II.5.2. Educación del personal sanitario.	34
II.5.3. Vigilancia.....	34
II.5.4. Higiene de manos.....	36
II.5.5. Aislamiento de contacto para pacientes colonizados por ERV	36
II.5.6. Control del uso de antibióticos	37
II.5.7. Descolonización de los pacientes portadores de ERV	38
II.5.8. Desinfección ambiental.....	38
II.6. Aplicación de marcadores moleculares en la epidemiología de los ERV	39
II.6.1. Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Electroforesis de Campo Pulsante (PFGE).....	42
II.6.2. Análisis del ADN por secuenciación: <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	47
II.6.3. Técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos	51

II.7. Factores de epidemicidad o virulencia.....	52
II.8. Tratamiento de ERV	53
III. MATERIAL Y MÉTODO	56
III. 1. Ámbito y periodo del estudio	57
III.2. Datos demográficos, clínicos y microbiológicos.....	57
III.3. Aislamiento, identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de los ERV en el HUC en el periodo 2001-2009.....	58
III.3.1. Preparación del inóculo para el Sistema Vitek [®] 2 (bioMérieux)	59
III.3.2. Sistema Automatizado Vitek [®] 2 (bioMérieux).....	59
III.3.3. Comprobación de la resistencia a la vancomicina y teicoplanina mediante E-test [®]	61
III.4. Tipificación molecular de la resistencia a los glucopéptidos por PCR.	62
III.4.1 Extracción del ADN	62
III.4.2. PCR múltiple para detección de genes de resistencia <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> ... 63	
III.5. Estudio del tipaje molecular mediante macrorrestricción: electroforesis de campo pulsado (PFGE).....	65
III.5.1. Preparación de insertos y lisis celular	65
III.5.2. Extracción del ADN bacteriano.....	66
III.5.3. Lavado de los insertos	67
III.5.4. Digestión del ADN con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte (Macrorrestricción).....	67
III.5.5. Elaboración del gel de agarosa	67
III.5.6. Electroforesis de campo pulsado	68
III.5.7. Tinción y visualización.....	68
III.6. Multilocus Sequence Typing (MLST).....	69
III.7. La amplificación de los genes <i>hyl</i> y <i>esp</i>	70
III.8. PCR a tiempo real Geneohm [™] VANR assay [®] (Becton Dickinson).....	71
III.8.1. Principio de la prueba	71
III.8.2. Procedimiento.....	72
III.9. Medidas de control ante un paciente infectado o colonizado por ERV en el HUC.....	73
III.10. Medidas de control durante el brote por ERV en la planta de Nefrología del HUC.....	74

III.11. Estudios de vigilancia activa (cribado de portadores) de ERV en el Hospital Universitario de Canarias en el periodo 2001-2009.	75
III.11.1. Estudios de vigilancia activa (cribado de portadores) de ERV en el Hospital Universitario de Canarias a partir del brote del 2005.	75
III.11.2. Estudios de vigilancia activa (cribado de portadores) de ERV en el Hospital Universitario de Canarias en el año 2007.	76
III.11.3. Estudios de vigilancia activa (cribado de portadores) de ERV en el Hospital Universitario de Canarias en el año 2009.	76
III.12. Análisis estadístico	77
IV. RESULTADOS	78
IV.I. Infecciones por <i>Enterococcus</i> spp. en el HUC durante el periodo 2001 – 2009	79
IV.2. Densidad de incidencia de infecciones por <i>Enterococcus</i> spp. en el HUC durante el periodo (2001-2009).	80
IV. 3. Infecciones por <i>Enterococcus</i> spp. por especie y localización clínica en el HUC en el periodo (2001-2009).	81
IV.4. Bacteriemias por enterococos relacionadas con la asistencia sanitaria.	85
IV.4.1. Bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria según especies de enterococos en el HUC durante el periodo 2001-2009.	85
IV.4.2. Densidad de Incidencia de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria por <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	86
IV. 4.3. Bacteriemias recogidas en el EARSS en el HUC durante el periodo 2001-2009.	87
IV.4.4. Importancia de las bacteriemias por enterococos en relación al total de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria en el periodo de estudio 2001-2009.	88
IV.4.5. Resistencia a la ampicilina, linezolid y de alto nivel a la gentamicina de las bacteriemias por <i>E.faecalis</i> y <i>E. faecium</i> en el HUC en los años 2008 y 2009.	89
IV.5. Resistencia a la ampicilina de los aislamientos por <i>E. faecium</i> en el HUC.	90
IV.6. <i>Enterococcus</i> spp. resistentes a la vancomicina en pacientes del HUC en el periodo 2001-2009.	91
IV.7. Estudio de un brote por <i>EfmvanA</i> en el 2005 en la planta de Nefrología del HUC.	96
IV. 8. Tipificación molecular de los ERV aislados en el HUC.	99
IV. 9. Sensibilidad antibiótica de todos los aislados de ERV (2001-2009).	103

IV.10. Resultados de los estudios de vigilancia activa de ERV realizados durante los años 2007 y 2009.....	106
V. DISCUSIÓN.....	108
V. 1. Infecciones por <i>Enterococcus</i> spp. en el HUC durante el periodo 2001–2009 y Densidad de Incidencia de infecciones por <i>Enterococcus</i> spp. en el HUC durante el periodo (2001-2009).	109
V. 2. Infecciones por <i>Enterococcus</i> spp. por especie y localización clínica en el HUC en el periodo (2001-2009).	111
V. 3. Bacteriemias por enterococos relacionadas con la asistencia sanitaria.	111
V.3.1. Bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria según especies de enterococos en el HUC durante el periodo 2001-2009.	111
V.3.2. Densidad de Incidencia de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria por <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i>	112
V.4. Bacteriemias recogidas en el EARSS en el HUC durante el periodo 2001-2009.	113
V.5. Importancia de las bacteriemias por enterococos en relación al total de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria en el HUC en el periodo de estudio 2001-2009.	114
V.6. Resistencia a la ampicilina, linezolid y de alto nivel a la gentamicina de las bacteriemias por <i>E. faecalis</i> y <i>E. faecium</i> en el HUC en los años 2008 y 2009.....	114
V.7. Resistencia a la ampicilina de los aislamientos por <i>E. faecium</i> en el HUC.	115
V.8. <i>Enterococcus</i> spp. resistentes a la vancomicina en pacientes del HUC en el periodo 2001-2009.....	115
V.9. Estudio de un brote por EfmvanA en el 2005 en la planta de Nefrología del HUC y tipificación molecular de los ERV aislados en el HUC.....	119
V. 10. Sensibilidad antibiótica de todos los aislados de ERV (2001-2009).....	121
V.11. Estudios de vigilancia epidemiológica de ERV llevados a cabo en el HUC en los años 2007 y 2009.	122
VI. CONCLUSIONES.....	123
VII. BIBLIOGRAFÍA	127

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria constituyen, uno de los problemas más importantes de Seguridad de los pacientes en los hospitales, habiendo además trascendido a otras instituciones especialmente centros de mayores así como a la propia comunidad.

Dentro de las infecciones tienen especial importancia las producidas por bacterias multiresistentes a los antibióticos, destacando especialmente las producidas por *Staphylococcus aureus* meticilin resistentes (SARM), *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenemes, *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* portadoras de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEE) y enterococos resistentes a la vancomicina (ERV).

En nuestro hospital han destacado las infecciones producidas por SARM lo que nos llevó a la implantación en el año 2008 de un Sistema de Vigilancia Activa que ha demostrado una gran efectividad y eficiencia.

Acinetobacter baumannii, a diferencia de muchos hospitales dentro y fuera de España, ha tenido una baja incidencia, si bien en los últimos años empieza a incrementarse.

Tampoco constituyen un problema importante las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistentes ni por *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* portadoras de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEE).

En EE.UU. y en algunos países de Europa los ERV particularmente *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina (EfmRV) constituyen un grave problema que ha llevado incluso a la implantación obligatoria en algunos Estados Americanos de un Sistema de Vigilancia Activa.

En nuestro estudio pretendemos precisar cual es la situación en el Hospital Universitario de Canarias de las infecciones asociadas a ERV y su evolución a lo largo de la década pasada (2001-2009). Así como conocer su epidemiología incluyendo la aplicación de marcadores moleculares.

II. REVISIÓN Y ANTECEDENTES

El término “enterococcus” deriva de la palabra griega “enteron” que significa “intestino” y “KoKKos” que significa “baya o pepita”. Los enterococos son cocos grampositivos difíciles de distinguir morfológicamente de los verdaderos estreptococos y hasta hace muy poco eran clasificados como estreptococos. En 1930 en el esquema de clasificación de Lancefield los enterococos estaban incluidos entre los estreptococos del grupo D, que incluían tanto especies de enterococos como de no enterococos. Sin embargo en 1984 se demostró que los enterococos diferían lo suficiente de los estreptococos como para ser clasificados dentro de su propio género *Enterococcus*⁽¹⁾. Un análisis filogenético de género de cocos gram positivos, catalasa negativos, basado en la comparación de secuencias del gen 16SrRNA reveló que el género *Enterococcus* estaba más relacionado con los géneros *Vagococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* que con los *Streptococcus* y *Lactococcus* con los que habían sido asociados fenotípicamente^{(2),(3)}.

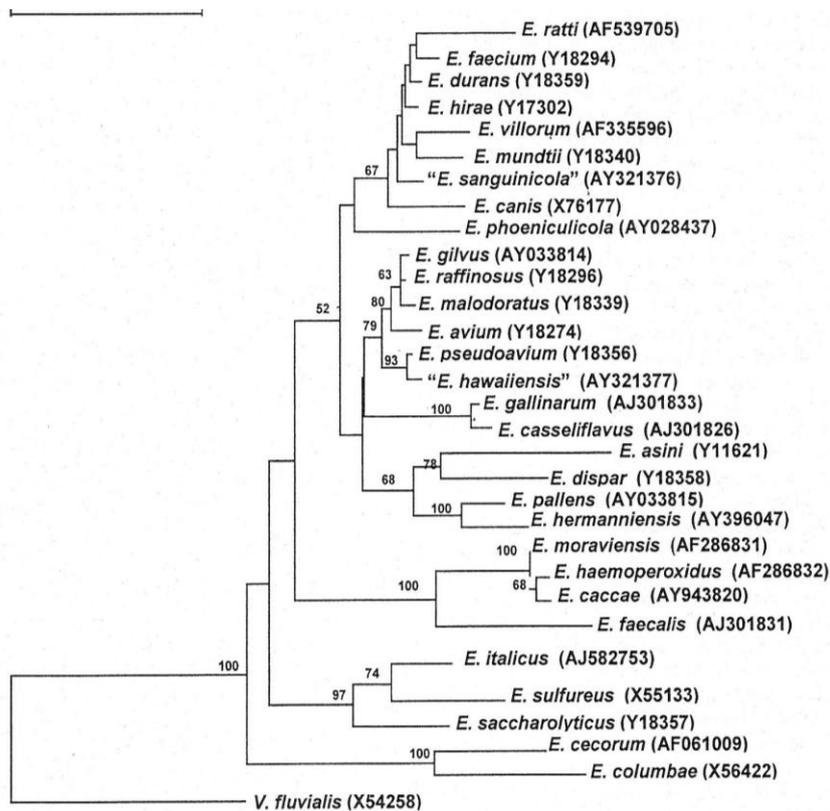


Figura 1. Árbol filogenético de especies del género *Enterococcus*, basado en la comparación de secuencias del gen 16SrRNA⁽⁴⁾.

El género *Enterococcus* contiene al menos 28 especies. Dos de ellas son responsables de la mayoría de las infecciones en humanos, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), que ha sido el más predominante, constituyendo entre el 80 y el 90% de los aislamientos clínicos y *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) representando entre el 5 y 10 %. Otras especies de enterococos son aisladas en muestras clínicas con menos frecuencia: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. caccae*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. mundtii*, *E. gilvus*, *E. hawaiiensis*, *E. hirae*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. pseudoavium* y *E. sanguinicola*. No se ha documentado el aislamiento de otras especies de enterococos en muestras clínicas ⁽⁴⁾.

Los enterococos son anaerobios facultativos capaces de crecer bajo condiciones extremas. De este modo son capaces de crecer en un rango de temperaturas entre 10 a 45° C, a un pH 9.6 y en soluciones de NaCl al 6,5%. Muchos de ellos son capaces de sobrevivir 30 minutos a 60°C y crecer en presencia de sales biliares al 40%. Los enterococos hidrolizan la esculina y L-pirrolinonil-B-naftil-amida (PYR).

Los enterococos se encuentran en una notable diversidad de ambientes, de este modo pueden ser hallados en abono, comida, agua y una gran variedad de animales vivos. El hábitat más importante de estos microorganismos parece ser el tracto gastrointestinal, concretamente el intestino grueso de los seres humanos y de otros animales, componen una porción significativa de la flora intestinal normal encontrándose *E. faecalis* con más frecuencia en las heces de seres humanos, aunque *E. faecium* es aislado también de forma habitual. Un pequeño número de enterococos se aísla de manera ocasional en las secreciones orofaríngeas y vaginales, en la piel, y sobre todo en el área perineal ⁽⁵⁾.

En el ámbito hospitalario, los enterococos, constituyen una de las causas más importantes de endocarditis, bacteriemia, infección urinaria e infecciones de localización quirúrgica. Se han convertido en la segunda causa más común de microorganismos aislados en infecciones del tracto urinario e infecciones de localización quirúrgica y la tercera causa más común de bacteriemias nosocomiales. A mitad de 1970 los enterococos comenzaron a ser reconocidos como causa común de infección nosocomial. Esto coincide con un aumento de la resistencia de los enterococos a las cefalosporinas de tercera generación. Una de las mayores razones por las que estos

microorganismos han sobrevivido en el ambiente hospitalario es su resistencia intrínseca a varios antibióticos comúnmente utilizados y quizás más importante, su habilidad de adquirir resistencia a antibióticos sea por mutación o por recibir material genético ajeno a través de transferencia de plásmidos y transposones ^{(5),(6)}.

II. 1. Aspectos históricos de la resistencia de los enterococos frente a la vancomicina.

En la década de los años 50 debido a las pocas opciones terapéuticas para tratar a los estafilococos resistentes a la penicilina, la compañía farmacéutica Eli Lilly comenzó un estudio cuyo objetivo era encontrar un antibiótico con actividad frente a esos patógenos. Fue en 1952 cuando un misionero en Borneo envió una muestra de tierra a la compañía Lilly donde se aisló el microorganismo *Streptomyces orientalis* que producía una sustancia llamada “componente 05865”, la cual presentaba actividad frente a los estafilococos resistentes a la penicilina. Observaron que algunos microorganismos anaerobios, incluyendo el género *Clostridium*, también eran sensibles a aquel componente. Tras varios pasos de purificación, el “componente 05865” pasó a llamarse Vancomicina (de la palabra “vanquish” que significa vencer). Una vez demostrada la eficacia clínica de la vancomicina, fue aprobada en 1958 en los Estados Unidos (EE.UU.) el mismo año en que se aprobó la meticilina y poco después las cefalosporinas. Como la vancomicina presentaba importantes reacciones adversas se reservó para pacientes alérgicos a los β -lactámicos o para pacientes infectados con microorganismos resistentes a nuevos antibióticos⁽⁷⁾.

En 1988, Uttley y colaboradores fueron los primeros en informar el aislamiento de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a la vancomicina en Inglaterra. Estudiaron un brote principalmente entre pacientes con insuficiencia renal, habiendo sido muchos de ellos tratados, antes del brote, con vancomicina o cefalosporinas⁽⁸⁾. Poco después fueron informados otros enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) por investigadores de Francia y cepas similares fueron detectadas en hospitales al este de los EE.UU. Como consecuencia, los ERV se propagaron rápidamente y ahora se pueden encontrar por hospitales a nivel mundial⁽⁶⁾.

En EE.UU. en la década de los 80 con la identificación de *Clostridium difficile* como causante de diarrea y el aumento de la prevalencia de *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa-negativa resistentes a la meticilina, se incrementó el uso de la vancomicina drásticamente, contribuyendo probablemente a la aparición de ERV⁽⁹⁾.

En 1989 se informó el primer enterococo con alta resistencia a la vancomicina en EE.UU., no está muy claro como se introdujo el primer ERV en sus hospitales, lo que sí se sabe es que apenas existía documentación sobre la colonización extrahospitalaria, al contrario que en Europa, dónde sí existía información sobre la colonización entre pacientes extrahospitalarios. La avoparcina, un glicopéptido usado durante años en muchos países de Europa como promotor del crecimiento en la alimentación de los animales, fue un importante factor asociado con la aparición de ERV en la comunidad⁽¹⁰⁾.

Las dificultades terapéuticas presentadas por los enterococos fueron reconocidas a principios de 1950 cuando al usar únicamente la penicilina como tratamiento en las endocarditis por enterococos, la respuesta era mucho menor que en endocarditis por estreptococos. Puesto que la mayoría de los enterococos son tolerantes a la actividad bactericida de los β -lactámicos y glicopéptidos, se hizo necesaria la sinergia bactericida entre antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos o glicopéptidos y aminoglucósidos para el tratamiento de las infecciones más graves por enterococos tales como endocarditis y meningitis. El tratamiento con estas combinaciones de antibióticos suelen durar mucho tiempo y la toxicidad es alta. La resistencia a los aminoglucósidos entre los enterococos está aumentando, en algunos centros muestran esta resistencia en más del 50% de los aislados y como consecuencia se está perdiendo la sinergia anteriormente comentada, constituyendo un grave problema. También, muchos *E. faecium* aislados son altamente resistentes a la penicilina porque sus proteínas de unión a la penicilina (PBP), presentan baja afinidad por éstas⁽⁶⁾.

Quizás lo más preocupante de los ERV es su capacidad de transmitir esa resistencia a otros patógenos, en particular al *Staphylococcus aureus*, ya que poseen varios sistemas de transmisión, como plásmidos y transposones. El primer estafilococo con sensibilidad disminuida a la vancomicina fue informado en Japón en 1997 y más tarde aparecieron en los EE.UU ⁽⁷⁾.

II. 2. Mecanismos de resistencia antibiótica

Los enterococos presentan dos tipos de resistencia antibiótica, intrínseca y adquirida. La intrínseca está presente en la mayoría de las cepas de enterococos y reside en el cromosoma. La adquirida se debe o a una mutación genética o a la adquisición de nuevo material genético. Los enterococos presentan resistencia intrínseca frente a cefalosporinas, bajas concentraciones de aminoglucósidos y lincosamidas y frente a trimetoprim-sulfametoxazol. Presentan resistencia adquirida frente a β -lactámicos (PBP alteradas), penicilina y ampicilina (β -lactamasa), cloranfenicol, macrólidos, tetraciclina, estreptograminas, vancomicina, linezolid, rifampicina, quinupristin-dalfopristin, altas concentraciones de lincosamidas y de aminoglucósidos, y recientemente a las quinolonas⁽⁵⁾.

II.2.1. Resistencia a β -lactámicos

Todos los enterococos muestran una resistencia relativa a la penicilina, ampicilina y otros β -lactámicos, como las cefalosporinas, causada por una reducción de la afinidad de las proteínas de unión a la penicilina de bajo peso molecular (en especial las PBP5)⁵. Mientras que la mayoría de los aislamientos de *E. faecalis* son inhibidos por concentraciones entre 1 y 8 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina o ampicilina, el *E. faecium* requiere de 16 a 64 $\mu\text{g/ml}$ para inhibir el crecimiento⁶. En general, las cefalosporinas, y especialmente las cefamicinas, son menos activas frente a los enterococos que las penicilinas, y ninguna de las cefalosporinas disponibles en la actualidad posee una actividad clínicamente útil frente a los enterococos. Aunque se han producido pocos cambios en la resistencia de *E. faecalis* a las penicilinas, ha aumentado espectacularmente la resistencia a las penicilinas en el caso de *E. faecium*⁽⁵⁾.

II.2.2. Resistencia los Aminoglucósidos

Recientes estudios demostraron que los enterococos presentaban 2 tipos de resistencia a la estreptomicina: 1) resistencia de bajo nivel (CMI 62 a 500 $\mu\text{g/ml}$) debido

a una baja permeabilidad, la cual aumenta cuando se añade una penicilina ya que ésta permite la captación celular del aminoglucósido; 2) resistencia de alto nivel (CMI ≥ 2000 $\mu\text{g/ml}$), la cual es mediada ribosómicamente debido a la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos. Ya que la resistencia frente a la gentamicina y estreptomicina ocurren por diferentes mecanismos, es importante testar la sensibilidad a ambos agentes⁽⁵⁾. La producción de enzimas modificadoras de los aminoglucósidos es el mecanismo más importante de la resistencia de alto nivel. Cada enzima puede conferir resistencia de alto nivel para más de un aminoglucósido y una única cepa de enterococos puede adquirir varios enzimas. Aunque la mayoría de los enzimas son mediados por plásmidos, *E. faecium* difiere de los otros enterococos en que su producción de enzimas está mediada cromosómicamente⁽¹¹⁾. La resistencia a la gentamicina es debida a la presencia de la enzima 6-acetiltransferasa-2-fosfotransferasa, confirmando resistencia a la tobramicina, netilmicina, amikacina y kanamicina. Por lo tanto, la resistencia a la gentamicina es un buen presagio de resistencia a otros aminoglucósidos excepto a la estreptomicina. La resistencia a la estreptomicina se debe a la producción por parte de los enterococos del enzima adeniltransferasa no dejando de ser estas cepas de enterococos sensibles a la gentamicina. No existe sinergia entre penicilina y aminoglucósidos cuando la cepa presenta resistencia de alto nivel a los aminoglucósidos (estreptomicina CMI $\geq 2000\mu\text{g/ml}$; gentamicina CMI, ≥ 500 $\mu\text{g/ml}$)^{(5),(6)}.

II.2.3. Resistencia a los glucopéptidos

El mecanismo de acción de los antibióticos glucopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina se basa fundamentalmente en su unión al dipéptido terminal D-alanina-D-alanina del precursor del peptidoglucano, inhibiendo la síntesis de la pared celular. Existen 7 diferentes fenotipos de resistencia a los glucopéptidos en los enterococos, denominados VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG y Van L. Todos fenotipos de resistencia adquirida a excepción de VanC que es intrínseca de *E. casseliflavus* y *E. gallinarum* (ver tabla 1).

Tabla 1. Mecanismos de resistencia a la vancomicina en los enterococos ⁽¹²⁾

phenotype	Acquired resistance						Intrinsic resistance
	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanC
ligase gene	<i>vanA</i>	<i>vanB</i> ²	<i>vanD</i> ²	<i>vanE</i>	<i>vanG</i> ²	<i>vanL</i>	<i>vanC</i>
MIC _{vancomycin} in mg/L	16 - 1000	4 - 32 (-1000)	64 - 128	8 - 32	16	8	2 - 32
MIC _{teicoplanin} in mg/L	(4-) 16 - 512	0,5 - 1	4 - 64	0,5	0,5	S	0,5 - 1
expression	inducible	inducible	constitutive	inducible	inducible	inducible	constitutive/ inducible
localisation	plasmid/ chromosome	plasmid/ chromosome	chromosome	chromosome	chromosome	chromosome?	chromosome
transferable by conjugation	+/-	+/-	-	-	+	-	-
distribution among enterococcal species	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> ¹ <i>E. casseliflavus</i> ¹ <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i> ¹	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. gallinarum</i> : <i>vanC1</i> <i>E. casseliflavus</i> : <i>vanC2/3</i>

¹ acquisition of *vanA* or *vanB* cluster in addition to *vanC1* or *vanC2/3* genes - rare event

² subtypes exist (*vanB1-3*, *vanD1-5*, *vanG1-2*); S, susceptible to teicoplanin (no value given in the corresponding paper)

Los fenotipos VanA y VanB son los más relevantes clínicamente, son mediados por un grupo de genes de reciente adquisición no encontrados antes en los enterococos y fueron descritos en primer lugar en *E. faecalis* y *E. faecium*, aunque hoy en día se han descrito en *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus* y *E. hirae*⁽¹³⁾.

El fenotipo de resistencia **VanA** se caracteriza por presentar resistencia inducible de alto nivel tanto a la vancomicina (CMI= 64-1000µg/ml) como a la teicoplanina (CMI= 4-512 µg/ml). La resistencia puede ser inducida por glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina, avoparcina y ristocetina) y por agentes no glucopéptidos tales como la bacitracina, polimixina B y robenidina, una droga usada en el tratamiento de infecciones por coccidios en aves de corral. Los detalles de la resistencia a la vancomicina han sido más estudiados en el complejo de genes *vanA* encontrados en el transposón *Tn1546* o *Tn5482*. El *Tn1546* se encuentra generalmente en plásmidos transferibles, lo cual explica la habilidad de los enterococos para transferir el complejo *vanA* a otras especies incluyendo estafilococos como el *Staphylococcus aureus* aunque,

ocasionalmente, puede encontrarse en el cromosoma. El mecanismo de resistencia a glucopéptidos es complejo, interviniendo en él siete genes diferentes localizados en el *Tn1546* o *Tn5482*: *vanA*, *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, *vanY* y *vanZ*. El gen principal para la resistencia es *vanA*, que codifica una proteína D-Ala ligasa que cataliza la adición de D-lactato a D-alanina para formar el dipéptido D-alanina-D-lactato. Este metabolito, que presenta baja afinidad por los glucopéptidos, sustituirá a la D-alanina-D-alanina (diana de los glucopéptidos) en el peptidoglicano. Para que se produzca la resistencia a los glucopéptidos son necesarias, además, al menos dos proteínas adicionales: VanH y VanX. VanX es una dipeptidasa que hidroliza el dipéptido D-alanina-D-alanina impidiendo, por tanto, su incorporación al peptidoglicano. Por otro lado, VanR y VanS constituyen un sistema regulador de dos componentes que regula la expresión de *vanA*, *vanH* y *vanX*. Tanto la vancomicina como la teicoplanina son capaces de activar este sistema de regulación, induciendo la expresión del mecanismo de resistencia. Finalmente, VanY y VanZ, son proteínas secundarias no esenciales para la resistencia; la primera es una carboxipeptidasa que elimina los residuos de D-alanina terminales que se hayan incorporado ya en el peptidoglucano y la segunda incrementa ligeramente las CMI's de teicoplanina específicamente, por un mecanismo aún desconocido^{6, 12, 13}.

El fenotipo **VanB** se caracteriza por resistencia inducible de moderado o alto nivel a la vancomicina (CMI= 4-1000 µg/ml) pero sensible a la teicoplanina (CMI=0,5-1µg/ml). Los elementos genéticos responsables de este fenotipo son similares al complejo de genes de *vanA* con seis genes de resistencia: *vanB*, *vanX_b*, *vanH_b*, *vanY_b*, *vanR_b*, *vanS_b* y *vanW*. Los primeros seis genes son similares a sus homólogos en el complejo *vanA* participando en la producción del precursor D-alanina-D-lactato terminal en la pared del peptidoglucano. La función de la proteína VanW es desconocida. Estos genes se sitúan en elementos similares al transposón *Tn1546*, aunque, al contrario de lo que ocurre con el fenotipo VanA, su localización puede ser cromosómica o plasmídica^{(5), (13), (14)}. Se han documentado tres subtipos: *vanB1*, *vanB2* y *vanB3*, basados en la variabilidad genética del gen *vanB*^{(13), (15)}. Los subtipos *vanB1* y *vanB2*, han sido encontrados en cepas de enterococos aislados en diferentes países de Europa y en EE.UU., sin embargo el subtipo *vanB3* se ha detectado sólo en EE.UU. Díaz y cols. aislaron el primer *Enterococcus faecium vanB* (*EfmvanB*) en España, al analizar su secuencia, resultó pertenecer al subtipo *vanB2*⁽¹⁶⁾.

El fenotipo **VanC** se caracteriza por resistencia de bajo nivel a la vancomicina (CMI =2 a 32µg/ml) pero sensible a la teicoplanina (CMI=0,5-1µg/ml). Este fenotipo, de localización siempre cromosómica, no transferible, es característico de algunas especies de enterococo raramente encontradas en muestras clínicas: *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* y *E. flavescens*. El complejo contiene 5 genes: *vanC*, *vanXY*, *vanT*, *vanR* y *vanS*. A diferencia de lo que ocurría en los fenotipos VanA y VanB, la proteína VanC sintetiza el dipéptido D-alanina-D-serina en vez de D-alanina-D-lactato^{(6),(14)}. Se han descrito tres genes *vanC*: *vanC-1* en *E. gallinarum*, *vanC-2* en *E. casseliflavus* y *vanC-3* en *E. flavescens*¹².

También se han descritos los fenotipos **VanD**, **VanE** y **VanG**. Los tres se deben a determinantes genéticos distintos de los clásicos VanA, B, o C, están localizados en el cromosoma y aparentemente son de naturaleza no transferible. De momento, ninguno de ellos parece estar ampliamente diseminado como los fenotipos VanA o VanB, ya que únicamente se han encontrado en unas pocas cepas, de forma muy localizada. El fenotipo VanD se ha encontrado en *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. raffinosus*, con resistencia a la vancomicina (CMI= 64-128 µg/ml) como a la teicoplanina (CMI= 4-64 µg/ml). El VanD se localiza en el cromosoma y no es transferible a otros enterococos. El VanE se ha descrito en *E. faecalis* presentando resistencia de bajo nivel frente a la vancomicina (CMI= 8-32 µg/ml) y sensible frente a la teicoplanina (CMI ≤ 0,5 µg/ml). El complejo de VanG ha sido descrito en *E. faecalis* el cual presenta resistencia de bajo nivel frente a la vancomicina (CMI=16) y sensibilidad frente a la teicoplanina (CMI ≤ 0,5)^{(6),(13),(14)}.

Se ha descubierto un nuevo fenotipo: **VanL**, el cual se ha encontrado en asilamientos de *E. faecalis* con CMI de 8 µg/ml para la vancomicina y CMI de 0,5 µg/ml para la teicoplanina, no transferible.

Un fenómeno importante que desarrollan algunas cepas de ERV con fenotipo VanA y VanB es la dependencia de vancomicina. Estos enterococos no son sólo resistentes a la vancomicina sino que además requieren de su presencia para su crecimiento. Han sido aislados in vitro, en modelos animales y de pacientes tratados durante largos periodos de tiempo con vancomicina^{(13),(17)}. Estas cepas han sufrido mutaciones en el gen de la ligasa que codifica el dipeptido D-alanina-D-alanina diana principal de la vancomicina, por tanto pueden crecer en su presencia y además la

vancomicina es necesaria para inducir la codificación de la D-alanina-D-lactato ligasa por parte de los genes *vanA* y *vanB*. Han sido recuperados de medios para aislamiento de *Campylobacter* o *Neisseria gonorrhoeae* los cuales llevan en su composición vancomicina^{(6),(13)}.

II.2.4. Los criterios del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y del EUCAST (European Comité on Antimicrobial Susceptibility Testing):

Los puntos de corte que determinan la sensibilidad o la resistencia a la vancomicina difieren según los criterios americanos o europeos.

Los criterios definidos por el **CLSI** americano, en el año 2010 son:

Vancomicina	Método	S	I	R
	Difusión con disco de 30µg (mm)	≥17	15-16	≤14
	CMI (µg/ml)	≤4	8-16	≥32

Teicoplanina	Método	S	I	R
	Difusión con disco de 30µg (mm)	≥14	11-13	≤10
	CMI (µg/ml)	≤8	16	≥32

Sin embargo, los puntos de corte que determinan la sensibilidad o la resistencia a la vancomicina definidos por el **EUCAST** en Europa en el año 2010 son:

Vancomicina	Método	S	R
	Difusión con disco de 5µg (mm)	≥12	<12
	CMI (µg/ml)	≤ 4	> 4

Teicoplanina	Método	S	R
	Difusión con disco de 30µg (mm)	≥16	<16
	CMI (µg/ml)	≤ 2	>2

II.3. Epidemiología de los enterococos resistentes a la vancomicina.

Aunque el origen exacto y los factores asociados con la emergencia de ERV no están del todo aclarados, sí se ha demostrado una compleja interrelación entre el medioambiente, reservorios de la bacteria, el uso de antibióticos tanto en animales como en humanos y la rapidez con que se diseminan dentro de los hospitales. El origen del complejo del gen *van* aún no está aclarado. Es interesante saber que microorganismos como *Streptomyces toyocanensis* y *Amycolatopsis orientalis* tienen genes similares a los genes *van*. Genes homólogos han sido detectados en el biopesticida *Bacillus popilliae* y en la bacteria fecal anaerobia *Eggerthella lenta* y *Clostridium innoculum*, lo cual sugiere que otra flora colonizante puede ser fuente de genes *van* homólogos. Aunque no se conoce la fuente ancestral del complejo del gen *van*, sí se sabe que los genes *van* se han extendido más allá del género *Enterococcus*⁽¹⁴⁾. Se ha aislado un *Streptococcus bovis* que contenía el gen *vanB* a partir de una muestra fecal⁽¹⁸⁾. El gen *vanA* también ha sido aislado en el género *Corynebacterium*, *Archanobacterium* y especies de *Lactococcus* incrementando la posibilidad de que la resistencia de alto nivel a la vancomicina se disemine a otros organismos gram positivos.

La epidemiología sobre las fuentes y reservorios de los ERV muestran una interesante dicotomía entre los EE.UU. y Europa. En EE.UU. la colonización entre personas no hospitalizadas ha sido poco documentada, al contrario que en Europa. El amplio uso de glucopéptidos tales como la avoparcina como promotores del crecimiento en la dieta de animales hizo que los ERV colonizaran el tracto gastrointestinal de muchos animales como pollos, aves de corral y cerdos. Una vez que en 1997 se prohibió el uso de la avoparcina, en Europa disminuyeron notablemente los casos de ERV hospitalarios y la colonización por ERV en los animales de granja^{(14),(10)}. Willems y cols. realizaron un análisis de una larga serie de ERV (con resistencia VanA) procedentes de animales, personas sanas y pacientes hospitalizados, comprobando que existía relación entre los aislados de los diferentes hospedadores. Para ello utilizaron la técnica Amplified fragment length polymorphism (AFLP) para realizar el genotipado, agrupando a los aislados en los siguientes genogrupos: A, B, C y D. Demostraron como los genogrupos A, B y D se encuentran en animales y personas sanas y el genogrupo C lo presentaban los pacientes hospitalizados. Estos hallazgos contradicen la relación

directa entre los enterococos del reservorio animal y aquellos causantes de brotes e infecciones hospitalarias⁽¹⁹⁾.

En contraste con Europa, los ERV en EE.UU. son resistentes a muchos antibióticos y poco variables genéticamente. Los enterococos procedentes de humanos en Europa suelen ser sensibles a muchos antibióticos y altamente policlonales. Los aislamientos clínicos tienen el mismo perfil de sensibilidad antibiótica que los ERV aislados de animales.

En los EE.UU. nunca se estableció una relación con las fuentes animales. Se han realizado diversos estudios con distintas fuentes animales y no se ha detectado ni el gen *vanA* ni el *vanB*. La avoparcina no ha sido utilizada en la industria ganadera de EE.UU. y esa podría ser una explicación a este hallazgo. A pesar de la escasa documentación sobre reservorios ambientales, los ERV son verdaderos patógenos nosocomiales en los EE.UU.^{(14),(10)}.

Existe la hipótesis de que los genes de la resistencia a la vancomicina se originaron en microorganismos productores de glicopéptidos como un mecanismo de defensa. Más tarde estos genes se diseminaron horizontalmente hasta llegar a los enterococos. Los ERV fueron seleccionados por la presión antibiótica. Esto dió lugar a un importante número de reservorios, animales y humanos sanos, de ERV en Europa, pero estos genogrupos no se diseminaban a gran escala dentro de los hospitales. Sin embargo en EE.UU. estos genes de resistencia entraron a formar parte de un genogrupo que ya era resistente a casi todos los antibióticos, y por tanto los ERV eran más sensibles al efecto selectivo de los antibióticos⁽²⁰⁾.

II.3.1. Descripción de la situación epidemiológica en los Estados Unidos

La emergencia de los ERV en los Estados Unidos está muy bien descrita en los datos aportados por el National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) de los Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Desde 1989 hasta 1993, en el NNIS se informó de un incremento en el porcentaje de las infecciones nosocomiales por ERV del 0.3% al 7.9% debido principalmente a un aumento de infecciones por ERV en las UCIs del **0.4%** al 13.6%⁽²¹⁾. En 1999 el porcentaje de ERV aumentó hasta un **25,2%** (1579 aislados de enterococos) en las UCIs lo que supone un incremento del 43% con respecto a la media de las tasas de resistencia entre los años 1989-1998. En 2000 el porcentaje de ERV fue de **26.3%** (2575 enterococos aislados) en las UCIs, lo que supone un incremento del 31% con respecto a la media de los porcentajes de resistencia entre los años 1995-1999⁽²²⁾. En 2003 (de los 2048 enterococos aislados), el porcentaje de resistencia frente a la vancomicina fue de un **28,5%** lo que supuso un incremento de un 12% con respecto a los 5 años previos desde 1998 a 2002⁽²³⁾.

Al principio los brotes que se informaban implicaban a pocos pacientes y eran controlados con la aplicación de medidas de control⁽²⁴⁾, sin embargo cada vez eran más los pacientes colonizados con ERV y en 1995 la situación se describió como endémica^{(25),(26)}. La colonización fue más frecuente en enfermos críticos y pacientes inmunocomprometidos tratados en servicios clínicos dónde el uso de antibióticos era muy alto siendo la transmisión cruzada importante en la diseminación hospitalaria de la bacteria, sugiriendo serios fallos en la aplicación de las medidas de control^{(26),(27)}. Varios estudios demostraron que la diseminación de los ERV en los hospitales fue influenciada por varios factores como la colonización de los pacientes por ERV, la contaminación ambiental y la presión antibiótica. En los Estados Unidos la emergencia de los ERV ha estado muy ligada al amplio uso de la vancomicina, lo cual no ocurría en Europa⁽²⁰⁾. Un estudio realizado por Kirst H. A. y cols. compararon el uso de vancomicina oral y parenteral entre EE.UU. y cinco países europeos, resultando ser de cinco a diez veces mayor el uso en EE.UU.⁽²⁸⁾. En cuanto a la comunidad, en Estados Unidos hay poca evidencia que sugiera la transmisión de ERV.

II.3.2. Descripción de la situación epidemiológica en Europa

El primer ERV aislado de origen no hospitalario informado en Europa fue un *E. faecium* en 1993 de muestras de aguas residuales en áreas urbanas de Inglaterra y pequeñas ciudades de Alemania. Los siguientes años se realizaron varios estudios que sugirieron una posible relación entre la recuperación de estos microorganismos y el uso de la avoparcina. Esta asociación fue confirmada por estudios epidemiológicos de Dinamarca, Noruega y Holanda ⁽¹⁰⁾.

La relación entre la colonización por ERV entre animales destinados al consumo humano y la colonización por ERV en humanos fue sugerido por Bates y cols. los cuales recuperaron ERV con idénticos ribotipos en restos de pollo y humanos ⁽²⁹⁾. En Europa, varios estudios demostraron la existencia de ERV en personas no relacionadas con los cuidados sanitarios ^{(30),(31)}.

Según datos del EARSS en 2007 se informaron menos aislamientos invasivos de *E. faecium* (n=4.561) por parte de los países participantes. De los 31 países participantes, 7 informaron menos de 20 aislados y 11 más de 20. En 2007 informaron con más del 25% de ERV aislados los siguientes países: Grecia (37%, n=388), Irlanda 83%, n=323) y Portugal (29%, n=158). Desde el 2001 al 2007 los ERV se han incrementado en 6 países: Alemania, Grecia, Irlanda, Israel, Eslovenia y Turkía. En Eslovenia no se informó ERV hasta el 2005. Se observa una disminución en los ERV en Croacia, Portugal y en Inglaterra. Portugal ha experimentado una continua disminución desde un 47% (n=103) en 2003, a un 29% (n=158) en 2007. En Italia aumentó el número de ERV aislados desde un 15% (n=80) en 2001 a un máximo de 24% (n=166) en 2003 para luego disminuir a un 11% (n=254). Una situación similar a Italia ocurrió en Israel ⁽³²⁾.

Los genotipos de resistencia más prevalentes en Europa son el *vanA* y *vanB*. El principal reservorio para adquirir la resistencia a la vancomicina en el hombre es el *E. faecium*. El incremento de las tasas de ERV en varios países de Europa es debido a un aumento de la prevalencia de *E. faecium* resistente a la vancomicina (*EfmRV*). Los *E. faecalis* resistentes a la ampicilina (*EfcRA*) y vancomicina (*EfcRV*) son raros ⁽¹²⁾.

Es curioso observar como entre distintos países de Europa teniendo similares orígenes, la prevalencia de ERV es diferente. Durante la mitad de la década de los 90 determinados clones fueron prevalentes en muchos países de Europa coincidiendo con un aumento de la prevalencia de *E. faecium* entre animales de cría y sus cuidadores, los cuales usaban la avoparcina como promotor del crecimiento^{(20),(33)}. En muchos países las tasas de ERV de aislamientos clínicos aumentó alcanzando su pico máximo 10 años más tarde cuando la resistencia a los glicopéptidos había disminuido en los reservorios no hospitalarios⁽³³⁾. Los brotes de ERV en un mismo centro son policlonales, sugiriendo una alta diversidad de cepas de *E. faecium* adquiridas en los hospitales y una alta movilidad de los determinantes genéticos⁽³⁴⁾.

Algunos sistemas de vigilancia europeos recogen datos de resistencia a la vancomicina en enterococos aunque en algunos países ya es obligatorio, en otros países los datos son muy limitados y no permiten un análisis estadístico de la población e incluso en algunos países no hay datos. Uno de los sistemas europeos de recogida de datos de resistencia antibiótica es el European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) (<http://www.rivm.nl/earss/>) que fue establecido en 1998 por la Comisión Europea. El EARSS recoge datos de resistencia antibiótica para determinadas bacterias (*S. aureus*, *Escherichia coli*, *E. faecalis* y *E. faecium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*) en infecciones invasivas. En 2006 alrededor de 800 laboratorios pertenecientes a más de 1300 hospitales de 31 países proporcionaron datos de más de 500.000 aislamientos invasivos. Sin embargo, el EARSS tiene sus limitaciones pues los laboratorios utilizan diferentes guías para la interpretación de los datos (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, British Society for Antimicrobial Chemotherapy –BSAC, etc) y utilizan diferentes métodos para determinar la sensibilidad antibiótica (Concentración Mínima Inhibitoria o determinación de CMI; difusión en disco, etc)⁽¹²⁾.

Norte de Europa

Los países nórdicos se caracterizan por la baja prevalencia en resistencias antibióticas y de ERV. Desde la mitad de la década de los 90, Noruega, Dinamarca e Islandia habían registrado casos esporádicos y pequeños brotes de infección o

colonización por ERV, a menudo entre pacientes transferidos desde otros hospitales con alta prevalencia de ERV de Europa o de los Estados Unidos⁽³⁵⁾. En Dinamarca y Noruega se informaron numerosos reservorios animales debido al uso de la avoparcina como promotor del crecimiento en los animales domésticos⁽³⁶⁾ aunque estos reservorios animales desaparecieron al prohibirse el uso de la avoparcina en 1996.

En **Helsinki** varios hospitales experimentaron entre 1996 y 1997 varios brotes de ERV en las plantas de Hematología y de Medicina Interna^{(37),(38)}. En los brotes estuvieron involucrados dos clones de *E.faecium* portadores del gen *vanA*, del gen *vanB* o ambos. Se aislaron también varios *E. faecium* sensibles a la vancomicina, los cuales mostraron el mismo perfil de bandas por macrorrestricción en el gel de electroforesis del campo pulsado (PFGE) que las cepas del brote. Por este motivo, los investigadores del brote sugirieron que el origen de este brote se produjo por la incorporación de los genes *vanA* y *vanB* a una cepa de *EfmRA* y sensible a la vancomicina. En Finlandia durante los últimos 10 años la situación ha sido estable con 30 a 60 casos de infecciones o colonizaciones de ERV por año⁽³⁹⁾.

En **Suecia**, la situación se ha mantenido estable con 18 a 53 casos de infecciones y colonizaciones por ERV por año entre 2000 y 2007, con una prevalencia de ERV en aislamientos invasivos por debajo del 0.5% hasta 2006^{(39),(40)}; pero esta situación cambia en agosto 2007 con la transmisión de un clon de *EfmvanB* y de otras cepas entre más de 200 pacientes en Estocolmo convirtiéndose en un patógeno endémico en algunas partes del país.

En cuanto a las medidas de prevención de este microorganismo en los países nórdicos, **Finlandia** estableció unas guías nacionales para ERV en conjunción con el brote de 1996-1997 y en Suecia a los pacientes se les hace un screening para ERV siguiendo las mismas guías que para el SARM. En **Dinamarca, Noruega e Islandia** los ERV no están sujetos a la misma regulación que el SARM⁽¹²⁾.

Inglaterra e Irlanda

No hay un único sistema para medir las infecciones por ERV en Inglaterra. Sin embargo las bacteriemias causadas por ERV están monitorizadas por cuatro programas

de vigilancia con distinto grado y cobertura de participación: el EARSS, el BSAC, el informe anual de bacteriemias por ERV del Departamento de Salud de Inglaterra y la Health Protection Agency (HPA). Según los datos de los cuatro programas la proporción estimada atribuible a los ERV en 2007 osciló entre el 8,5-12,5% para todos los enterococos, 20-25% para *E. faecium* y 1.6-2.5% y el para *E. faecalis*^{(12, 32),(41),(42)}.

Los datos de vigilancia de la HPA y el BSAC muestran cómo la prevalencia de ERV en bacteriemias se ha incrementado en 2001 hasta 2006. El EARSS comenzó a determinar la prevalencia a partir del 2005.

Entre octubre 2006 y septiembre 2007, se informaron 910 bacteriemias por ERV en hospitales ingleses al Departamento de Salud. Pero los ERV no parecen una causa importante de infecciones invasivas ya que son eclipsados por las 4.438 bacteriemias por SARM y los 50.392 casos de *Clostridium difficile* en el mismo periodo.

Irlanda contribuye con el EARSS desde el 2002 con una cobertura excelente de casi el 100%. Las tasas de *E. faecalis* resistentes a la vancomicina se han incrementado ligeramente pero continúan por debajo del 5%⁽¹²⁾.

Europa Central

Austria ha informado datos de resistencia para enterococos al EARSS desde el año 2001, alcanzando en 2006 el 87% de cobertura de la población. Estos datos también se encuentran con más detalle en el National Antibiotic Resistance and Consumption Report (AURES) 2005. La resistencia a la vancomicina, en Austria, es rara. Las tasas de *E. faecalis* y *E. faecium* resistentes a la vancomicina fueron menores al 1% entre 2003 y el 2006 con un ligero incremento hasta el 1,9% en 2007. El aumento de las tasas de *E. faecium* resistentes a la ampicilina desde un 67% en 2001 a un 89% en 2006, sugiere una amplia diseminación de clones de adquisición en hospitales como ocurre en otros países de Europa. AURES también informó de la baja colonización de animales de granja por ERV.

Alemania informa al EARSS desde el año 1999, pero el número de laboratorios participantes cayó notablemente en 2006 (15 laboratorios representando sólo al 2% de la

población) por lo que se hace imprescindible comparar sus datos con los de los distintos programas de vigilancia que existen en el país. Según el EARSS el porcentaje de *E. faecium* resistentes a la vancomicina aumentó desde un 1% en 2001 a un 11% en 2004 para luego disminuir a un 8% en 2006 y aumentar hasta un 15% en 2007. Esta variación en las tasas es motivada por el cambio en el número de laboratorios participantes y no refleja la verdadera tendencia epidemiológica del país. Un aspecto a destacar es el aumento del porcentaje de *EfmRA* llegando a alcanzar cifras por encima del 90% después de 2004. La prevalencia de *EfcRV* se mantiene por debajo del 1%. Uno de los programas de vigilancia más consolidados en Alemania es el Paul Ehrlich Society for Chemotherapy Task Force Susceptibility testing and Resistance, en el que participan 30 laboratorios de Alemania, 3 de Austria y otros 3 de Suiza. En este sistema se informaron tasas de *EfcRV* por debajo del 1% y de un aumento de las tasas de *EfmRV* desde un 2.7% en 2001 a un 13.5% en 2004 y un 11.2% en 2007 confirmando los resultados de otros sistemas de vigilancia⁽¹²⁾.

En **Bélgica**, son 24 los laboratorios que envían datos al EARSS. Bélgica ha presentado en años recientes unas elevadas tasas de SARM, por lo que han establecido programas nacionales de control y campañas para atajar el problema. Según el EARSS las tasas de *EfmRV* se incrementaron desde 2004 a 2005 desde un 0% a un 14% pero luego disminuyeron en 2007 a menos del 1%. Estas fluctuaciones se deben al variado número de laboratorios participantes y a varios brotes producidos en este periodo⁽⁴³⁾.

En **Holanda** los datos de resistencia de varias bacterias, incluyendo los ERV, aislados de muestras de sangre y orina son recogidos en el programa de vigilancia electrónico para laboratorios ISIS. Además cada vez son más los laboratorios que envían sus datos al EARSS con una cobertura estimada de casi el 69% de la población holandesa. A parte de unos pocos brotes hospitalarios de importancia durante el 2000, la prevalencia de ERV en bacteriemias es baja (<1%) a lo largo de los años; esto puede deberse al uso prudente de antibióticos y a la severa política frente a ERV y SARM llevada a cabo en los hospitales holandeses⁽³²⁾. A pesar de las bajas tasas de prevalencia por ERV, en un reciente estudio nacional se demuestra un significativo aumento de *EfmRA* en Holanda⁽⁴⁴⁾. La proporción de *EfmRA* respecto al total de bacteriemias producidas por enterococos aumentó desde un 4% en 1994 a un 20% en 2005⁽⁴⁵⁾. Debido a ésto Holanda ha desarrollado guías con medidas destinadas a la prevención de

la transmisión de microorganismos con elevada resistencia antibiótica incluyendo el *E.faecium*. En estas guías el *E.faecium* es considerado un microorganismo de alta resistencia cuando la cepa es resistente a ambos antibióticos, ampicilina y vancomicina, poniendo en aislamiento al paciente en estos casos⁽⁴⁶⁾.

Francia

Antes de 2005, se informaron de casos esporádicos de ERV o brotes con un número limitado de casos. La incidencia de bacteriemias por *EfmRV* se encuentra por debajo del 5%⁽³²⁾. A pesar del cuadro tranquilizador, en 2005, ocurrió un importante brote en el cual estuvieron implicados cientos de pacientes, esto impulsó a las autoridades francesas a notificar todos los casos de infecciones y colonizaciones por ERV, además de la implantación de estrictas medidas de control de la infección. Los aislamientos debían ser enviados al laboratorio de referencia de enterococos situado en el Centro de Referencia de Resistencia Antimicrobiana de Francia, por lo que se asume que este Centro ha analizado los aislamientos de la mayoría de los brotes ocurridos en Francia desde el año 2005, concluyendo que la tasa de infección es inferior a la de colonización por ERV en este país. La gran mayoría de los aislados contenían genes *vanA* o *vanB* siendo el *EfmvanA* el predominante. El análisis PFGE reveló una diversidad clonal entre los ERV. Cada hospital tiene sus clones específicos aunque en ocasiones se ha observado la transmisión de cepas entre hospitales vecinos los cuales intercambian pacientes. El tipado por MLST y el análisis eBURST mostraron que los clones más predominantes en Francia pertenecían al complejo clonal hospitalario CC17. Las secuencias ST78 y la ST18 son las más frecuentemente aisladas y la presencia de los genes *esp* y *hyl* es variable.

Suiza, al no pertenecer a la Unión Europea estableció su propio programa de vigilancia de las resistencias antibióticas llamado SEARCH (Surveillance of Antibiotic Resistance in Switzerland). En el año 2007 estos datos fueron incorporados al EARSS. Estos resultados muestran la baja resistencia antibiótica encontrada en Suiza: en 2007 las tasas eran del 1,5% y del 1,1% para *E. faecium* y *E. faecalis* respectivamente. Sin embargo, cerca del 80% de los *E. faecium* aislados eran resistentes a la ampicilina lo que demuestra una amplia distribución de clones de adquisición hospitalaria⁽¹²⁾.

Sur de Europa

Las elevadas tasas de ERV asociados con infecciones nosocomiales en Europa fueron informadas por varios países del sur de Europa como Grecia y Portugal con tasas de hasta un 45%⁽³²⁾. Igual que en otros países de Europa, los aislamientos de *EfmvanA* fueron los responsables de las altas tasas de infección por ERV en Grecia, Portugal e Italia^{(47),(48),(49)}.

Grecia cuenta con una alta participación de laboratorios que envían sus datos al EARSS, las tasas de *EfmRV* pasaron de <1% en el año 2000 a un 42% en el 2006 para luego disminuir a un 37% en 2007. Como en otros países europeos las tasas de resistencia frente a los glucopéptidos para *E. faecalis* se mantienen bajas (<10%)⁽³²⁾.

Los primeros estudios de vigilancia de ERV en **Portugal** datan de 1994, dónde 10 hospitales participantes informaron de tasas del 1% de *EfcRV* y 9% de *EfmRV* causantes de infecciones del tracto urinario e infecciones invasivas. En 1996 los mismos 10 hospitales anteriores informaron de tasas de hasta un 20% para *EfmRV* y de un 47% en 2003^{(32),(50)}. En 2007 las tasas disminuyeron a un 29% debido a la implementación de medidas de control. Son muchos los hospitales portugueses que informan al EARSS con una cobertura del 90% de la población. Aunque la policlonalidad fue observada por *EfmRV*, determinadas cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* con gen *vanA* parecían contribuir a la rápida y extensa diseminación entre los hospitales portugueses^{(47),(51)}. La alta proporción de *EfmRA* (70-74% entre 1994 y 2006)⁽³²⁾ junto con los datos obtenidos por MLST sugirieron una alta diseminación de clones epidémicos entre los hospitales Portugueses^{(47),(52)}.

En **Italia** un amplio estudio multicéntrico realizado entre 1993 y 1995 informó de un 9% de *EfmRV*⁽⁵³⁾. Desde 2001 La Italian Antibiotico-resistenza-Instituto Superiore di Sanità ha enviado datos de ERV al EARSS a través de hospitales de atención secundaria con una cobertura de la población que ha ido disminuyendo hasta un 11% en el 2007. La frecuencia de *EfcRV* se ha incrementado, pero manteniéndose siempre por debajo del 5%⁽³²⁾. El primer brote clonal causado por ERV en Italia se produjo en una UCI en 1996 y desde entonces se han informado otros brotes^{(49),(54)}. La mayoría de las cepas de *EfmRV* asociadas a infecciones en humanos, desde 1993, han

sido cepas multiresistentes pertenecientes a clones de adquisición hospitalaria^{(55),(49)}. La transferencia horizontal de *Tn1546* también parece haber contribuido a la reciente expansión de ERV en Italia⁽⁵⁶⁾.

Este de Europa

El primer informe de ERV en **Polonia** data de la segunda mitad de la década de los 90, dónde se aisló el primer *EfmvanA* en tres pacientes hospitalizados en una planta de Hematología⁽⁵⁷⁾. El primer *EfmvanB*, portador de la variante del gen *vanB2*, fue encontrado en un paciente sometido a un prolongado tratamiento con vancomicina en una UCI de un hospital de Varsovia en 1999⁽⁵⁸⁾. La implantación de adecuadas medidas de control de la infección evitó una mayor diseminación de ERV entre hospitales. Al igual que en otros países, la mayoría de los brotes por ERV en Polonia fueron causados por *E.faecium* y *E.faecalis*. En el año 2005 tuvo lugar un brote inusual con mezcla de *E.faecium* y *E.raffinosis*, ambos portadores del gen *vanA*, en las plantas de Hematología, Nefrología y Cirugía de un hospital de Cracovia⁽³⁴⁾. A pesar de estos brotes esporádicos, según datos del EARSS, los ERV no son un problema importante en Polonia⁽³²⁾.

En la **República Checa** los primeros aislados de ERV fueron identificados en 1997 en un hospital de la región de Moravia⁽⁵⁹⁾. Entre 1998 y 2002, los ERV se mantuvieron constantes en niveles entre 4.9 a un 6.8% de todos los enterococos aislados en el hospital. El *EfmvanA* fue el más aislado, seguido del *EfcvanB*^{(59),(60)}. Pero estas tasas de ERV aumentaron en los años siguientes⁽³²⁾. El screening en la población en general y en aves de corral mostró la existencia de ERV fuera del entorno nosocomial pero sin evidencias moleculares de intercambio de cepas o de sus determinantes genéticos de resistencia entre la flora comensal de animales y hombres y el ambiente hospitalario^{(59),(60)}.

Según el EARSS no existen datos de ERV procedentes de **Eslovenia**. En **Hungría** entre el 2001 y 2004 se experimentó una disminución de enterococos aislados de animales muertos desde que el uso de la avoparcina disminuyó en 1998^{(61),(62)}. Son pocos los datos obtenidos por el EARSS o por otras publicaciones de ERV en hospitales de Hungría. Los escasos datos procedentes de los **países Bálticos (Letonia, Lituania y**

Estonia) impiden hacer una estimación de las tasas de ERV sugiriendo la ausencia de casos o brotes por ERV. Según datos del EARSS en Eslovenia aparece el primer caso de ERV en 2006⁽³²⁾.

II.3.3. Descripción de la situación epidemiológica en España

Los datos del EARSS de **España** están disponibles desde el año 2001. Las tasas de ERV se mantienen entre las más bajas de la Unión Europea: <1% para *EfcRV* y 1-3% de *EfmRV* entre 2001 y 2003. Se han informado varios brotes causados por *EfcvanA*^{(63),(64),(65)}. El primer *EfmvanB* informado en España fue aislado en diciembre del 2001 en el Hospital Universitario de Canarias, Tenerife, de una úlcera sacra de un paciente de 76 años. El gen *vanB* del aislado presentaba una alta homología con el gen *vanB2* (ligado al trasposón Tn5382) de un *E. faecium* aislado en Taiwan⁽¹⁶⁾. La descripción de dos brotes importantes causados por *EfmvanB* en diferentes ciudades del noroeste de España en 2004 y 2006, y la reciente diseminación interhospitalaria de una clona en particular merecen mucha atención^{(16),(66),(67),(15)}. La mayoría de los aislados en estos brotes pertenecen a tipos de clonas epidémicas de *E. faecium* y *E. faecalis* (*EfmRV*:CC17 y *EfcRV*: CC2/CC9)⁽⁶⁸⁾.

Pese a la baja prevalencia de *EfmRV* en España, se ha detectado un importante incremento de *EfmRA* aumentando desde un 49% en 2001 a un 73% en 2006 según datos del EARSS⁽³²⁾ y de un 52,1% en el 2001 a un 62,9% en el 2006 según datos del estudio español VIRA (Vigilancia de Resistencias a los Antimicrobianos) publicado en el año 2006⁽⁶⁹⁾, lo cual puede facilitar en un futuro el incremento de *EfmRV* en España^{(66),(67),(70)}.

En Canarias, la prevalencia de ERV es baja, como ya describe un estudio realizado por Hernández X. y cols. en 2002⁽⁷¹⁾.

II.4. Cadena epidemiológica

II.4.1. Reservorio

II.4.1.1. Reservorio humano

Los pacientes hospitalizados colonizados por ERV son el principal reservorio para la transmisión de estos microorganismos a nivel hospitalario, así queda demostrado en el estudio que Bonten MJ y cols. llevan a cabo en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) demostrando que la colonización por ERV y la subsiguiente transmisión cruzada, son importantes factores para su diseminación hospitalaria⁽²⁷⁾. Debido a que estos pacientes colonizados son asintomáticos, estos reservorios pasan fácilmente inadvertidos a menos que se lleven a cabo cultivos de vigilancia⁽⁷²⁾. Los pacientes con colonización rectal por ERV tienen mayor riesgo de desarrollar una infección y son una fuente para la transmisión hospitalaria a través de las manos del personal sanitario, del ambiente hospitalario y por contacto con otros pacientes, especialmente si éstos presentan diarrea⁽²⁴⁾.

Montecalvo y cols. hicieron hincapié en que los pacientes quedaban colonizados con ERV durante semanas o meses y a menudo seguían colonizados una vez que eran readmitidos en el hospital⁽⁷³⁾. Livornese y cols. encontraron que la mayoría de los pacientes permanecían colonizados durante más de 3 meses⁽⁷⁴⁾ e incluso, se ha informado de casos de pacientes con cultivos positivos durante 1 año⁽²⁴⁾. De acuerdo al estudio de Montecalvo y cols. algunos pacientes permanecen persistentemente colonizados con la misma cepa de ERV, lo cual se demostró por macrorrestricción y PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) y otros fueron positivos a más de una cepa durante el periodo de estudio⁽⁷³⁾.

El riesgo de colonización por ERV depende en primer lugar de la exposición al microorganismo y en segundo lugar de la susceptibilidad del hospedador⁽⁹⁾. Los

pacientes más susceptibles de colonizarse con ERV son los gravemente enfermos y con muchas comorbilidades. Estos pacientes tienden a ser hospitalizados durante largos periodos de tiempo en áreas como UCI dónde en países como EE.UU. la endemicidad de ERV es muy alta⁽⁷⁵⁾. Son muchos los estudios que se han realizado sobre los factores de riesgo asociados a la colonización rectal por ERV, los más importantes son la proximidad a otro paciente colonizado por ERV^(76, 77), una larga estancia hospitalaria^{(78),(79),(80),(77)}, y administración previa de antibióticos^{(81); (9)}.

La presión de colonización es definida como la proporción de pacientes colonizados dentro de una población o área definida. Cuando la presión de colonización por ERV en una determinada área dentro de un hospital es alta se puede convertir en el principal factor para la adquisición de ERV, siendo menos importantes otros factores de riesgo, incluso el personal sanitario corre el riesgo de ser colonizados. Si la presión de colonización es baja, los pacientes más enfermos y los que reciben múltiples y prolongados tratamientos antibióticos son los que presentan mayor riesgo de ser colonizados por ERV. En EE.UU. los pacientes procedentes de centros de larga estancia que ingresan en hospitales de referencia son el principal reservorio de ERV⁽⁸⁶⁾.

El papel de las clínicas con pacientes crónicos en la epidemiología de ERV no está bien definido. En un estudio realizado en Chicago, con una alta endemicidad por ERV durante años, se encontró que el 47 % de los pacientes admitidos a un hospital de referencia, desde las clínicas con pacientes crónicos, estaban colonizados con ERV⁽⁸²⁾. Éste y otros estudios llegaron a la conclusión de que los pacientes de éstas clínicas podían servir como de reservorio de EVR para hospitales de cuidados agudos y viceversa⁽⁶⁾.

Aunque el papel de los antibióticos en la epidemiología de los ERV ha sido estudiado con detalle, existen muchas controversias. Los antibióticos más implicados en la adquisición de la colonización o infección por ERV son vancomicina, cefalosporinas y antianaerobios⁽⁸³⁾.

Debido a la disminución del uso de la vancomicina oral existen pocos datos epidemiológicos que relacionen la misma con la prevalencia de ERV, sin embargo el

primer caso de bacteriemia por ERV documentado en EE.UU. fue descrito en un paciente que recibió profilaxis con vancomicina oral⁽⁸⁴⁾. Numerosos estudios han descrito la asociación entre el uso de vancomicina intravenosa y ERV, mientras otros estudios no la encuentran^(83, 85). un estudio multicéntrico llevado a cabo en EE.UU. dónde participaron 126 UCI de adultos de 60 hospitales repartidos por todo el país concluyeron que el uso frecuente de la vancomicina y cefalosporinas de tercera generación está asociado a un aumento de la prevalencia de ERV independientemente de las características de la UCI, por lo tanto una disminución de su uso podría reducir las tasa de ERV en UCIs⁽⁸⁶⁾. Con el objetivo de disminuir la resistencia frente a la vancomicina los CDC crearon unas guías para el correcto uso de la misma, a pesar de esta iniciativa varios estudios han mostrado que el uso de la vancomicina sigue siendo alto y que un alto porcentaje de casos es considerado inapropiado sobretodo en aquellos hospitales dónde los SARM y los estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina son un problema endémico. Moacyr S.J. y cols. estudiaron los factores de riesgo asociados al uso inapropiado de vancomicina en su hospital con una alta incidencia de SARM y de estafilococos coagulasa negativos resistentes a la meticilina, concluyendo que el uso de la vancomicina era inadecuado en pacientes de menos de 60 años, no ingresados en UCIs y en pacientes que no presentaban neutropenia⁽⁸⁷⁾.

Las cefalosporinas de amplio espectro han sido identificadas por muchos estudios como un importante factor de riesgo de colonización por ERV^{(26),(27),(86),(88)} y los agentes antianaerobios también^{(26),(89),(90)}.

Donskey y cols. demostraron con un modelo murino que la ceftriaxona y la ticarcilina-clavulánico promovían la colonización gastrointestinal por ERV mientras que la piperacilina–tazobactam no⁽⁹¹⁾. Este mismo autor comprobó como aquellos antibióticos con actividad frente a bacterias anaerobias y escasa actividad enterocócica promovían la colonización rectal por ERV en ratones⁽⁹²⁾.

En cuanto a la piperacilina–tazobactam existen estudios que relacionan un aumento de su uso con el riesgo de la colonización por ERV y otros que no encuentran asociación ninguna⁽⁹³⁾. Dentro de los agentes antianaerobios, el metronidazol, muy recomendado para el tratamiento de la enfermedades asociadas por *Clostridium difficile*

tanto en los casos leves como moderados, favorece al igual que la vancomicina la permanencia de altas concentraciones de ERV en pacientes colonizados las cuales disminuyen al retirar el tratamiento⁽⁹⁴⁾.

En cuanto a las fluorquinolonas y su relación con la colonización por ERV existen pocos estudios parece ser que su pobre actividad antianaerobia no promueve altos niveles de colonización por ERV⁽⁸³⁾.

II. 4.1.2. Reservorio ambiental

Las superficies, instrumentos y equipos médicos en la habitación del paciente frecuentemente están contaminados con ERV y pueden también servir de reservorios para estos microorganismos en el hospital. Ejemplos de esos instrumentos son: ropas del paciente, baños, camas, barandillas de las camas, pisos, pomos de las puertas, contadores de glucosa, tensiómetros, termómetros, monitores de electrocardiogramas, bombas de fluidos intravenosos, teléfonos, estetoscopios^{(24),(95),(74),(26),(25)}. En algunos estudios, se ha demostrado que los aislamientos obtenidos de superficies contaminadas de las habitaciones y de pacientes afectados pertenecen a la misma cepa de ERV⁽²⁵⁾. Los ERV pueden continuar vivos en esas superficies durante días o semanas pues estos microorganismos son muy resistentes a la desecación y temperaturas extremas, por ejemplo ERV puede sobrevivir de 5 a 7 días en mostradores y ha sido recuperado a las 24 horas, o más, de las barandillas de las camas, teléfono o estetoscopios⁽⁹⁶⁾. *EfmRV* ha sido también aislado en un torniquete, 4 días después de dar de alta a un paciente colonizado y de un equipo de monitorización intravascular después de varios días de estar almacenado⁽²⁴⁾.

II. 4.2. Mecanismos de transmisión

La transmisión puede ser directa, por contacto con pacientes colonizados o infectados, o indirecta, a través de las manos del personal sanitario o de superficies contaminadas.

En un estudio de cohorte retrospectivo llevado a cabo en 8 UCI en Boston, EE.UU., se comprobó que la admisión de un paciente en una habitación anteriormente

ocupada por un paciente ERV positivo y SARM positivo aumentaba significativamente el riesgo de adquirir ERV y SARM, sugiriendo el importante papel de la contaminación ambiental en la transmisión de estos microorganismos a pesar de los métodos de limpieza estándares nacionales. Sin embargo, esta ruta de transmisión no es tan importante como otras⁽⁹⁷⁾.

La transmisión de ERV a través de las manos del personal sanitario es probablemente el mecanismo más común de transmisión de paciente a paciente y son eliminados de las manos mediante el correcto lavado de las mismas. Dukro y cols. demostraron que el personal sanitario puede contaminar sus manos con ERV desde objetos inanimados o de la piel de los pacientes y transferirlos a otras superficies dentro de la misma habitación o incluso a otros pacientes⁽⁹⁸⁾. Cerca de la tercera parte del personal sanitario adquiere ERV en sus guantes después de tocar a los pacientes y un 29% también lo llevan en sus manos después de quitárselos, por ello se recomienda el lavado de manos antes y después de quitarse los guantes. El uso de guantes reduce el riesgo de adquirir ERV en un 71%⁽⁹⁹⁾. Alrededor de un 37% del personal sanitario que no usa guantes se contamina sus manos con ERV cuando entran en la habitación de un paciente colonizado por ERV, frente al 5% del personal que sí los llevan puestos⁽¹⁰⁰⁾.

Austin y cols estudiaron la dinámica de la transmisión de ERV en una UCI realizando cultivos de vigilancia diarios en los pacientes, tipado molecular de los aislados y monitorizando el cumplimiento de las prácticas de control de infección. Ellos demostraron cómo cuantitativamente las medidas de control tales como lavado de manos, reagrupamiento o sectorización de los pacientes y personal junto con la restricción antibiótica influyen en la transmisión cruzada nosocomial. En el estudio, el lavado de manos y la sectorización del personal sanitario fueron las medidas de control con mayor importancia en la transmisión de ERV⁽¹⁰¹⁾.

Numerosos estudios mostraron una elevada tasa de incumplimiento de las medidas de control de infección por parte del personal sanitario. En el 2001 en el estudio Antimicrobial Resistance Prevention and Control (ARPAC) se evaluaron los programas de control de infección de 169 países europeos, en la tercera parte de los hospitales incluidos en el estudio no se incluía el uso de soluciones alcohólicas en la política de control de infecciones, sin embargo describían una adherencia al lavado de

manos por encima de un 80%. Un estudio concluyó que el lavado de manos con soluciones alcohólicas es más efectivo que el lavado de manos con jabón⁽¹⁰²⁾.

II.4.3. Sujeto susceptible

Numerosos factores de riesgo se han asociado con la colonización e infección por ERV, unos dependen de la susceptibilidad del hospedador: edad avanzada, gravedad de la enfermedad de base, pacientes inmunocomprometidos, quemados, hematológicos, transplantados, con insuficiencia renal crónica, en hemodiálisis, colonizados por ERV en tracto gastrointestinal, con previa diarrea por *Clostridium difficile*. Otros factores de riesgo dependen de la exposición nosocomial como estar hospitalizados en UCI o en plantas de transplantados, la proximidad a otro paciente con ERV, larga estancia hospitalaria (sobre todo en plantas con alta prevalencia de ERV), alimentación enteral, uso previo de antibióticos, pacientes portadores de catéter venoso central, tubos nasofaríngeos, procedimientos invasivos y factores medioambientales^{(75),(103),(104)}.

A diferencia de lo que ocurre en EE.UU. donde el problema de la resistencia a glucopéptidos en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) es especialmente grave (al menos la mitad de las infecciones por ERV han afectado a pacientes en UCI), la mayoría de los brotes en Europa han ocurrido en Unidades de Nefrología y Hematología y sólo unos pocos brotes han ocurrido en UCI⁽¹⁰⁵⁾.

La colonización del tracto gastrointestinal por ERV precede a la infección en muchos de los pacientes. En varios estudios realizados por diferentes autores la proporción de pacientes colonizados por ERV que desarrollan bacteriemia varía dependiendo de la población en estudio, en un estudio con pacientes con cáncer presentaban una proporción del 29,3% (29 bacteriemias de 99 colonizados), en otro estudio con pacientes transplantados de médula ósea la proporción era de un 26,7% (4 de 15). Algunos de los factores de riesgo para el desarrollo de bacteriemia por ERV identificados en estos estudios incluyeron: neutropenia, diabetes, fallo renal y uso previo de vancomicina⁽¹⁰⁶⁾. En el estudio de casos y controles llevado a cabo por Salgado CD, de 768 pacientes colonizados por ERV, 31 (4%) desarrolló bacteriemia por ERV dentro de los 18 días posteriores a su descubrimiento como portador rectal de

ERV. Los pacientes colonizados por ERV que desarrollaron bacteriemia tenían una media de edad de 52 años, muchos provenían de centros de crónicos, habían estado más expuestos a procedimientos invasivos durante su hospitalización, presentaban otras infecciones, habían sido, en su mayoría, tratados con vancomicina previamente y también presentaban más probabilidad de morir que los pacientes colonizados con ERV que no desarrollaron bacteriemia⁽¹⁰⁷⁾.

Las tasas de mortalidad en pacientes con bacteriemia por ERV pueden alcanzar de un 60 a un 70 %. Aproximadamente la mitad de esas muertes pueden ser atribuibles directamente a la infección. Aunque muchas bacteriemias nosocomiales de enterococos son polimicrobianas, del 80 al 90 % de las bacteriemias por ERV han sido monomicrobianas. Además de causar infecciones en sangre, las cuales son a menudo relacionadas con catéter, ERV se aíslan en orina, abscesos intraabdominales y heridas quirúrgicas infectadas, son aislados ocasionalmente en líquido pleural y muy raramente en líquido cefaloraquídeo. No es fácil valorar el significado clínico de ERV en cultivos de rutina o de diferenciar colonización de infección, especialmente cuando se aíslan en orina o cuando forma parte de infecciones polimicrobianas. En algunos de estos casos, el tratamiento no está indicado. La exactitud con la que el ERV causa morbilidad y mortalidad es a menudo difícil de determinar, pues la mayoría de los pacientes afectados tienen graves enfermedades de base que causan morbilidad e incluso la muerte y además suelen recuperarse de cultivos mixtos con la presencia de otros microorganismos potencialmente patógenos⁽⁶⁾.

Carmeli Y. y cols. llevaron a cabo un estudio retrospectivo de casos y controles comparando pacientes con bacteriemias producidas por ERV con pacientes con bacteriemias por enterococos sensibles a la vancomicina (ESV), encontraron que los pacientes con ERV presentaban unas tasas de mortalidad muchos más altas 17% frente a un 6% (Riesgo relativo [RR] de 2,13; 95% intervalo de confianza [CI]:1.05-4.37), mayor duración de la estancia hospitalaria, intervenciones quirúrgicas, mayores ingresos en UCI y provenían con más frecuencia de centros de crónicos que los pacientes con bacteriemias por ESV⁽¹⁰⁸⁾.

II.5. Vigilancia y control de enterococos resistentes a los glucopeptidos.

Es importante controlar la emergencia y diseminación de ERV en los hospitales debido a las limitadas alternativas terapéuticas, comprometiendo la salud del paciente y también debido a la capacidad que tienen de transferir la resistencia frente a los glucopeptidos a otras bacterias patógenas como son los *Staphylococcus aureus* incluyendo los resistentes a la meticilina. La epidemiología es compleja pues los hospitales pueden verse afectados por casos esporádicos, epidémicos o endémicos de colonización e infección. Cada una de estas situaciones habrá que manejarla de distinta manera dependiendo del riesgo que conlleva al paciente⁽²⁴⁾.

No existe una guía de recomendaciones estandarizadas para el control de la infección por ERV que pueda aplicarse a cualquier institución. Cuando se elige una estrategia a seguir debe tenerse en cuenta los siguientes factores: la prevalencia de ERV en esa institución, los factores de riesgo de su población, los reservorios, el modo de transmisión y los recursos con los que se cuentan para llevarla a cabo. De esto se deduce que cada institución debería establecer un programa para el control de la infección por ERV, eligiendo los métodos que mejor se adapten a sus características. Para ello deben involucrarse y trabajar de forma conjunta todo el personal sanitario, incluyendo personal para el control de las infecciones, enfermería, médicos, microbiólogos, farmacólogos, personal de limpieza y administradores.

En el año 2003 la Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) publicó una guía para la prevención de la transmisión nosocomial de cepas multiresistentes de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.* en instituciones sanitarias⁽¹⁰⁹⁾. Un año más tarde la Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) of the Centers for Disease Control and prevention (CDC) publicó en forma de proyecto una propuesta de revisión de su guía sobre precauciones de aislamiento en hospitales publicada en el año 1996 y además incluía recomendaciones generales para el control de organismos multiresistentes en las instituciones sanitarias cuya versión final fue publicada en el año 2006⁽¹¹⁰⁾. Ambas guías ofrecen una revisión de recomendaciones para el control de microorganismos multiresistentes basada en la evidencia usando para ello el mismo sistema de clasificación, también recomiendan

similares medidas de control y destacan la importancia de monitorizar la adherencia por parte del personal sanitario al cuidado del paciente⁽¹¹¹⁾.

La mayoría de las guías recogen una serie de recomendaciones para la prevención y control de los ERV en los hospitales que incluyen:

II.5.1. Medidas administrativas.

Crear sistemas que alerten del ingreso de un paciente colonizado o infectado por ERV ya conocido antes de su readmisión o antes de ser trasladados a otro centro sanitario⁽¹¹²⁾.

II.5.2. Educación del personal sanitario.

Promover programas periódicos y educativos dirigidos al personal sanitario sobre las medidas para la prevención de la transmisión de ERV⁽¹¹³⁾.

II.5.3. Vigilancia.

Los laboratorios de Microbiología deberán usar métodos estandarizados y actualizar las guías publicadas para la determinación de la susceptibilidad de los ERV. Deberán desarrollar e implementar protocolos de laboratorio para guardar las cepas de ERV para realizar, cuando sea necesario, un tipado molecular y así confirmar la transmisión o definir la epidemiología en la institución.

Cada Institución deberá monitorizar la tendencia de la incidencia de los ERV para determinar si las tasas han disminuido y si es necesario añadir alguna medida de control adicional^{(113),(114)}. También han de revisar los cultivos positivos para detectar cualquier ERV y realizar estudios de prevalencia de colonización en unidades con pacientes de riesgo^{(114),(73)}. Implementar sistemas de vigilancia activa mediante cultivos para identificar el reservorio de ERV y utilizar medidas de precaución de contacto para evitar su diseminación.

Son muchos los estudios que han demostrado que la vigilancia activa con cultivos para identificar pacientes colonizados y el uso de las medidas de precaución de contacto para evitar la contaminación de las manos del personal sanitario al cuidado del paciente, han originado una notable reducción de las tasas de colonización e infección de pacientes con ERV^{(74),(114),(112),(115)}. El factor de riesgo más importante para la adquisición de ERV durante un brote fue la proximidad a un paciente con cultivo positivo por ERV durante los 7 días previos, por el contrario, no fue un factor de riesgo usando medidas de aislamiento de contacto⁽¹¹⁶⁾.

Está indicado realizar cultivos de vigilancia en el momento de la admisión hospitalaria a todo paciente con factores de riesgo de ser colonizado por ERV^{(24),(112),(113)}. La frecuencia de los cultivos dependerá de la prevalencia de ERV de cada hospital^{(114),(117),(118)}.

En las instituciones con una alta prevalencia de ERV está indicado realizar cultivo a todos los pacientes ingresados para identificar a los que son portadores de ERV y así instaurar medidas de aislamiento^{(114),(119)}.

La muestra idónea para el estudio de vigilancia de ERV son heces o exudado rectal o perianal. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los cultivos con caldo de enriquecimiento y cultivos cuantificados de heces tienen mayor sensibilidad que la siembra directa de los exudados rectales y perianales. La siembra directa de exudados perianales se utiliza para el control de la infección y es recomendado por su efectividad y rentabilidad^{(114),(74),(120)}.

Los pacientes ERV pueden agruparse en cohortes con otros pacientes portadores de ERV⁽¹¹⁴⁾.

Es evidente que en nuestro caso como en el resto de hospitales de España, no procede poner en marcha un Sistema permanente de Vigilancia Activa de ERV, dada la situación epidemiológica actual.

II.5.4. Higiene de manos

La higiene de manos es considerada como la medida más importante para el control de la transmisión de ERV y otros microorganismos multiresistentes como SARM. El CDC ha recomendado el correcto lavado de las manos después del contacto con cualquier paciente, con especial énfasis, en las precauciones universales desde 1987 y luego en las precauciones de contacto desde 1996. Pero a pesar de los esfuerzos, existen estudios que demuestran que la adherencia del personal sanitario es baja con tasas desde un 40% o tan bajas como el 10%. Las razones de la falta de adherencia al lavado de manos son complejas y complica el esfuerzo para reducir la transmisión de ERV. El insuficiente número de lavabos ha sido informado como un factor de riesgo, sin embargo, en un estudio reciente, se informó de una disminución de la adherencia incluso después de la construcción de un nuevo hospital dotado de más lavabos⁽¹²¹⁾. La irritación de la piel por el frecuente lavado de las manos con agua y jabón suele ser un importante obstáculo para la adherencia. Debido a la baja adherencia, casi universal, está claro que hay que hacer especial hincapié para la mejora de la higiene de manos entre el personal sanitario al cuidado del paciente⁽¹²²⁾.

El personal sanitario deberá fomentar la descontaminación de sus manos con alguna preparación antiséptica antes y después del contacto con cualquier paciente^{(123),(124),(125)}. Lavarse las manos con jabón y agua se requiere cuando están visiblemente sucias o contaminadas con sangre, fluidos u otras sustancias corporales⁽¹²⁶⁾. Cuando las manos no están visiblemente contaminadas se recomienda usar soluciones alcohólicas que contengan emoliente^{(127),(128),(129)}. Es muy útil monitorizar la adherencia del lavado de manos del personal sanitario⁽¹³⁰⁾.

II.5.5. Aislamiento de contacto para pacientes colonizados por ERV

Entre las medidas de aislamiento de contacto cabe destacar:

- Ponerse guantes siempre al entrar en la habitación^{(131), (99), (132)}.
- Usar equipo de protección personal^{(24), (74), (112), (114)}.

- Usar ropa adecuada y guantes o sólo guantes en unidades de riesgo dónde existan pacientes con cultivos de vigilancia pendientes⁽²⁵⁾.
- Aislamiento de pacientes en una habitación individual. Si no es posible, realizar cohortes en la misma habitación con pacientes colonizados por ERV o con pacientes con riesgo de colonizarse^{(117), (115)}. Cuando estos cohortes con pacientes colonizados por ERV no se puedan llevar a cabo, colocar pacientes con bajo riesgo de colonizarse por ERV y cuya estancia hospitalaria sea corta⁽¹⁰⁹⁾.
- Utilizar el mismo material no crítico para uso exclusivo del paciente infectado o colonizado por ERV⁽¹¹⁷⁾.
- Algunos hospitales sectorizan el personal al cuidado de los pacientes colonizados o infectados por ERV⁽¹¹⁷⁾.

II.5.6. Control del uso de antibióticos

Los servicios clínicos deberían tener sus propias políticas de antibióticos para evitar el uso inadecuado de los mismos⁽⁶⁾, como por ejemplo, restringir el uso de la vancomicina y así disminuir la presión selectiva que favorece la resistencia a la vancomicina^{(133),(134)}. También deberán prevenir la colonización intestinal por ERV, disminuyendo el uso de antibióticos con poca o ninguna actividad frente a los enterococos en pacientes cuyo estado de portador de ERV no sea conocido (siempre que sea adecuado para el cuidado del paciente que está siendo tratado), como por ejemplo, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación^{(134), (135),(136)}, o disminuir el uso de agentes antianaerobios en pacientes portadores intestinales de ERV (siempre que sea adecuado para el cuidado del paciente que está siendo tratado)^{(114), (135),(137)}.

II.5.7. Descolonización de los pacientes portadores de ERV

No se recomienda la descolonización de pacientes portadores de ERV. No se ha establecido ni el régimen ni la eficacia de los protocolos para ERV^{(114), (138), (139)}.

II.5.8. Desinfección ambiental

No existe evidencia suficiente sobre cual es el mejor régimen de limpieza para la eliminación de los ERV⁽¹⁴⁰⁾. Cada hospital debe desarrollar políticas de limpieza y desinfección ambiental frente a microorganismos multiresistentes tales como los ERV. La clasificación de Spaulding divide a los instrumentos en las categorías de crítico, semicrítico y no crítico con diferentes niveles de desinfección y esterilización para cada uno de ellos^{(141), (142)}.

Es importante la limpieza, desinfección de las superficies y equipos médicos que pueda estar contaminado incluyendo barandillas de la cama del paciente portador de ERV, pomos de las puertas, mesillas, etc⁽¹⁴³⁾.

Los ERV son susceptibles a muchos desinfectantes de bajo nivel e intermedio, compuestos de amonio cuaternario, fenoles e iodóforos (con diluciones adecuadas)^{(144), (145)}.

Aunque muchos desinfectantes son activos tanto para SARM, ERV como para MSSA y ESV, se ha comprobado que para la eliminación de los ERV es más efectivo realizar una limpieza a fondo de las superficies que pasar un paño mojado con desinfectante⁽¹¹³⁾. Byers y cols. encontraron que el 16% de las superficies de las habitaciones del hospital permanecían contaminadas por ERV después de una limpieza rutinaria que consistía en pasar rápidamente un paño mojado con un desinfectante de amonio cuaternario. En contraste, los autores encontraron mayor eficacia utilizando un nuevo método de limpieza que consistía en pasar un trapo mojado con el mismo desinfectante pero dejando las superficies empapadas durante 10 minutos⁽¹⁴⁶⁾.

Aunque la realización de cultivos ambientales de forma rutinaria no está recomendado, en casos dónde la transmisión de ERV es continua sí que ayudan a evaluar la efectividad y limpieza de los procedimientos de desinfección⁽¹⁴⁷⁾.

Hay que tener en cuenta la desinfección del material médico como estetoscopios, esfingomanómetros, termómetros, etc, ya que son reservorios de ERV. La desinfección con alcohol isopropilo al 70% ha demostrado ser eficaz⁽¹³¹⁾. La limpieza de estos materiales debe llevarse a cabo de forma rutinaria entre pacientes para prevenir la transmisión de ERV⁽¹⁰⁹⁾.

II.6. Aplicación de marcadores moleculares en la epidemiología de los ERV

Los procedimientos de tipificación molecular constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. Estos sistemas comprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. De este modo se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados de un mismo microorganismo precursor común. La mayor ventaja de estos métodos es la estabilidad de los marcadores genéticos utilizados y la posibilidad de poder utilizarlos universalmente a distintos géneros y especies de microorganismos. Los marcadores moleculares se han aplicado en diferentes campos y su disponibilidad ha mejorado nuestro conocimiento sobre:

- patogénesis e historia natural de ciertas infecciones
- detección de brotes y epidemias, identificación de reservorios y de mecanismos de transmisión de patógenos
- diseño de medidas de control de propagación de la infección y evolución genética de poblaciones microbianas.

En todas las aplicaciones el objetivo de los marcadores moleculares es el de definir la relación existente, clonal o no, entre los aislamientos estudiados. El término clon o grupo clonal en epidemiología hace referencia al grupo de aislamientos relacionados por el hecho de descender de un ancestro común, esto es, por formar parte

de una cadena de replicación y transmisión. Las cepas relacionadas provienen, pues, de la expansión clonal de un precursor único y poseen un nivel de similitud entre sus genotipos y fenotipos significativamente superior al que se encontraría entre aislamientos no relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente.

La aplicación de técnicas y marcadores de epidemiología molecular es indispensable en el estudio de la infección nosocomial, sobre todo en hospitales en los que se dispone de unidades de vigilancia intensiva, neonatología, quemados, hematología u oncología, en dónde ingresan pacientes susceptibles de adquirir infecciones graves intrahospitalarias. Asimismo existen numerosas referencias relacionadas con la aplicación de marcadores moleculares al estudio de las infecciones extrahospitalarias, son algunos ejemplos los estudios de patrones de transmisión de tuberculosis, la identificación de reservorios de legionelosis y los estudios epidemiológicos de infección por neumococo o meningococo.

Existen varios métodos moleculares aplicados al estudio epidemiológico, la elección del mismo dependerá de la capacidad de la técnica y tecnológica del laboratorio, de la situación epidemiológica específica a estudiar y de la rapidez necesaria en la respuesta del laboratorio.

La definición de clon es probabilística y el nivel de similitud necesario para su definición debe tener en cuenta el taxón estudiado, el marcador utilizado y el tiempo que dure la investigación epidemiológica. Por ello, antes de escoger un marcador molecular debe formularse de forma clara y precisa aquella pregunta en términos epidemiológicos cuya respuesta es preciso conocer, definir el nivel de relación genética que es necesario determinar, escoger los marcadores que son capaces de discriminar a este nivel de relación y verificar la eficacia de los métodos seleccionados.

Cuando se analizan brotes epidémicos por taxones muy homogéneos es necesario utilizar marcadores muy discriminativos para reconocer a los aislamientos no relacionados como distintos de la cepa epidémica. Por el contrario, en la vigilancia de las enfermedades infecciosas, puede interesar monitorizar la diseminación de un clon a nivel mundial de forma prospectiva. En este caso, es posible que este clon sufra cambios microevolutivos que generen patrones relacionados pero no idénticos. Si

utilizamos patrones muy discriminativos podemos identificar aislamientos relacionados como diferentes. Es por ello que se ha recomendado establecer categorías de relación entre las cepas. En el caso de la electroforesis de campo pulsante (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), se habla de cepas “idénticas”, “probablemente relacionadas”, “posiblemente relacionada” o “distintas” en función del número de cambios genéticos que traduce la diferencia genética entre los patrones obtenidos. La capacidad de discriminación de un marcador depende de la variabilidad genética existente en la región del cromosoma que se explora⁽¹⁴⁸⁾.

Desde el punto de vista de la aportación de la microbiología a los estudios epidemiológicos, es básico diferenciar entre lo que se define como epidemiología local o a corto plazo de lo que es la global o a largo plazo. En la epidemiología a corto plazo se intenta responder a cuestiones como las siguientes: 1) en los casos en los que se observa una infección recurrente en un paciente, ¿se trata de una recidiva por fracaso terapéutico o estamos ante una reinfección por una cepa diferente?; 2) en el caso de agrupamientos de casos en la comunidad o en el hospital, ¿nos encontramos ante un brote o, alternativamente, ante una serie de infecciones independientes por diferentes cepas? Sin embargo en la epidemiología a largo plazo, el fin último es establecer las relaciones de las diferentes líneas clonales (que producen brotes en diferentes países/continentes y/o décadas, que adquieren determinantes de resistencia a antimicrobianos o que manifiestan un aumento del nivel de virulencia) y ser capaces de trazar su dispersión global⁽¹⁴⁹⁾.

Para dar respuesta a las necesidades de la epidemiología a corto plazo, se han desarrollado los sistemas de tipificación microbiológicos que podríamos definir como clásicos, incluyendo ambos, los fenotípicos y los moleculares o genéticos. En los últimos años se han desarrollado algunos sistemas que podríamos definir como “universales” por la posibilidad de ser aplicados en la práctica totalidad de las especies bacterianas. Entre éstos, destacan el análisis del ADN mediante PFGE que es un método altamente discriminativo y detecta pequeñas variaciones que se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano⁽¹⁵⁰⁾.

Para la epidemiología a largo plazo o global es imprescindible el intercambio rápido y preciso de información entre diferentes laboratorios. A menudo los laboratorios

no utilizan los mismos métodos, y aún en el caso de que lo hagan, los resultados son casi siempre difíciles de comparar. Los métodos de la epidemiología a corto plazo, como el PFGE, están basados en la generación de patrones de bandas en geles de agarosa y su comparación en formato de imagen. Esto hace muy complejo el compartir información. Así surgió la necesidad de desarrollar un marcador válido para epidemiología global como el MLST⁽¹⁴⁹⁾.

No existe un método de tipado ideal para ERV. Al principio, los laboratorios pudieron reconocer brotes locales de ERV por la presencia de características, biotipos o antibiogramas inusuales. Sin embargo estos marcadores no eran suficientemente discriminativos para su compleja epidemiología por lo que se requerían técnicas de tipado. Se han aplicado muchos métodos de tipado a los enterococos. Los métodos fenotípicos tales como el serotipado y fagotipado diseñados para *E. faecalis* fueron reemplazados por una amplia variedad de métodos basados en el DNA aplicables a todas las especies de enterococos. Entre los métodos más recientes se incluyen el AFLP (amplificación mediante PCR de fragmentos de restricción) y, para *E. faecium*, el MLST (multi-locus sequence typing). El PFGE se ha convertido en el método de elección para el análisis epidemiológico de muchos tipo de infección nosocomial incluyendo al ERV⁽¹⁴⁰⁾.

II.6.1. Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Electroforesis de Campo Pulsante (PFGE).

Con el fin de evitar la contaminación de su genoma por ADN exógeno, las bacterias han desarrollado un sistema de protección basado en los enzimas de restricción, que reconocen una secuencia específica de nucleótidos de unos 4 a 8 pares de bases (pb) dando lugar a un corte en la molécula de ADN a este nivel. A la secuencia específica reconocida por cada enzima se le conoce como lugar de restricción. Este sistema de protección se complementa con una metilación del ADN propio de la bacteria en el lugar de restricción para evitar que sea digerido por su propio enzima de restricción. Podemos dividir a los enzimas de restricción para una especie concreta, en aquellos que darán lugar a un gran número de fragmentos (cientos) de pequeño tamaño y aquellos cuyo lugar de restricción estará poco representado en el genoma y darán pocos fragmentos (10 a 30) de gran tamaño. Los fragmentos de pequeño tamaño

obtenidos con los enzimas de alta frecuencia de corte pueden separarse por electroforesis convencional mientras que los fragmentos de gran tamaño (> 40Kb) co-migran en una única banda en la electroforesis convencional y se deben separar con técnicas electroforéticas especiales como la electroforesis con alternancia de campos eléctricos o electroforesis de campo pulsante. También para una especie bacteriana concreta podemos encontrar enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, es decir, enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana en cuestión. El uso de este tipo de enzimas permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria y la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30). Muchos de estos fragmentos son de gran tamaño, más de 40Kb, y no pueden separarse por técnicas electroforéticas convencionales, en las que se aplica un campo eléctrico constante ó estático, sino que requieren técnicas en las que la orientación del campo eléctrico es variable periódicamente, son las denominadas técnicas de electroforesis en campo pulsante o PFGE.

La combinación de estas dos técnicas, macrorrestricción del ADN y separación de los fragmentos por PFGE, se ha aplicado con mucha frecuencia en estudios epidemiológicos en bacteriología. Se obtienen así patrones de restricción sencillos que representan el ADN cromosómico bacteriano distribuido en unas pocas bandas con movilidades electroforéticas distintas. Sin embargo, las características de estas técnicas determinan una serie de cambios a tener en cuenta en las distintas fases en las que se divide el proceso de macrorrestricción y PFGE: 1) el procedimiento de extracción de ADN, obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloques de agarosa, en los que se llevará a cabo la lisis, de manera que el ADN cromosómico también quede embebido en agarosa, el objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fracture accidentalmente (al pipetear, agitar, etc, lo cual desvirtuaría los patrones de restricción y afectaría a la reproducibilidad de la técnica), 2) la restricción del ADN debe hacerse tal y como éste esté preparado, es decir, inmovilizado en los bloques de agarosa, utilizando enzimas de restricción de baja frecuencia de corte, y 3) la técnica de electroforesis utilizada para la separación de fragmentos debe ser una PFGE, con las características diferenciales propias de ésta.

Las condiciones para obtener la mejor resolución por PFGE están, por supuesto, en función del rango del tamaño de las moléculas a separar y del enzima de restricción seleccionado, pero también intervienen variables técnicas como la duración y alternancia de los pulsos eléctricos, el voltaje, la temperatura de la cubeta, el tiempo de electroforesis, el tampón utilizado o el ángulo de reorientación. Los sistemas PFGE consiguen separar fragmentos grandes de ADN y de inducir la reorientación de las moléculas mediante campos periódicos en el campo eléctrico. La duración del campo eléctrico que se alterna determina el tamaño del ADN que puede separarse. Los pulsos pueden durar fracciones de segundos para separar moléculas de pocas Kb, o pueden durar algo más de una hora para separar moléculas de 5Mb. Puesto que nos estamos refiriendo a la aplicación de PFGE en la tipificación bacteriana, el rango de peso molecular que interesa separar suele oscilar entre las 20 Kb y las 600-800 Kb, lo cual se consigue con tiempos que oscilan entre los 0,5 segundos y los 50-60 segundos.

El objetivo final de las técnicas de tipado molecular aplicado al análisis de brotes endémicos, es poner de manifiesto que los aislamientos relacionados epidemiológicamente lo están también genéticamente. Es imprescindible conocer los fundamentos de las técnicas de PFGE y cómo ciertos cambios genéticos pueden alterar los patrones de bandas obtenidos por PFGE, para interpretar correctamente los resultados. En una situación ideal, los patrones de PFGE de los aislamientos que representan una cepa epidémica deberían ser idénticos y fácilmente diferenciables de los aislamientos epidemiológicamente no relacionados. Es importante tener en cuenta la naturaleza de la colección de aislamientos que nos proponemos estudiar. Son más fáciles de interpretar los patrones obtenidos de cepas aisladas en un periodo de tiempo corto y que han dado lugar a un brote epidémico. En ocasiones, aislamientos no relacionados epidemiológicamente pueden presentar un genotipo idéntico o muy parecido, particularmente si pertenecen a una misma especie o subtipo con una diversidad genética limitada. Este es el caso de ciertos microorganismos multiresistentes, por ejemplo SARM. En estos casos puede ser difícil discernir si las cepas que estamos estudiando pertenecen a un brote o el genotipo más prevalente son los responsables.

A la hora de interpretar los patrones de PFGE, debe examinarse la colección completa de cepas a estudiar en busca de un patrón epidémico, que sería el más común

entre los aislamientos. A continuación todos los otros patrones deben compararse con éste y a la vez entre sí. Es preciso contabilizar el número de fragmentos distintos de cada cepa con todas las demás, fragmento a fragmento. A pesar de todo, la comparación e interpretación de los patrones de restricción tiene un importante componente de subjetividad por parte del observador. Tenover y cols. en base a su experiencia elaboraron unos los criterios de interpretación de bandas⁽¹⁵⁰⁾, en función del número de diferencias entre dos patrones clasifica a los aislamientos en:

- Idénticos. Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma cepa.

- Genéticamente relacionados. Cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3. En este caso las dos cepas se pueden considerar genéticamente relacionadas y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.

- Posiblemente relacionados. Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 bandas (inserciones o deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos pueden también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica. Este número de variaciones puede verse entre aislamientos separados por largos periodos de tiempo (> 6 meses), entre aislamientos que proceden de brotes que han afectado a un gran número de personas o entre aislamientos que proceden de situaciones endémicas prolongadas. En estos casos, antes de llegar a una conclusión sería interesante analizar las características fenotípicas de los aislamientos, su sensibilidad antibiótica y aplicar otros marcadores genotípicos si fuera necesario.

- No relacionados. Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica.

El patrón de restricción considerado como el patrón epidémico se designa normalmente con la letra A. Los patrones que están probablemente o posiblemente relacionados epidemiológicamente con el patrón epidémico se consideran subtipos de A y se designan como A1, A2, etc. Los patrones que difieren sustancialmente con el patrón epidémico se designan con otra letra distinta: B, C, etc.

Se pueden también analizar los patrones de PFGE mediante sistemas informáticos que objetivan el número de diferencias entre dos aislamientos y les asignan una “distancia genética”. Son sistemas muy útiles para analizar colecciones que incluyen muchos microorganismos.

Las técnicas de macrorrestricción y PFGE se han utilizado para la tipificación molecular de un gran número de especies bacterianas. Son técnicas que exploran la organización del ADN bacteriano bajo la acción de la digestión por un enzima, por tanto dan información general sobre el genotipo bacteriano y sus cambios más recientes. En general sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos aislados en un periodo de tiempo corto. Al aplicar estas técnicas al estudio de brotes de infección nosocomial endémicos, hay que tener en cuenta que la rentabilidad de la técnica variará en función del momento del brote, por ejemplo, al principio del brote es probable que la diversidad genética sea baja, mientras que más tarde, al irse acumulando cambios genéticos en las cepas epidémicas/endémicas, se incrementará la diversidad de los patrones de PFGE.

Entre los inconvenientes de la técnica se encuentra el hecho de que carecen del suficiente poder de discriminación. Por esta razón, al emplear la técnica sobre alguna especie de la que no hay experiencia previa, es necesario elegir cuidadosamente las cepas que utilizaremos como controles (aislamientos no relacionados epidemiológicamente con las cepas a estudiar). También existen algunas especies bacterianas en las que la degradación del ADN cromosómico hace que muchas de sus cepas sean “no tipables” por PFGE. Se han publicado algunas modificaciones para disminuir la degradación del ADN y mejorar la resolución de la electroforesis. Asimismo se han publicado procedimientos técnicos que permiten obtener resultados en

24-48 h, mejorando otro de los inconvenientes de la técnica. Un inconveniente importante es el derivado de la interpretación de los patrones de bandas obtenidos, que es subjetiva en la mayoría de los casos, y de la ausencia de un sistema normalizado que permita cuantificar uniformemente la distancia genética.

Finalmente, debe recordarse que las técnicas de macrorrestricción y PFGE no detectan cambios puntuales en genes ni permiten la observación detallada de ciertos elementos genéticos (plásmidos, transposones, secuencias de inserción, etc.). Por tanto, para abordar algunos problemas epidemiológicos en los que intervengan estas secuencias, se requiere la combinación con otras técnicas. Es una técnica cuya tipabilidad, reproducibilidad y poder de discriminación son excelentes, la técnica no es fácil de realizar y es de un coste elevado⁽¹⁴⁸⁾.

II.6.2. Análisis del ADN por secuenciación: *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

El MLST es una técnica desarrollada y diseñada para identificar clones y/o líneas clonales fundamentalmente en poblaciones bacterianas. Es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo (identificación de grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente), aunque ha sido ocasionalmente utilizado para dar respuesta a interrogantes planteados en epidemiología local o a corto plazo (caracterización de brotes, diferenciación de recidivas, reinfecciones y/o fallos terapéuticos, etc).

En el MLST, las variaciones en los diferentes locus se detectan de forma directa por secuenciación del ADN en fragmentos seleccionados, permitiendo la identificación de grupos de microorganismos con idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) genotipos. El principio del desarrollo de MLST se encuentra en algunos trabajos de genética de poblaciones que intentaron correlacionar la información generada a partir del análisis de isoenzimas con la obtenida mediante secuenciación de los genes analizados^{(151),(152)}. En este proceso se observó que algunas regiones específicas de los genes analizados eran responsables de la mayor parte de la variabilidad observada, mientras que el resto del *locus* presentaba un alto grado de

conservación. Así pues se decidió analizar en cada gen sólo un fragmento interno de entre 450-500 pb cuyo nivel de variabilidad combinado entre los genes analizados, proporcionaba un alto grado de discriminación. El número de genes en los que se basa el esquema de MLST para las diferentes especies bacterianas es de siete.

El proceso de selección de genes, así como de los fragmentos internos de éstos, no es universal, es decir, este proceso debe ser realizado para cada especie bacteriana de forma individual. Así que el método es de aplicación universal, pero su desarrollo, no. El proceso de desarrollo es lento y laborioso. Desde 1988 en que se describió, el método ya ha sido desarrollado para 11 especies diferentes de bacterias lo cual se puede consultar en la siguiente página web (<http://www.mlst.net/databases/default.asp>), entre las que habría que destacar por su relevancia *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* y *Enterococcus faecium*.

El primer paso en el proceso de análisis por MLST consiste en la amplificación y posterior secuenciación de los fragmentos variables de los siete genes previamente seleccionados. La secuencia de cada uno de los loci se alinea con las existentes en una base de datos centralizada. Si la secuencia coincide, el programa asigna uno de los alelos ya identificados; en caso contrario, asigna un nuevo número a ese nuevo alelo. La asignación de los alelos se realiza de forma inequívoca al secuenciar ambas hebras de ADN, por lo que las variaciones en la secuencia de ADN son de esta forma “autenticadas”. Una vez asignado un número de alelo se genera un perfil alélico que será la combinación de los siete alelos ya asignados. Las combinaciones alélicas encontradas definen lo que se conoce como el tipo de secuencia o *sequence type* (ST). Tras la definición de los perfiles alélicos, la comparación entre cepas es sencilla.

La existencia de bases de datos para cada microorganismo en el que se ha desarrollado MLST, accesibles mediante página web (<http://mlst.net>) funciona como nexo común para todos los posibles participantes, pudiendo realizarse todo el proceso de consultas y análisis así como enviar las propias cepas para inclusión en las bases de datos, con conexión posible desde cualquier lugar del mundo.

Un inconveniente de la técnica es su bajo poder de discriminación comparándolo con la aplicación de otros marcadores como el análisis del ADN mediante PFGE, o

técnicas de tipificación por PCR, etc. Otro inconveniente es que la técnica es costosa, laboriosa y precisa de tecnología de secuenciación automática. Su aplicación queda de momento restringida a laboratorios de referencia⁽¹⁴⁹⁾.

Utilizando técnicas basadas en la secuenciación de ADN como es el MLST los *E. faecium* pueden ser asignados a distintos clones o complejos clonales mediante análisis filogenéticos (eBURST). En 2005, Willems RJ. y cols. fueron los primeros en utilizar el MLST y el programa eBURST para estudiar la evolución genética, la estructura de la población y la distribución geográfica de 411 *E. faecium* resistentes y sensibles a la vancomicina aislados de fuentes humanas y no humanas, de reservorios comunitarios y hospitalarios de los 5 continentes. Identificaron un linaje genético de *E. faecium* (Complejo-17 ó CC17) cuya diseminación es mundial y el cual se caracteriza por resistencia a la ampicilina, por poseer una isla de patogenicidad (PAI) y estar asociado con brotes hospitalarios. El complejo-17 es el resultado de la acumulación de procesos evolutivos que la bacteria ha desarrollado para su adaptación al medio hospitalario. La prevención de la diseminación de esta subpoblación de *E. faecium* epidémica es crítica y los esfuerzos deben centrarse en la detección prematura de cepas del complejo-17 resistentes a la ampicilina. El complejo clonal CC17 también está asociado con una alta resistencia frente a ciprofloxacino, además posee un contenido genómico adicional, que incluyen marcadores de virulencia como el gen *esp* (proteína de superficie de enterococos), el gen *hyl* (hialuronidasa) o el gen *acm* (proteína de unión al colágeno)^{(153),(154), (155),(156)}.

Se ha sugerido que las cepas de *E. faecium* resistentes a la ampicilina (*EfmRA*) sirven como sustratos para la aparición de brotes de cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina (*EfmRV*) en las instituciones europeas y americanas^{(157),(158),(37)}. El MLST incluyendo estudios epidemiológicos independientes de aislados de diferentes fuentes y zonas geográficas, demostró que en los últimos *E. faecium* la biología de la población tiene al menos dos componentes principales: (i) un gran número de genotipos y (ii) un complejo clonal de reciente aparición que abarca la mayoría de los aislamientos de EVR aislados de brotes de hospitales en los distintos continentes (originalmente designado C1 y renombrado CC17) que son en su mayoría resistentes a la ampicilina (90%) y contienen el marcador de epidemidad *esp* (70%)^{(55),(159),(153)}. Coque TM y cols. llevaron a cabo un estudio de 8 años de seguimiento (1995 a 2002), detectaron similares

diferencias entre *E. faecium* sensibles a la ampicilina (*EfmSA*) y las poblaciones *EfmRA* causando bacteriemia un hospital español. *EfmRA* aislados constituyen una población clonal con características muy similares al complejo clonal CC-17 (*Purk--1* y *--21*; AFLP genogrupo C), lo que sugiere que la aparición de resistencia a la vancomicina entre las cepas *EfmRA* en España puede ser una cuestión de tiempo⁽⁷⁰⁾. La baja diversidad de *EfmRA* de aislamientos clínicos se ha demostrado también en los hospitales noruegos y suecos, lo que sugiere la aparición y propagación de la una subpoblación de *E. faecium* en el contexto clínico, tanto en el zonas geográficas donde los ERV se consideran epidemia y en aquellos en los que no lo son^{(159),(160),(161)}.

Después de la publicación de Willems y cols. describiendo el complejo CC17, también conocido como linaje C1, se sucedieron otras publicaciones confirmando su emergencia en hospitales de Brazil, Alemania, Italia, Korea, Holanda, Singapore, Suecia, España^{(162),(163),(55),(164),(165),(166),(167),(70)}.

En el 2006 fue desarrollado un esquema de MLST para *E. faecalis* detectándose la dispersión en Europa y América de dos complejos clonales de alto riesgo denominados CC2 y CC9 especialmente adaptados al medio hospitalario⁽⁶⁸⁾. Además un estudio de casi 300 *E. faecalis* aislados de hospitales polacos identificaron dos nuevos complejos clonales de enterococos de alto riesgo ST40 y CC87⁽¹⁶⁸⁾. La resistencia a la vancomicina, característica poco frecuente en los *E. faecalis*, fue frecuente en estos *E. faecalis* pertenecientes a estos complejos de alto riesgo. Garbajosa P. y cols. caracterizaron por MLST 81 cepas de *E. faecalis* aisladas en diferentes años y regiones de España incluyendo cepas de brotes hospitalarios por *EfcRV*. Detectaron entre los aislados los complejos CC2 y CC9, agrupándose en estos dos complejos tanto las cepas de *EfcRV* causantes de los brotes hospitalarios como las cepas de origen hospitalario sensibles a la vancomicina, por lo tanto las medidas de control deben ir encaminadas a la detección de estos complejos clonales de alto riesgo, ya que su presencia en los hospitales podrían predecir tendencias futuras en cuanto a la adquisición de determinadas resistencias como es el caso de la vancomicina⁽⁶⁸⁾.

II.6.3. Técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en el mismo principio general común para todas ellas: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación^{(169),(170)}. Las técnicas de PCR se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos.

Por lo general las técnicas de tipificación basadas en la PCR son menos laboriosas, más rápidas y más flexibles que la PFGE y además permiten trabajar con un mayor número de muestras^{(169),(170)}. Las técnicas de PCR son útiles para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente, pero son menos discriminativas que la PFGE para diferenciar subtipos entre cepas relacionadas clonalmente. Estas técnicas pueden presentar problemas metodológicos relacionados con la inhibición de la PCR y la contaminación de las muestras durante el proceso de preamplificación. Otro de los problemas son los criterios utilizados para interpretar los patrones de bandas y la dificultad para comparar los patrones de ADN en varios geles, aunque esto último se puede resolver con programas informáticos que analizan automáticamente los patrones y los agrupa en los llamados *clusters*⁽¹⁷¹⁾.

Son varios los métodos de PCR descritos para la detección de ERV como la **REP-PCR** (del inglés Repetitive Extragenic Palindrome PCR) basado en las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas, o la **RAPD** (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA)⁽¹⁷²⁾ basado en la amplificación al azar del ADN polimórfico (del inglés Restriction Fragments Length Polymorphism). Patel y cols. desarrollaron una **PCR RFLP** (del inglés Restriction Fragments Length Polymorphism) basada en la digestión con enzimas de restricción de los productos de amplificación, la cual utilizaron para detectar y discriminar los genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*. La PCR RFLP posee un poder de discriminación inferior al del PFGE pero es una técnica rápida, simple que permite la obtención de resultados en una sola jornada⁽¹⁷³⁾. El estudio del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados o lo que es lo mismo la **AFLP** es una técnica de PCR basada en la amplificación de fragmentos de restricción a

los que previamente se les ha unido unos adaptadores que hibridan con cebadores específicos, los protocolos más utilizados suelen emplear dos enzimas de restricción y cebadores fluorescentes. Los inconvenientes de la AFLP son su laboriosidad y elevado coste, en cuanto a ventajas es interesante su elevada sensibilidad y su excelente poder de discriminación. Aunque suele ser menos discriminativa que el PFGE, para determinados microorganismos como el *E. faecium*, se ha observado que el poder de discriminación de ambos métodos son muy similares^{(174),(175)}. Como el estudio de Willems RJL y cols. ya nombrado anteriormente, dónde realizaron un análisis de una amplia serie de ERV, para ello utilizaron la AFLP agrupando a los aislados en los genogrupos: A, B, C y D: Demostraron como los genogrupos A, B y D se encuentran en animales y personas sanas y el genogrupo C lo presentaban los paciente hospitalizados⁽¹⁹⁾.

Se han desarrollado varios protocolos de **PCR-Múltiple** rápidos y fiables que permiten la detección de los enterococos en pocas horas. En 1999, Ke y cols. diseñaron un protocolo para la detección específica de todos los enterococos de importancia clínica a nivel de género⁽¹⁷⁶⁾. La PCR-Múltiple permite la detección simultánea de los genes de resistencia *vanA*, *vanB*, *vanC1*, además de la identificación a nivel de especie de *E.faecium*, *E.faecalis*, *E.gallinarum* y *E.casseliflavus*⁽¹⁷⁷⁾. En el año 2002, Hernández X. y cols. desarrollaron un protocolo de PCR múltiple a partir de colonia que permite la identificación de los enterococos a nivel de género y la detección de los genes de resistencia a vancomicina más frecuentes (*vanA*, *vanB*, *vanC1* y *vanC2/C3*)⁽¹⁷⁸⁾.

II.7. Factores de epidemicidad o virulencia

Aunque la patogénesis de las infecciones enterocócicas no se han demostrado, se han descrito algunos genes que pueden contribuir a la virulencia de estas especies y que están asociados a los complejos clonales CC17 de *E. faecium* y los CC2, CC9, CC87 y CC21 de *E.faecalis*^{(179),(180),(181),(70),(56)}. En *E.faecalis* estos factores incluyen la sustancia de agregación (*asa*), implicada en los fenómenos de conjugación y que facilita la adhesión e internalización y supervivencia en las células humanas⁽¹⁸²⁾, una gelatinasa (*gel*), una metaloproteasa extracelular dependiente de zinc, una citolisina (*cyl*) con actividad tóxica en células eucariotas⁽¹⁸³⁾ y una proteína de superficie (*esp*) que favorece la adhesión a células epiteliales, la formación de biofilms, la evasión de la respuesta

inmune la cual está codificada por un gen localizado en una isla de patogenicidad⁽⁵⁶⁾,
(183),(184),(185).

Los factores asociados a la epidemicidad o virulencia de *E. faecium* son una proteína con homología a la hialuronidasa (hyl) involucrada en procesos de virulencia en otras especies, y una proteína de superficie (esp) análoga a la de *E. faecalis* pero codificada por un gen localizado en una isla de patogenicidad diferente^{(185),(186)}. Ambos se han identificado exclusivamente en CC17, con lo que se ha establecido una asociación entre la presencia de esp y clones causantes de brotes nosocomiales^{(70),(186),(159),(153)}.

II.8. Tratamiento de ERV

Aunque no se dispone actualmente de antibióticos para erradicar la colonización por ERV, existen varias opciones de tratamiento para la infección por ERV. La mayoría de los aislamientos de ERV son resistentes a la penicilina y ampicilina, sin embargo, existen casos en que dichos agentes son activos, y pueden ser de utilidad terapéutica. Existen varias opciones para el actual y, posiblemente, futuro tratamiento de la infección con ERV como se describe a continuación. El antibiograma se recomienda para verificar la actividad de cualquier agente que se utiliza para tratamiento de los ERV.

Quinupristina-dalfopristina A finales de 1999, quinupristina-dalfopristina se convirtió en el primer antimicrobiano disponible para el tratamiento de la infección por *EfmRV*. Aunque *E. faecium* (el más común de ERV) es susceptible a quinupristina-dalfopristina, la mayoría de los aislamientos de *E. faecalis* y muchos otros no *E. faecium* especies son intrínsecamente resistentes a este agente antimicrobiano. Quinupristina-dalfopristina, es una estreptogramina, que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en el ribosoma 50S bacteriano. Aunque la resistencia es poco común, se desarrolla por la modificación de la molécula diana, inactivación enzimática y/o flujo de salida. Los efectos adversos más comunes son artralgias y/o mialgias, que pueden ser debilitantes y por ello han limitado su uso generalizado.

Linezolid, es el primero de una nueva clase de agentes antimicrobianos llamado oxazolidinonas, disponible desde el 2000. Puede ser administrado por vía oral o intravenosa y, a diferencia de quinupristina-dalfopristina, tiene actividad frente a *E.faecium* y especies no *E faecium* (*E faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*). La formulación oral tiene una excelente biodisponibilidad. En la actualidad, linezolid es el único agente oral aprobado por la Food and Drug Administration para el tratamiento de infecciones causadas por ERV. Linezolid inhibe la síntesis de la proteína ribosomal, pero en sitios diferentes de otros agentes que se dirigen a los ribosomas (cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, aminoglucósidos, tetraciclina). En consecuencia, los mecanismos existentes de la resistencia a estos agentes no confieren resistencia cruzada al linezolid. Produce efectos adversos mielosupresores, especialmente trombocitopenia, que limitan su uso en algunos pacientes. Además, dado que linezolid es inhibidor débil de la monoaminooxidasa, se recomienda una dieta baja en tiramina (como se indica en el prospecto) mientras se toma el medicamento. Linezolid tiene potencialmente importantes interacciones fármaco-fármaco, por ello se recomienda una cuidadosa revisión del régimen terapéutico del paciente, en consulta con un farmacéutico, antes de que se prescriba. Linezolid tiene varias características que lo catalogaban como importante para prevenir la aparición de resistencia. Es un agente sintético, y la resistencia preexistente similar a la observada con agentes antibacterianos naturales (penicilina, vancomicina, etc), se consideró poco probable. Además, debido a que las oxazolidinonas inhiben la síntesis de proteína al unirse al dominio V del ARN ribosomal, la cual es codificada por los genes (ARN ribosomal) presente en varias copias (4 copias en *E.faecalis* y 5-6 en copias *E.faecium*), la selección de la resistencia a las mutaciones que se esperaba para requerir mutaciones en múltiples copias de 23S ribosomal ADN, es un evento poco probable hipotéticamente. Por desgracia, los casos de enterococos resistentes a linezolid han surgido y se han extendido en el ambiente hospitalario. En 2001, en la Clinica Mayo de Rochester Londres, se informó de 7 aislamientos clínicos de *E. faecium* resistentes a la vancomicina y linezolid. La resistencia a linezolid fue identificada, en principio, en un paciente trasplantado de hígado tratado con linezolid por infección intra-abdominales por *E. faecium* resistente a la vancomicina. La cepa se transmitió nosocomialmente a otros 6 pacientes a pesar de aislamiento estricto del caso índice, del uso de habitaciones individuales y de guantes para el personal sanitario antes de entrar en la habitación de los pacientes.

Daptomicina es un lipopéptido cíclico producto de la fermentación de *Streptomyces roseosporus*, disponible en el mercado desde 2003. Presenta actividad bactericida frente a muchas bacterias gram positivas. Se une a la membrana citoplasmática bacteriana a través de un proceso que es dependiente de la concentración de Ca^{2+} . Como consecuencia, se produce la despolarización de la membrana bacteriana, lo que da lugar a una rápida inhibición de la síntesis de proteínas, DNA y RNA que provoca la muerte de la bacteria. La daptomicina tiene actividad in vitro contra los ERV, pero son pocos los datos clínicos publicados en cuanto a su uso para el tratamiento de las infecciones causadas por los ERV. La daptomicina no debe ser utilizada para tratar la neumonía porque varios ensayos clínicos han demostrado una alta tasa de fracaso. Además, ha comenzado a emerger la resistencia a la daptomicina.

Otros Agentes

La **tigeciclina**, es una glicilciclina, un agente antimicrobiano de amplio espectro, disponible desde el año 2005. Esta nueva tetraciclina presenta actividad frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas aerobias y anaerobias, incluyendo aislados resistentes a las tetraciclinas. Similar a la daptomicina este compuesto tiene actividad in vitro contra los ERV, sin embargo, faltan datos clínicos sobre el tratamiento de infecciones causadas por ERV. Muchos de los aislamientos de ERV son susceptibles a la nitrofurantoína, que se ha utilizado para tratar la infección del tracto urinario ERV pero no tiene actividad útil en las otras infecciones por ERV. Opciones futuras para el tratamiento de la infección por ERV puede incluir manopeptimicinas y dalbavancina. **Manopeptimicinas** es una nueva clase de glucopeptidos, son semisintéticos antimicrobianos aislado de *Streptomyces hygroscopicus*. Al igual que la vancomicina, impiden la transglicosidación de la pared celular de peptidoglicano. Son activos contra una amplia variedad de bacterias gram-positivas, incluyendo ERV, y se ha demostrado su actividad bactericida in vivo. La **dalbavancina** es otro glucopeptido semisintético que ha ganado la atención por su régimen de dosificación una vez por semana. Sin embargo, es activo frente a ERV fenotipo VanB, dalbavancina tiene poca actividad frente a el más común de los fenotipos de ERV, el VanA⁽¹⁸⁷⁾.

III. MATERIAL Y MÉTODO

III. 1. Ámbito y periodo del estudio

Nuestro estudio se ha realizado en el Hospital Universitario de Canarias (HUC) que es un Hospital Universitario de tercer nivel ubicado en Tenerife y vinculado académicamente a la Facultad de Medicina de La Universidad de La Laguna. Dispone de 667 camas y cubre el Area Norte de la isla de Tenerife con un total de 481.939 habitantes.

El periodo de estudio se ha realizado desde el 1 de Enero de 2001 al 31 de Diciembre de 2009. Se estudiaron las infecciones por enterococos de todos los pacientes hospitalizados y específicamente aquellos en las que se aisló ERV en una muestra clínica o en una muestra de vigilancia epidemiológica (exudado perianal).

En el periodo de estudio concretamente entre julio y octubre de 2005 se produjo en nuestro hospital el primer brote por *Enterococcus faecium vanA* en Canarias. El brote tuvo lugar en la planta de Nefrología con 16 pacientes implicados además de tres ERV aislados en otros dos hospitales de Canarias: el Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) de 960 camas ubicado también en Tenerife y el Hospital Universitario Insular de Gran Canaria (HUIGC) de 718 camas situado en Las Palmas de Gran Canaria.

III.2. Datos demográficos, clínicos y microbiológicos

Para la recogida de los datos demográficos y clínicos se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes, labor que fue realizada por el Servicio de Medicina Preventiva como parte del programa del control de infección. Fueron incluidos:

- Datos personales y de identificación del enfermo (nombre, nº de historia clínica, edad y sexo).
- Datos administrativos (fecha de ingreso en el hospital, servicio, fecha de alta).

- Datos clínicos (cirugía previa, antecedentes personales, factores de riesgos extrínsecos como por ejemplo dispositivos intravasculares, sondas vesicales, etc.).
- Datos en relación con el aislamiento de ERV (fecha, tipo de muestra).
- Datos correspondientes a las medidas de control adoptadas tras el aislamiento del ERV (días de aislamiento de contacto, estado de portador).

Se siguieron las definiciones de infección o colonización, hospitalaria o comunitaria del CDC (Centres for Disease Control)⁽¹⁸⁸⁾.

III.3. Aislamiento, identificación y estudio de la sensibilidad antibiótica de los ERV en el HUC en el periodo 2001-2009.

Los aislamientos de ERV se realizaron a partir de su crecimiento en Agar Sangre y Agar Chocolate (bioMérieux). La identificación presuntiva se llevó a cabo mediante las pruebas clásicas (morfología, Gram y catalasa) y con las tarjetas de identificación para gram positivos por el Sistema automático Vitek2[®] (ID-GPC; bioMérieux, Vitek Systems, Hazelwood, Mo., USA).

Para el estudio de la sensibilidad antibiótica se utilizaron tarjetas AST-589 por el sistema Vitek2[®] (bioMérieux). Los antibióticos testados fueron los siguientes: ampicilina, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, levofloxacino, norfloxacino, teicoplanina, tetraciclina, vancomicina, quinupristin-dalfopristin, linezolid, gentamicina y estreptomina. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de vancomicina y teicoplanina se confirmó también por E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) siguiendo las instrucciones del fabricante. La susceptibilidad a los distintos antimicrobianos se interpretó, durante los años 2001 hasta el 2007, de acuerdo a las normas de la CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), a partir del 2008 se interpretaron según el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). La tipificación molecular de la resistencia a glucopéptidos se realizó mediante PCR múltiple⁽¹⁸⁹⁾.

III.3.1. Preparación del inóculo para el Sistema Vitek[®] 2 (bioMérieux)

Una vez identificada la colonia mediante las pruebas clásicas (Gram, catalasa, etc) se toman varias colonias aisladas a partir de cultivo puro y se emulsionan en 3 ml de solución salina estéril (NaCl acuoso al 0,45-0,50%, con un ph de 4,5 a7,0) en un tubo de ensayo de plástico transparente (poliestireno) alcanzándose una turbidez final del 0,5% MC Farland utilizando para ello el DensiCHEKTMVITEK2[®](bioMérieux) calibrado.

III.3.2. Sistema Automatizado Vitek[®] 2 (bioMérieux)

Una vez preparado el inóculo se coloca el tubo con la suspensión y la tarjeta GP en un casete. Cada casete consta de 14 posiciones, 2 posiciones por muestra, es decir, en cada casete irán dos tubos por muestra, en el primero irá la suspensión con la tarjeta GP y el segundo tubo irá vacío con la tarjeta AST-589. Se introducirán los datos de las muestras de cada casete en el Sistema de Consola Satélite y luego se cargan los casetes en el Vitek[®] 2.

La tarjeta de identificación GP está diseñada para la identificación automatizada de las bacterias gram positivas más significativas. Se basa en métodos bioquímicos establecidos y sustratos recientemente desarrollados. Consta de 43 test bioquímicos que miden la utilización de la fuente de carbono, las actividades enzimáticas y la resistencia. Se obtienen resultados de identificación finales en aproximadamente 8 horas o menos.

La tarjeta AST representa una metodología de test automatizado basado en la técnica de la concentración mínima inhibitoria (CMI) descrita por MacLowry⁽¹⁹⁰⁾ y Gerlach⁽¹⁹¹⁾. La tarjeta AST es básicamente una versión miniaturizada y abreviada de la técnica de dilución doble para las CMI determinadas mediante el método de microdilución. Cada tarjeta AST contiene 64 pocillos. Un pocillo control que contiene sólo medio de cultivo microbiológico, mientras que el resto de los pocillos contienen concentraciones de un antibiótico específico combinado con el medio de cultivo.

Una vez que el casete está dentro del Vitek[®]2 pasa por distintas estaciones:

1) Estación surtidor. Aquí se transfiere desde el tubo de inoculación un volumen preestablecido desde el tubo de inoculación con la tarjeta GP al tubo con la tarjeta AST-589.

2) Estación de llenado. Se inoculan todas las tarjetas de un casete con la suspensión contenida en sus tubos de inoculación correspondientes.

3) Estación de sellado. Esta estación completa las funciones en el interior del Vitek[®]2 que prepara las tarjetas de test para la incubación y lectura.

4) Incubación y lectura de las tarjetas. Las tarjetas se irán colocando en las ranuras de un carrusel dónde permanecerán durante todo el ciclo de lectura. Durante el tiempo que están en el carrusel, las tarjetas de test se incuban a una temperatura media de 35,5°C.

El Vitek[®]2 realiza los análisis de identificación y susceptibilidad supervisando continuamente el crecimiento y la actividad de los organismos en el interior de los pocillos de las tarjetas de test. Dos sistemas ópticos diferentes realizan esta función; sistema óptico de fluorescencia y sistema óptico de transmitancia:

a) El sistema óptico de fluorescencia detecta indirectamente el crecimiento y la actividad de los organismos a través de un producto químico de su crecimiento llamado fluoróforo el cual absorbe luz en una longitud de onda de 365 nm, e inmediatamente vuelve a emitir a una longitud de onda diferente de 445 nm. La cantidad de luz reemitida producida proporciona un excelente indicador de la actividad de crecimiento.

b) El sistema óptico de transmitancia utiliza luz visible para medir directamente el crecimiento del organismo.

En cuanto a la lectura de las tarjetas AST el sistema evalúa el patrón de crecimiento de cada organismo en presencia del antimicrobiano en relación con el crecimiento registrado en el pocillo de control. El sistema comunicará una

interpretación de categorías (sensible, intermedio y resistente) junto con una CMI, según las interpretaciones definidas por la Food and Drug Administration (FDA) y la CLSI.

III.3.3. Comprobación de la resistencia a la vancomicina y teicoplanina mediante E-test®.

El E-test® es una técnica cuantitativa para determinar la sensibilidad antibiótica de un microorganismo. El E-test cuantifica en términos de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Estas CMI están predefinidas en un gradiente continuo de concentración antibiótica. Los E-test son tiras de plástico finas, inertes y no porosas de 5 mm de ancho y 60 mm de largo. Uno de los lados está calibrado con una escala de CMI en µg/ml. El otro lado tiene, seco y estabilizado, un gradiente exponencial del antibiótico que queremos estudiar. Cuando las tiras de E-test son aplicadas sobre el agar, se produce una difusión del antibiótico inmediata, creándose un gradiente continuo y exponencial en el agar alrededor de la tira. El crecimiento bacteriano se produce formando una elipse. El punto de corte es el que se produce en el encuentro del final de la elipse con la tira.

Procedimiento:

Se sacan las tiras de la nevera, las tiras de E-test de vancomicina y teicoplanina 30 minutos antes para que se atemperen. Se cogen varias colonias y se crea una suspensión de 0,5 MCFarland de turbidez. Se sumerge una torunda en la suspensión, se libera el exceso de suspensión exprimiendo la torunda contra las paredes del tubo de la suspensión, y descargamos el contenido de la torunda en una placa de agar Muller-Hinton. Se esperan de 10-15 minutos y se colocan las tiras de E-test® siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa se incuba durante 24h a 35°C. Transcurrido el tiempo de incubación se observa el punto de corte que corresponderá a la CMI para ese antibiótico. La interpretación se hará siguiendo los criterios de la CLSI y a partir del 2008 del EUCAST para la vancomicina y teicoplanina.

III.4. Tipificación molecular de la resistencia a los glucopéptidos por PCR.

III.4.1 Extracción del ADN

Antes de llevar a cabo una PCR hay que realizar una extracción del ADN bacteriano. Para ello utilizamos dos métodos: uno basado en una extracción convencional y a partir del 2008 utilizamos otro basado en el sistema automatizado de extracción de ADN Maxwell[®] 16 IVD Instrument (Promega Madison, WI).

III.4.1.1. Extracción convencional del DNA

A partir de un cultivo reciente en placa, se inocula de una a tres colonias en caldo LB (Luria Bertani) y se deja 18 horas en agitación a 37°C. De esta suspensión celular saturada se cogen 1 ml y se centrifuga a 5.000 rpm 5 minutos descartándose el sobrenadante.

1. Se le añade 100 µl de Tampón de lisis I (6 mM Tris HCl (pH 7'6); 1 M de NaCl; 100mM EDTA (ph 7'5); 0'5% Brij 58; 0'2% Deoxicolato; 0'5% de Sarcosilato (SLS) al que se le agregan los enzimas a la concentración deseada. Los volúmenes siguientes son los correspondientes a 1ml de tampón de lisis:

Lisozima 100 mg/ml (Sigma).....20µl
Lisostafina 15 mg/ml (Sigma).....6,6 µl

2. Se resuspende bien el sedimento y se incuba a 37°C durante 1 hora.
3. Se añade 150 µl de TS (20 mM Tris HCl (pH 8'0); 1% SDS) junto con Proteinasa K y se deja digerir toda la noche a 37°C.
4. Se añade 250 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (49; 49; 2) (Merck). Se agita en vortex hasta que se mezcle bien.
5. Se centrifuga 5 minutos a 120.000 rpm.
6. Se traspasa la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorff y se añaden 750µl de etanol absoluto (Merck). Se mezcla bien y típicamente se verá un precipitado de DNA.

7. Se centrifuga 5 minutos a 12.000 rpm y se desecha el sobrenadante.
8. Se lava el sedimento con 500µl de etanol al 70%. Se centrifuga 5 minutos a 120.000 rpm y se decanta el sobrenadante. Se deja secar unos 10 minutos.
9. Se resuspende en 200µl de TE (10 mM Tris HCl (pH 8'0); 0'1mM EDTA). Se guarda a 4 °C.

III.4.1.2. Extracción del DNA de ERV mediante el aparato Maxwell® (Promega Madison USA).

Este sistema nos permite aislar DNA desde la colonia en aproximadamente 53 minutos.

La extracción consta de dos fases, una fase de lisis que se realiza fuera del aparato y otra que es la extracción que se realiza en el interior del aparato.

- a) Fase de lisis: en un tubo de microcentrífuga se introducen 200µl de solución salina estéril y añadimos la colonia. Luego añadimos 20µl de proteinasa K y 200µl de lisis Buffer que se encuentran en el kit del Maxwell® y se introduce toda la mezcla en un bloque térmico a 56°C durante 10 minutos.
- b) Fase de extracción: se lleva a cabo en el Maxwell® siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.4.2. PCR múltiple para detección de genes de resistencia *vanA*, *vanB*, *vanC*.

Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en el mismo principio general común para todas ellas: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación.

Para la confirmación de genes de resistencia utilizamos una PCR múltiple ya descrita Bell JM y cols.⁽¹⁸⁹⁾ empleando para ello los siguientes reactivos:

- 15 µl Agua destilada estéril
- 2,5 µl Solución B_j al 10x
- 1 µl Cl₂ Mg (Promega Madison,U.S.A.)
- 2 µl dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP)
- 1 µl Primer mix (van ABF, vanAR/vanB, vanC1F/C1R, van C23F/C23R), cuyas secuencias se aprecian en la figura n°2)
- 2.5 µl DNA extraído de la muestra
- 1 µl Taq polimerasa 1 U/ µl (Roche)

Figura 2 . Secuencias de los primer empleados en la PCR.

Primer	Sequence	Specificity	Location within gene (strand) ^a
VanABF	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC	<i>vanA</i>	358-378 (+)
VanAR	CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	<i>vanA</i>	568-588 (-)
VanBR	GCCGACAATCAAATCATCCTC	<i>vanB</i>	664-684 (-)
VanC1F	TGGTATTGGTATCAAGGAAACC	<i>vanC1</i>	139-160 (+)
VanC1R	AGATTGGAGCGCTGTTTTGTC	<i>vanC1</i>	565-585 (-)
VanC23F	CAGCAGCCATTGGCGTACAA	<i>vanC2</i> and <i>vanC3</i>	431-450 (+)
VanC23R	CAAGCAGTTTTTGTAGTAGTTC	<i>vanC2</i> and <i>vanC3</i>	1006-1027 (-)

^a Position in nucleotide sequence relative to the initiation codon. +, positive strand; -, negative strand.

La amplificación de DNA se llevó a cabo en un sistema de termociclador de PCR iCycler[®] (Biorad), con el siguiente esquema de ciclos:

- 1) Desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos
- 2) 34 ciclos de amplificación: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, 2 minutos de hibridación a 60°C y 2 minutos de extensión a 72°C.
- 3) Un paso final de extensión a 72°C durante 5 minutos.

La presencia o no de amplificación se evidenció mediante electroforesis convencional (TBE 0,5 X, 110 Voltios) pipeteando 5 µl de cada reacción de PCR y 5 µl del peso molecular en los diferentes pocillos de un gel de agarosa al 2%. Los

amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz UV tras tinción con Bromuro de etidio (Serva) al 5%.

III.5. Estudio del tipaje molecular mediante macrorrestricción: electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Para la determinación de la clonalidad de los aislados de ERV se utilizó la técnica de macrorrestricción y electroforesis de campo pulsado (PFGE). Mediante esta técnica obtendremos patrones de restricción sencillos que representan el ADN bacteriano distribuidos en unas 10-12 bandas con movilidades electroforéticas distintas.

Los pasos a seguir son los siguientes:

III.5.1. Preparación de insertos y lisis celular

A partir de cultivos puros en medios sólidos, de no más de 18-24 horas de incubación, se inocula de una a tres colonias en caldo LB (Luria Bertani) y se incuba a 37°C durante 18-24 horas.

Se estandarizó el inóculo mediante espectrofotometría. Se midió la absorbancia a 540 nm y se escogió el volumen según la densidad óptica (D.O.):

10 ml para una D.O. de 0.6 a 0.7

7 ml para una D.O. de 1.3

5 ml para una D.O. mayor de 1.5.

El volumen escogido se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 4-5ml de PET IV (10mM Tris base; 1 M NaCl). Se pasa por vortex y se centrifuga 10 minutos a 3.000 rpm, se decanta el sobrenadante y se resuspende en 1 ml de PET IV.

III.5.2. Extracción del ADN bacteriano

Este paso obliga a inmovilizar las células bacterianas en bloque de agarosa, en los que más tarde se llevará a cabo la lisis, de manera que el ADN cromosómico también quede embebido en la agarosa de bajo punto de fusión, el objetivo es que el ADN permanezca íntegro y no se fracture accidentalmente lo cual afectaría a la reproducibilidad de la técnica.

Se limpia con agua destilada y etanol los moldes de los insertos (primero con agua destilada, luego con etanol y finalmente con agua destilada de nuevo). Dejamos secar totalmente y sellamos la parte inferior con cinta adhesiva transparente.

Los insertos se preparan al 0'8% de concentración final de agarosa de bajo punto de fusión (InCert agarose FMC Bioproducts; EEUU). Se prepara la cantidad necesaria de agarosa de bajo punto de fusión al 1'6% y se mantiene a 40-45°C. Se mezclan bien 300 µl de agarosa y 300 µl de la suspensión preparada con PET IV en un tubo de microcentrífuga. Para preparar 5 insertos por aislamiento, se transfieren aproximadamente 100 µl en cada pocillo del molde. Se deja solidificar a 4 °C durante 40-60 minutos.

Una vez solidificados los insertos, se retira la cinta adhesiva y se extraen del molde con la ayuda de una pera de goma. Presionando con la pera en la parte superior del molde, se transfieren los insertos directamente a un tubo con 2 ml de tampón de lisis I. Para conseguir la lisis celular, los bloques se sumergen en 2 ml de una solución de lisis I (6 mM Tris HCl pH 7.6, 1 M NaCl, 100mM EDTA pH 7.5, 0.2% deoxicolato de sodio, 0.5% sarcosilato, 0.5% brij 58,) que contiene los enzimas precisos para romper las células como lisozima (100 mg/ml), lisostafina (15 mg/ml), RNAsa (10 mg/ml), incubando todo durante 24h a 37° C. Pasado ese tiempo se decanta la solución de lisis I y se sustituirá por 2 ml de una solución lisis II (EDTA 0.5 M (pH 9-9.5); Sarcosilato 1%, que contiene 10 mg/ml de proteinasa-K y se volverá a incubar durante 48h a 50-55° C, así obtendremos el ADN libre de nucleasas y proteínas. Los insertos se guardan a 4°C en esta solución (pueden guardarse durante un año aproximadamente).

III.5.3. Lavado de los insertos

Antes de proceder a la digestión con enzimas de restricción es necesario inactivar la proteinasa K y eliminar los detergentes utilizados para la lisis celular, ya que estos podrían inactivar los enzimas de restricción.

Se transfieren los insertos a un tubo con tapa de rosca de 10 ml estéril con 5-6 ml de TE [10mM Tris HCL (pH= 8), 1mM EDTA (pH=8)]. Lo dejamos a 4°C durante 16-18 horas. Se cambia el TE varias veces en un intervalo de 1 hora aproximadamente. Una vez finalizados los lavados se guardan en TE a 4°C (en esta solución se pueden guardar durante 1 mes).

III.5.4. Digestión del ADN con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte (Macrorrestricción)

Para la digestión del ADN se realizó según el protocolo de Smith y colaboradores ⁽¹⁹²⁾ se coge un cuarto del bloque de agarosa y se introduce en un tubo estéril con una solución de restricción que contiene:

- 143 de agua estéril,
- 20µl del tampón específico “J” del enzima *SmaI* (Promega Madison, U.S.A.),
- 2µl de BSA a una concentración de 10mg/ml (Promega Madison, U.S.A.)
- 30 UI (3µl) de *SmaI* (Promega Madison, U.S.A.).

El volumen final es de 200µl. Se deja incubando 16-18 horas a 30°C.

II.5.5. Elaboración del gel de agarosa

Se elaboran 100ml de gel de agarosa (Serva) a una concentración del 1 % en TBE 0.5X y se disuelve al microondas. Se deja atemperar y se vuelca en el molde para que se solidifique.

Una vez solidificado el gel se procede a cargar los pocillos con los insertos digeridos. En todos los geles de PFGE además de las muestras se incluyeron controles

de peso molecular adecuados que facilitan la comparación entre patrones y la identificación de determinados fragmentos de ADN. El peso molecular utilizado es el ADN de concatámeros del fago lambda (Lambda ladder PFGE marker, Promega Madison, U.S.A.) que genera fragmentos entre 50 y 500kb en incrementos progresivos de 50 KB.

III.5.6. Electroforesis de campo pulsado

El sistema de electroforesis utilizado es el creado por Chu y col. en 1986 denominado *Contour Clamped Homogeneous Electric Field* (CHEF). En este sistema el campo eléctrico se genera por electrodos puntuales equidistantes entre sí y dispuestos en forma hexagonal. Los electrodos que determinan el ángulo seleccionado, que puede variar entre 60° y 120°, presentan mayor potencial que el resto de los electrodos, que funcionarán con potenciales intermedios. Este hecho genera un campo eléctrico homogéneo a lo largo de todo el gel⁽¹⁹³⁾.

El aparato utilizado para la electroforesis de campo pulsado fue el CHEF-DRII[®] System (Bio-Rad, La Jolla, California). Se añaden 2.200-2500 ml de TBE 0'5X a la cubeta de electroforesis y conectamos el sistema de recirculación y refrigeración del tampón. Una vez se ha alcanzado la temperatura deseada, se introduce el gel ya cargado en la cubeta. Las condiciones de electroforesis que se eligieron fueron las siguientes:

- Bloque 1: 0,1-10 pulsos (segundos) en 8 horas
- Bloque 2: 10-35 pulsos (segundos) en 16 horas
- Temperatura: 14°C
- Voltaje: 6 V/cm

III.5.7. Tinción y visualización

Una vez terminada la electroforesis se tiñe el gel con bromuro de etidio y posteriormente se visualiza y fotografía bajo luz UV. Los patrones de bandas fueron comparados siguiendo los criterios de Tenover y cols.⁽¹⁵⁰⁾ y analizados por el programa informático InfoQuestTMFP (BioRad). Los patrones de bandas obtenidos fueron

comparados por el método UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) utilizando el coeficiente de Dice.

El primer patrón de restricción encontrado se designó con la letra A. Los patrones que están probablemente o posiblemente relacionados se consideran subtipos de A y se designaron como A₁, A₂, etc. Los siguientes patrones encontrados no relacionados se designaron continuando con el alfabeto.

III.6. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Un subconjunto de aislamientos de ERV representativos de cada PFGE tipo fue estudiado por MLST utilizando el esquema previamente descrito para su realización⁽¹⁵⁹⁾.

Para ello se seleccionaron los siete genes esenciales siguientes:

adk (adenilato kinasa): (*adk*, 5-TAT GAA CCT CAT TTT AAT GGG-3 y *adk2* 5-GTT GAC TGC CAA ACG ATT TT-3)

atpA (subunidad alfa ATP sintasa): (*atpA1*, 5-CGG TTC ATA CGGAAT GGC ACA-3, y *atpA2*, 5-AAG TTC ACG ATA AGC CAC GG-5)

ddl (D-alanina: D-alanina ligasa): (*ddl1*, 5-GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT G-3, y *ddl2*, 5-AAA AAG AAA TCG CAC CG-3)

gyd (gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa): (*gyd1*, 5-CAA ACTGCT TAG CTC CAA GG C-3, y *gyd2*, 5-CAT TTC GTT GTC ATA CA GC-3)

gyh (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa): (*gdh1*, 5-GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT-3, y *gdh2*, 5-CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA-3)

purk (subunidad ATPasa fosforibosilaminoimidazol carboxilasa): (*purK1*, 5-GCA GAT TGG CAC ATT GAA AGT-3, y *purK2*, 5-TAC ATA AAT CCC CCT GTT TY-3)

pstS (transportador de ATP fosfato): (*pstS1*, 5-TTG AGC CAA TCGAA GCT GGA G-3, y *pstS2*, 5-CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC-3)

De cada uno de estos genes se seleccionó un fragmento interno de 400 a 600 pb los cuales se amplificaron mediante las condiciones de PCR descritas a continuación:

- 1) Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
- 2) 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos
- 3) 50 °C durante 30 segundos
- 4) 72°C durante 30 segundos
- 5) Extensión a 72°C durante 5 minutos.

Los productos de la PCR fueron purificados y secuenciados. A cada secuencia de cada gen se le considera un alelo el cual se alinea con las ya existentes en una base de datos centralizada (www.efaecium.mlst.net). Si la secuencia coincide, el programa asigna uno de los alelos ya identificados; en caso contrario, asigna un nuevo número. Una vez asignado un número a cada alelo se genera un perfil alélico que será la combinación de los siete alelos ya asignados. Cada perfil alélico define lo que se llama "tipo de secuencia" o "*sequence type*" (ST). La aplicación de un algoritmo matemático de agrupación, concretamente el método UPGMA, al conjunto de STs permite estimar las relaciones genéticas entre cepas. Las secuencias obtenidas se introdujeron en la página web <http://www.efaecium.mlst.net> para la obtención de un perfil numérico que nos permitirá reconocer los clones con otros ya descritos internacionalmente y poder establecer un estudio poblacional.

III.7. La amplificación de los genes *hyl* y *esp*

La presencia de los genes *hyl* y *esp* fue investigada por PCR utilizando los cebadores específicos previamente descritos⁽¹⁸¹⁾. La secuencia de los primers utilizados para la PCR fueron: *esp11* [5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3'] y *esp12* [5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3']; *14F* [5'-GATTTCATCTTTGATTCTTGG-3'] y *12R* [5'-AATTGATTCTTTAGC ATCTGG-3']). Las condiciones de la PCR fueron:

- 1) desnaturalización a 95°C durante 15 minutos
- 2) 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos

- 3) 52°C durante 30 segundos
- 4) 72°C durante 1 minuto
- 5) Extensión a 72°C durante 7 minutos.

III.8. PCR a tiempo real GeneOhm™VANR assay® (Becton Dickinson).

III.8.1. Principio de la prueba

El BD GeneOhm™ VanR es una prueba cualitativa para la detección rápida de la resistencia a la vancomicina (*vanA* y *vanB*) directamente de muestras perianales y/o rectales. Detecta la presencia de los genes *vanB* y *vanA* asociados con los ERV. La prueba BD GeneOhm™ VanR se puede utilizar como ayuda para identificar, prevenir y controlar la colonización resistente a vancomicina en hospitales, pero no con la intención de diagnosticar infecciones de ERV ni para orientar o controlar el tratamiento de infecciones de ERV.

Después de la lisis de las muestras, si el gen *vanA* y *vanB* está presente, se amplifica. El ADN amplificado se detectan con sondas llamadas “moléculas beacon”. Estas sondas tienen forma de horquilla, que consiste en una sola cadena de oligonucleótidos marcados en un extremo con un “quencher” (molécula que inhibe la fluorescencia) y en el otro extremo con un fluoróforo. En ausencia del ADN del gen *vanA* o *vanB* no hay fluorescencia, en caso contrario, se abre la horquilla, se produce la hibridación y se emite fluorescencia. Para la detección del amplicón *vanA*, la sonda contiene el fluoróforo FAM en el extremo 5' y el quencher DABCYL en el extremo 3'. Para la detección del amplicón *vanB*, la sonda contiene el fluoróforo Roja Texas en el extremo 5 y el quencher DABCYL el extremo 3'. La cantidad de fluorescencia depende de la cantidad de ADN amplificado. El SmartCycler® monitoriza la fluorescencia emitida por cada sonda, interpreta los datos y proporciona un resultado final.

III.8.2. Procedimiento.

a) Extracción del ADN cromosómico

- 1) Las torundas perianales o rectales se introducen en un tubo de tampón de muestra (Simple buffer) y se vortea durante 5 minutos.
- 2) Transferir 50µl de la suspensión anterior a un tubo de lisis (Lysis tube) y vortear 5 minutos a alta velocidad (14000-21000g).
- 3) Calentar a 95°C durante 10 minutos.
- 4) Mantener el tubo de lisis con su contenido en el congelador (-20°C) durante 45 minutos mínimo.

c) Prueba Geneohm™VANR assay® (Becton Dickinson)

Colocar el número necesario de tubos Master Mix en un bloque de enfriamiento.

- 1) Añadir 225µl de diluyente por cada tubo Master Mix.
- 2) Agitar con vortex durante 5-10 segundos.
- 3) Colocar el número necesario de tubos de reacción SmartCycler® en el bloque de enfriamiento.
- 4) Colocar un tubo Control DNA en bloque de enfriamiento y añadir 225µl de tampón de muestra. Agitar con vortex 5-10 segundos.
- 5) Añadir 25 µl de Master Mix en cada tubo de reacción SmartCycler®.
- 6) Añadir 3 µl de Control Positivo a su correspondiente tubo de SmartCycler®.
- 7) Añadir 3 µl de tampón de muestra al tubo de SmartCycler® que se usará como control negativo.
- 8) Añadir 3 µl de las muestras lisadas a cada uno de sus correspondientes tubos de SmartCycler®.
- 9) Centrifugar todos los tubos de reacción SmartCycler® durante 5-10 segundos. Mantener los tubos de reacción en el bloque de enfriamiento antes de colocarlos en el instrumento.
- 10) Transferir al instrumento SmartCycler® y comenzar el análisis que durará entre 60-75 minutos.

c) Interpretación de los resultados:

Resultado notificado de la prueba	Interpretación del resultado
NEG (negativo)	No se han detectado gen <i>vanA</i> ni <i>vanB</i> .
POS	Se ha detectado ADN del gen de resistencia <i>vanA</i> no se ha detectado <i>vanB</i> ; probable ERV.
POS Presunto	Se ha detectado ADN del gen de resistencia <i>vanB</i> (no se ha detectado <i>vanA</i>); presunto ERV. Se recomienda realizar cultivo.
Positivo	Se ha detectado ADN de los genes de resistencia <i>vanA</i> y <i>vanB</i> .
Unresolved (sin resolver)	Muestra inhibida o defecto de reactivo.
ND	Sin determinar debido a fallo en el módulo I-CORE.

III.9. Medidas de control ante un paciente infectado o colonizado por ERV en el HUC.

La instauración de estas medidas de control siempre se realiza en el momento en el que el Servicio de Microbiología informa de la detección de un aislamiento de ERV al Servicio de Medicina Preventiva el cual establece las siguientes medidas de control aprobadas por el Comité de Infecciones del HUC:

1) Informar al personal de la planta donde se aísla el ERV de la epidemiología del microorganismo, de las normas de aislamiento y su seguimiento. Cuando se establece el aislamiento de contacto el Servicio de Medicina Preventiva llevará por escrito las normas de aislamiento, la carta de aislamiento y un cartel para la puerta de la habitación.

2) Aislamiento de contacto:

- Habitación individual
- Uso de guantes y bata desechable al entrar a la habitación.

- Uso de material no crítico de uso exclusivo del paciente.
- Lavado de manos al entrar y al salir de la habitación.

3) Limpieza del ambiente

Las salas se limpian regularmente como parte del programa general de higiene hospitalaria siguiendo la política del HUC. Después de un brote o un incidente de colonización o infección con ERV, las habitaciones de aislamiento (o de toda la sala después de un brote más extenso) deben limpiarse intensamente.

4) Estudio de portador

El control de estado de portador se realiza una vez por semana al paciente así como de la localización dónde se aisló inicialmente.

Para el control de portador se pueden obtener muestras perianales o muestra rectales. La muestra perianal se obtiene con una torunda previamente humedecida con suero salino estéril, la cual se pasará por la zona perianal con movimientos circulares. La muestra rectal se obtiene insertando la torunda a través del esfínter anal (la torunda debe mostrar heces). Las muestras se deben obtener por la mañana, antes del baño.

5) Retirada del aislamiento.

La retirada del aislamiento se realizará cuando se obtengan 3 resultados negativos en al menos 3 muestras clínicas y 3 controles, obtenidas con una semana de diferencia.

6) Transferencia de pacientes con ERV a otra institución sanitaria

Si un paciente con ERV es transferido a otra institución sanitaria, el personal clínico y de control de la infección de esta institución será informado.

III.10. Medidas de control durante el brote por ERV en la planta de Nefrología del HUC.

Un brote fue definido como un incremento temporal en la incidencia producida por un determinado microorganismo en la población estudiada, o alternativamente, un

incremento temporal de la colonización con o sin incremento de la incidencia de la infección⁽¹⁹⁴⁾.

Se aplicaron medidas de control de la infección anteriormente descritas incluyendo a todos los pacientes ingresados en el Servicio de Nefrología.

Una decisión importante fue trasladar el día 24 de octubre del 2005 la planta de hospitalización del Servicio de Nefrología a una nueva planta, que estaba ya, previamente diseñada y en marcha su adecuación. Su ubicación, es la 2ª planta del cuerpo A.

III.11. Estudios de vigilancia activa (cribado de portadores) de ERV en el Hospital Universitario de Canarias en el periodo 2001-2009.

III.11.1. Estudios de vigilancia activa (cribado de portadores) de ERV en el Hospital Universitario de Canarias a partir del brote del 2005.

Desde el 17 de octubre del 2005 hasta el 13 de Marzo del 2006 todos los pacientes ingresados en la planta de Nefrología fueron cribados una vez por semana con cultivos de muestras perianales en busca de colonización por ERV. Se recogieron un total de 391 muestras perianales que fueron cultivadas en dos tipos diferentes de medios de cultivo sólidos en placa para detectar el mayor número posible de portadores. No se utilizó en ningún momento cultivo en caldo previo. Estos medios de cultivos fueron los siguientes: Slanez and Bartley (OXOID, Hampshire, England) con un disco de 30 µg vancomicina (bioMérieux, Marcy l'etoile, France) y Campyloset (bioMérieux, Marcy l'etoile, France). Ambos medios se incubaron durante 24 y 48 horas, realizándose lectura de las placas también a las 24 y 48 horas. Se trabajaron entre tres y cinco colonias sospechosas por paciente, que fueron posteriormente subcultivadas en Agar sangre para la realización de la identificación y antibiograma mediante el sistema VitekII (bioMérieux, Marcy l'etoile, France).

III.11.2. Estudios de vigilancia activa (cribado de portadores) de ERV en el Hospital Universitario de Canarias en el año 2007.

Los días 24 y 26 de septiembre del 2007 se llevó a cabo un cribado en la planta de Nefrología, dónde se recogieron 32 muestras perianales de 19 pacientes. A 13 se le tomaron muestras perianales ambos días y al resto sólo en uno.

Todas las muestras se cultivaron en dos medios de cultivo sólidos: en Agar chromIDTMVRE (bioMérieux, Marcy l'etoile, France) y en Slanetz and Bartley (OXOID, Hampshire, England) al cual le añadimos dos discos de 30 µg de vancomicina.

También se realizó, a todas las muestras, un cultivo previo para enriquecimiento en Brain Heart Infusión (BHI o caldo corazón cerebro) al que se le añadieron discos de 30 µg de vancomicina hasta conseguir una concentración de 3,3mg/ml, el cual tras 24 horas de incubación se subcultivó en Agar chromID VRE (bioMérieux, Marcy l'etoile, France). La lectura de las placas se realizó a las 24 y 48 horas de incubación. A cualquier colonia sospechosa se le realizaba gram, resiembra en medio agar sangre e identificábamos por sistema Vitek2[®].

III.11.3. Estudios de vigilancia activa (cribado de portadores) de ERV en el Hospital Universitario de Canarias en el año 2009.

Este estudio se realizó en el periodo comprendido entre marzo y junio del 2009. Se tomó una muestra perianal a 185 pacientes: 60 de Hemodiálisis, 47 de Cirugía General Digestiva, 36 de Medicina Interna, 19 de Oncología Médica y 23 de Nefrología. Todas las muestras se sembraron en el medio de cultivo Enterococcosel[®] (Becton Dickinson) el cual es un medio cromogénico y selectivo para la detección de ERV. A continuación la torunda utilizada para la siembra en medio sólido se introducía en un tubo con solución buffer, la cual agitábamos en vórtex durante 60 segundos y separábamos 50µl para realizar la PCR a tiempo real GeneOhmTMVAnR Assay[®](Becton Dickinson) para detección de la presencia de genes *vanA* y *vanB*. Seguidamente se introducía, la misma torunda, en el medio de enriquecimiento Brain-Heart Infusión[®](Oxoid) al cual le añadimos discos de 30µg de vancomicina y que tras 24

horas de incubación se subcultivó en el medio Enterococcosel[®]. Se realizaron lecturas en los medios sólidos a las 24 y 48h de su siembra tanto directa como a partir del caldo de enriquecimiento. A cualquier colonia sospechosa se le realizaba gram, resiembra en medio agar sangre y posterior identificación y estudio de sensibilidad antibiótica por sistema Vitek2[®].

III.12. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba estadística Regresión de Poisson, comparando cada año con el resto, de las densidades de incidencia de las infecciones por *E.faecalis* y *E. faecium* (tabla 3) utilizando para ello como numerador el número de infecciones anual y como denominador el número de estancias.

También hemos utilizado la Regresión de Poisson para la densidad de incidencia de bacteriemias por *E.faecalis* y *E. faecium* (tabla 12).

Por último, hemos comparado las proporciones de las infecciones según la localización por *E.faecalis* y *E. faecium* con la prueba estadística de Johckheere-terpstra y calculado el Riesgo Relativo (tablas 4 y 5).

IV. RESULTADOS

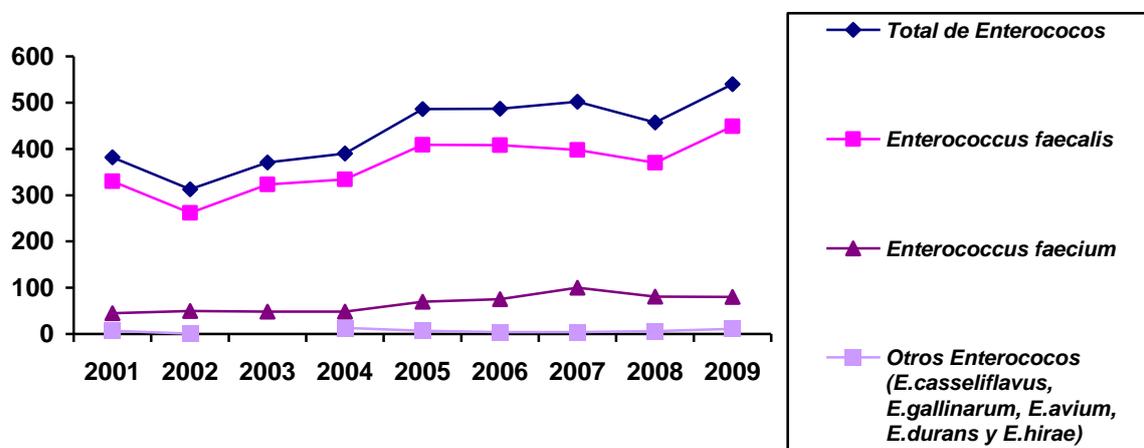
IV.I. Infecciones por *Enterococcus spp.* en el HUC durante el periodo 2001 – 2009

A lo largo del periodo de estudio se han aislado en el HUC los enterococos que figuran en la tabla 2 y figura 3, indicando las diferentes especies. Se incluyen tanto los aislados de Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria como de las comunitarias.

Tabla 2. Infecciones por *Enterococcus spp.* en el HUC durante el periodo 2001 – 2009

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
<i>E.casseliflavus</i>	2	-	-	4	-	-	-	-	1	7
<i>E.gallinarum</i>	-	1	-	-	2	-	-	3	3	9
<i>E.avium</i>	3	-	-	2	4	4	1	2	7	23
<i>E.durans</i>	2	-	-	2	-	-	3	1	-	8
<i>E.hirae</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>E.faecalis</i>	330	262	323	334	409	408	398	370	449	3283
	86,4%	83,7%	87%	85,6%	84,2%	83,8%	79,3%	80,9%	83,2%	
<i>E.faecium</i>	45	50	48	48	70	75	100	81	80	597
	11,8%	15,9%	12,9%	12,9%	14,4%	15,4%	19,9%	17,7%	14,8%	
TOTAL Todos Enterococos spp.	382	313	371	390	486	487	502	457	540	3928
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

Figura 3. Infecciones por *Enterococcus spp.* en el HUC durante el periodo 2001 – 2009



IV.2. Densidad de incidencia de infecciones por *Enterococcus spp.* en el HUC durante el periodo (2001-2009).

En la tabla 3 y figura 4 se reflejan las densidades de incidencia de infecciones por enterococos *E. faecalis* y *E. faecium* durante el periodo en estudio. Dado el bajo número de aislamientos de otras especies de enterococos no se ha calculado una densidad de incidencia específica para ellos, apareciendo solamente incluidos en la de todos los enterococos.

Se incluyen tanto Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria como comunitarias.

Tabla 3. Densidad de Incidencia de infecciones por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* en el HUC durante el periodo 2001-2009.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
ESTANCIAS	205.728	203.398	211.000	211.650	212.831	214.314	216.572	205.532	206.713
DI Efc	1,6	1,3	1,5	1,6	1,9	1,9	1,8	1,8	2,2
DI Efm	0,2	0,3	0,2	0,23	0,33	0,35	0,46	0,39	0,39
DI Etotol	1,86	1,54	1,76	1,86	2,28	2,27	2,32	2,22	2,61

ESTANCIAS= total de días anuales de estancia hospitalaria.

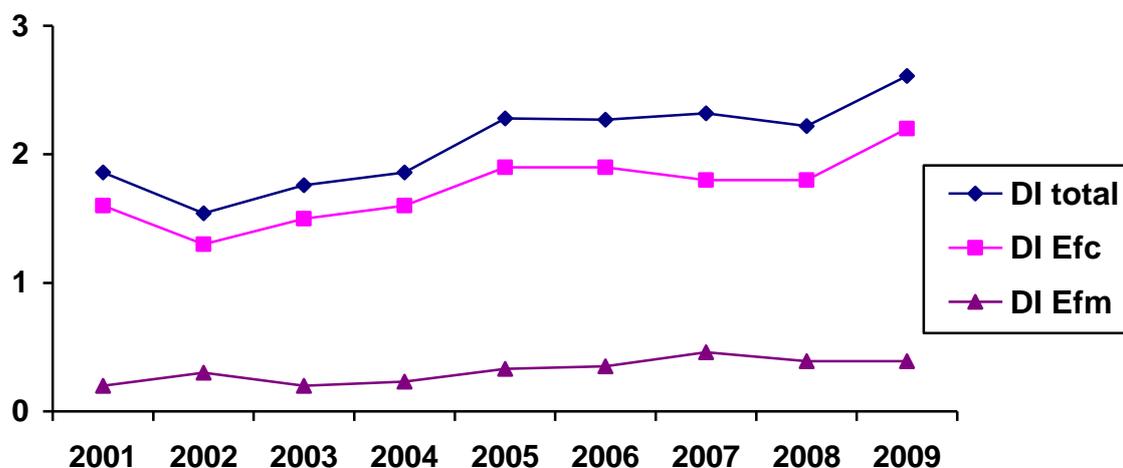
DI Efc = densidad de incidencia de infecciones por *E. faecalis*.

DI Efm = densidad de incidencia de infecciones por *E. faecium*

DI Etotol= densidad de incidencia de infecciones por *Enterococcus spp.* total.

DI= Densidad de Incidencia= $\frac{\text{número de infecciones anual}}{\text{número de estancias (días)}} \times 1000$

Figura 4. Densidad de Incidencia de por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus spp.* total en el HUC durante el periodo 2001-2009.



DI Efc = densidad de incidencia de infecciones por *E. faecalis*

DI Etotol= densidad de incidencia de infecciones por *Enterococcus spp.* total.

DI Efm = densidad de incidencia de infecciones por *E. faecium*

IV. 3. Infecciones por *Enterococcus spp.* por especie y localización clínica en el HUC en el periodo (2001-2009).

Para el estudio de infecciones según localización hemos establecido las siguientes: infecciones del tracto urinario, bacteriemias, infecciones de heridas, piel y partes blandas. El resto de localizaciones se incluyen en OTRAS. En la base de datos no se han reflejado separadamente las infecciones de localización quirúrgica.

En las tablas 4 hasta la tabla 10 se han ido agrupando las infecciones por enterococos anualmente según la localización clínica. Hemos incluido las infecciones del tracto urinario, bacteriemias, infecciones de heridas, piel y partes blandas y el resto la hemos incluido como otras localizaciones.

Tabla 4. Infecciones por localización clínica de *E. faecalis*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
ITU	169 51,2%	109 41,6%	146 45,2%	135 40,4%	157 38,38%	148 36,3%	152 39,19%	115 31%	149 33,18%	1280 38,99%
Bacteriemias	52 15,75%	42 16%	58 17,95%	59 17,67%	81 19,8%	91 22,3%	61 15,3%	79 21,35%	81 18%	604 18,39%
IHPB	50 15,15%	66 25,19%	79 24,45%	72 21,55%	110 26,89%	105 25,73%	146 36,68%	120 32,43%	172 38,30%	920 28,02%
OTRAS	59 17,8%	45 17,2%	40 12,4%	68 20,4%	61 14,9%	64 15,7%	39 9,8	56 15,3%	47 10,5%	479 14,59%
TOTAL	330 100%	262 100%	323 100%	334 100%	409 100%	408 100%	398 100%	370 100%	449 100%	3283 100%

IHPB= Infecciones de herida, piel y partes blandas

OTRAS= otros exudados (principalmente líquidos estériles)

ITU= Infección del tracto urinario

Tabla 5. Infecciones por localización clínica de *E. faecium*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
ITU	19 38,8%	17 34%	17 35,41%	18 31%	16 22,9%	15 18,3%	28 27%	13 16%	13 16,3%	156 25,04%
Bacteriemias	6 12,2%	12 24%	11 22,9%	16 27,6%	13 18,5%	22 26,8%	20 19%	27 33,3%	12 15%	139 22,31%
IHPB	15 30,6%	14 28%	14 29,16%	18 31%	28 40%	26 31,7%	40 38,1%	26 32%	37 46,2%	218 34,99%
OTRAS	9 18,4%	7 14%	6 12,5%	6 10,34%	13 18,6%	19 23,2%	17 16,2%	15 18,5%	18 22,5%	110 17,66%
TOTAL	49 100%	50 100%	48 100%	58 100%	70 100%	82 100%	105 100%	81 100%	80 100%	623 100%

IHPB= Infecciones de herida, piel y partes blandas

OTRAS= otros exudados (principalmente líquidos estériles).

ITU= Infección del tracto urinario

Tabla 6. Infecciones por localización clínica de *E. avium*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
ITU	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Bacteriemias	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IHPB	3	-	-	1	2	4	-	2	5	17
OTRAS	-	-	-	1	2	-	-	-	2	5
TOTAL	3	-	-	2	4	4	1	2	7	23

IHPB= Infecciones de herida, piel y partes blandas

OTRAS= otros exudados (principalmente líquidos estériles).

ITU= Infección del tracto urinario

Tabla 7. Infecciones por localización clínica de *E. casseliflavus*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
ITU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteriemias	1	-	-	1	-	-	-	-	-	2
IHPB	1	-	-	3	-	-	-	-	1	5
OTRAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	2	-	-	4	-	-	-	-	-	6

IHPB= Infecciones de herida, piel y partes blandas

OTRAS= otros exudados (principalmente líquidos estériles).

ITU= Infección del tracto urinario

Tabla 8. Infecciones por localización clínica de *E. gallinarum*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
ITU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteriemias	-	-	-	-	1	-	-	2	2	5
IHPB	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2
OTRAS	-	1	-	-	1	-	-	-	-	2
TOTAL	-	1	-	-	2	-	-	3	3	9

IHPB= Infecciones de herida, piel y partes blandas

OTRAS= otros exudados (principalmente líquidos estériles).

ITU= Infección del tracto urinario

Tabla 9. Infecciones por localización clínica de *E. hirae*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
ITU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteriemias	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IHPB	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
OTRAS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1

IHPB= Infecciones de herida, piel y partes blandas

OTRAS= otros exudados (principalmente líquidos estériles).

ITU= Infección del tracto urinario

Tabla 10. Infecciones por localización clínica de *E. durans*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
ITU	1	-	-	2	-	-	1	-	-	4
Bacteriemias	1	-	-	-	-	-	1	-	-	2
IHPB	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
OTRAS	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
TOTAL	2	-	-	2	-	-	3	1	-	8

IHPB= Infecciones de herida, piel y partes blandas

OTRAS= otros exudados (principalmente líquidos estériles).

ITU= Infección del tracto urinario

IV.4. Bacteriemias por enterococos relacionadas con la asistencia sanitaria.

Las bacteriemias constituyen evidentemente uno de los indicadores de más valor en el estudio de las Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria. En su estudio merecen igualmente una especial atención las que están producidas por bacterias multiresistentes.

IV.4.1. Bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria según especies de enterococos en el HUC durante el periodo 2001-2009.

En la tabla 11 figuran los datos correspondientes a cada uno de los años del periodo de estudio tanto para el total de enterococos como para *E. faecalis*, *E. faecium* y el resto de las especies. Se trata de bacteriemias asociadas a cuidados sanitarios ya que dentro del sistema de vigilancia de las Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria todas las bacteriemias son estudiadas sistemáticamente.

Tabla 11. Bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria por *Enterococcus spp.*

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	TOTAL
<i>E. faecalis</i>	30 88,2%	31 79,5%	43 82,7%	41 77,4%	64 86,5%	69 81,18%	58 77,3%	64 77,10%	59 85,50%	459 81,38%
<i>E. faecium</i>	3 8,8%	8 20,5%	7 13,5%	10 18,86%	9 12,16%	16 18,82%	16 21,3%	19 22,9%	8 11,59%	96 17,02%
<i>E. casseliflavus</i>	1 2,9%	-	-	1 1,8%	-	-	-	-	-	2 0,35%
<i>Enterococcus spp</i>			2 3,8%	1 1,8%	-	-	1 1,3%	-	-	4 0,71%
<i>E. gallinarum</i>	-	-	-	-	1 1,4%	-	-	-	2 2,9%	3 0,53%
TOTAL <i>Enterococcus spp</i>	34 100%	39 100%	52 100%	53 100%	74 100%	85 100%	75 100%	83 100%	69 100%	564 100%

IV.4.2. Densidad de Incidencia de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria por *E. faecalis* y *E. faecium*.

Se han calculado las densidades de incidencia de las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria por *E. faecalis* y *E. faecium* y para el total de enterococos. Para el resto de las especies, dado su escaso aislamiento, no se ha calculado. En la tabla 12 y el figura 5 se expresan los datos referidos a la densidad de incidencia el periodo en estudio.

Tabla 12. Densidad de Incidencia de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* durante el periodo 2001-2009.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
ESTANCIAS	205.728	203.398	211.000	211.650	212.831	214.314	216.572	205.532	206.713
DI Efc	1.5	1.5	2	1.9	3	3.2	2.7	3	2.9
DI Efm	0.15	0.4	0.42	0.5	0.42	0.75	0.74	0.9	0.39
DI Etotal	1.65	1.92	2.5	2.5	3.5	3.96	3.46	4	3.2

ESTANCIAS= total de días anuales de estancia hospitalaria.

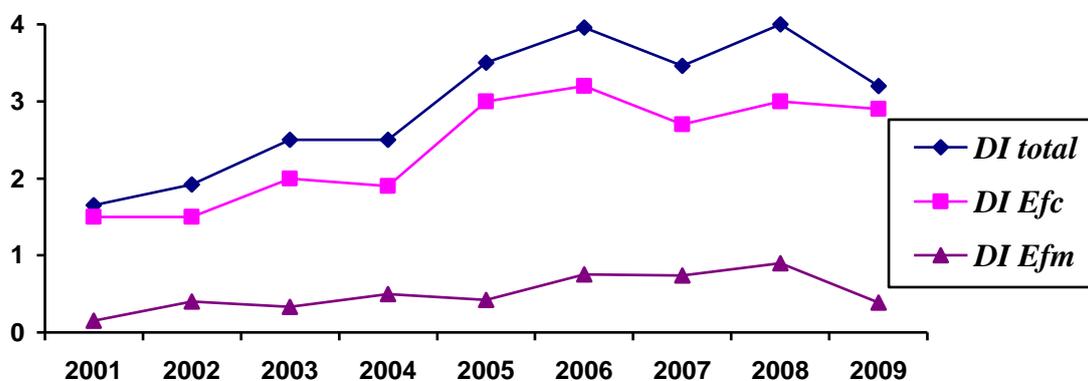
DI Efc = densidad de incidencia de Bacteriemias por *E. faecalis*.

DI Efm = densidad de incidencia de Bacteriemias por *E. faecium*

DI Etotal= densidad de incidencia de Bacteriemias por *Enterococcus spp.* total.

DI= Densidad de Incidencia= $\frac{\text{número de Bacteriemias anual} \times 10.000}{\text{número de estancias (días)}}$

Figura 5. Densidad de Incidencia de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* durante el periodo 2001-2009.



DI Efc = densidad de incidencia de Bacteriemias por *E. faecalis*.

DI Efm = densidad de incidencia de Bacteriemias por *E. faecium*.

DI Etotal= densidad de incidencia de Bacteriemias por *Enterococcus spp.* total.

IV. 4.3. Bacteriemias recogidas en el EARSS en el HUC durante el periodo 2001-2009.

Desde enero del año 2008 el departamento de Microbiología y Medicina Preventiva del HUC se incorporó al Sistema Europeo de Vigilancia de Resistencia Antibiótica (EARSS) que realiza la vigilancia de las bacteriemias por los microorganismos que se citan a continuación, recogiendo la resistencia antibiótica:

Escherichia coli
Klebsiella pneumoniae
Staphylococcus aureus
Pseudomonas aeruginosa
Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Streptococcus pneumoniae

En este caso se incluyen tanto las bacteriemias asociadas a cuidados sanitarios como las comunitarias. En la tabla 13 se reflejan los datos del EARSS de los años 2008 y 2009 referidos a nuestro hospital tanto de las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria como las comunitarias.

Tabla 13. Bacteriemias según datos del EARSS años 2008 y 2009.

	<u>2008</u>		<u>2009</u>	
	<u>BARS</u>	<u>COM</u>	<u>BARS</u>	<u>COM</u>
<i>E. faecalis</i>	64	15	59	22
<i>E. faecium</i>	19	1	8	2

BARS= Bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria

COM= Comunitarias

IV.4.4. Importancia de las bacteriemias por enterococos en relación al total de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria en el periodo de estudio 2001-2009.

En la tabla 14 hemos incluido la etiología de las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria en nuestro hospital para todo el periodo de estudio. Hemos agrupado todas las enterobacterias (ENB), los estafilococos coagulasa negativos (SCN), es decir, no *S.aureus*, los bacilos gram negativos no fermentadores (BGNNF) y los anaerobios. Específicamente hemos incluido el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), los *Enterococcus spp.* (*E.spp*), las *Candidas spp.* y una categoría como OTROS que incluyen bacilos gram positivos como corinebacterias, listerias, etc.

Tabla 14. Posición que ocupan los enterococos en bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria en el HUC en el periodo 2001-2009.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2001-2009
1º	ENB 30,58%	SCN 30,57%	ENB 29,7%	ENB 27,60%	ENB 31,44%	ENB 30,71%	ENB 32,12%	ENB 36,81%	SCN 24,30%	ENB 30,25%
2º	SCN 26,46%	ENB 27,27%	SCN 25,9%	SCN 21,07%	SCN 16,84%	BGNNF 16,31% y E.spp 16,31%	SCN 15,56% <i>S.aureus</i> 15,56%	E.spp 16,33%	ENB 23,44%	SCN 20,26%
3º	E. spp 11,68%	<i>S.aureus</i> 11,29%	BGNNF 13,1% E.spp 13,1%	<i>S.aureus</i> 14,53%	BGNNF 14,95%	SCN 14,01%	E.spp 15,15%	SCN 15,35%	BGNNF 16,98%	E.spp 13,9%
4º	<i>S.aureus</i> 10,65%	BGNNF 11,02%	<i>S.aureus</i> 9,47%	BGNNF 12,83% E.spp 12,83%	E.spp 12,71%	<i>S.aureus</i> 12,67%	BGNNF 11,72%	BGNNF 14,17%	E.spp 14,40%	BGNNF 13,66%
5º	BGNNF 8,94%	E. spp 10,74%	Candida spp 6,55%	Candida spp 8,72%	<i>S.aureus</i> 12,54%	Candida spp. 7,29%	Candida spp. 7,27%	<i>S.aureus</i> 9,25%	<i>S.aureus</i> 10,32%	<i>S.aureus</i> 11,9%
6º	Candida spp 7,90%	Candida spp 6,61%	Otros 1,76%	Anaerobios 1,45 %	Candida spp 8,42%	Anaerobios 1,15%	Anaerobios 1,62%	Candida spp 6,10%	Candida spp 8,60%	Candida spp 7,5%
7º	Otros 2,4%	Otros 1,5%	Anaerobios 0,25 %	Otros 0,97%	Anaerobios 1,89 %	Otros Gram (+) 1,54%	Otros Gram (+) 1,01%	Anaerobios 1,18%	Otros 1,29%	Otros 1,3%
8º	Anaerobios 0,69%	Anaerobios 1,22%	-	-	Otros 1,21%	-	-	Otros 0,78%	Anaerobios 0,64%	Anaerobios 1,2%

IV.4.5. Resistencia a la ampicilina, linezolid y de alto nivel a la gentamicina de las bacteriemias por *E.faecalis* y *E. faecium* en el HUC en los años 2008 y 2009.

En las tablas 15 y 16 se recogen datos del EARSS del 2008 y 2009 de las resistencias a la ampicilina, a la gentamicina y linezolid de los aislamientos de *E.faecalis* y *E. faecium* en bacteriemias de nuestro hospital.

Tabla 15. Resistencia a la ampicilina, linezolid y de alto nivel a la gentamicina de las bacteriemias por *E.faecalis* en el HUC en los años 2008 y 2009.

	%R		%I		%S	
	2008	2009	2008	2009	2008	2009
Ampicilina	9,9	9,2	-	-	90,1	90,8
Gentamicina de alto nivel	42,5	49,4	-	-	57,5	50,6
Linezolid	-	1,2	4	6	96	92,8

n=81 en el 2008

n=87 en el 2009

Tabla 16. Resistencia a la ampicilina, linezolid y de alto nivel a la gentamicina de las bacteriemias y por *E.faecium* en el HUC durante los años 2008 y 2009.

	%R		%I		%S	
	2008	2009	2008	2009	2008	2009
Ampicilina	85,7	54,5	-	-	14,3	45,5
Gentamicina de alto nivel	23,8	45,5	-	-	71,4	54,5
Linezolid	-	-	15	-	85	100

n=21 en el 2008

n=11 en el 2009

IV.5. Resistencia a la ampicilina de los aislamientos por *E. faecium* en el HUC.

Es conocido que la resistencia adquirida a la ampicilina es un marcador fenotípico importante de las Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria por el *E. faecium* en Europa y que la experiencia mostraba que a menudo precedía al incremento de la frecuencia de ERV con una anticipación de varios años. Por eso en la tabla 17 reflejamos los porcentajes de la resistencia a la ampicilina a lo largo de todo el periodo de estudio.

Tabla 17. Resistencia a la ampicilina de los aislamientos por *E. faecium* en el periodo 2001-2009.

AÑO	Sensibilidad a la Ampicilina	
	R	S
2001 (n=41)	38 92,7%	3
2002 (n=46)	39 84,8%	7
2003 (n=48)	40 83%	8
2004 (n=46)	34 74%	12
2005 (n=68)	60 88,2%	8
2006 (n=74)	62 83,8%	12
2007 (n=112)	97 86,6%	15
2008 (n=81)	72 89%	9
2009 (n=80)	67 84%	13

n= número de aislamientos de *E. faecium*

IV.6. *Enterococcus spp.* resistentes a la vancomicina en pacientes del HUC en el periodo 2001-2009.

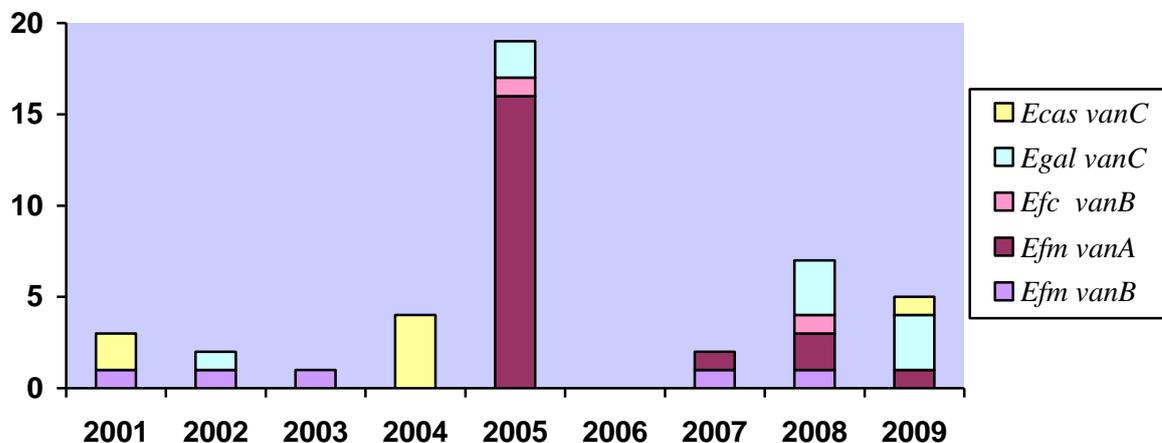
En la tabla 18 y figura 6 se recogen los enterococos resistentes a la vancomicina en el periodo comprendido entre el año 2001 al 2009, especificando los que se aislaron de Infección Hospitalaria (IH) y los que se aislaron por estudio de portador como Colonización Hospitalaria (CH). Entre esos enterococos se encuentran: *E.faecium*, *E. faecalis*, *E.gallinarum* y *E. casseliflavus*, en el resto de las especies de enterococos: *E. avium*, *E. durans* y *E.hirae* no se han visto resistencias a la vancomicina ni a la teicoplanina en nuestro hospital.

El primer aislado en 2001 en nuestro hospital resultando fue un *EfmvanB* el cual fue el primer *EfmvanB* informado en España. Ese mismo año se aislaron 2 *E. casseliflavus*. En 2002 se aisló un *EfmvanB* y un *E. gallinarum*. En 2003 se aisló también un *EfmvanB*. En 2004 se aislaron 4 *E. casseliflavus*. Posteriormente, en 2005 tuvo lugar un brote por *EfmvanA* dónde se vieron implicados 16 pacientes: 4 con infección y 12 colonizados, también este año se aislaron 2 *E. gallinarum* y un *EfcvanB*. En el 2006 no se aisló ningún ERV. En 2007 se aislaron un *EfmvanB* y un *EfmvanA*, en 2008 dos *EfmvanA*, un *EfmvanB*, un *EfcvanB* y 3 *E.gallinarum* y por último, en 2009 un *EfmvanA*, 3 *E.gallinarum* y un *E. casseliflavus*.

Tabla 18. Aislamientos por *Enterococcus spp.* resistentes a la vancomicina en el periodo 2001-2009.

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<i>Enterococcus faecium vanB</i>	1 IH	1 IH	1 IH	-	-	-	1 IH	1 CH	-
<i>Enterococcus faecium vanA</i>	-	-	-	-	4 IH 12 CH	-	1 IH	1 IE 1 IH	1 CH
<i>Enterococcus faecalis vanB</i>	-	-	-	-	1CH	-	-	1 IH	-
<i>Enterococcus faecalis vanA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus gallinarum</i>	-	1	-	-	2	-	-	3	3
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	-	-	4	-	-	-	-	1

Figura 6. Aislamientos por *Enterococcus spp.* resistentes a la vancomicina en el periodo 2001-2009.



Ecas= *Enterococcus casseliflavus*

Egal= *Enterococcus gallinarum*

Efc= *Enterococcus faecalis*

Efm= *Enterococcus faecium*

De los 27 pacientes hospitalizados en el HUC a los que se les aisló ERV durante el periodo 2001-2009, en 14 pacientes se aislaron ERV en muestra clínica y en los otros 13 pacientes se aislaron ERV después de realizar cultivos para estudio de portadores.

De los 14 pacientes con ERV en muestra clínica, 11 correspondían con infecciones hospitalarias, 1 con infección extrahospitalaria y 2 con colonizaciones hospitalarias (punta de catéter y exudado de herida). Las características demográficas y clínicas de estos pacientes se muestran a continuación en las tablas 20 y 21.

Como se muestra en la tabla 19 los 11 pacientes con infección hospitalaria presentaban una edad media de 66,36(DE +/- 9,52), 4 (36,36%) mujeres, 7 (63,63%) hombres, con una media de 79,08 días de hospitalización. Todos los pacientes menos uno fueron sometidos a cirugía previa, todos ellos recibieron antibioterapia previa, 7 (63,63%) de los 11 pacientes murieron.

En la **figura 7** se representan los porcentajes de los *EfmRV* y *EfcRV* aislados tanto de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria como de las comunitarias y el porcentaje de causantes de infección hospitalaria en el HUC durante el periodo 2001-2009.

Figura 7. Porcentajes del total de *EfmRV* y de *EfcRV* aislados en el HUC en el periodo 2001-2009.

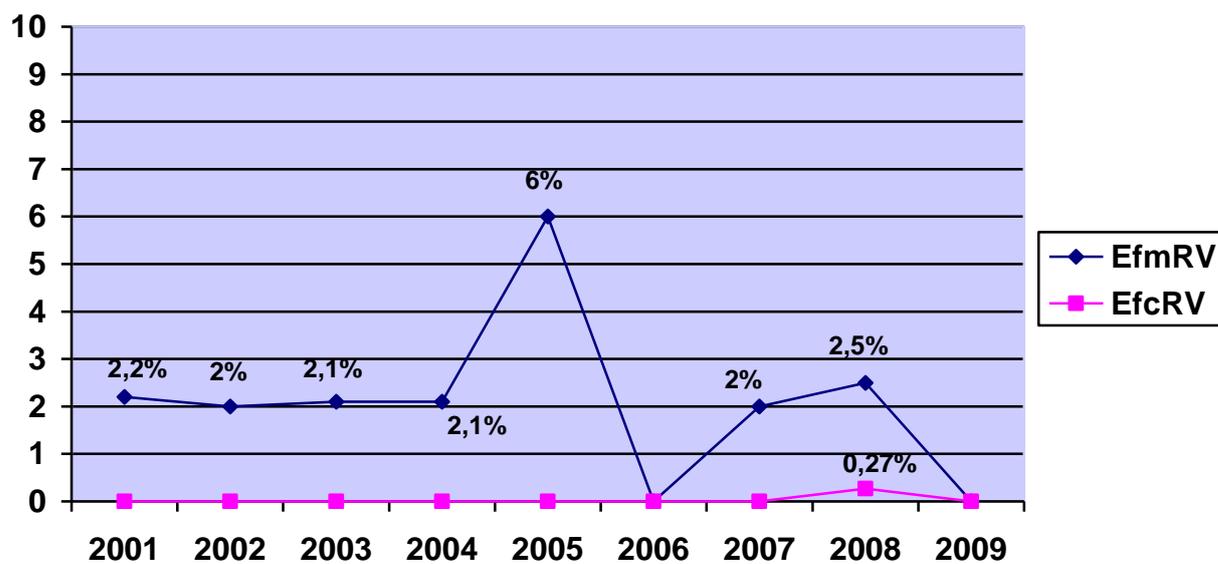


Tabla 19. Características demográficas y clínicas de los pacientes hospitalizados con aislamientos por *E.faecium* y *E. faecalis* resistentes a la vancomicina en muestra clínica y catalogada como infección hospitalaria.

P	Edad	Sexo	Aislamiento	Fecha aislamiento	Planta	Muestra	CP	Días de Hosp.	Cirugía previa	Tto ATB previo	Ingresos en UCI	Motivo del Alta
1	75	V	<i>EfmvanB</i>	3-12-2001	Neurocirugía	Ulcera sacra. IHPB	NR	63	Si	Si	Si	Exitus
2	74	M	<i>EfmvanB</i>	19-01-2002	Reumatología	Drenaje IHPB	NR	6	Si	Si	No	Exitus
3	61	V	<i>EfmvanB</i>	25-11-2003	Hematología	Sangre Bacteriemia	No	39	Si	Si	No	Exitus
4	56	M	<i>EfmvanA</i>	25-7-2005	Nefrología	Herida Qx ISQx	NR	23	Si	Si	Si	Exitus
5	54	M	<i>EfmvanA</i>	5-9-2005	Nefrología	Absceso IHPB	Si	80	Si	Si	Si	Mejora
6	57	M	<i>EfmvanA</i>	4-10-2005	Nefrología	Orina ITU	Si	70	Si	Si	No	Mejora
7	61	V	<i>EfmvanA</i>	7-10-2005	Nefrología	Drenaje ISQx	Si	305	Si	Si	Si	Exitus
8	84	V	<i>EfmvanA</i>	2-3-2007	Cirugía Gral y Digestiva	Exudado herida ISQx	No	60	Si	Si	Si	Mejora
9	72	V	<i>EfmvanB</i>	28-3-2007	Digestivo	Líquido Ascítico peritonitis	No	47	Si	Si	No	Exitus
10	63	M	<i>EfmvanA</i>	22-3-2008	Digestivo	L. ascítico IE	Si	16	No	Si	No	Exitus
11	70	V	<i>EfcvanB</i>	22-7-2008	M. Interna	Sangre Bacteriemia 1ª	Si	150	Si	Si	Si	Exitus
12	66	V	<i>EfmvanA</i>	27-12-2008	Neurocirugía	LCR y válvula	No	90	No	Si	Si	Mejora

CP= colonización perianal

NR= no realizado

Tto. ATB previo= tratamiento antibiótico previo

Días de Hosp.= días de hospitalización.

Tabla 20. Características demográficas y clínicas de los pacientes hospitalizados con aislamientos por *E.faecium* y *E. faecalis* resistentes a la vancomicina en muestra clínica y catalogada como colonización hospitalaria.

P	Edad	Sexo	Aislamiento	Fecha aislamiento	Planta	Muestra	CP	Días de Hosp.	Cirugía previa	Tto ATB previo	Ingresos en UCI	Motivo del Alta
13	67	M	<i>EfcvanB</i>	6-6-2005	CCV	Catéter	NR	21	Si	Si	Si	Mejora
14	44	V	<i>EfmvanB</i>	19-11-2008	COT-A	Exudado herida.	No	10 meses	Si	Si	Si	Mejora y al mes exitus

De los 13 pacientes con ERV aislados en cultivos de vigilancia, 12 estuvieron involucrados en el estudio del brote que tuvo lugar en el año 2005 y uno se obtuvo durante un estudio de vigilancia activa realizado en el año 2009. Las características demográficas y epidemiológicas de estos pacientes se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Características demográficas y clínicas de los pacientes hospitalizados con aislamientos por *E.faecium* y *E. faecalis* resistentes a la vancomicina en muestra de vigilancia activa.

<i>P</i>	Edad	Sexo	Aislamiento	Fecha aislamiento	Planta	Muestra	Días de Hosp.	Cirugía previa	Tto ATB previo	Ingresos en UCI	Motivo del Alta
15	51	M	<i>EfmvanA</i>	17/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	23	Si Tx	Si	Si	Mejora
16	52	M	<i>EfmvanA</i>	17/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	83	Si Tx	Si	Si	Mejora
17	52	M	<i>EfmvanA</i>	17/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	9	Si Tx	Si	Si	Mejora
18	59	V	<i>EfmvanA</i>	17/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	19	Si Tx	Si	Si	Mejora
19	55	M	<i>EfmvanA</i>	17/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	41	Si Tx	Si	Si	Mejora
20	58	V	<i>EfmvanA</i>	17/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	12	No	Si	No	Mejora
21	35	V	<i>EfmvanA</i>	26/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	65	Si Tx	Si	Si	Mejora
22	61	M	<i>EfmvanA</i>	26/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	4	Si Tx	Si	Si	Mejora
23	55	V	<i>EfmvanA</i>	26/10/2005	Nefrología	Exudado perianal	11	Si Tx	Si	Si	Mejora
24	52	M	<i>EfmvanA</i>	02/11/2005	Nefrología	Exudado perianal	77	Si	Si	Si	Mejora
25	50	M	<i>EfmvanA</i>	02/11/2005	Nefrología	Exudado perianal	15	Si Tx	Si	Si	Mejora
26	49	V	<i>EfmvanA</i>	02/12/2005	Nefrología	Exudado perianal	-	No	Si	No	Mejora
27	81	M	<i>EfmvanA</i>	22/3/2009	Medicina Interna	Exudado perianal	4 meses	No	Si	No	Mejora

IV.7. Estudio de un brote por *EfmvanA* en el 2005 en la planta de Nefrología del HUC

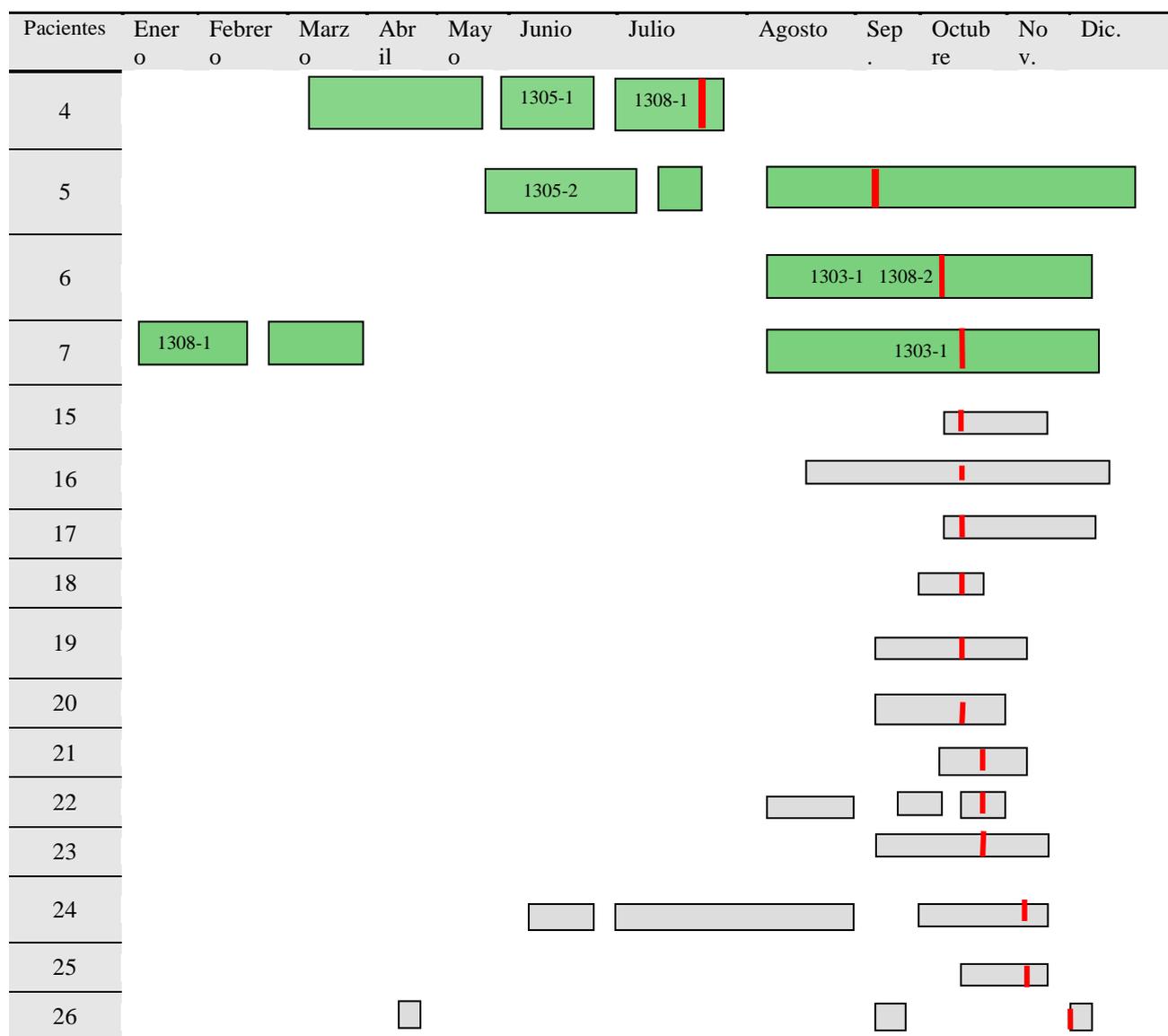
Como se aprecia en el figura 8, en julio del 2005, se aisló un *EfmvanA* por primera vez en nuestro hospital, procedente de una paciente (**paciente 4, ver tabla 20**) con una infección de sitio quirúrgico ingresada en la planta de Nefrología, la cual murió al día siguiente. En septiembre se detectó una segunda infección del sitio quirúrgico por *EfmvanA* (**paciente 5**), y en octubre se detectaron 2 casos más de infección, una del tracto urinario (**paciente 6**) y una del sitio quirúrgico (**paciente 7**), en la misma planta de Nefrología. Estas infecciones evolucionaron favorablemente con tratamiento antibiótico (linezolid). Se adoptaron medidas de control de la infección, por lo que se aplicó aislamiento de contacto. El 17 de octubre se realizó el primer cribado con muestras perianales a todos los pacientes (21 pacientes) ingresados en la planta de Nefrología. Se encontraron en ese momento 9 pacientes colonizados por *EfmvanA*, incluidos 3 de los 4 pacientes con infección hospitalaria (al primer paciente, paciente 4, no se le pudo recoger, pues había fallecido). Después de este primer cribado y a partir del 15 de diciembre de 2005 se realizó estudio de portadores una vez por semana a todos los pacientes ingresados en Nefrología. En este periodo se identificaron otros 6 pacientes colonizados. A partir de este momento y hasta marzo de 2006, en el que finalizaron los cribados, no se identificó ningún paciente colonizado más. A los pacientes colonizados por *EfmVR* se les aplicó aislamiento de contacto sin tratamiento de su estado de portador. Es importante señalar que el 24 de octubre del 2005 la planta de Nefrología se trasladó dentro del hospital a otra planta de nueva creación y que reunía, en todos los sentidos mejores condiciones.

Los 16 pacientes en los que se aisló *EfmvanA*, ya sea por colonización o por infección hospitalaria, eran trasplantados renales y la mayoría de ellos habían sido intervenidos quirúrgicamente, como se puede apreciar en las tablas 19 y 21. La media de edad de los pacientes fue de 53,5 años (rango: 35-61 años), 10 pacientes (62,5%) eran mujeres y 6 pacientes (37,5%) eran varones. A todos se les había realizado hemodiálisis antes del tranplante renal, con una duración media de 43 meses (rango: 7-128 meses). El 100% de los pacientes había recibido tratamiento antibiótico múltiple los meses previos al aislamiento de *EfmvanA*, y concretamente el 44% había recibido glucopéptidos en el último mes: 5 pacientes recibieron vancomicina y 2 pacientes

recibieron teicoplanina. La media de días de hospitalización previos al aislamiento de *EfmvanA* fue de 35 días (rango: 4-83 días).

En el figura 8 aparecen los 4 pacientes que padecieron infección hospitalaria durante el brote con el color verde y el resto corresponde a los pacientes colonizados con color gris. En el eje de abscisas se muestra el tiempo de ingreso en la planta de nefrología. En el eje de abscisas se muestra el tiempo de ingreso en la planta de nefrología.

Figura 8. Distribución de pacientes infectados y portadores perianales de *EfmvanA* involucrados en el brote del año 2005. Cada rectángulo representa el tiempo de ingreso en la planta de Nefrología y el número, en el caso de las infecciones, la habitación en la que estaban ingresados. La línea roja simboliza el momento en que se aisló el *EfmvanA*.



En el mismo periodo otros 3 pacientes con aislamiento de *EfmvanA* se detectaron por primera vez en otros 2 hospitales universitarios de Canarias. En el Hospital Universitario Insular de Gran Canaria (HUIGC) se aisló un *EfmvanA* en una paciente de 16 años a la que se le había trasplantado un riñón en nuestro hospital (HUC) en septiembre del 2005. En el Hospital Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) se detectaron 2 pacientes más con aislamientos de *EfmvanA* en febrero y mayo del 2006. El primer paciente era un varón de 37 años ingresado en la Unidad de Cirugía General del HUNSC y que coincidió en tiempo y lugar con uno de los pacientes involucrados en el brote por *EfmvanA* del HUC. El segundo paciente era otro varón de 81 años de edad hospitalizado en la Unidad de Digestivo del HUNSC sin aparente relación con los casos anteriores. Tanto en el HUIGC como en el HUNSC se adoptaron medidas de control de la infección, como el aislamiento de contacto y la toma de muestras de cribado de los pacientes infectados para descartar colonización rectal.

Los aislados de ERV fueron remitidos a nuestro departamento de Microbiología y Medicina Preventiva para realizar el genotipado. En la tabla 22 se exponen los datos demográficos y clínicos de estos tres pacientes.

Tabla 22. Características demográficas y clínicas de los pacientes hospitalizados con aislamientos por enterococos resistentes a la vancomicina en otros Hospitales de Canarias.

<i>P</i>	Edad	Sexo	Aislamiento	Fecha aislamiento	Hospital	Muestra	CP	Días de Hosp.	Cirugía previa	Tto ATB previo	Ingresos en UCI	Motivo del Alta
28	16	M	<i>EfmvanA</i>	17/11/2005	HUIGC	Orina	Si	5 días	Si (TX)	Si	Si	Mejora
29	37	V	<i>EfmvanA</i>	20/02/2006	HUNSC	Sangre	Si	70	Si	Si	Si	Exitus (al mes)
30	81	M	<i>EfmvanA</i>	25/05/2006	HUNSC	Orina	Si	37	No	Si	No	Exitus

IV. 8. Tipificación molecular de los ERV aislados en el HUC.

Los resultados del PFGE, ver figura 9, 10 y 11, revelan que los 16 *EfmvanA* aislados en el brote del 2005 en nuestro hospital y los aislamientos de los dos hospitales (HUIGC y HUNSC) se agruparon en un mismo PFGE tipo con 3 subtipos (A₁, A₂, A₃) estrechamente relacionados (2 o 3 bandas de diferencia entre ellos y más del 90% de similitud). Los tres pacientes colonizados rectales con infección hospitalaria estaban colonizados por el mismo subtipo de PFGE.

Los aislamientos de *EfmvanA* encontrados en el HUC en los años 2007 y 2008 eran diferentes a los involucrados en el brote del 2005.

Figura 9. Dendograma resultante del análisis de los pulsotipos de PFGE de los *EfmvanA* aislados en el brote 2005 y en los años 2007 y 2008.

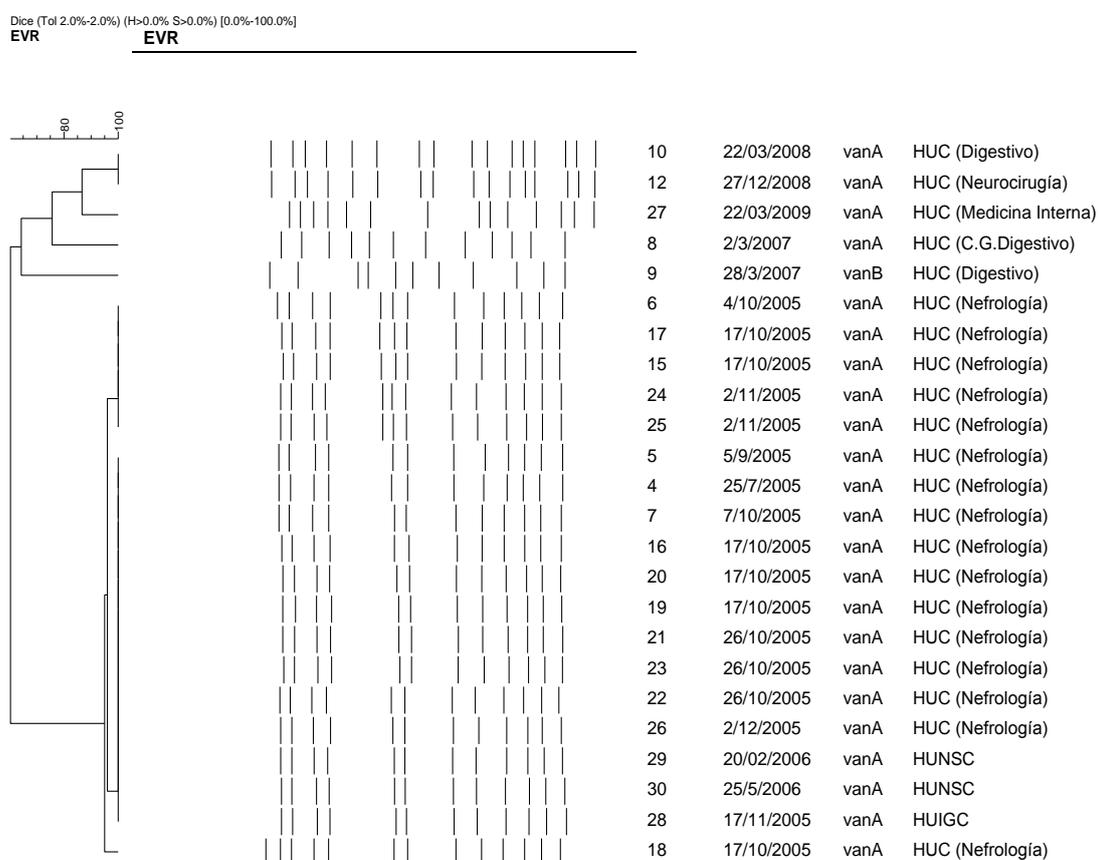


Figura 10. PFGE de *EfmvanA* aislados en el brote 2005. Las líneas 1, 8 y 15 pertenecen al marcador de peso molecular, las líneas 2, 3 4 y 5 pertenecen a los 4 pacientes con infección (**paciente 4, 5, 6 y 7**, ver tabla 19) el resto de líneas pertenecen a pacientes colonizados por *EfmvanA* obtenidos tras realizar el control de portadores (**paciente 18, 16, 17, 15, 20 y 19**, ver tabla 21).

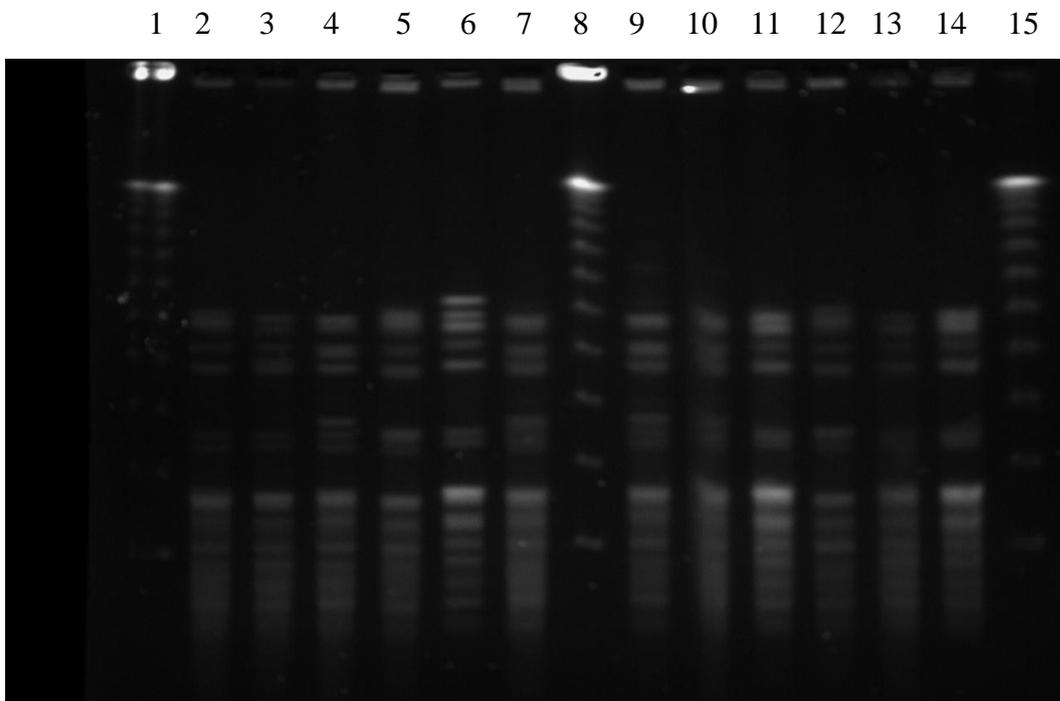
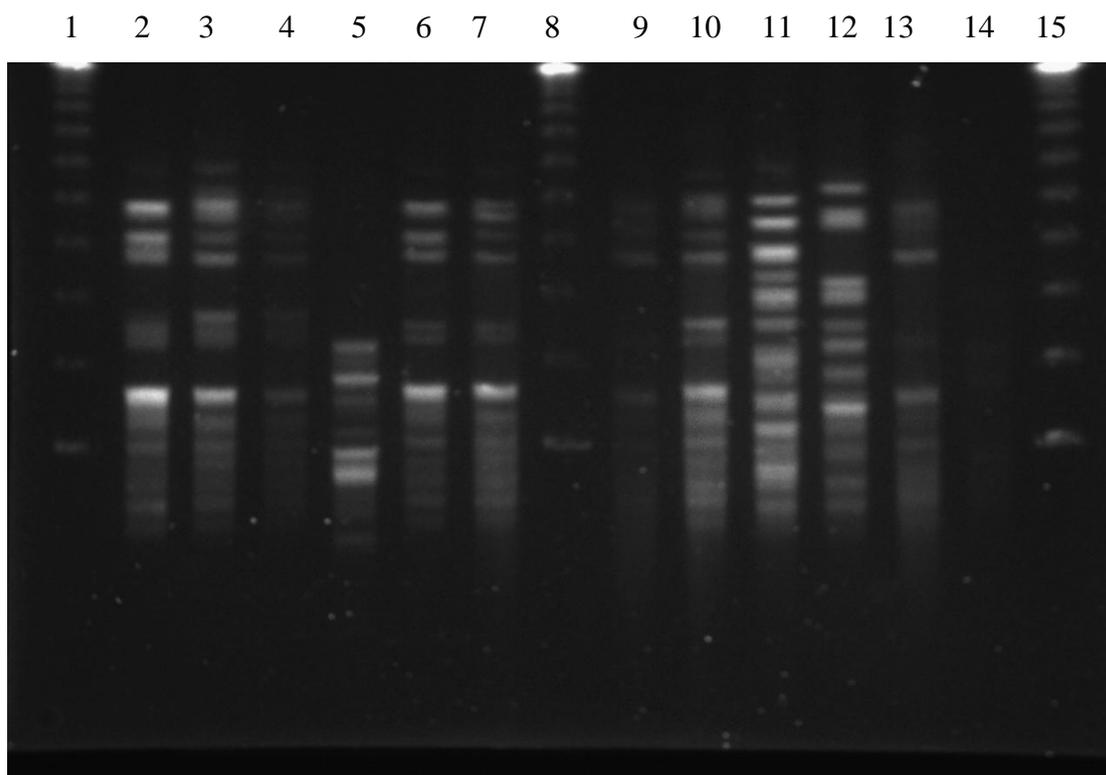


Figura 11. PFGE Las líneas 1, 8 y 15 pertenecen al marcador de peso molecular, las línea 2, 3, 4 y 6 pertenecen a pacientes colonizados por *EfmvanA* obtenidos tras realizar el control de portadores en 2005. La línea 5 pertenece a un *E. gallinarum* aislado en muestra clínica en 2005. Las líneas 7, 9 pertenecen a muestras clínicas de dos pacientes del HUNSC dónde se aisló *EfmvanA* en 2006 (**pacientes 29 y 30**, ver tabla 22), la línea 10 es un *EfmvanA* aislado en el HUIGC (**pacientes 28**). La línea 11 pertenece a un *EfmvanA* aislado en 2007(**paciente 8**, ver tabla 19) y la 12 a un *EfmvanB* aislado el mismo año (**paciente 9**, ver tabla 19). La línea 13 pertenece a un *EfmvanA* aislado en el HUNSC el 2007 y la 14 a un *E. gallinarum* del estudio de portadores realizado el 2007.



El resto de resultados obtenidos por técnicas de epidemiología molecular junto con otros datos epidemiológicos de los pacientes se observan en las tablas 23 y 24.

Tabla 23. Características epidemiológicas de los pacientes con infección o colonización por *EfmvanA* y características moleculares de los aislados en el HUC.

Paciente	Fecha de aislamiento	Planta de Hospitalización	Colonización Perianal	PFGE	Fenotipo	Genotipo <i>van</i>	Presencia del gen <i>esp</i>	Presencia del gen <i>hyl</i>	ST	CC
4	25/07/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
5	05/09/2005	Nefrología	NR	A ₁	VanA	<i>vanA</i>	Neg	Neg	18	17
6	04/10/2005	Nefrología	Sí	A ₂	VanA	<i>vanA</i>				
7	7/10/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
15	17/10/2005	Nefrología	Sí	A ₃	VanA	<i>vanA</i>	Neg	Neg	18	17
16	17/10/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
17	17/10/2005	Nefrología	Sí	A ₂	VanA	<i>vanA</i>				
18	17/10/2005	Nefrología	Sí	A ₂	VanA	<i>vanA</i>				
19	17/10/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
20	17/10/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
21	26/10/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
22	26/10/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
23	26/10/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
24	02/11/2005	Nefrología	Sí	A ₂	VanA	<i>vanA</i>				
25	02/11/2005	Nefrología	Sí	A ₂	VanA	<i>vanA</i>				
26	02/12/2005	Nefrología	Sí	A ₁	VanA	<i>vanA</i>				
8	02/03/2007	Cirugía General	No	B	VanA	<i>vanA</i>	Pos	Pos	192	17
10	22/03/2008	Digestivo	Si	D ₁	VanA	<i>vanA</i>				
12	27/12/2008	Neurocirugía	No	D ₁	VanA	<i>vanA</i>				
27	22/03/2009	M. Interna	Si	E	VanA	<i>vanA</i>				

Tabla 24. Características epidemiológicas de los pacientes con infección o colonización por *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina y características moleculares de los aislados en el HUNSC y HUIGC en el año 2006 y 2007

P	Fecha de aislamiento	Hospital	Planta de Hospitalización	Colonización Perianal	PFGE	Fenotipo	Genotipo <i>van</i>	Presencia del gen <i>esp</i>	Presencia del gen <i>hyl</i>	ST	CC
28	17/11/2005	HUIGC	Nefrología	Sí	A ₁	VANA	<i>vanA</i>	Neg	Neg	18	17
29	20/02/2006	HUNSC	Cirugía General	Sí	A ₁	VANA	<i>vanA</i>	Neg	Neg	18	17
30	25/05/2006	HUNSC	Digestivo	Sí	A ₁	VANA	<i>vanA</i>	Pos	Pos	18	17

IV. 9. Sensibilidad antibiótica de todos los aislados de ERV (2001-2009).

Los 27 ERV del estudio se identificaron mediante el sistema automatizado Vitek2 (bioMérieux), al igual que la sensibilidad antibiótica. De los 27 ERV, 25 fueron *E. faecium* y 2 *E. faecalis*. En las tablas 25, 26 y 27 se recogen los porcentajes de sensibilidad frente a los diferentes antibióticos testados.

Tabla 25. Sensibilidad antibiótica de los *EfmvanA* aislados en el HUC en el periodo 2001-2009.

	S	I	R
AMPICILINA (n=20)	-	-	20 (100%)
GENTAMICINA DE ALTO NIVEL DE RESISTENCIA (n=19)	17 (89,5%)	-	2 (10,5%)
ESTREPTOMICINA DE ALTO NIVEL DE RESISTENCIA (n=20)	19 (95%)	-	1 (5%)
CLINDAMICINA (n=19)	-	-	19 (100%)
ERITROMICINA (n=20)	-	8 (40%)	12 (60%)
CIPROFLOXACINO (n=20)	-	-	20 (100%)
LEVOFLOXACINO (n=19)	-	-	19 (100%)
NORFLOXACINO (n=17)	-	-	17 (100%)
TETRACICLINA (n=20)	2 (10%)	-	18 (90%)
NITROFURANTOINA (n=17)	2 (11,7%)	11 (64,7%)	4 (23,5%)
TRIMETROPRIM-SULFAMETOXAZOL (n=12)	-	-	12 (100%)
TEICOPLANINA (n=20)	-	-	20 (100%)
VANCOMICINA (n=20)	-	-	20 (100%)
QUINUPRISTIN/DALFOPRISTIN (n=20)	19 (95%)	1 (5%)	-
LINEZOLID (n=17)	17(100%)	-	-

n= número de aislamientos testados

Tabla 26. Sensibilidad antibiótica de los *EfmvanB* aislados en el HUC en el periodo 2001-2009.

	S	I	R
AMPICILINA (n=5)	2(40%)	-	3(60%)
GENTAMICINA DE ALTO NIVEL DE RESISTENCIA(n=5)	2(40%)	-	3(60%)
ESTREPTOMICINA DE ALTO NIVEL DE RESISTENCIA (n=5)	3(60%)	-	2(40%)
CLINDAMICINA (n=2)	-	-	2(100%)
ERITROMICINA (n=5)	1(20%)	-	4(80%)
CIPROFLOXACINO (n=5)	1(20%)	1(20%)	3(60%)
LEVOFLOXACINO (n=5)	2(40%)	-	3(60%)
NORFLOXACINO (n=4)	-	1(25%)	3(75%)
TETRACICLINA (n=4)	2(50%)	-	2(50%)
NITROFURANTOINA (n=1)	-	1(100%)	-
TRIMETROPRIM-SULFAMETOXAZOL (n=2)	-	-	2(100%)
TEICOPLANINA (n=5)	5(100%)	-	-
VANCOMICINA (n=5)	-	-	5(100%)
QUINUPRISTIN/DALFOPRISTIN (n=5)	2(40%)	3(60%)	-
LINEZOLID (n=5)	5(100%)	-	-

n= número de aislamientos testados

Tabla 27. Sensibilidad antibiótica de los *EfcvanB* aislados en el HUC en el periodo 2001-2009.

	S	I	R
AMPICILINA (n=2)	2(100%)	-	-
GENTAMICINA DE ALTO NIVEL DE RESISTENCIA (n=2)	1(50%)	-	1(50%)
ESTREPTOMICINA DE ALTO NIVEL DE RESISTENCIA (n=2)	1(50%)	-	1(50%)
CLINDAMICINA (n=2)	-	-	2(100%)
ERITROMICINA (n=2)	-	1(50%)	1(50%)
CIPROFLOXACINO (n=2)	1(50%)	-	1(50%)
LEVOFLOXACINO (n=2)	1(50%)	-	1(50%)
NORFLOXACINO (n=1)	-	1(100%)	-
TETRACICLINA (n=2)	-	-	2(100%)
NITROFURANTOINA (n=1)	1(50%)	-	-
TRIMETROPRIM-SULFAMETOXAZOL (n=1)	-	-	1(50%)
TEICOPLANINA (n=2)	2(100%)	-	-
VANCOMICINA (n=2)	-	-	2(100%)
QUINUPRISTIN/DALFOPRISTIN (n=1)	-	-	1(50%)
LINEZOLID (n=0)	-	-	-

n= número de aislamientos testados

IV.10. Resultados de los estudios de vigilancia activa de ERV realizados durante los años 2007 y 2009.

Como ya hemos indicado con motivo del brote que tuvimos en el Servicio de Nefrología realizamos un estudio de vigilancia activa con tomas perianales en todos los pacientes de dicha unidad. Dicho estudio se inició el 17 de octubre del 2005 y se finalizó el 13 de marzo de 2006.

Si bien en el año 2006 no tuvimos ninguna infección, ni siquiera colonización por *EfmRV* o *EfcRV* en todo el hospital y sólo en 2007 tuvimos 2 infecciones, una por *EfmvanA* y otra por *EfmvanB* en el servicio de Digestivo y en el de Cirugía General y digestiva. Se tomó la decisión de realizar un estudio de vigilancia activa en Nefrología. Se escogieron dos días alternos de la última semana de septiembre y se procedió al estudio en 19 pacientes. A 13 se le tomaron muestras perianales ambos días y al resto sólo en uno, es decir, se realizaron un total de 32 tomas. En ninguno de los pacientes se aisló *EfmRV* ni *EfcRV*. En 2 pacientes se aisló *E. gallinarum* en las dos tomas que se le realizó a cada uno de ellos.

El tercer estudio de vigilancia se realizó en un periodo comprendido entre marzo y junio de 2009. Se realizaron muestras perianales a 185 pacientes: 60 de Hemodiálisis, 47 de Cirugía General Digestiva, 36 de Medicina Interna, 19 de Oncología Médica y 23 de Nefrología. Como se refleja en la tabla 28 de todos los pacientes del estudio sólo en un caso se aisló 1(0,5%) *EfmvanA* (vancomicina CMI>256 µg/ml, Teicoplanina CMI>32µg/ml), el cual fue detectado tanto por la PCR a tiempo real GeneOhm™VANR Assay®(Becton Dickinson) como a las 48h de incubación de los cultivos directo Enterococcosel® Agar with Vancomycin, 8µg/ml (Becton Dickinson) y de enriquecimiento Brain-Heart Infusión®(Oxoid) . El resto de las PCR fueron: 154(83%) negativas y 30(16%) positivas para *vanB*. Ninguna de las PCR positivas para *vanB* fueron identificadas como *E. faecium* ni *E. faecalis*. De las 30 muestras con PCR *vanB* positivas: en 15(50%) los cultivos fueron negativos, en 2(13.3%) *Pediococcus pentosaceus* y en 1(3,3%) *Streptococcus spp*, en 9(30%) se aisló *E.gallinarum*, en 3(10%) *E. casseliflavus* a los cuales les realizamos PCR casera y ninguno era portador del gen *vanB*, como consecuencia, obtuvimos un 16% de falsos positivos. Se aisló *E.*

gallinarum en los cultivos de 33(17,8%) pacientes y *E. casseliflavus* en 8(4,3%), con bajo nivel de resistencia a la vancomicina (ver tabla 29). Se revisó la historia clínica de la paciente portadora de *EfmvanA*, ingresada en el servicio de Medicina Interna, para la búsqueda de factores de riesgo: edad avanzada, una larga estancia hospitalaria y tratamiento previo con vancomicina debido a una sepsis de origen pulmonar por *Staphylococcus aureus* meticilin resistente.

Tabla 28. Resultados del estudio de vigilancia de ERV en el año 2009.

PCR a tiempo real	cultivo directo		cultivo tras enriquecimiento	
	24h	48h	24h	48h
Total = 185				
● PCR positivas para <i>vanA</i> : 1	Neg	<i>E.faecium</i>	Neg	<i>E.faecium</i>
● PCR negativas: 154 (83%)	Neg	Neg	Neg	Neg
● PCR positivas <i>vanB</i> : 30 (16%)	15(50%) cultivos negativos 2(13,3%) cultivos positivos = <i>Pediococcus pentosaceus</i> 1(3,3%) cultivos positivos = <i>Streptococcus spp.</i> 9(30%) cultivos positivos = <i>Enterococcus gallinarum</i> 3(10%) cultivos positivos = <i>Enterococcus casseliflavus</i>			

Tabla 29. Porcentajes de *Enterococcus gallinarum* aislados durante el estudio de vigilancia realizado en el año 2009.

Servicio	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
Oncología médica	36,8%	1,9%
Medicina Interna	22,2%	2,8%
Digestivo	12,8%	4,2%
Hemodiálisis	15%	5%
Nefrología	13%	4,4%

V. DISCUSIÓN

V. 1. Infecciones por *Enterococcus spp.* en el HUC durante el periodo 2001–2009 y Densidad de Incidencia de infecciones por *Enterococcus spp.* en el HUC durante el periodo (2001-2009).

Los enterococos constituyen uno de los agentes causales más importantes de infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria así como de extrahospitalarias, con un predominio claro de *E. faecalis*, que en nuestro caso, se ha mantenido a lo largo de todo el periodo con un porcentaje en torno al 83-84%, seguido de *E. faecium* que representa alrededor de un 14-15% e incluso en algunos años superior (19-20%), habiendo incrementado ligeramente su participación dentro del conjunto de enterococos. El resto de enterococos como puede verse en la tabla 2 tienen una escasa presencia predominando para el conjunto del periodo el *E. avium*.

El incremento de participación de *E. faecium* en las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y extrahospitalarias ha sido señalado por otros autores en España que incluso lo sitúan en el 22% de los casos de bacteriemias^{(195),(196)}.

En las tablas 30 y 31 se presenta el análisis estadístico realizado mediante la Regresión de Poisson, aplicada a la densidad de incidencia, tanto en el caso de infecciones de *E. faecalis* como *E. faecium* que ponen en evidencia un incremento claro en el caso de infecciones de *E. faecalis* a partir del año 2005 que se estabiliza para el resto del periodo hasta el 2009. En el caso de *E. faecium* ese aumento tiene su punto de inflexión en el 2006 estabilizándose nuevamente hasta 2009. Los referidos incrementos tienen, como puede verse, significación estadística.

Tabla 30. Resultados del análisis estadístico realizado mediante la Regresión de Poisson, aplicada a la densidad de incidencia de infecciones de *E. faecalis* (2001-2009).

<i>Infecciones E.faecalis</i>									
<i>P</i>									
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
2001	-	0,009	0,57	No hay <i>P</i>	0,02	0,03	0,07	0,14	<0,001
2002	-	-	0,04	0,15	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
2003	-	-	-	0,73	0,002	0,003	0,01	0,03	<0,001
2004	-	-	-	-	0,007	0,01	0,04	0,07	<0,001
2005	-	-	-	-	-	0,93	0,56	0,39	0,07
2006	-	-	-	-	-	-	0,65	0,46	0,049
2007	-	-	-	-	-	-	-	0,81	0,01
2008	-	-	-	-	-	-	-	-	0,007
2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 31. Resultados del análisis estadístico realizado mediante la Regresión de Poisson, aplicada a la densidad de incidencia de infecciones de *E. faecium* (2001-2009).

<i>Infecciones E.faecium</i>									
<i>P</i>									
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
2001	-	0,64	0,85	0,94	0,037	0,015	<0,001	0,002	0,002
2002	-	-	0,78	0,77	0,14	0,06	<0,001	0,01	0,014
2003	-	-	-	0,99	0,06	0,024	<0,001	0,003	0,004
2004	-	-	-	-	0,06	0,023	<0,001	0,003	0,004
2005	-	-	-	-	-	0,77	0,03	0,30	0,36
2006	-	-	-	-	-	-	0,08	0,51	0,58
2007	-	-	-	-	-	-	-	0,32	0,27
2008	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97
2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-

V. 2. Infecciones por *Enterococcus spp.* por especie y localización clínica en el HUC en el periodo (2001-2009).

Tanto en el caso de *E. faecalis* como *E. faecium* (tablas 4 y 5), la localización más frecuente es la infección de herida de piel y partes blandas (IHPB). En ambos casos igualmente se ha producido un notable incremento a lo largo del periodo. Cuando se realiza el análisis estadístico partiendo de la hipótesis de que las IHPB podrían ser el origen de esos puntos de inflexión en el caso de *E. faecalis* como de *E. faecium*, cuando hipotetizamos se obtiene un Riesgo Relativo RR=1,5 [IC 95%: 1,33-1,70; p<0,001] el cual es el doble en el segundo periodo que en el primero, aumento que no tiene que ver con las estancias hospitalarias puesto que se mantienen a lo largo del tiempo. La comparación de proporciones se llevó a cabo con la prueba estadística Johckheere-terpstra.

En el caso de *E. faecalis* las ITU constituyen la segunda localización cercana a las IHPB. Para *E. faecium* las ITU representan una localización mucho menos frecuente que las IHPB y similar a las bacteriemias.

No merecen especial comentario las otras especies de enterococos en cuanto a sus localizaciones, sólo señalar el *E. avium*, el más frecuente entre ellos, destacando su localización en IHPB. Para *E. gallinarum*, sin embargo, la infección más frecuente ha sido la bacteriemia.

V. 3. Bacteriemias por enterococos relacionadas con la asistencia sanitaria.

V.3.1. Bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria según especies de enterococos en el HUC durante el periodo 2001-2009.

En la tabla 11, que refleja los datos correspondientes a las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria para cada uno de los años del periodo de estudio, puede verse que el *E. faecalis* constituye el 81,38% de todos los casos, mientras que el *E. faecium* el 17%. Estas cifras son coherentes con las descritas por otros autores, si

bien, en algunos casos se sitúa ya en el 22% para *E. faecium*. Es llamativo en nuestro caso que el resto de *Enterococcus spp.* concretamente *E. casseliflavus*, *E. durans* y *E. gallinarum*, sólo representan el 1,6% de las bacteriemias por enterococos mientras que para otros autores españoles representan el 7% e incluso el 8%^{(195),(197)}.

V.3.2. Densidad de Incidencia de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria por *E. faecalis* y *E. faecium*.

Para poder valorar adecuadamente la evolución de las bacteriemias por enterococos a lo largo del periodo de estudio recurrimos a la densidad de incidencia calculada para *E. faecalis* y *E. faecium*, que está reflejada en la tabla 12 y figura 5.

En la tabla 32 y 33 reflejamos los resultados que se obtienen aplicando la Regresión de Poisson.

Tabla 32. Resultados del análisis estadístico realizado mediante la Regresión de Poisson, aplicada a la densidad de incidencia de bacteriemias de *E. faecalis*

<u>BACTERIEMIAS <i>E. faecalis</i></u>									
<i>P</i>									
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
2001	-	0,96	0,19	0,29	0,001	<0,001	0,008	<0,001	0,003
2002	-	-	0,26	0,37	0,002	<0,001	0,01	0,001	0,005
2003	-	-	-	0,90	0,06	0,02	0,21	0,04	0,11
2004	-	-	-	-	0,04	0,01	0,13	0,02	0,07
2005	-	-	-	-	-	0,80	0,58	0,91	0,84
2006	-	-	-	-	-	-	0,34	0,92	0,55
2007	-	-	-	-	-	-	-	0,46	0,80
2008	-	-	-	-	-	-	-	-	0,69
2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 33. Resultados del análisis estadístico realizado mediante la Regresión de Poisson, aplicada a la densidad de incidencia de bacteriemias por *E. faecium*

BACTERIEMIAS <i>E.faecium</i>									
	<i>P</i>								
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
2001	-	0,22	0,36	0,10	0,16	0,006	0,006	<0,001	0,23
2002	-	-	0,94	0,88	0,99	0,19	0,20	0,06	0,99
2003	-	-	-	0,63	0,82	0,10	0,11	0,02	0,97
2004	-	-	-	-	0,99	0,34	0,36	0,12	0,85
2005	-	-	-	-	-	0,24	0,25	0,07	0,99
2006	-	-	-	-	-	-	0,99	0,64	0,18
2007	-	-	-	-	-	-	-	0,62	0,19
2008	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
2009	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuando estudiamos lo sucedido con *E. faecalis* en la tabla 32, podemos ver que se produce un punto de inflexión entre el 2004 y 2005 con una elevación que es claramente significativa pero que se va a mantener sin cambios entre 2005 y 2009. Para *E. faecium* (tabla 33) podemos establecer que realmente sólo existen diferencias significativas del 2006 al 2008 con relación al 2001, sin que con posterioridad, hablando en términos generales se hayan producido cambios en la tendencia de bacteriemias por *E. faecium*.

V.4. Bacteriemias recogidas en el EARSS en el HUC durante el periodo 2001-2009.

En la tabla 13 se reflejan los datos de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria y las comunitarias tanto para *E. faecalis* como para *E. faecium*. Podemos observar que para esos dos años *E. faecium* representa el 15,79% del total de bacteriemias, representando las comunitarias del global el 7,5%.

V.5. Importancia de las bacteriemias por enterococos en relación al total de bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria en el HUC en el periodo de estudio 2001-2009.

Como señalamos anteriormente en la tabla 14 se recoge la etiología de las bacteriemias relacionadas con la asistencia sanitaria en nuestro hospital para cada año del periodo de estudio y globalmente.

Hay que destacar que para el conjunto del periodo las bacteriemias por *Enterococcus spp.* ocupan la tercera posición. Esta posición es superior a la referida por autores españoles⁽¹⁹⁷⁾, así como por estudios de ámbito internacional como el SENTRY⁽¹⁹⁸⁾ que sitúan a *Enterococcus spp.* en la quinta posición en Europa, en la cuarta en Norteamérica y en la novena posición en Latinoamérica.

Mayor interés tiene, referirse al porcentaje que representan las bacteriemias por enterococos del total de bacteriemias, en el referido estudio SENTRY⁽¹⁹⁸⁾, en EE.UU. son el 10,2%, en Europa el 7,2% y en Latinoamérica el 3,3%. En España, los datos del EPINE y de otros autores^{(199),(70, 197)} lo sitúan incluso por debajo de Europa en un rango del 5,6%⁽¹⁹⁵⁾.

Para nosotros el porcentaje es del 13,9% para *Enterococcus spp.*, lo que subraya la importancia que tienen los enterococos en nuestro estudio.

V.6. Resistencia a la ampicilina, linezolid y de alto nivel a la gentamicina de las bacteriemias por *E.faecalis* y *E. faecium* en el HUC en los años 2008 y 2009.

En las tablas 15 y 16 recogíamos los datos de las resistencia a la ampicilina, linezolid y de alto nivel a la gentamicina de las bacteriemias, tanto relacionadas con la asistencia sanitaria como comunitarias de nuestro hospital a través del programa EARSS para los años 2008 y 2009.

Es concordante con todos los estudios, la baja resistencia de *E. faecalis* a la ampicilina y la alta resistencia de *E. faecium*^{(70),(200)}. Para la resistencia de alto nivel para la gentamicina nos situamos en valores para esos dos años de 42-49% para *E. faecalis* y

de 23,8- 45% para *E. faecium*). Esto quiere decir que nos situamos en un nivel alto de resistencia ya que los datos para Europa de bacteriemias en 2008 situaban el rango de resistencia de alto nivel para gentamicina de *E. faecalis* entre 25-50%. Para *E. faecium* estos valores se aproximan a los de otros estudios situándose por debajo de la resistencia de *E. faecalis*⁽²⁰¹⁾.

Tanto *E. faecalis* como *E. faecium* presentan una alta sensibilidad al Linezolid.

V.7. Resistencia a la ampicilina de los aislamientos por *E. faecium* en el HUC.

En muchas ocasiones se ha establecido que el incremento de la resistencia de *E. faecium* a la ampicilina precede a menudo, con unos años de diferencia, a la resistencia a la vancomicina⁽¹²⁾. No es nuestro caso porque como puede verse en la tabla 17 desde el comienzo de nuestro periodo de estudio hemos tenido una resistencia alta a la ampicilina superando en términos generales el 80% sin que se haya producido, como ya veremos posteriormente un incremento real de la resistencia a la vancomicina. Picazo y colaboradores en el estudio VIRA 2006⁽⁶⁹⁾ cita para el año 2001 un porcentaje del 52,1% (92,7% en nuestro hospital) y un 62,9% para el año 2006 (83,8% en nuestro caso). Esto indica el elevado nivel de resistencia a la ampicilina en nuestro caso.

V.8. *Enterococcus spp.* resistentes a la vancomicina en pacientes del HUC en el periodo 2001-2009.

Como puede verse en la tabla 18 y en la figura 6, el número de ERV aislados en nuestro hospital es afortunadamente muy reducido ya que en este periodo de 9 años sólo hemos tenido 11 infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria por ERV, de las cuales 10 fueron por *E. faecium* (4 *EfmvanB* y 6 *EfmvanA*) y sólo una por *EfcvanB*. Además tuvimos una infección extrahospitalaria por *EfmvanA*. Tuvimos 15 colonizaciones en el HUC, de las cuales 13 son perianales, obtenidas por búsqueda activa de portadores en relación al brote y 2 colonizaciones son de muestra clínica (exudado de herida y punta de catéter como se aprecia en la tabla 20). Mención aparte

son las infecciones por *E.gallinarum* y *E.casseliflavus* que fueron 9 y 7 respectivamente. Ninguna otra especie de ERV fue aislada.

El porcentaje de ERV en el caso de *E.faecium* está en torno, como puede verse en el gráfico 7, al 2%, con un pico en el año 2005 de un 6% el cual corresponde al brote que comentaremos posteriormente y, en el otro extremo, el año 2009, dónde no tuvimos ninguno. Este valor es similar al referido para España y algunos países Europeos⁽⁸⁸⁾.

Para *E.faecalis* el porcentaje es cero en todos los años salvo la única infección en el 2008 que lo sitúan en 0,27%.

Quisiéramos destacar que el primer aislamiento de *EfmvanB* que hicimos en el año 2001 representa el primer caso en España, al menos informado.

Cuando comparamos nuestros datos referidos a bacteriemias encontramos que se sitúan en el límite inferior del rango para España 1-3%⁽¹²⁾ para *EfmRV*. En el caso de *EfcRV* se habla de <1%⁽¹²⁾, siendo en nuestro caso de 0,2%. Esto es llamativo si se compara con EE.UU. y con algunos países de Europa, así, en EE.UU. alrededor del 13% de los enterococos aislados son ERV llegando al 20% en las UCIs⁽²⁰²⁾. Este porcentaje está referido al conjunto, es decir, incluyendo *E.faecalis* y *E. faecium* resistentes a la vancomicina, ya que los datos del estudio SENTRY para el 2002 señalaban una resistencia a la vancomicina para *E. faecium* del 60,9% y sólo del 2,5% para *EfcRV*⁽¹⁹⁸⁾.

En el Reino Unido, los datos referidos a las bacteriemias señalan un 8-12% en el periodo 2001-2007 de ERV, siendo el 20-25% para *EfmRV* y 1,6% *EfcRV*. Italia para el 2007 refleja un 11% aunque había llegado a un 24% en el 2003 para *EfmRV*. Portugal, en el 2007, fue del 29%, si bien, llegó a un 47% en el 2003. Grecia llegó en el 2006 al 42% de *EfmRV* y Alemania refleja cifras del 8% para el 2006 y 15% en el 2007 para *EfmRV*. Países como Bélgica, Francia y Austria presentan niveles bajos de ERV⁽¹²⁾.

La distribución interna para *EfmvanB* y *EfmvanA* y de *EfcvanB* y *EfcvanA* es muy similar a la que presenta Francia, así, *EfmvanA* representa para ellos el 78% y para nosotros el 74%; *EfmvanB* en el caso de Francia es el 18% y en nuestro caso 18,5%; hay

ligeras diferencias en *EfcvanA* y *EfcvanB* con respecto a Francia, pero es que en nuestro caso tenemos sólo un aislado que es *EfcvanB*.

En resumen, podríamos decir que los ERV no representan un problema en nuestro hospital dada su escasa incidencia en absoluto comparable a los de otras bacterias multiresistentes.

Y esto una vez descartado el origen animal de los ERV en Europa como se habló en su tiempo, tampoco es atribuible en nuestro caso, ni en general, en España, a una rigurosa política de antibióticos.

Es llamativo, ver tabla 34, como el consumo de vancomicina en nuestro hospital durante el periodo 2001-2010, marca un punto de inflexión a partir de 2005, valor máximo del periodo, para caer hacia la mitad aproximadamente del consumo de 2010. Esta caída se acompaña de un incremento injustificado del linezolid para el mismo periodo (ver tabla 35).

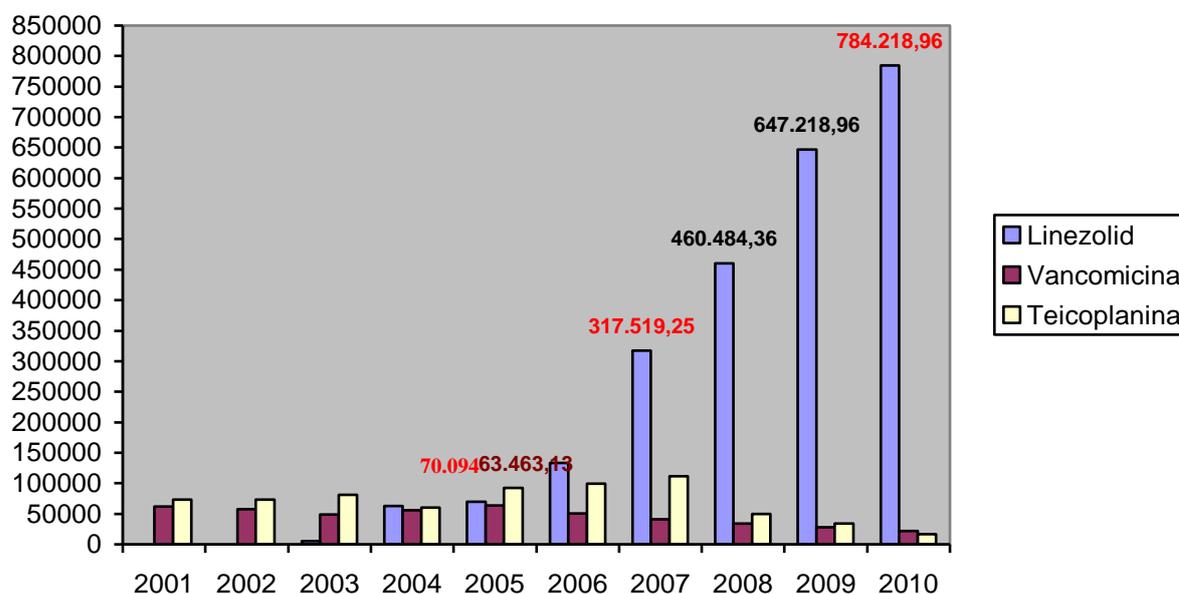
Tabla 34. Evolución del consumo de vancomicina en nuestro hospital durante el periodo 2001-2010.

	<u>IMPORTE euros</u>	<u>Nº VIALES</u>
2001	61.740	19.772
2002	57.843,70	20.210
2003	49.096,31	22.096
2004	56.151,98	26.653
2005	63.463,13	30.340
2006	50.577,79	26.474
2007	41.281,76	26.601
2008	34.378,79	22.919
2009	28.002,90	18.738
2010	21.501,44	14.528

Tabla 35. Evolución del consumo del linezolid en nuestro hospital durante el periodo 2001-2010.

	<u>IMPORTE euros</u>	<u>Nº VIALES</u>
2001	-	-
2002	-	-
2003	5.040	81
2004	62.603	1.006
2005	70.094	1.395
2006	133.084,31	2.239
2007	317.519,25	5.326
2008	460.484,36	7.724
2009	647.929,21	10.868
2010	784.218,96	13.699
2011(6meses)	341.793,74	5.242

Figura 12. Consumo de Linezolid, Vancomicina y Teicoplanina en el HUC durante el periodo 2001-2010 (importe total en euros y nº de viales consumidos por año)



El perfil de riesgo de los pacientes que tuvieron infección hospitalaria es el siguiente: edad media alta (66,36 años), estancia hospitalaria prolongada con una media de 79 días, todos con antibioterapia previa prolongada y todos menos uno sometidos a cirugía previa. Siete (63,63%) de los 11 pacientes, murieron sin que podamos establecer en qué casos, si los hubo, hay una relación con la infección. Predominan las infecciones

de herida quirúrgica, piel y partes blandas y solamente dos bacteriemias. Cuatro de los pacientes eran post-transplante renal.

Dado qué, cómo es lógico no está instaurado un sistema de vigilancia activa de ERV y en relación con la escasa incidencia de infecciones sólo se aislaron en todo el periodo dos *EfcRV* en muestras clínicas en nuestro hospital, ambos fueron *vanB*, uno constituye un aislado de infección hospitalaria y el otro una colonización hospitalaria.

En relación con el brote que describiremos a continuación realizamos durante un periodo de tiempo una vigilancia activa en el servicio de Nefrología que dió lugar a los resultados que aparecen en la tabla 21 y sobre los que incidiremos a continuación al hablar del brote.

V.9. Estudio de un brote por *EfmvanA* en el 2005 en la planta de Nefrología del HUC y tipificación molecular de los ERV aislados en el HUC.

Como hemos visto la presencia de ERV ha sido mínima en nuestro hospital como pasa en general en los hospitales españoles. Si bien, hay que destacar que tuvimos un brote, 4 fueron infecciones entre julio y octubre del 2005, en el servicio de Nefrología de nuestro hospital, todos ellos en pacientes post-transplantados. Y que estuvo relacionado con los primeros aislamientos de *EfmVR* en otros dos hospitales universitarios de las islas Canarias.

Como consecuencia del brote en nuestro hospital iniciamos en octubre del 2005 un sistema de vigilancia activa para la detección de ERV a partir de tomas perianales a todos los pacientes hospitalizados en la planta de Nefrología. El último aislamiento de toma perianal se realizó el 2 de diciembre del 2005. Dado que desde entonces no se volvió en los meses siguientes a aislar, suprimimos la vigilancia activa el 13 de Marzo de 2006. En total, el brote en nuestro hospital incluyó a 4 pacientes con infección, en 3 de los cuales la toma perianal fue positiva, teniendo en cuenta que el primer caso falleció al día siguiente de identificar si infección de localización quirúrgica y 12 pacientes en los que hubo colonización detectada por vigilancia activa pero no infección. Esto es coherente con lo ya conocido, que por cada caso de infección por

ERV se detectan muchos más casos de colonización. Todos los pacientes tanto infectados como colonizados responden a los perfiles de riesgo descritos que incluyen: hemodiálisis, hospitalizaciones frecuentes y prolongadas, enfermedades crónicas y subyacentes, multitratamiento con antibióticos incluyendo tratamientos previos con vancomicina y/o cefalosporinas.

Este brote que es el primero descrito en Canarias, responde por lo tanto a las características ya descritas en otros brotes, pero además es interesante que por las circunstancias ya relatadas en los resultados pudo verse que afectó a 3 pacientes de otros 2 hospitales claramente relacionados epidemiológicamente. Además, el estudio de todos los aislados a través del PFGE que sigue siendo sin lugar a dudas el mejor marcador molecular epidemiológico, confirma esa asociación epidemiológica.

En las tablas 23 y 24 y figuras 9, 10 y 11 puede comprobarse lo expuesto. Todos los aislados se agruparon en el mismo PFGE, en tres subtipos: A₁, A₂, A₃, estrechamente relacionados (2 o 3 bandas de diferencia entre ellos y más del 90% de similitud). Por lo que evidentemente forman parte de un mismo brote o cluster. Así mismo se comprueba que en los 3 pacientes infectados en los que se realizó aislamiento perianal coincidía el subtipo de la infección con el de la colonización. Por otra parte por MLST (ver tablas 23 y 24), se agruparon todos en una secuencia tipo ST18 que pertenece al complejo clonal 17 el cual es el linaje más importante de *EfmRV* adaptado a los hospitales y que está ampliamente descrita su presencia en los 5 continentes. Algunos autores^{197, 199} han propuesto además que los genes de virulencia *esp* y *Hyl* se han utilizado como marcador del complejo C17. Como puede comprobarse en las tablas 23 y 24, en los casos que pudimos realizar el estudio, fueron negativos en 4 de ellos y positivos en 3, tanto para el gen *esp* como para el *hyl*, contradiciendo la afirmación de los anteriores autores, además dos de los cuales, su secuencia tipo es la ST192.

V. 10. Sensibilidad antibiótica de todos los aislados de ERV (2001-2009).

En las tablas 25, 26 y 27 hemos expuesto las resistencias de los distintos ERV, es decir, los 20 *EfmvanA*, 5 *EfmvanB* y los 2 *EfcvanB*, a los diferentes antibióticos cuyo estudio interesa.

Con respecto a *EfmvanA* hay que destacar que todos fueron resistentes a la ampicilina. El alto nivel de resistencia a la gentamicina fue muy bajo, concretamente un 10,5%. Todos los aislados implicados en el brote y que pertenecían al mismo pulsotipo no presentaban alto nivel de resistencia a la gentamicina. Para la estreptomycinina el 95% no presentaban resistencia de alto nivel. Igualmente el 100% fueron sensibles al linezolid y el 95% al quinupritin/dalfopristin. Concordante con el perfil de los aislados pertenecientes al CC17, el 100% fueron resistentes a las quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino y norfloxacino).

Los *EfmvanB* aislados, si bien su número es limitado (5), presentaron un menor nivel de resistencia a la ampicilina, un 60%, inferior por lo tanto al conjunto de todos los *E. faecium* estudiados incluyendo tanto los sensibles como los resistentes a la vancomicina. Sin embargo, presentan un mayor nivel de resistencia a la gentamicina (60%) y a la estreptomycinina (40%) y un menor nivel de resistencia a las quinolonas. Todos los aislados fueron sensibles al linezolid.

Con respecto a los *EfcvanB* no se puede establecer ningún tipo de conclusión al ser sólo dos los estudiados. Tal vez señalar que los dos fueron sensibles a la ampicilina (100%), lo cual es coherente con el comportamiento general de *E. faecalis*. En el caso de gentamicina y estreptomycinina en cuanto a resistencia de alto nivel tuvimos un aislado sensible y otro resistente a ambos antibióticos.

V.11. Estudios de vigilancia epidemiológica de ERV llevados a cabo en el HUC en los años 2007 y 2009.

Como hemos visto en el estudio de portadores realizado en el 2007, en el que sólo se incluyó a 19 pacientes, no se aisló ningún *EfmRV* ni *EfcRV*, y sí, en cambio, en 2 pacientes se aisló *E.gallinarum*. Esto pone en evidencia la ausencia de colonización en nuestros pacientes que es coherente con la baja incidencia de infecciones por ERV. También merece un pequeño comentario el hecho de que el medio cromogénico utilizado no es absolutamente selectivo para *EfmRV* ni *EfcRV*, sino que permite en algún caso el crecimiento de *E. gallinarum*. En cualquier caso esto no resulta un inconveniente en absoluto para su utilización.

El estudio realizado en 2009, recordemos entre marzo y junio del 2009, incluyó un número mucho más elevado de pacientes y por primera vez no se limitó al servicio de Nefrología, sino que también se realizó en Hemodiálisis, Oncología Médica, Digestivo y Medicina Interna con un total de 185 pacientes. La razón de incluir estos otros servicios es que son aquellos en los que a lo largo de nuestro periodo de estudio hemos aislado algún ERV.

Nuevamente hay que destacar el bajo nivel de colonización por *EfmRV* y *EfcRV* ya que sólo se aisló un *EfmvanA* en una paciente de Medicina Interna. Si conviene destacar los aislamientos de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus* por 2 razones: una, la más importante, porque hay que destacar la alta frecuencia de colonización especialmente por *E. gallinarum* en nuestro estudio que supera la descrita en otros trabajos⁽²⁰³⁾,⁽²⁰⁴⁾,⁽²⁰⁵⁾. La otra, por la baja infectividad que demuestra ya que en todo el periodo sólo hemos tenido 9 infecciones, aunque habría que destacar que 5 de ellos fueron bacteriemias.

VI. CONCLUSIONES

1. Los *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* se sitúan en el Hospital Universitario de Canarias entre los agentes causales más importantes de las Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria con un claro predominio de *Enterococcus faecalis*, si bien *Enterococcus faecium* ha incrementado su participación dentro del conjunto de enterococos. Además, ambos han aumentado su incidencia en los últimos años.
2. La localización clínica más frecuente la constituyen las infecciones de heridas, piel y partes blandas que son las que han producido en nuestro hospital el incremento global de las infecciones por los enterococos que hemos señalado anteriormente.
3. En el Hospital Universitario de Canarias las bacteriemias por enterococos, en casi su totalidad *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, ocupan la tercera posición en el conjunto etiológico y superan el porcentaje referido por otros autores tanto en EE.UU como en Europa. Con referencia a España nuestro porcentaje dobla el valor de los datos globales nacionales.
4. A lo largo de todo el periodo, la resistencia a la ampicilina de los *E. faecium* aislados en nuestro hospital, se ha mantenido en valores muy altos sin variaciones significativas. Esta alta resistencia a la ampicilina de *E. faecium* no ha significado, a pesar de lo señalado por varios expertos, un incremento de la incidencia de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina.
5. La incidencia de *Enterococcus faecalis* y de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina ha sido mínima a lo largo de todo el periodo, y en todos los casos, salvo en dos, siempre fueron *Enterococcus faecium*. Destacaremos que el primer *Enterococcus faecium vanB* aislado en Canarias fue en nuestro hospital. Además, resaltaremos que, a excepción de un caso, siempre fueron Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria. Las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina constituyen, por su importancia, uno de los indicadores más sensibles. En nuestro caso nos encontramos en el límite inferior del rango

para España, tanto en el caso de *Enterococcus faecalis* y de *Enterococcus faecium*. Esto contrasta no sólo con los valores altos de EE.UU. sino incluso con los de algunos países europeos como Reino Unido, Italia, Portugal, Grecia y Alemania.

6. Dentro de esa mínima incidencia merece destacarse la aparición en el año 2005 de un brote por *Enterococcus faecium vanA* con cuatro Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria en pacientes transplantados del Servicio de Nefrología en el que además detectamos 12 pacientes colonizados. El estudio mediante PFGE identificó la existencia de un sólo pulsotipo con 3 subtipos estrechamente relacionados, poniendo en evidencia que se trataba de un brote o cluster, el cual ha sido el único descrito en Canarias.
7. Por MLST se agrupan todos los aislados del brote en una secuencia, la ST18, que pertenece al CC17, el cual es el linaje más importante de *E. faecium* adaptados a los hospitales y cuya presencia está ampliamente descrita en los cinco continentes. La identificación de genes *esp* e *hyl* utilizada por algunos autores como marcadores del CC17 fue negativa en la mayoría de los aislados lo que contradice dicha afirmación. Con posterioridad al brote en 2 aislados se identificó la secuencia ST192 perteneciente igualmente al complejo clonal CC17.
8. Los estudios de portadores realizados con posterioridad al brote en el Servicio de Nefrología no detectaron en ningún caso la presencia de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina. Sólo en un estudio de portadores realizado en el año 2009 en los servicios de Hemodiálisis, Cirugía General Digestiva, Medicina Interna, Oncología Médica y de Nefrología se detectó un *Enterococcus faecium vanA* concretamente en el servicio de Medicina Interna. Esta, prácticamente, ausencia de colonización es coherente con la baja incidencia de Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria. Si es destacable que en el estudio realizado en el 2009 se encontraron porcentajes elevados de colonización por *E.gallinarum* y *E.*

casseliflavus, particularmente el primero, que superan los encontrados por otros estudios realizados en distintos países.

9. Por todo lo anterior es evidente que en nuestro hospital no procede la puesta en marcha de un Sistema de Vigilancia Activa de ERV como el que iniciamos para mejorar el control de los *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, a diferencia de lo que ocurre en muchos hospitales de EE.UU.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Schleifer K, Kilpper-Baltz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. . Int J Syst Bacteriol. 1984; 34:31-4.
2. Devriese LA CM, Wirth R. The prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, applications 2ed. New York: Springer-Verlag; 1992.
3. Facklam R, Carvalho MGS, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. Washington DC: ASM Press; 2002.
4. Murray PR JBE, Jorgensen JH, landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9 ed. Washington DC. 2007.p: 430-442.
5. Mandell GL BJ, Dolin R. Género *Enterococcus*. *Streptococcus bovis* y género *Leuconostoc*. Enfermedades Infecciosas, Principios y Práctica. 6ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2006. p. 2411-21.
6. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev. 2000 Oct; 13(4):686-707.
7. Levine DP. Vancomycin: a history. Clin Infect Dis. 2006 Jan 1;42 Suppl 1:S5-12.
8. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet. 1988 Jan 2-9;1(8575-6):57-8.
9. Patel R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. J Antimicrob Chemother. 2003 Jun;51 Suppl 3:iii13-21.
10. McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. Emerg Infect Dis. 1997 Jul-Sep;3(3):311-7.
11. Wade JJ, Uttley AH. Resistant enterococci--mechanisms, laboratory detection and control in hospitals. J Clin Pathol. 1996 Sep;49(9):700-3.
12. Werner G, Coque TM, Hammerum AM, Hope R, Hryniewicz W, Johnson A, et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. Euro Surveill. 2008 Nov 20;13(47).
13. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin Infect Dis. 2006 Jan 1;42 Suppl 1:S25-34.
14. Climo MW AG, Monroe S. Vancomycin-resistant gram-positive pathogens: potential approaches for prevention and control. In: RP W, editor. Prevention and control of nosocomial infections. 4 ed. Philadelphia.USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2003. p. 170-85.

15. Torres C, Escobar S, Portillo A, Torres L, Rezusta A, Ruiz-Larrea F, et al. Detection of clonally related vanB2-containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals. *J Med Microbiol*. 2006 Sep;55(Pt 9):1237-43.
16. Lorenzo-Diaz F, Delgado T, Reyes-Darias JA, Flores C, Mendez-Alvarez S, Villar J, et al. Characterization of the first VanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in a Spanish hospital. *Curr Microbiol*. 2004 Mar;48(3):199-203.
17. Dever LL, Smith SM, Handwerger S, Eng RH. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. *J Clin Microbiol*. 1995 Oct;33(10):2770-3.
18. Poyart C, Pierre C, Quesne G, Pron B, Berche P, Trieu-Cuot P. Emergence of vancomycin resistance in the genus *Streptococcus*: characterization of a vanB transferable determinant in *Streptococcus bovis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Jan;41(1):24-9.
19. Willems RJ, Top J, van Den Braak N, van Belkum A, Endtz H, Mevius D, et al. Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Infect Dis*. 2000 Sep;182(3):816-23.
20. Bonten MJ, Willems R, Weinstein RA. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis*. 2001 Dec;1(5):314-25.
21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Nosocomial enterococci resistant to vancomycin-United States 1983-1993. *MMRW Morb Mortal Wkly Rep Surveill Summ*. 1993;42(30):597-9.
22. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. *Am J Infect Control*. 2001;29(6):404-21.
23. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report. Data Summary from January 1992-June 2004. *Am J Infect Control*. 2004;32(8):470-85.
24. Boyce JM, Opal SM, Chow JW, Zervos MJ, Potter-Bynoe G, Sherman CB, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. *J Clin Microbiol*. 1994 May;32(5):1148-53.
25. Slaughter S, Hayden MK, Nathan C, Hu TC, Rice T, Van Voorhis J, et al. A comparison of the effect of universal use of gloves and gowns with that of glove use alone on acquisition of vancomycin-resistant enterococci in a medical intensive care unit. *Ann Intern Med*. 1996 Sep 15;125(6):448-56.
26. Morris JG, Jr., Shay DK, Hebden JN, McCarter RJ, Jr., Perdue BE, Jarvis W, et al. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents, including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. *Ann Intern Med*. 1995 Aug 15;123(4):250-9.
27. Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, van Voorhis J, Matushek M, Slaughter S, et al. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1996 Dec 14;348(9042):1615-9.

28. Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 May;42(5):1303-4.
29. Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. *J Antimicrob Chemother.* 1994 Oct;34(4):507-14.
30. Donnelly JP VA, Witte W, Murcy BE. Does the use in animals of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics, influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? *J Antimicrob Chemother.* 1996;37:389-92.
31. Hubert P Eea. Fecal Carriage of Vancomycin-Resistant Enterococci in Hospitalized Patients and those living in the Community in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 1997:3026-31.
32. European Antimicrobial Resistant Surveillance System (EARSS). Disponible en: http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2007_EARSS_Annual_Report.pdf
33. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* 2003 Dec 1;88(2-3):269-90.
34. Kawalec M, Kedzierska J, Gajda A, Sadowy E, Wegrzyn J, Naser S, et al. Hospital outbreak of vancomycin-resistant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Sep;13(9):893-901.
35. Simonsen GS, Myhre MR, Dahl KH, Olsvik O, Sundsfjord A. Typeability of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant enterococci using long-range PCRs and specific analysis of polymorphic regions. *Microb Drug Resist.* 2000 Spring;6(1):49-57.
36. Agerso Y, Lester CH, Porsbo LJ, Orsted I, Emborg HD, Olsen KE, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Oct;62(4):844-5.
37. Suppola JP, Kolho E, Salmenlinna S, Tarkka E, Vuopio-Varkila J, Vaara M. vanA and vanB incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality. *J Clin Microbiol.* 1999 Dec;37(12):3934-9.
38. Vuopio-Varkila J, Suppola J, Klinger N, Tarkka E, Kolho E. Increase of the number of vancomycin resistant enterococci (VRE) isolated in Helsinki, Finland. *Euro Surveill.* 1997 Dec;2(12):97-8.
39. Olofsson MB, Pornull KJ, Karnell A, Telander B, Svenungsson B. Fecal carriage of vancomycin- and ampicillin-resistant Enterococci observed in Swedish adult patients with diarrhea but not among healthy subjects. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(9):659-62.

40. Torell E, Fredlund H, Tornquist E, Myhre EB, Sjoberg L, Sundsfjord A. Intrahospital spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Sweden. Scand J Infect Dis. 1997;29(3):259-63.
41. Brown DF, Hope R, Livermore DM, Brick G, Broughton K, George RC, et al. Non-susceptibility trends among enterococci and non-pneumococcal streptococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. J Antimicrob Chemother. 2008 Nov;62 Suppl 2:ii75-85.
42. British Society for antimicrobial Chemotherapy (BSAC). Resistant Surveillance project. Disponible en: http://www.bsac.org.uk/resistance_surveillance.cfm
43. Deplano A, Denis O, Nonhoff C, Rost F, Byl B, Jacobs F, et al. Outbreak of hospital-adapted clonal complex-17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain in a haematology unit: role of rapid typing for early control. J Antimicrob Chemother. 2007 Oct;60(4):849-54.
44. Top J, Willems R, van der Velden S, Asbroek M, Bonten M. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in The Netherlands. J Clin Microbiol. 2008 Jan;46(1):214-9.
45. de Regt MJ, van der Wagen LE, Top J, Blok HE, Hopmans TE, Dekker AW, et al. High acquisition and environmental contamination rates of CC17 ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in a Dutch hospital. J Antimicrob Chemother. 2008 Dec;62(6):1401-6.
46. Stichting Werkgroep Infectiepreventie (WIP). Disponible en: <http://www.wip.nl>.
47. Novais C, Sousa JC, Coque TM, Peixe LV. Molecular characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Portuguese hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jul;49(7):3073-9.
48. Routsis C, Platsouka E, Willems RJ, Bonten MJ, Paniara O, Saroglou G, et al. Detection of enterococcal surface protein gene (esp) and amplified fragment length polymorphism typing of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* during its emergence in a Greek intensive care unit. J Clin Microbiol. 2003 Dec;41(12):5742-6.
49. Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. J Clin Microbiol. 2005 Apr;43(4):1575-80.
50. Melo-Cristino J. Antimicrobial resistance in staphylococci and enterococci in 10 Portuguese hospitals in 1996 and 1997. POSGAR. Portuguese Study Group of Antimicrobial Resistance. Microb Drug Resist. 1998 Winter;4(4):319-24.
51. Novais C, Coque TM, Sousa JC, Baquero F, Peixe L. Local genetic patterns within a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clone isolated in three hospitals in Portugal. Antimicrob Agents Chemother. 2004 Sep;48(9):3613-7.

52. Novais C, Coque TM, Ferreira H, Sousa JC, Peixe L. Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jun;71(6):3364-8.
53. Fontana R, Ligozzi M, Mazzariol A, Veneri G, Cornaglia G. Resistance of enterococci to ampicillin and glycopeptide antibiotics in Italy. The Italian Surveillance Group for Antimicrobial Resistance. *Clin Infect Dis.* 1998 Aug;27 Suppl 1:S84-6.
54. Lambiase A, Del Pezzo M, Piazza O, Petagna C, De Luca C, Rossano F. Typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains in a cohort of patients in an Italian intensive care Unit. *Infection.* 2007 Dec;35(6):428-33.
55. Bonora MG, Ligozzi M, De Fatima M, Bragagnolo L, Goglio A, Guazzotti GC, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates causing hospital outbreaks in northern Italy belong to the multilocus sequence typing C1 lineage. *Microb Drug Resist.* 2004 Summer;10(2):114-23.
56. Biavasco F, Foglia G, Paoletti C, Zandri G, Magi G, Guaglianone E, et al. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. *Appl Environ Microbiol.* 2007 May;73(10):3307-19.
57. Hryniewicz W, Szczypa K, Bronk M, Samet A, Hellmann A, Trzcinski K. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated in Poland. *Clin Microbiol Infect.* 1999 Aug;5(8):503-5.
58. Kawalec M, Gniadkowski M, Zielinska U, Klos W, Hryniewicz W. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain carrying the vanB2 gene variant in a Polish hospital. *J Clin Microbiol.* 2001 Feb;39(2):811-5.
59. Kolar M, Pantucek R, Vagnerova I, Kesselova M, Sauer P, Matouskova I, et al. Genotypic characterisation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from haemato-oncological patients at Olomouc University Hospital, Czech Republic. *Clin Microbiol Infect.* 2006 Apr;12(4):353-60.
60. Kolar M, Pantucek R, Bardon J, Cekanova L, Kesselova M, Sauer P, et al. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in humans and animals in the Czech Republic between 2002 and 2004. *J Med Microbiol.* 2005 Oct;54(Pt 10):965-7.
61. Ghidan A, Kaszanyitzky EJ, Dobay O, Nagy K, Amyes SG, Rozgonyi F. Distribution and genetic relatedness of vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated from healthy slaughtered chickens in Hungary from 2001 to 2004. *Acta Vet Hung.* 2008 Mar;56(1):13-25.
62. Kaszanyitzky EJ, Tenk M, Ghidan A, Fehervari GY, Papp M. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. *Int J Food Microbiol.* 2007 Apr 1;115(1):119-23.
63. Velasco D, Perez S, Angeles Dominguez M, Villanueva R, Bou G. Description of a nosocomial outbreak of infection caused by a vanA-containing strain of

- Enterococcus faecalis* in La Coruna, Spain. J Antimicrob Chemother. 2004 May;53(5):892-3.
64. del Campo R, Tenorio C, Zarazaga M, Gomez-Lus R, Baquero F, Torres C. Detection of a single vanA-containing *Enterococcus faecalis* clone in hospitals in different regions in Spain. J Antimicrob Chemother. 2001 Nov;48(5):746-7.
65. Marciá MD JC, Oliver A, Hidalgo O y Pérez JL Caracterización molecular de un brote por *Enterococcus faecalis* resistente a los glucopéptidos en una Unidad de Cuidados Intensivos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:460-3.
66. Nebreda T, Oteo J, Aldea C, Garcia-Estebanez C, Gastelu-Iturri J, Bautista V, et al. Hospital dissemination of a clonal complex 17 vanB2-containing *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother. 2007 Apr;59(4):806-7.
67. Valdezate S, Labayru C, Navarro A, Mantecon MA, Ortega M, Coque TM, et al. Large clonal outbreak of multidrug-resistant CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. J Antimicrob Chemother. 2009 Jan;63(1):17-20.
68. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, Top J, Nallapareddy SR, Torres C, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. J Clin Microbiol. 2006 Jun;44(6):2220-8.
69. Picazo JJ, Betriu C, Rodriguez-Avial I, Culebras E, Gomez M, Lopez F. Antimicrobial resistance surveillance: VIRA STUDY 2006. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006 Dec;24(10):617-28.
70. Coque TM, Willems RJ, Fortun J, Top J, Diz S, Loza E, et al. Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance? Antimicrob Agents Chemother. 2005 Jul;49(7):2693-700.
71. Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Delgado T, Moreno A, Reyes-Darias A, Sierra Lopez A, et al. Low prevalence of vancomycin-resistant enterococci in clinical samples from hospitalized patients of the Canary Islands, Spain. Int Microbiol. 2002 Sep;5(3):117-20.
72. Boyce JM. Vancomycin-resistant enterococcus. Detection, epidemiology, and control measures. Infect Dis Clin North Am. 1997 Jun;11(2):367-84.
73. Montecalvo MA, de Lencastre H, Carraher M, Gedris C, Chung M, VanHorn K, et al. Natural history of colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infect Control Hosp Epidemiol. 1995 Dec;16(12):680-5.
74. Livornese LL, Jr., Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor S, May P, et al. Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. Ann Intern Med. 1992 Jul 15;117(2):112-6.
75. Mazuski JE. Vancomycin-resistant enterococcus: risk factors, surveillance, infections, and treatment. Surg Infect (Larchmt). 2008 Dec;9(6):567-71.

76. Zhou Q, Moore C, Eden S, Tong A, McGeer A. Factors associated with acquisition of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in roommate contacts of patients colonized or infected with VRE in a tertiary care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008 May;29(5):398-403.
77. Metallidis S, Chatzidimitriou M, Tsona A, Bisiklis A, Lazaraki G, Koumentaki E, et al. Vancomycin-resistant enterococci, colonizing the intestinal tract of patients in a university hospital in Greece. *Braz J Infect Dis*. 2006 Jun;10(3):179-84.
78. Sakka V, Tsiodras S, Galani L, Antoniadou A, Souli M, Galani I, et al. Risk-factors and predictors of mortality in patients colonised with vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Jan;14(1):14-21.
79. Reale AL, Depetri ML, Culasso C, Paviolo M, Cheguirian ML, Enrico MC, et al. Vancomycin-resistant enterococci: prevalence and factors associated with intestinal colonization in oncology patients from Hospital de Ninos de Cordoba. *Rev Argent Microbiol*. 2009 Apr-Jun;41(2):92-6.
80. Humphreys H, Dolan V, Sexton T, Conlon P, Rajan L, Creamer E, et al. Implications of colonization of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in renal dialysis patients. Learning to live with it? *J Hosp Infect*. 2004 Sep;58(1):28-33.
81. Kalocheritis P, Baimakou E, Zerbala S, Papaparaskevas J, Makriniotou I, Tassios PT, et al. Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among haemodialysis patients in Athens, Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Dec;54(6):1031-4.
82. Elizaga ML, Weinstein RA, Hayden MK. Patients in long-term care facilities: a reservoir for vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*. 2002 Feb 15;34(4):441-6.
83. Harbarth S, Cosgrove S, Carmeli Y. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Jun;46(6):1619-28.
84. Kaplan AH, Gilligan PH, Facklam RR. Recovery of resistant enterococci during vancomycin prophylaxis. *J Clin Microbiol*. 1988 Jun;26(6):1216-8.
85. Chavers LS, Moser SA, Benjamin WH, Banks SE, Steinhauer JR, Smith AM, et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect*. 2003 Mar;53(3):159-71.
86. Fridkin SK, Edwards JR, Courval JM, Hill H, Tenover FC, Lawton R, et al. The effect of vancomycin and third-generation cephalosporins on prevalence of vancomycin-resistant enterococci in 126 U.S. adult intensive care units. *Ann Intern Med*. 2001 Aug 7;135(3):175-83.
87. Junior MS, Correa L, Marra AR, Camargo LF, Pereira CA. Analysis of vancomycin use and associated risk factors in a university teaching hospital: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2007;7:88.

88. Torres E, Perez S, Vindel A, Rodriguez-Bano J, Camba V, Villanueva R, et al. Enterococcus faecium resistente a glucopeptidos en un hospital del norte de España. Caracterización molecular y epidemiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Nov;27(9):511-7.
89. Pegues DA, Pegues CF, Hibberd PL, Ford DS, Hooper DC. Emergence and dissemination of a highly vancomycin-resistant vanA strain of Enterococcus faecium at a large teaching hospital. *J Clin Microbiol*. 1997 Jun;35(6):1565-70.
90. Sethi AK, Al-Nassir WN, Nerandzic MM, Donskey CJ. Skin and environmental contamination with vancomycin-resistant Enterococci in patients receiving oral metronidazole or oral vancomycin treatment for *Clostridium difficile*-associated disease. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Jan;30(1):13-7.
91. Donskey CJ, Hanrahan JA, Hutton RA, Rice LB. Effect of parenteral antibiotic administration on the establishment of colonization with vancomycin-resistant Enterococcus faecium in the mouse gastrointestinal tract. *J Infect Dis*. 2000 May;181(5):1830-3.
92. Donskey CJ. The role of the intestinal tract as a reservoir and source for transmission of nosocomial pathogens. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul 15;39(2):219-26.
93. Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Aug;18(4):300-5.
94. Al-Nassir WN, Sethi AK, Li Y, Pultz MJ, Riggs MM, Donskey CJ. Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Jul;52(7):2403-6.
95. Karanfil LV, Murphy M, Josephson A, Gaynes R, Mandel L, Hill BC, et al. A cluster of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in an intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1992 Apr;13(4):195-200.
96. Noskin GA, Stosor V, Cooper I, Peterson LR. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1995 Oct;16(10):577-81.
97. Huang SS, Datta R, Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants. *Arch Intern Med*. 2006 Oct 9;166(18):1945-51.
98. Duckro AN, Blom DW, Lyle EA, Weinstein RA, Hayden MK. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Arch Intern Med*. 2005 Feb 14;165(3):302-7.
99. Tenorio AR, Badri SM, Sahgal NB, Hota B, Matushek M, Hayden MK, et al. Effectiveness of gloves in the prevention of hand carriage of vancomycin-resistant enterococcus species by health care workers after patient care. *Clin Infect Dis*. 2001 Mar 1;32(5):826-9.
100. Hayden MK, Blom DW, Lyle EA, Moore CG, Weinstein RA. Risk of hand or glove contamination after contact with patients colonized with vancomycin-resistant

enterococcus or the colonized patients' environment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008 Feb;29(2):149-54.

101. Austin DJ, Bonten MJ, Weinstein RA, Slaughter S, Anderson RM. Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 8;96(12):6908-13.

102. Tacconelli E, Cataldo MA. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Feb;31(2):99-106.

103. Puzniak L A, Mundy, MD. Enterococci. En: *APIC TEXT of Infetion Control and Epidemiology.* 2 ed.Vol.2: The edfinitive source for clinical standards in infection prevention and patient safety. Association for Profesionals in Infection Control and Epidemiology (APIC)..2005.p:71-1,71-9.

104. DeLisle S, Perl TM. Vancomycin-resistant enterococci: a road map on how to prevent the emergence and transmission of antimicrobial resistance. *Chest.* 2003 May; 123(5 Suppl):504S-18S.

105. Francia MV. Glycopeptide-resistant Enterococcus in Europe: an increasing nosocomial problem. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2005 Oct;23(8):457-9.

106. Salgado CD. The risk of developing a vancomycin-resistant Enterococcus bloodstream infection for colonized patients. *Am J Infect Control.* 2008 Dec;36(10):S175 e5-8.

107. Olivier CN, Blake RK, Steed LL, Salgado CD. Risk of vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) bloodstream infection among patients colonized with VRE. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008 May;29(5):404-9.

108. Carmeli Y, Eliopoulos G, Mozaffari E, Samore M. Health and economic outcomes of vancomycin-resistant enterococci. *Arch Intern Med.* 2002 Oct 28;162(19):2223-8.

109. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of Staphylococcus aureus and enterococcus. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003 May;24(5):362-86.

110. Strausbaugh S.J. JM, Rhinehart E, Chiarello L. HIPAC, CDC. Draft guideline for isolation precautions: preventing transmiión of infectious agents in healthcare setings. 2004 Disponible en:

http://www.premierinc.com/all/safety/resources/gudelines/cdc_guidelines.jsp.

111. Strausbaugh LJ, Siegel JD, Weinstein RA. Preventing transmission of multidrug-resistant bacteria in health care settings: a tale of 2 guidelines. *Clin Infect Dis.* 2006 Mar 15;42(6):828-35.

112. Ostrowsky BE, Trick WE, Sohn AH, Quirk SB, Holt S, Carson LA, et al. Control of vancomycin-resistant enterococcus in health care facilities in a region. *N Engl J Med*. 2001 May 10;344(19):1427-33.
113. Falk PS, Winnike J, Woodmansee C, Desai M, Mayhall CG. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a burn unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2000 Sep;21(9):575-82.
114. Byers KE, Anglim AM, Anneski CJ, Germanson TP, Gold HS, Durbin LJ, et al. A hospital epidemic of vancomycin-resistant *Enterococcus*: risk factors and control. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001 Mar;22(3):140-7.
115. Montecalvo MA, Jarvis WR, Uman J, Shay DK, Petrullo C, Rodney K, et al. Infection-control measures reduce transmission of vancomycin-resistant enterococci in an endemic setting. *Ann Intern Med*. 1999 Aug 17;131(4):269-72.
116. Siddiqui AH, Harris AD, Hebden J, Wilson PD, Morris JG, Jr., Roghmann MC. The effect of active surveillance for vancomycin-resistant enterococci in high-risk units on vancomycin-resistant enterococci incidence hospital-wide. *Am J Infect Control*. 2002 Feb;30(1):40-3.
117. Rupp ME, Marion N, Fey PD, Bolam DL, Iwen PC, Overfelt CM, et al. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001 May;22(5):301-3.
118. Golan Y, Snyderman DR. Reduced acquisition of vancomycin-resistant enterococci: gown effect or confounding? *Clin Infect Dis*. 2003 Feb 15;36(4):535-6; author reply 7-8.
119. Jochimsen EM, Fish L, Manning K, Young S, Singer DA, Baker R, et al. Control of vancomycin-resistant enterococci at a community hospital: efficacy of patient and staff cohorting. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999 Feb;20(2):106-9.
120. Puzniak LA, Leet T, Mayfield J, Kollef M, Mundy LM. To gown or not to gown: the effect on acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis*. 2002 Jul 1;35(1):18-25.
121. Lankford MG ZT, Trick WE, Hacek DM, Noskin GA, Peterson LR. Impact of hospital design on the handwashing compliance among healthcare workers. Presented at the 38th Annual Meeting of the Infectious Diseases society of America; September 7-10, 2000; New Orleans, LA. Abstract 18:43.
122. Boyce JM, Pittet D; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee; HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HICPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. Society for Healthcare Epidemiology of America/Association for Professionals in Infection Control/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep*. 2002 Oct 25; 51(RR-16):1-45, quiz CE1-4.
123. Larson E KM. Factors influencing handwashing behavior of patient care personnel. *Am J Infect Control* 1982;10(3):93-9.

124. Maki DG. The use of antiseptics for handwashing by medical personnel. *J Chemother.* 1989 Apr;1 Suppl 1:3-11.
125. Ehrenkranz NJ, Alfonso BC. Failure of bland soap handwash to prevent hand transfer of patient bacteria to urethral catheters. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1991 Nov;12(11):654-62.
126. Larson E. A causal link between handwashing and risk of infection? Examination of the evidence. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1988 Jan;9(1):28-36.
127. Larson EL, Aiello AE, Bastyr J, Lyle C, Stahl J, Cronquist A, et al. Assessment of two hand hygiene regimens for intensive care unit personnel. *Crit Care Med.* 2001 May;29(5):944-51.
128. Widmer AF. Replace hand washing with use of a waterless alcohol hand rub? *Clin Infect Dis.* 2000 Jul;31(1):136-43.
129. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Lonks JR, Boyce JM. Comparative *In vitro* activities of daptomycin and vancomycin against resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Dec;44(12):3447-50.
130. Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, Touveneau S, et al. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. *Infection Control Programme. Lancet.* 2000 Oct 14;356(9238):1307-12.
131. Zachary KC, Bayne PS, Morrison VJ, Ford DS, Silver LC, Hooper DC. Contamination of gowns, gloves, and stethoscopes with vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001 Sep;22(9):560-4.
132. Muto CA, Byers KE, Karchmer TB, Dill JB, Durbin LJ, Farr BM. Controlling vancomycin-resistant enterococcus (VRE) at a university hospital. Presented at the Seventh Annual Meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America; April 27-29, 1997; St. Louis, MO. Abstract 52:28.
133. Fridkin SK, Lawton R, Edwards JR, Tenover FC, McGowan JE, Jr., Gaynes RP. Monitoring antimicrobial use and resistance: comparison with a national benchmark on reducing vancomycin use and vancomycin-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis.* 2002 Jul;8(7):702-7.
134. Quale J, Landman D, Saurina G, Atwood E, DiTore V, Patel K. Manipulation of a hospital antimicrobial formulary to control an outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Dis.* 1996 Nov;23(5):1020-5.
135. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Hoyer CK, Hanrahan JA, Huger AM, et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med.* 2000 Dec 28;343(26):1925-32.
136. May AK, Melton SM, McGwin G, Cross JM, Moser SA, Rue LW. Reduction of vancomycin-resistant enterococcal infections by limitation of broad-spectrum cephalosporin use in a trauma and burn intensive care unit. *Shock.* 2000 Sep;14(3):259-64.

137. Donskey CJ, Hanrahan JA, Hutton RA, Rice LB. Effect of parenteral antibiotic administration on persistence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):384-90.
138. Donskey CJ, Hoyen CK, Das SM, Helfand MS, Hecker MT. Recurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus* stool colonization during antibiotic therapy. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002 Aug;23(8):436-40.
139. Hachem R, Raad I. Failure of oral antimicrobial agents in eradicating gastrointestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2002 Jan;23(1):43-4.
140. Cookson BD, Macrae MB, Barrett SP, Brown DF, Chadwick C, French GL, et al. Guidelines for the control of glycopeptide-resistant enterococci in hospitals. *J Hosp Infect.* 2006 Jan;62(1):6-21.
141. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. Recommendations of the Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR Recomm Rep.* 1995 Sep 22;44(RR-12):1-13.
142. EH S. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: Lawrence CA, Block SS, eds. *Disinfection, sterilization, and Preservation.* Philadelphia: Lea and Febiger; 1968:517-531.
143. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? *Clin Infect Dis.* 2004 Oct 15;39(8):1182-9.
144. Saurina G, Landman D, Quale JM. Activity of disinfectants against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997 May;18(5):345-7.
145. Anderson RL, Carr JH, Bond WW, Favero MS. Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997 Mar;18(3):195-9.
146. Byers KE, Durbin LJ, Simonton BM, Anglim AM, Adal KA, Farr BM. Disinfection of hospital rooms contaminated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1998 Apr;19(4):261-4.
147. Centers for Disease Control and Prevention/Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Draft Guidelines for Environmental Infection Control in Healthcare Facilities.* Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2001. Disponible en: www.cdc.gov/ncidod/hip/enviro/guide.htm.
148. Coll P., Coque M.T., Domínguez M.A., Vázquez J., Villa J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos de Microbiología clínica. Recomendaciones de la SEIMC.2005.* Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
149. Vázquez J, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:113-20.

150. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995 Sep;33(9):2233-9.
151. Smith NH, Holmes EC, Donovan GM, Carpenter GA, Spratt BG. Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of *argF*, *recA*, *rho*, and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. *Mol Biol Evol.* 1999 Jun;16(6):773-83.
152. Feil E, Zhou J, Maynard Smith J, Spratt BG. A comparison of the nucleotide sequences of the *adk* and *recA* genes of pathogenic and commensal *Neisseria* species: evidence for extensive interspecies recombination within *adk*. *J Mol Evol.* 1996 Dec;43(6):631-40.
153. Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis.* 2005 Jun;11(6):821-8.
154. Leavis HL, Willems RJ, Top J, Bonten MJ. High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2006 Mar;44(3):1059-64.
155. Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, et al. A potential virulence gene, *hyleFm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *J Infect Dis.* 2003 Feb 1;187(3):508-12.
156. Willems RJ, Homan W, Top J, van Santen-Verheuvél M, Tribe D, Manziros X, et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet.* 2001 Mar 17;357(9259):853-5.
157. Kawalec M, Gniadkowski M, Zaleska M, Ozorowski T, Konopka L, Hryniewicz W. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: probable transmission of the resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. *J Clin Microbiol.* 2001 May;39(5):1781-7.
158. Perlada DE, Smulian AG, Cushion MT. Molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of enterococci in Cincinnati, Ohio: a prospective citywide survey. *J Clin Microbiol.* 1997 Sep;35(9):2342-7.
159. 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 Jun;40(6):1963-71.
160. Jureen R, Top J, Mohn SC, Harthug S, Langeland N, Willems RJ. Molecular characterization of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from hospitalized patients in Norway. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2330-6.
161. Torell E, Kuhn I, Olsson-Liljequist B, Haeggman S, Hoffman BM, Lindahl C, et al. Clonality among ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in Sweden and relationship with ciprofloxacin resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Oct;9(10):1011-9.

162. Titze-de-Almeida R, Van Belkum A, Felipe MS, Zanella RC, Top J, Willems RJ. Multilocus sequence typing of hospital-associated *Enterococcus faecium* from Brazil reveals their unique evolutionary history. *Microb Drug Resist.* 2006 Summer;12(2):121.
163. Koh TH, Hsu LY, Chiu LL, Lin RV. Emergence of epidemic clones of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Singapore. *J Hosp Infect.* 2006 Jun;63(2):234-6.
164. Granlund M, Carlsson C, Edebro H, Emanuelsson K, Lundholm R. Nosocomial outbreak of vanB2 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Sweden. *J Hosp Infect.* 2006 Feb;62(2):254-6.
165. Klare I, Konstabel C, Mueller-Bertling S, Werner G, Strommenger B, Kettlitz C, et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005 Dec;24(12):815-25.
166. Lee WG, Lee SM, Kim YS. Molecular characterization of *Enterococcus faecium* isolated from hospitalized patients in Korea. *Lett Appl Microbiol.* 2006 Sep;43(3):274-9.
167. Mascini EM, Troelstra A, Beitsma M, Blok HE, Jalink KP, Hopmans TE, et al. Genotyping and preemptive isolation to control an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clin Infect Dis.* 2006 Mar 15;42(6):739-46.
168. Kawalec M, Pietras Z, Danilowicz E, Jakubczak A, Gniadkowski M, Hryniewicz W, et al. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *J Clin Microbiol.* 2007 Jan;45(1):147-53.
169. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999 Jun;37(6):1661-9.
170. van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev.* 1994 Apr;7(2):174-84.
171. Fernández F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22:355-60.
172. Monstein HJ, Quednau M, Samuelsson A, Ahrne S, Isaksson B, Jonasson J. Division of the genus *Enterococcus* into species groups using PCR-based molecular typing methods. *Microbiology.* 1998 May;144 (Pt 5):1171-9.
173. Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR, 3rd. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol.* 1997 Mar;35(3):703-7.
174. Antonishyn NA, McDonald RR, Chan EL, Horsman G, Woodmansee CE, Falk PS, et al. Evaluation of fluorescence-based amplified fragment length polymorphism analysis for molecular typing in hospital epidemiology: comparison with pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2000 Nov;38(11):4058-65.

175. Borgen K, Wasteson Y, Kruse H, Willems RJ. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) from Norwegian poultry cluster with VREF from poultry from the United Kingdom and The Netherlands in an amplified fragment length polymorphism genogroup. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jun;68(6):3133-7.
176. Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol.* 1999 Nov;37(11):3497-503.
177. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 May;33(5):1434.
178. Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin F. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002 Apr;42(4):273-7.
179. Leavis HL, Bonten MJ, Willems RJ. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):454-60.
180. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis.* 1995 May;171(5):1223-9.
181. Leavis HL, Willems RJ, Top J, Spalburg E, Mascini EM, Fluit AC, et al. Epidemic and nonepidemic multidrug-resistant *Enterococcus faecium*. *Emerg Infect Dis.* 2003 Sep;9(9):1108-15.
182. Sussmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun.* 2000 Sep;68(9):4900-6.
183. Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature.* 2002 Jun 13;417(6890):746-50.
184. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2004 Oct;72(10):6032-9.
185. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Oct;67(10):4538-45.
186. Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol.* 2004 Feb;186(3):672-82.

187. Zirakzadeh A, Patel R. Vancomycin-resistant enterococci: colonization, infection, detection, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2006 Apr;81(4):529-36.
188. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *American Journal of Infection Control.* 1988;16(3):128-40.
189. Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998 Aug;36(8):2187-90.
190. McGinniss MH, MacLowry JD, Holland PV. Acquisition of K:1-like antigen during terminal sepsis. *Transfusion.* 1984 Jan-Feb;24(1):28-30.
191. Gerlach, EH. Microdilution 1: A Comparative Study, p.63-76, In: Balows, A.(ed), *Current Techniques for Antibiotic Susceptibility Testing*, Charles C. Thomas, Springfield, IL.1974.
192. Smith CL KC, Cantor CR. . Pulsed field electrophoresis and the technology of large DNA molecules. *Genome analysis: a practical approach.* Oxford IRL, Press; 1988.
193. CHU G. Pulsed-field gel electrophoresis: theory and practice. *Methods: a companion to methods in enzymology*; 1990.
194. Byl B, Jacobs F, Struelens MJ, Thys JP. Extraintestinal *Clostridium difficile* infections. *Clin Infect Dis.* 1996 Apr;22(4):712.
195. Conde-Estevez D, Sorli L, Morales-Molina JA, Knobel H, Terradas R, Mateu-de Antonio J, et al. Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009 Jun-Jul;28(6):342-8.
196. Farinas MC, Torres C. [Enterococcus: an emerging pathogen in our hospitals?]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007 Oct;25(8):500-2.
197. Martínez-Odrizola P, Muñoz-Sánchez J, Gutiérrez-Macias A, Arriola-Martínez P, Montero-Aparicio E, Ezpeleta-Baquedano C, et al. [An analysis of 182 enterococcal bloodstream infections: epidemiology, microbiology, and outcome]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007 Oct;25(8):503-7.
198. Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004 Sep;50(1):59-69.
199. Sociedad Española de Medicina Preventiva Salud Pública e Higiene (SEMPSPH), 2007. Estudio de Prevalencia de las infecciones nosocomiales en España. EPINE 1990-2006: 17 años. Disponible en: http://neo.vhebron.net/ac/preventiva/epine/6_epine_1990_2006.pdf.

200. Fernandez Fernandez FJ, de la Fuente Aguado J, Rubianes Gonzalez M, Perez Fernandez S, Alvarez Fernandez M, Nodar Germinas A, et al. [Enterococcus faecalis bacteremia]. *Rev Clin Esp.* 2004 May;204(5):244-50.
201. McBride SJ, Upton A, Roberts SA. Clinical characteristics and outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* bacteraemia--a five-year retrospective review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010 Jan;29(1):107-14.
202. Campos Franco J, Gonzalez Quintela A. Enterococci and resistances. *Rev Clin Esp.* 2004 May;204(5):241-3.
203. Schouten MA, Hoogkamp-Korstanje JA, Meis JF, Voss A. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000 Nov;19(11):816-22.
204. Tøye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the vanC genotype). *J Clin Microbiol.* 1997 Dec;35(12):3166-70.
205. Maschieto A, Martinez R, Palazzo IC, Darini AL. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 Nov;99(7):763-7.