



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Microbiología y Ecología
Programa de Doctorado 3139 Medicina: Microbiología

TESIS DOCTORAL

Epidemiología de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido en una unidad de cuidados intensivos: Descripción clínica y caracterización molecular de un brote nosocomial

Presentada por

Eva María González Barberá

Licenciada en Farmacia

Dirigida por

María Dolores Gómez Ruíz

Juan José Camarena i Minyana

Juan Ginés Córdoba Cortijo

Valencia, octubre 2020

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: GÓMEZ RUÍZ, MARÍA DOLORES N.I.F. 22681660-A, Departamento/Instituto: SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA Centro: HOSPITAL UNIVERSITARI I POLITÈCNIC LA FE

2.- Apellidos y nombre: CAMARENA MINYANA, JUAN JOSE N.I.F. 19986708-F, Departamento/Instituto: MICROBIOLOGIA I ECOLOGIA Centro: UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

3.- Apellidos y nombre: CÓRDOBA CORTIJO, JUAN GINÉS N.I.F. 22642881-W, Departamento/Instituto: SERVICIO DE MICROBIOLOGIA Centro: HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCTOR PESET

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre: [REDACTED] .N.I.F. [REDACTED], Departamento/Instituto: [REDACTED] Centro: [REDACTED]

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "EPIDEMIOLOGÍA DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCTORA DE β -LACTAMASA DE ESPECTRO EXTENDIDO EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS: DESCRIPCIÓN CLÍNICA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN BROTE NOSOCOMIAL"

de D/Dña. EVA MARÍA GONZÁLEZ BARBERÁ,

estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

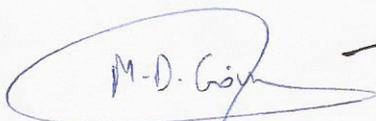
Fecha: 7 de octubre de 2020

Fdo.: M.D. Gómez

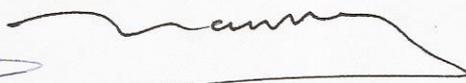
Fdo.: J.J. Camarena

Fdo.: J.G. Córdoba

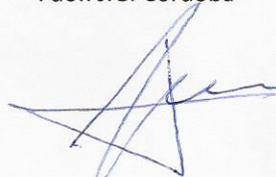
Fdo.: [REDACTED]



Director/a



Director/a



Director/a

Tutor/a

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

AGRADECIMIENTOS

A todos los que me han ayudado, apoyado, acompañado y soportado, GRACIAS, sin vosotros esta tesis no se hubiera finalizado.

Gracias a mis directores por haber mantenido su fe en mí a pesar de que parecía que nunca iba a conseguir acabar. A la Dra. M. Dolores Gómez Ruiz, que siempre ha tenido palabras de ánimo y ha sido y es como una segunda madre para mí. Al Dr. Juan José Camarena y al Dr. Juan Córdoba por haberme ayudado en todo lo que estaba en su mano.

Gracias al Dr. Jose Luis López Hontangas, por poner todo de su parte para que nos pudiéramos formar y trabajar en equipo con otros servicios y, sobretodo, por su paciencia conmigo.

Gracias a mis compañeros del Servicio de Microbiología, por aguantarme a pesar de que algunos momentos estaba insoportable, sin todos vosotros no la hubiera podido acabar. A Oihana Sabalza, mi segunda hermana pequeña, por tener siempre una sonrisa y echarme una mano en lo que hiciera falta (fuera de lo que fuera). A Ana Gil, juntas emprendimos este camino, y aunque no lo pudimos acabar a la vez, parece que ambas llegamos al destino.

Gracias a los compañeros del Servicio de Medicina Intensiva ya que sin ellos no hubiera podido entender las historias clínicas de sus pacientes y al Dr. Jaime Sanz, del Servicio de Hematología, por ayudarme en todo lo que estaba a su alcance.

Gracias al Dr. Miguel Salavert, sin el que probablemente esta tesis no se hubiera realizado, y a toda la Unidad de Enfermedades Infecciosas, por haberme enseñado tanto.

A David Hervás y Antonio Cañada, estadísticos del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, por su colaboración en el análisis de datos.

A mi familia y amigos, simplemente por estar ahí, no sabéis cuanto me habéis ayudado, gracias por hacerme sonreír.

A mi madre, aunque ya no estés, sé que estarías orgullosa de mí, gracias por enseñarme a luchar para conseguir mis sueños. Te sigo echando de menos.

ÍNDICE

pág. 3

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
ÍNDICE	3
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	11
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
INTRODUCCIÓN	15
1. INTRODUCCIÓN	17
OBJETIVOS.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
3.1. Estudio microbiológico.....	43
3.1.1. Revisión de los resultados microbiológicos.....	43
3.1.2. Estudio de sensibilidad.....	44
3.1.3. Microbiología molecular	47
3.1.4. Medidas de control del brote.....	63
3.1.5. Recogida de datos	64
3.1.6. Análisis de los datos	65
3.1.7. Análisis estadístico	65
3.2. Estudio observacional descriptivo.....	66
3.2.1. Objetivo del estudio	66
3.2.2. Diseño del estudio.....	66
3.2.3. Marco	66
3.2.4. Pacientes	66
3.2.5. Recogida de datos clínicos	68
3.2.6. Tamaño muestral	69
3.2.7. Análisis estadístico	69
RESULTADOS.....	71
4. RESULTADOS.....	73
4.1. Medidas de densidad de incidencia, prevalencia e incidencia mensual.....	73
4.2. Estudio de sensibilidad acumulado.....	75

4.3.	Estudios de tipificación molecular	76
4.3.1.	Electroforesis en campo pulsado.	76
4.3.2.	Rep-PCR (Diversilab™)	80
4.3.3.	Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)	82
4.3.4.	Multilocus sequence typing (MLST)	83
4.4.	Caracterización molecular de la resistencia a β-lactámicos.....	85
4.4.1.	PCR multiplex BLEE.....	85
4.4.2.	PCR y secuenciación BLEE tipo CTX-M grupo 1	86
4.4.3.	PCR y secuenciación BLEE tipo CTX-M grupo 9	86
4.4.4.	PCR y secuenciación β-lactamasa tipo SHV.....	87
4.4.5.	PCR y secuenciación de β-lactamasas de tipo TEM.....	88
4.4.6.	PCR de otras β-lactamasas de espectro extendido	89
4.4.7.	PCR y secuenciación de OXA-1	89
4.4.8.	PCR β-lactamasas tipo AmpC	90
4.4.9.	PCR de carbapenemasas	91
4.5.	Resistencia a colistina mediada por genes <i>mcr</i>	92
4.6.	Factores de virulencia asociados a la cápsula polisacáridica	93
4.7.	Resumen de los resultados de la caracterización molecular	94
4.8.	Informe acumulado de sensibilidad	95
4.9.	Resultados secuenciación genómica completa.....	97
4.10.	Medidas de control	101
4.10.1.	Muestreo ambiental.....	101
4.10.2.	Estudio de portadores.....	102
4.10.3.	Otras medidas	102
4.11.	Descripción de los pacientes afectados por el perfil 1.....	104
4.12.	Análisis univariante del estudio de casos y controles	109
4.13.	Análisis multivariante del estudio de casos y controles.....	114
4.14.	Estudio comparativo de los pacientes que desarrollaron un proceso infeccioso por <i>Kpn1</i> frente a los que no lo desarrollaron.....	115
	DISCUSIÓN	121
5.	DISCUSIÓN.....	123
5.1.	Epidemiología.....	123

5.2.	Resultados microbiológicos.....	124
5.3.	Estudio poblacional	135
5.4.	Búsqueda de reservorio ambiental y estudio de portadores.....	138
5.5.	Medidas de vigilancia y control.....	138
5.6.	Limitaciones del estudio.....	140
	CONCLUSIONES	141
6.	CONCLUSIONES	143
	BIBLIOGRAFÍA.....	145
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	147
	ANEXO I - CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS	165
	ANEXO II – DENDOGRAMAS OBTENIDOS MEDIANTE REP-PCR (DIVERSILAB™)	183
	ANEXO III – DENDOGRAMA OBTENIDO MEDIANTE RAPD	191
	ANEXO IV – DENDOGRAMA DE PFGE, MLST Y GENES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA.....	195

LISTA DE ABREVIATURAS

- AmpCp: AmpC plasmídica
- APACHE II: *Acute physiology and chronic health evaluation II*
- BLEE: β -lactamasa de espectro extendido
- BRC: Bacteriemia relacionada con catéter
- CC: Complejo clonal
- cg-MLST: *core-genome MLST*
- CMI: Concentración mínima inhibitoria
- DDS: Solución de descontaminación digestiva selectiva
- ECDC: *European center for disease prevention and control*
- ECIN: Equipo de control de infección nosocomial
- ECMO: Oxigenación por membrana extracorpórea
- ERIC: Secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias
- Kpn1*: *Klebsiella pneumoniae* perteneciente al perfil 1 de PFGE
- LPS: Lipopolisacárido
- MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of flight*
- MBL: Metalo- β -lactamasas
- MLST: Tipado por secuenciación de múltiples loci
- MR: Multi-resistente
- NAVM: Neumonía asociada a ventilación mecánica
- pb: pares de bases
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- PFGE: Electroforesis en campo pulsado
- RAPD: Amplificación al azar de ADN polimórfico
- REP: Secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas
- Rep-PCR: PCR con secuencias de ADN repetidas
- r-MLST: *ribosomal MLST*
- SAPS 3: *Simplified acute physiology score 3*
- SLV: *Single locus variant*
- SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

SOFA: *Sequential Organ Failure Assesment*

TAVM: Traqueobronquitis asociada a ventilación mecánica

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

wg-MLST: *Whole genome MLST*

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Esquema de clasificación de β -lactamasas de espectro extendido ([modificado de Bush y Jacoby (31)].....	20
Tabla 2. Antibióticos en desarrollo frente a enterobacterias resistentes a carbapenemas (84).	28
Tabla 3. Clones de alto riesgo en <i>Klebsiella pneumoniae</i> (modificado de Navon-Venezia <i>et al.</i>) (71)	33
Tabla 4. Composición Mezcla de reacción (20 muestras).....	48
Tabla 5. Genes y cebadores utilizados en la técnica MLST.	51
Tabla 6. Oligonucleótidos empleados en la secuenciación de MLST diferentes a los de amplificación.	51
Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la caracterización molecular de las BLEE.	52
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en la detección de β -lactamasas tipo OXA-1.	57
Tabla 9. Oligonucleótidos empleados y concentración de los mismos en la detección de AmpCp.....	58
Tabla 10. Oligonucleótidos empleados en la detección de carbapenemasas.	59
Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados en la detección de genes transmisibles de resistencia a colistina <i>mcr</i>	60
Tabla 12. Oligonucleótidos empleados en el estudio de factores de virulencia asociados a la cápsula polisacárida.....	61
Tabla 13. Medidas de densidad de incidencia de infecciones y colonizaciones por <i>K. pneumoniae</i> BLEE en UCI.	73
Tabla 14. Informe acumulado de sensibilidad <i>Klebsiella pneumoniae</i> durante el periodo de estudio.....	73
Tabla 15. Estudio de sensibilidad.	75
Tabla 16. Resultados Diversilab TM comparado con PFGE.....	81
Tabla 17. Comparación de resultados de cepas de <i>K. pneumoniae</i> de un mismo paciente realizados en días diferentes.....	81
Tabla 18. Resultados MLST en cepas representativas de todos los perfiles de PFGE.....	83
Tabla 19. Resultados obtenidos mediante PCR multiplex de BLEE por perfiles de PFGE.	85
Tabla 20. Resultados PCR y secuenciación CTX-M grupo 1 por perfiles de PFGE.	86
Tabla 21. Resultados PCR y secuenciación CTX-M grupo 9 por perfiles de PFGE.	86

Tabla 22. Resultados de secuenciación del gen SHV por perfiles de PFGE.....	87
Tabla 23. Resultados de la PCR y secuenciación de TEM.....	88
Tabla 24. Resultados de la PCR y secuenciación de OXA-1.....	89
Tabla 25. Resultados estudio de factores de virulencia asociados a la cápsula mediante PCR..	93
Tabla 26. Resumen de los resultados de la caracterización molecular de la resistencia y factores de virulencia asociados a la cápsula.....	94
Tabla 27. Informe acumulado de sensibilidad por perfiles de PFGE.....	95
Tabla 28. Informe de sensibilidad de los perfiles de PFGE con un único aislado.....	96
Tabla 29. Evaluación QUASt del ensamblaje.....	97
Tabla 30. Análisis del archivo fasta utilizando la base de datos del Instituto Pasteur.....	98
Tabla 31. Resultados ResFinder.....	100
Tabla 32. Resultados análisis mediante KmerResistance.....	100
Tabla 33. Resultados del análisis mediante PlasmidFinder.....	101
Tabla 34. Resultados del muestreo ambiental (agosto de 2012).....	102
Tabla 35. Resultados del estudio de portadores.....	102
Tabla 36. Enfermedades de base y factores de riesgo al ingreso en UCI.....	106
Tabla 37. Tratamiento antibiótico de los pacientes.....	107
Tabla 38. Dispositivos invasivos.....	107
Tabla 39. Variables cuantitativas con distribución normal utilizadas en la selección de controles.....	109
Tabla 40. Variables cuantitativas con distribución no normal utilizadas en la selección de controles.....	109
Tabla 41. Variables cualitativas utilizadas en la selección de controles.....	109
Tabla 42. Variables cualitativas potenciales condicionantes de colonización por <i>Kpn1</i>	110
Tabla 43. Variables cuantitativas con distribución normal potenciales condicionantes de colonización por el clon 1 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE.....	112
Tabla 44. Variables cuantitativas con distribución no normal potenciales condicionantes de colonización por el clon 1 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE.....	112
Tabla 45. Comparación del tiempo de estancia en UCI entre casos y controles.....	113
Tabla 46. Modelo de regresión logística.....	114
Tabla 47. Variables cualitativas potenciales condicionantes de infección por el clon 1 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE.....	115
Tabla 48. Variables cuantitativas con distribución normal potenciales condicionantes de colonización por el clon 1 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE.....	117

Tabla 49. Variables cuantitativas con distribución no normal potenciales condicionantes de infección por el clon 1 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de BLEE.	118
Tabla 50. Comparación del tiempo de estancia en UCI entre infectados y colonizados por <i>Kpn1</i>	120
Tabla 51. Comparación población de las UCIs españolas 2011-2014 (estudios ENVIN) con la población colonizada o infectada por <i>Kpn1</i>	136

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plantilla del antibiograma	45
Figura 2. Prueba de difusión del doble disco (resultado positivo).....	45
Figura 3. Carbapenemasa de clase B (MBL).	47
Figura 4. Carbapenemasa de clase A.....	47
Figura 5. Algoritmo de trabajo de detección de BLEE.	54
Figura 6. Prevalencia e incidencia mensual (%) de infección/colonización por <i>K. pneumoniae</i> productora de BLEE	74
Figura 7. Casos prevalentes en función del tipo de muestras positivas.	74
Figura 8. Dendograma de PFGE.....	76
Figura 9. Casos incidentes de <i>K. pneumoniae</i> BLEE por perfil de PFGE.	77
Figura 10. Casos incidentes y prevalentes mensuales de <i>K. pneumoniae</i> BLEE - Perfil 1	78
Figura 11. Presión de colonización y casos incidentes de <i>K. pneumoniae</i> BLEE asociada al perfil 1.....	78
Figura 12. Comparación del patrón electroforético del aislado 183 en dos experimentos.....	81
Figura 13. Dendograma generado mediante RAPD comparado con los perfiles de PFGE.	82
Figura 14. Antibiograma de aislados incluidos en perfil de PFGE 2b.	87
Figura 15. Antibiogramas de los aislados estudiados para descartar la presencia de β -lactamasas tipo AmpC.....	90
Figura 16. Antibiograma de alguna de las cepas del perfil 6 no productoras de β -lactamasas tipo DHA.	91
Figura 17. Cepas productoras de carbapenemasa tipo VIM y CTX-M-9 pertenecientes al perfil 20 y ST147.	91
Figura 18. Antibiogramas de las cepas con desaparición del halo de inhibición a colistina.	92

Figura 19. Antibiograma de los aislados de <i>K. pneumoniae</i> en los que se realizó secuenciación genómica.....	97
Figura 20. Hospitales de procedencia.....	104
Figura 21. Unidad o servicio de procedencia.....	105
Figura 22. Motivo de ingreso en UCI.....	105
Figura 23. Tipo de muestra en la detección por primera vez de la colonización/infección.....	106
Figura 24. Tipos de infección causada por <i>Klebsiella pneumoniae</i> clon 1.....	108
Figura 25. Comparación de la estancia en UCI entre casos y controles mediante gráfica de Kaplan Meier.....	113
Figura 26. Probabilidad de colonización en función de los días de tratamiento con carbapenemas.....	114
Figura 27. Comparación de la estancia en UCI entre los pacientes infectados y los colonizados por <i>Kpn1</i> mediante la gráfica de Kaplan-Meier.....	120
Figura 28. Distribución mundial de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST11.....	127
Figura 29. Distribución mundial de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST15.....	127
Figura 30. Distribución mundial de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST147.....	128
Figura 31. Distribución mundial de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST437.....	129

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Klebsiella pneumoniae (Schroeter, 1886; Trevisan, 1887) forma parte del género *Klebsiella* (Trevisan, 1885), dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (Rahn, 1937) (1). Esta familia está formada por bacterias gramnegativas anaerobio-facultativas con morfología bacilar o cocobacilar, presentes en el tracto gastrointestinal de personas sanas (2).

K. pneumoniae es uno de los microorganismos más frecuentemente relacionados con infecciones asociadas a cuidados sanitarios, sobre todo en enfermos ingresados en unidades de pacientes críticos, y más ocasionalmente en pacientes quirúrgicos complejos e inmunodeprimidos. *K. pneumoniae* se ha asociado con entre el 2 y el 5% de las infecciones hospitalarias entre 2011 y 2014 según los datos publicados en los estudios EPINE (3,4), acercándose al 8% en los últimos años (5,6), especialmente en aquellas que afectan al tracto urinario y respiratorio (7). Según los datos publicados en los estudios ENVIN este microorganismo causa entre el 5 y el 10% de las infecciones acontecidas en unidades de medicina intensiva, observándose frecuentemente unos altos porcentajes de resistencia, en ocasiones cercanos al 50%, de cefalosporinas de 3ª generación, penicilinas asociadas a inhibidores de β -lactamasas y quinolonas y una resistencia creciente a carbapenémicos (8–15).

Al menos, cuatro componentes están implicados en la patogenicidad que presentan los aislados de *Klebsiella*: la presencia de fimbrias o producción de adhesinas, la expresión de sideróforos, la presencia de un lipopolisacárido que protege a este microorganismo de la respuesta inmunitaria del paciente y la existencia de una cápsula polisacárida (1).

La formación de biopelículas, muy asociadas a las infecciones relacionadas con dispositivos invasivos, está facilitada por la presencia de fimbrias, sobre todo de tipo 3, que permiten su unión a superficies abióticas (16). La secreción de sideróforos, moléculas con alta afinidad por el hierro como enterobactina, yersiniabactina, salmoquelina y aerobactina, ayudan a la bacteria a adquirir hierro en medios pobres en este elemento imprescindible para su patogénesis (16).

El lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de los bacilos gramnegativos constituye otro factor de virulencia en este microorganismo. El lípido A, habitualmente descrito como potente activador de la cascada inflamatoria, impide su reconocimiento por determinados receptores a través de una modificación basada en una 2-hidroxi-acilación, además este fragmento del LPS puede proteger a la bacteria de péptidos catiónicos antimicrobianos. El antígeno O impide la unión a C1q impidiendo la activación del complemento, y se une a C3b impidiendo la formación del complejo de ataque a membrana (16).

La capsula polisacáridica protege de la respuesta inmunitaria por múltiples vías: inhibiendo la fagocitosis, previniendo la activación del complemento y evitando la lisis por el complemento y los péptidos antimicrobianos (16). A mediados de los años 80, se comenzaron a describir infecciones graves en pacientes jóvenes y sanos causadas por *K. pneumoniae* en el sudeste asiático asociada a un fenotipo de hipermucoviscosidad debido a la hiperproducción de la cápsula polisacáridica y la presencia de genes específicos como el gen *rmpA*, comenzándose a denominar como patotipo hipervirulento frente al tradicional y ampliamente distribuido que pasó a denominarse denominado patotipo clásico, aunque no todas las cepas hipervirulentas presentan este fenotipo hipermucoviscoso (17). Tradicionalmente se consideraba que este patotipo no solía presentar problemas relativos a resistencia antibiótica, pero con la diseminación global de elementos genéticos móviles que confieren genes de resistencia, se ha comenzado a describir asociado a la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o carbapenemasas en todo el mundo (17). Los serotipos capsulares K1 y K2, estrechamente asociados a la hipervirulencia, son más resistentes a la fagocitosis por varios mecanismos: 1) inducción de una menor liberación de especies reactivas del oxígeno por parte de los neutrófilos y mejor supervivencia en los tejidos, 2) menor presencia de ácido siálico en su superficie, asemejándose a la membrana de las células del hospedador y evadiendo la respuesta inmune y 3) ausencia de repeticiones de residuos manosa específicos que permiten su reconocimiento por factores del hospedador, previniendo la lectino-fagocitosis y las señales proinflamatorias (16).

Este microorganismo presenta, en el caso de sepsis, una mortalidad cruda superior al 25% (18). Scheuerman *et al.* señalan que la mortalidad en el caso de cepas productoras de BLEE alcanza el 33,7% de los pacientes siendo muy superior a la producida por *Escherichia coli* BLEE (17,4%) (19). En el estudio publicado por Kim *et al.* (20) en el que la mortalidad a los 30 días en bacteriemia causada por *K. pneumoniae* era del 16,9% se analizaban los factores de riesgo asociados a este desenlace, encontrando como tales la presencia de leucopenia en el día de bacteriemia, una puntuación de SOFA elevada, la presencia del tipo capsular *wzi50* y de la asociación de la mulirresistencia antibiótica con la isla genómica *pks* [responsable de la producción de colibactina, una genotoxina que induce daño celular en las células del hospedador y se ha relacionado en *Escherichia coli* con incremento de la proliferación celular epitelial *in vivo*, de la invasión tumoral y del número de tumores en varios modelos murinos de cáncer colorectal, sugiriendo que podría promover el desarrollo de cáncer colorectal humano (21)]. El fenotipo de hipermucoviscosidad, muy asociado al desarrollo de absceso hepático, constituye un factor protector en este trabajo. Otros autores han señalado como factores de riesgo de mortalidad

en la bacteriemia por *K. pneumoniae*: el ingreso en UCI, la edad mayor a 65 años, una neoplasia subyacente, la necesidad de ventilación mecánica invasiva o sondaje urinario, el alcoholismo o la asociación con neumonía (16). En el estudio de Li *et al.* publicado en el año 2018 la mortalidad en bacteriemia causada por cepas hipervirulentas (37,1%) era similar a la observada por cepas “clásicas” (40,7%) aunque demostraban que determinados factores de riesgo como la diabetes mellitus o que se tratara de una infección adquirida en la comunidad favorecían la presencia de cepas con patotipo hipervirulento (22).

En el comienzo del siglo XXI, el problema de la resistencia a antibióticos ha alcanzado una alarmante magnitud global, siendo uno de los problemas sin resolver de la salud pública. La implacable evolución de la resistencia, acompañada del estancamiento en el diseño de nuevos fármacos antimicrobianos, prácticamente aboca a encontrar casos en los que ningún antibiótico es activo, recordando la era pre-antibiótica (23). Este hecho ya se ha puesto de manifiesto en los últimos años, pudiendo hallar ya en la literatura descripciones de casos en los que las cepas implicadas fueron consideradas pan-resistentes (24–26).

En enterobacterias la resistencia a β -lactámicos se debe fundamentalmente a la producción de β -lactamasas, siendo las más relevantes clínicamente en la primera década del siglo XXI por su perfil hidrolítico y frecuencia aquellas que generan resistencia a cefalosporinas de tercera generación, como las β -lactamasas de espectro extendido y β -lactamasas de tipo AmpC. En estos casos el tratamiento antimicrobiano se basa en el uso de antibióticos carbapenémicos en monoterapia o asociados a otros antibióticos como aminoglucósidos en el caso de infecciones graves (27). En la segunda década de éste siglo se ha producido una merma drástica de nuestras opciones terapéuticas en muchos casos con la emergencia y diseminación global de enzimas capaces de hidrolizar carbapenemas (28).

K. pneumoniae presenta resistencia natural a aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y otras penicilinas, siendo sensible a la gran mayoría de antibióticos β -lactámicos. Esta resistencia natural se debe a la producción constitutiva de bajo nivel de una β -lactamasa cromosómica de clase A (según la clasificación de Ambler) (29) que se inhibe por la acción del ácido clavulánico denominada SHV-1, aunque es frecuente encontrar mutaciones en la misma que en ocasiones modifican su espectro hidrolítico (30,31). En *K. pneumoniae*, la resistencia de alto nivel a antibióticos β -lactámicos se debe mayoritariamente a la producción de β -lactamasas vehiculadas en elementos genéticos móviles; un ejemplo son las BLEE y las de tipo AmpC comentadas anteriormente. En estos elementos genéticos móviles además podemos encontrar genes que confieren resistencia a otros

antibióticos, como aminoglucósidos o incluso quinolonas, aunque en este último caso la resistencia suele deberse a mutaciones en los genes cromosómicos *gyrA* y *parC* (1).

Las β -lactamasas de espectro extendido se definen como enzimas pertenecientes a la clase A o clase D de Ambler capaces de hidrolizar oximino- β -lactámicos (ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima y aztreonam, siendo en su mayoría inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico o tazobactam. En el año 1995 Bush, Jacoby y Medeiros propusieron una clasificación de β -lactamasas no basada en su estructura molecular como Ambler si no en su función (32), esta clasificación fue revisada 15 años más tarde (31) y en la **Tabla 1** se resume los grupos de β -lactamasas de espectro extendido existentes en la actualidad.

Tabla 1. Esquema de clasificación de β -lactamasas de espectro extendido ([modificado de Bush y Jacoby (31)]

Clasificación de Bush-Jacoby	Clase molecular	Sustrato distintivo	Inhibición por ácido clavulánico o tazobactam	Característica definitoria	Enzimas representativas
2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactams	SI	Hidrólisis aumentada de oximino- β -lactámicos	TEM-3 SHV-2 grupo CTX-M PER-1 VEB-1 GES-1 SFO-1
2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactams	NO	Hidrólisis aumentada de oximino- β -lactámicos y resistencia a inhibidores de β -lactamasas	TEM-50
2de	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	Hidrolisis de oximino- β -lactámicos y cloxacilina u oxacilina	OXA-11 OXA-15

Las β -lactamasas de espectro extendido inicialmente descritas derivaban de las β -lactamasas clásicas SHV-1, TEM-1 y OXA por modificaciones aminoacídicas que cambiaron sus sustratos definitivos. La primera descripción de TEM-3 (primera β -lactamasa de espectro extendido dentro de este grupo) data de 1984 en Francia, actualmente hay más de 100 β -lactamasas tipo TEM descritas y siendo todas ellas BLEE a excepción de TEM-1 y TEM-2 (33).

En el caso del grupo de las BLEE de tipo SHV, que derivan de SHV-1 y presentan un cambio aminoacídico de serina por glicina en la posición 238 responsable de la capacidad de hidrolizar ceftazidima y en algunos casos un cambio de lisina por glutamato en la posición 240 responsable de la hidrólisis de cefotaxima. Este grupo de β -lactamasas de espectro extendido junto con las derivadas de TEM-1 fueron las predominantes desde su descripción hasta los primeros años del siglo XXI (33,34).

Las β -lactamasas de tipo CTX-M denominadas así por su capacidad para hidrolizar cefotaxima, fueron descritas por primera vez en 1990. Este grupo de enzimas, en el que podemos encontrar 5 subgrupos principales (1, 2, 8, 9 y 25), hidrolizan cefalotina mejor que bencilpenicilina y cefotaxima mejor que ceftazidima, aunque algunas β -lactamasas de este grupo (como las del grupo 1) son capaces de actuar sobre ella. Todos los componentes de este grupo son capaces de hidrolizar cefepime y el grado de actuación sobre aztreonam es variable. A diferencia de los grupos anteriores, las β -lactamasas de tipo CTX-M no surgieron por modificación puntual de otra β -lactamasa clásica, sino que fueron identificadas inicialmente en el cromosoma de *Kluyvera* spp. y posteriormente pasaron a un plásmido que permitió su diseminación (33) convirtiéndose en la β -lactamasas más frecuentes a partir del principios del siglo XXI .

La β -lactamasas de espectro extendido del grupo de las OXA (englobadas dentro del grupo D de la clasificación de Ambler) son mucho menos frecuentes en enterobacterias que las enzimas de clase A. Dentro de este grupo podemos encontrar dos subfamilias importantes: a) las derivadas de OXA-10 entre las que encontramos OXA-11, OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19 y OXA-28 que presentan mutaciones que aumentan el grado de hidrólisis de cefalosporinas respecto a OXA-10 (no considerada β -lactamasa de espectro extendido aunque sí que es capaz de hidrolizar débilmente cefotaxima, ceftriaxona y aztreonam) y b) las derivadas de OXA-2 entre las que encontramos OXA-15 y OXA-36 (35).

Entre las β -lactamasas de clase A podemos resaltar PER-1, que es una β -lactamasa de espectro extendido descrita por primera vez en el año 1993 en *Pseudomonas aeruginosa* (36). En la actualidad se han definido hasta 8 variantes fundamentalmente en aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, considerándose su presencia en enterobacterias rara, aunque en nuestro país encontramos una descripción de un aislado de *Proteus mirabilis* productor de esta β -lactamasa (37). Su perfil hidrolítico afecta a penicilinas y cefalosporinas (especialmente ceftazidima) y es inhibida por clavulánico, sulbactam, y

tazobactam, aunque este último presenta un grado de inhibición menor que el observado con ácido clavulánico (38).

La primera descripción de una β -lactamasa de espectro extendido de tipo VEB (VEB-1) la encontramos en el año 1999 en un aislado de *Escherichia coli*. Estas β -lactamasas se clasifican dentro del grupo A de la clasificación de Ambler y dentro de este grupo su grado de homología con el resto de enzimas es inferior al 20% salvo con PER-1 y PER-2 que alcanza el 38%. Este enzima presenta un mayor grado de hidrólisis de cefotaxima y ceftriaxona frente al observado en ceftazidima y aztreonam, mientras que su actividad frente a penicilinas es menor (39,40).

SFO-1 es una β -lactamasa de espectro extendido de clase A descrita por primera vez en un plasmido autotransferible de un aislado de *Enterobacter cloacae* en Japón en el año 1999. SFO-1 se induce por la exposición a imipenem y es capaz de hidrolizar la mayoría de antibióticos β -lactámicos (excepto cefamicinas y carbapenemas) (41). Se considera una β -lactamasa poco frecuente aunque fue detectada en un brote de *Enterobacter cloacae* multirresistente en España publicado en el año 2011 (42).

GES-1 es una β -lactamasa de clase A descrita en por primera vez en el año 2000 en Francia en un aislado de *Klebsiella pneumoniae*. Este enzima presenta un mayor grado de hidrólisis de ceftazidima frente al observado con cefotaxima o aztreonam y a pesar de haberse aislado por primera vez en *K. pneumoniae* se considera poco frecuente en este microorganismo (43).

Desde la primera descripción de un aislado de *Klebsiella* spp. resistente a cefalosporinas de tercera generación por producción de BLEE en Alemania en 1983, se ha observado un incremento progresivo de los aislados con este patrón de resistencia a nivel mundial (44), en paralelo a este incremento, también se ha observado un aumento de los aislados con AmpC plasmídicas, pero de menor envergadura que el relacionado con las BLEE (45). A diferencia de las cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE, cuyo aumento de incidencia en nuestro país se debe a aislados procedentes de pacientes no hospitalizados, preferentemente de la comunidad y en menor grado asociados a cuidados sanitarios, *K. pneumoniae* productora de BLEE sigue presentando una distribución de casos principalmente nosocomial o muy relacionada con la asistencia sanitaria (46). En este microorganismo la tasa de BLEE se ha ido incrementando en los últimos años, desde el 18,6% de 2015 a un 25,4% en 2016-2017, sobre todo debido a infecciones nosocomiales donde el porcentaje es del 31,5%, dato muy superior al 12,7% observado en infecciones adquiridas en la comunidad (47). Todo ello justifica la menor diversidad clonal de los aislados de *K. pneumoniae* frente a los de *E. coli* (48).

Según los últimos estudios internacionales, los brotes epidémicos de infecciones hospitalarias causados por cepas multi-resistentes (MR) del género *Klebsiella* están siendo especialmente preocupantes (49). Se ha llegado a cuantificar que el 30% de los episodios de bacteriemia nosocomial por *K. pneumoniae* pudieran estar producidos por cepas productoras de BLEE (50). En unidades de pacientes críticos, donde el consumo de antibióticos es mayor y se ejerce una fuerte presión antimicrobiana selectiva sobre los clones resistentes, junto al potencial de transmisión facilitado entre pacientes de estos microorganismos, el porcentaje es aún mayor, y la producción de BLEE casi alcanza al 45% de los episodios de bacteriemia causados por *K. pneumoniae* (50).

En España se han llevado a cabo diferentes estudios para conocer la prevalencia real de *K. pneumoniae* y *E. coli* productora de BLEE, y se ha podido observar un cambio en el tipo de β -lactamasa implicado. En el primer estudio nacional realizado en el año 2000 (51), se analizaron 81 cepas de *K. pneumoniae* con sensibilidad disminuida a cefotaxima, ceftazidima, cefepima y aztreonam, y se demostró la presencia de BLEE en 70 cepas procedentes de 17 centros hospitalarios. Posteriormente fue publicada la caracterización molecular de estas cepas que presentaban 26 patrones diferentes mediante Rep-PCR, y los principales enzimas encontrados fueron β -lactamasas de tipo TEM (3, 4, 25 y 133) y de tipo SHV (2,2a, 5 y 12), aunque también aparecían 4 cepas que presentan una BLEE de tipo CTX-M-3 (52). En el año 2006 se realizó un segundo estudio nacional recogiendo 162 aislados de *K. pneumoniae* que fueron posteriormente caracterizados a nivel molecular (46). Se demostró la presencia de BLEE tipo CTX-M (15, 1, 14, 32 y 9) en el 46,9% de los casos (53), lo que refrendaba la evolución observada en el resto de Europa (54).

La diseminación global de aislados de enterobacterias productoras de BLEE (55) ha obligado a una amplia utilización de carbapenemas a nivel hospitalario ya que aunque estas cepas serían en principio sensibles a penicilinas asociadas a inhibidores como amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam (salvo otros mecanismo de resistencia presentes) su uso en determinados momentos ha sido desaconsejado por el riesgo de fracaso terapéutico con estos agentes (56). Este sobreuso de carbapenemas se ha relacionado con la aparición de enterobacterias resistentes a estos antibióticos (57,58).

La resistencia a carbapenemas puede estar mediada por modificación de proteínas de membrana (porinas) unida a la producción de cefalosporinas (59) o a la hiperexpresión de bombas de eflujo, pero principalmente se debe a la producción de carbapenemasas.

Las porinas presentes en la membrana externa de *Klebsiella pneumoniae* son unas proteínas triméricas que constituyen canales rellenos de agua permitiendo el transporte de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño (<600 Da) y algunos antibióticos, además pueden actuar como receptores de bacteriocinas y bacteriófagos y mantienen la integridad de la célula bacteriana. Estas proteínas juegan un papel en la adherencia, invasión y resistencia a la capacidad bactericida del suero. *K. pneumoniae* presenta 2 proteínas mayores en su membrana externa: OmpK35 y OmpK36, estas proteínas son homólogas a OmpC y OmpF de *Escherichia coli*. Además de estas dos proteínas presenta otra denominada OmpK37, que habitualmente se encuentra inactiva (60).

OmpK35 permite la entrada de cefoxitina, cefotaxima y carbapenemas y su presencia implica una reducción de las CMI de algunos antibióticos β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclina y cloranfenicol en al menos dos diluciones, pero cabe destacar la importante disminución de CMI en cefamicinas, oximino-cefalosporinas, cefalosporinas zwitterionicas e imipenem cuando se encuentra presente (61). La mayor parte de las cepas productoras de BLEE suelen perder la expresión de esta proteína, lo que puede contribuir a la resistencia antibiótica y a la selección de otros mecanismos (61). En el caso de la pérdida de OmpK36, la otra proteína de membrana fundamental en *K. pneumoniae* en cepas productoras de BLEE se ha relacionado con la elevación de CMI a agentes β -lactámicos, además también se ha relacionado con resistencia a carbapenemas en cepas con AmpC plasmídica y con resistencia a quinolonas en cepas con alteración en las topoisomerasas o bombas de eflujo activas (60), sin embargo este aumento en la resistencia viene acompañado de una disminución en la virulencia de las cepas por una mayor susceptibilidad a la fagocitosis mediada por neutrófilos (62). La pérdida de ambas proteínas produce alto nivel de resistencia a cefalosporinas y un importante incremento de la CMI a carbapenémicos (siendo mucho más importante el efecto frente a meropenem que sobre imipenem) (62).

Klebsiella pneumoniae puede expresar otras porinas como PhoE, LamA y OmpK26, que pueden ser cruciales para el microorganismo en ausencia de OmpK35/36. La expresión de OmpK26 parece compensar la ausencia de estas proteínas pero conlleva una menor penetración de carbapenemas, reduciendo la sensibilidad a estos antibióticos (60,63). Tanto la disminución en la expresión de PhoE como la de LamB parecen contribuir a la resistencia a carbapenemas (64).

En *K. pneumoniae* también podemos encontrar bombas de eflujo capaces de expulsar antibióticos, que pertenecen a cuatro familias diferentes: RND (Resistance-Nodulation-Division),

MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance) y MATE (Multidrug and Toxin Extrusion), siendo la más relevante desde el punto de vista de sensibilidad antibiótica el sistema AcrAB que pertenece a la familia RND.

El sistema AcrAB perteneciente a la familia RND es de origen cromosómico y está codificado por el operón *acrRAB*, en el que el gen *acrR* codifica un gen represor de AcrAB, mientras que *acrA* y *acrB* codifican una lipoproteína periplásmica de 40 KDa anclada en la membrana interna que une las membranas interna y externa y una proteína integral de membrana de 113,5 KDa con 12 segmentos transmembrana, situados en la membrana citoplasmática. La proteína AcrB conecta una proteína externa de membrana denominada TolC. Esta bomba de eflujo es capaz de actuar sobre diferentes sustratos como quinolonas, eritromicina, tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglucósidos y antibióticos β -lactámicos (a excepción de carbapenemas) aumentando sus CMI. Algunos autores refieren que cuando se producen mutaciones en el gen represor de AcrAB (*acrR*) se produce una hiperproducción de AcrAB que lleva a un marcado incremento de la resistencia a quinolonas y también se relaciona con resistencia a β -lactámicos y tigeciclina (60,65). Padilla *et al.* refieren que otros factores se encuentran implicados en este aumento de la resistencia, como la presencia de otros mecanismos de resistencia asociados o a la sobreexpresión del activador transcripcional RamA (que se debe a las mutaciones del gen regulador *ramR*) está implicada en la sobreexpresión de AcrAB que conduce al aumento de resistencia a los antibióticos antes mencionados (66–68).

Dentro del grupo RND encontramos otras bombas de eflujo implicadas en la aparición de resistencia a antibióticos, como OqxAB, de origen cromosómico en *K. pneumoniae*, aunque también podemos encontrarla en esta especie vehiculada en un plásmido conjugativo de 52 Kb, Una hiperexpresión de esta bomba contribuye a la reducción de sensibilidad a quinolonas (60,69).

El mecanismo fundamental de resistencia a carbapenemas en enterobacterias es la producción de carbapenemasas pertenecientes a tres clases de la clasificación molecular de Ambler (70):

- Clase A, que engloba enzimas del tipo KPC (*Klebsiella* Productora de Carbapenemasas), Nmca, IMI, Sme y GES.
- Clase B, o metalo- β -lactamasas (MBL) (sobre todo enzimas del tipo VIM, IMP y NDM).
- Clase D o serin-carbapenemasas (OXA-48 y sus variantes)

La primera carbapenemasa en *K. pneumoniae* se detectó en Japón en el año 1991 y pertenecía al grupo de las IMP (71), sin embargo el primer caso de resistencia a carbapenemas mediada por carbapenemasas en España se retrasó hasta el año 2005, tratándose de una metalo- β -lactamasa del tipo VIM-1 (72). Aunque la diseminación parecía iniciarse con pasos titubeantes en un primer momento en nuestro país en el que se detectaban casos aislados y brotes esporádicos de carbapenemasas sobre todo de tipo VIM e IMP, progresivamente fue aumentando originando brotes nosocomiales (27), semejando la evolución inicial que tuvieron las BLEE y a la que hacían referencia Walsh *et al.* en su artículo de revisión previendo la diseminación que se podría producir (73).

La primera detección de carbapenemasas de tipo OXA-48 se produjo en el año 2001 en Turquía, apareciendo en nuestro país en el año 2009, pero diseminándose con gran velocidad por todo el territorio español y causando brotes y situaciones de endemia fundamentalmente en hospitales terciarios (74). De esta carbapenemasa ya se han descrito hasta 11 variantes y empieza a detectarse incluso en infecciones adquiridas en la comunidad (45). Este enzima se caracteriza por presentar un alto nivel de resistencia a penicilinas incluso asociadas a inhibidores, una baja actividad hidrolítica de carbapenemas y nula actividad frente a cefalosporinas y monobactams, pero una proporción importante de las cepas productoras de OXA-48 co-expresan β -lactamasas de espectro extendido o AmpC plasmídicas y algunos estudios han reseñado su asociación con otras carbapenemasas u otros genes plasmídicos de resistencia a quinolonas o aminoglucósidos (45).

En el caso de las carbapenemasas de tipo KPC, su asociación con clones de alto riesgo como el ST512 ha conducido a una diseminación por todo el país causando importantes brotes con gran repercusión mediática y gran impacto clínico (75,76). Si bien inicialmente la detección de casos de metalo- β -lactamasas de tipo NDM se asociaba a pacientes con estancia previa en India (27), en la actualidad se ha detectado en brotes interhospitalarios (77).

La detección e identificación de las carbapenemasas puede representar un reto para el microbiólogo clínico. El diferente y variable grado de expresión de estas enzimas puede generar valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de las carbapenemas en el rango de sensibilidad (78). Los genes que codifican carbapenemasas normalmente se encuentran en elementos genéticos móviles, pudiendo conferir al microorganismo resistencia (o capacidad de adquirirla) a otras familias de antimicrobianos (59), por lo que es habitual encontrar casos de resistencia extensa o pan-resistencia (26) frente a la que no hay una alternativa óptima de tratamiento antibiótico.

La magnitud del problema de la resistencia antibiótica en la actualidad ha hecho que se desarrollen estrategias a nivel nacional e internacional para detener su hasta ahora implacable evolución (79,80). La resistencia a carbapenemas en enterobacterias constituye uno de los puntos de prioridad crítica de la Organización Mundial de la Salud (80). En el año 2010, ante la grave crisis en la que nos encontrábamos debido a la diseminación de mecanismos de resistencia y al estacionamiento en la génesis de nuevos antimicrobianos, la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos (IDSA) desarrolló la iniciativa “10 x ’20” en colaboración con el gobierno de EEUU, sociedades científicas, profesionales sanitarios, industria y universidades teniendo por objetivo el desarrollo de 10 antibióticos nuevos, seguros y efectivos hasta 2020 (81).

Las nuevas alternativas antibióticas ya aprobadas en nuestro país y basadas en el anillo β -lactámico como ceftazidima/avibactam o ceftolozano/tazobactam han demostrado efectividad para el tratamiento de infecciones causadas por cepas productoras de BLEE y aunque ceftolozano/tazobactam puede ser efectivo contra β -lactamasas de tipo OXA-48, no lo es frente a las combinaciones de esta carbapenemasa con β -lactamasas de espectro extendido. Ceftazidima/avibactam es activo frente a esta combinación de mecanismos y frente a carbapenemasas de clase A, aunque ya se han empezado a describir casos de resistencia (82,83). En la **Tabla 2** se recogen otros antibióticos que podrían ser efectivos frente a enterobacterias resistentes a carbapenemas y se encuentran actualmente en fase de estudio o han sido recientemente aprobados (84).

Tabla 2. Antibióticos en desarrollo frente a enterobacterias resistentes a carbapenemas (84).

Estructura	Antibióticos	Fase de desarrollo
Carbapenema + inhibidor de β -lactamasas derivado de ácido borónico	Meropenem - vaborbactam	Aprobado por FDA y EMA
Carbapenema + cilastatina + inhibidor de β -lactamasas (diazabicyclooctanona)	Imipenem-cilastatina + ETX2514SUL	Fase 2
	Imipenem-cilastatina + relebactam	Fase 3
Carbapenema + inhibidor de β -lactamasas (diazabicyclooctanona)	Meropenem-nacubactam	Fase 1
Cefalosporina + inhibidor de β -lactamasas	Cefepime + AAI101	Fase 3
Cefalosporina + inhibidor de β -lactamasa (diazabicyclooctanona)	Cefepime + VNRX-5133	Fase 1
	Cefepime + Zidebactam	Fase 1
	ETX0282CPDP	Fase 1
β -lactámico	AIC499	Fase 1
Monobactam	BOS-228 (LYS228)	Fase 2
β -lactámico sideróforo	Cefiderocol	Fase 3
Aminoglucósido	Plazomicina	Aprobado FDA
Tetraciclinas	Eravaciclina	Aprobado FDA
	TP-6076	Fase 1
Polimixina	SPR741	Fase 1
	SPR206	Fase 1

En los casos de resistencia extensa, el último recurso son antibióticos como colistina, tigeciclina, fosfomicina o amikacina (85–87), cuyo perfil de eficacia y seguridad no ha sido suficientemente estudiado en este contexto (59). Debemos tener en cuenta que esta sobreutilización de estos antimicrobianos también conduce a la aparición de resistencias, siendo cada vez es más frecuente encontrar casos de resistencia a colistina durante el tratamiento fundamentalmente debidos a modificaciones en el lipopolisacárido de la membrana externa (88). Otro mecanismo de resistencia a colistina con gran trascendencia debido a su posibilidad de diseminación es la modificación del lípido A del lipopolisacárido de la membrana externa con la adición de un residuo fosfoetanolamina mediante enzimas con actividad fosfoetanolamina-transferasa. El gen que codifica estos enzimas se denomina *mcr*, se encuentra vehiculado en plásmidos y fue descrito por primera vez en el año 2016 en China, pero en los últimos años ya se han descrito hasta 8 variantes y se han detectado casos en todo el mundo (89–96). En el estudio de epidemiología global publicado por Bradford *et al.* en el año 2015, la tasa de resistencia en enterobacterias productoras de carbapenemasas era del 12%, de las cuales en el 95% el microorganismo implicado era *Klebsiella pneumoniae* (97).

Hasta la fecha se han comunicado más de 60 brotes hospitalarios de infecciones causados por *K. pneumoniae* productora de BLEE (98). Clásicamente, el tracto gastrointestinal inferior de los pacientes colonizados ha sido aceptado como el principal reservorio de estos microorganismos (99), y se ha documentado la contaminación cruzada a través de las manos del personal sanitario en el medio hospitalario. Sin embargo, cada vez se dispone de nuevas evidencias acerca de la posible existencia de otros reservorios (como alimentos o elementos del entorno ambiental cercano) que podrían contribuir a la diseminación de estas enterobacterias productoras de BLEE (100).

Para el estudio de los brotes nosocomiales causados por bacterias multirresistentes son necesarias herramientas basadas en la bacteriología clásica (estudio y comparación de las características de las bacterias y su fenotipo en el antibiograma) y otras de tipificación molecular que permiten conocer la clonalidad de los aislados, así como confirmar la fuente de infección reservorio. Entre las técnicas de tipificación molecular, la técnica considerada de referencia es la electroforesis en campo pulsado (PFGE) por su elevado poder de discriminación pero, por su elevado coste, laboriosidad y la dificultad en la interpretación de los resultados obtenidos, en los laboratorios asistenciales se utilizan con mayor frecuencia técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, como la PCR de secuencias de ADN repetidas (Rep-PCR). Otras técnicas basadas en secuenciación como el tipado por secuenciación de múltiples loci (MLST), el core-genome MLST (cg-MLST) o la secuenciación genómica completa se utilizan para estudios epidemiológicos globales o para analizar la estructura poblacional de los mismos (101).

La técnica de PFGE se basa en la digestión del ADN cromosómico con un enzima de restricción de corte poco frecuente, permitiendo la obtención de fragmentos que se separarán mediante una electroforesis en campo pulsado (en la que la dirección del campo eléctrico se cambia periódicamente) obteniendo un mayor número de fragmentos del que se obtendría en una electroforesis convencional. La comparación entre las bandas (fragmentos) obtenidas de las diferentes cepas estudiadas permite identificar los clones (101). Habitualmente para la interpretación se utilizan los criterios establecidos por Tenover *et al.* en el año 1995, en el que consideraba dos cepas indistinguibles si no presentaban ninguna banda de diferencia, cepas muy relacionadas si presentaban un máximo de 3 bandas de diferencia, cepas posiblemente relacionadas si tenían hasta 6 bandas de diferencia y cepas no relacionadas si presentan 7 o más bandas de diferencia (102). La comparación de patrones de bandas cuando se están estudiando muchas cepas se torna muy complicada, por ello en la actualidad se prefiere utilizar herramientas informáticas que permiten hacer el análisis de forma más sencilla y rápida,

utilizando habitualmente como punto de corte para considerar cepas como relacionadas un 80-85% de semejanza (103).

Las técnicas basadas en PCR se basan en amplificación de genes o secuencias cromosómicas que se encuentran distribuidas por el cromosoma, que posteriormente son separados mediante electroforesis. Estas técnicas presentan una menor laboriosidad y una mayor flexibilidad y rapidez en la obtención de resultados, así como una menor dificultad a la hora de interpretarlos, puesto que el número de bandas (amplicones) obtenidos es menor que el número de fragmentos que se obtendría en la PFGE (101). Dentro de estas técnicas cabe destacar fundamentalmente dos:

- PCR con cebadores arbitrarios, también conocida como Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés): Se basa en utilizar un único cebador de unos 10 nucleótidos que hibrida aleatoriamente con regiones inespecíficas del cromosoma, generando un patrón de bandas en la electroforesis que puede ser comparado. El poder de discriminación de esta técnica es inferior al de la PFGE, pero puede incrementarse utilizando varios cebadores en reacciones independientes (101).
- Rep-PCR: Se basa en la utilización de cebadores que hibridarán con secuencias de ADN repetitivas de función desconocida. Hay 3 familias de secuencias repetitivas: las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP), las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) i las secuencias o elementos BOX. Dentro de estas tres familias las más utilizadas son las secuencias REP. El proceso de REP-PCR puede automatizarse, encontrando en el mercado el sistema Diversilab que presenta una mayor reproducibilidad que la técnica manual y una análisis más sencillo porque incorpora su propio software de análisis, pero supone un mayor coste económico (101).

Las técnicas descritas hasta ahora presentan como uno de sus principales inconvenientes la variabilidad interexperimento, haciendo difícil la comparación de patrones de bandas obtenidos en diferentes laboratorios o momentos temporales. Por tanto son muy útiles para determinar la existencia de un brote, pero no nos permiten saber si la cepa implicada es la que se encuentra circulando en otro hospital, comunidad o país.

Las técnicas basadas en secuenciación permiten obtener resultados objetivables, que se pueden almacenar en formato electrónico y pueden ser intercambiados entre laboratorios. Dentro de las técnicas basadas en secuenciación encontramos:

- MLST: Realiza un análisis filogenético basado en el alineamiento genético (SNPs) de 6-7 genes altamente conservados permitiendo estudiar estructura poblacional en un brote bacteriano y construir un mapa de transmisión. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* los genes a analizar (cuyo tamaño permite su estudio mediante secuenciación de Sanger), las secuencias de los cebadores utilizados y las condiciones de amplificación se describen en el artículo elaborado por Diancourt *et al.* (104). Los resultados pueden analizarse en las bases de datos diseñadas a tal efecto y disponibles en Internet. Las más frecuentemente utilizadas internacionalmente son las de la Universidad de Oxford (<https://pubmlst.org/>) y las del instituto Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/>) en el que encontramos la base de datos utilizada en *K. pneumoniae*. Los resultados obtenidos permiten conocer que alelo de cada gen está presente en nuestra cepa en estudio y en perfil alélico genera el secuenciotipo (ST). La técnica de MLST permite realizar estudios epidemiológicos globales pero no resulta útil para el estudio de un brote ya que tiene un bajo poder de discriminación (101).
- r-MLST: La técnica es similar a la de MLST clásica pero se estudian 52 a 53 genes que codifican subunidades proteicas ribosomales (105). Es un método poco utilizado en *K. pneumoniae*.
- whole-genome MLST (wgMLST): En este caso se analizan todos los loci de un microorganismo dado, incluso regiones intergénicas si están definidas (105).
- cg-MLST: Se analizan los genes que componen el genoma principal o *core-genome* excluyendo los genes accesorios(105). El esquema de cgMLST para *Klebsiella pneumoniae* fue descrito por Zhou *et al.* en el año 2017 (106).

Estas tres últimas técnicas se basan en la secuenciación del genoma completo, por tanto su realización no se encuentra disponible en la actualidad en la mayor parte de los laboratorios de microbiología asistenciales.

La secuenciación genómica completa permite identificar cambios en una única base (SNPs) en todo el genoma. Este análisis de polimorfismos ya se ha utilizado para trazar la historia filogenética de determinados patógenos o estudiar la cadena de transmisión de brotes (107,108), Sin embargo, aunque permite identificar los aislados pertenecientes a un brote, el gran número de SNPs de diferencia que puede existir entre dos microorganismos que se consideran relacionados dificulta la aplicación de un punto de corte simple en el análisis (109). Sin embargo, una de sus principales ventajas es que permite conocer también otros factores implicados en la evolución clínica como los mecanismos de resistencia no sólo transmisibles sino

también aquellos debidos a mutaciones puntuales y factores de virulencia (110). En la actualidad los estudios que utilizan la secuenciación genómica en el estudio de un brote en tiempo real aún son minoritarios ya que a pesar del abaratamiento en costes sigue siendo necesario unos conocimientos de bioinformática amplios y un equipamiento informático potente para el manejo adecuado de los datos.

La definición de secuenciotipos mediante MLST ha permitido conocer la epidemiología global de los microorganismos y determinar que ST (o clones) son más prevalentes. Estos estudios a nivel mundial han permitido definir lo que se denominan “clones de alto riesgo” debiendo cumplir los siguientes requisitos: distribución global, asociación de varios determinantes de resistencia a antimicrobianos, habilidad para colonizar y persistir en el hospedador durante periodos prolongados, transmisión efectiva entre hospedadores, adaptabilidad y patogenicidad incrementadas y causar infecciones graves y/o recurrentes (111). Definiremos complejo clonal (CC) a una agrupación coherente biológicamente que se ha diversificado recientemente desde un ST fundador común y que normalmente presenta un único alelo de diferencia con su fundador (*single locus variant* o SLV) (112). En la revisión publicada por Mathers *et al.* en el año 2015 se reconocía al complejo clonal 258 de *K. pneumoniae* como clon de alto riesgo ya que cumplía todos los requisitos establecidos.

En el estudio publicado por Navon-Venezia *et al.* se definió clon de alto riesgo aquel que hubiera causado al menos 4 brotes reconocidos y hubiera sido descrito en al menos 10 países. En la **Tabla 3** se recoge la relación de STs de alto riesgo descrita en esta revisión. Cabe destacar que 7 clones relacionados con brotes importantes: ST16, ST20, ST48, ST307, ST336, ST340 y ST395 y no fueron clasificados de alto riesgo por no cumplir su definición (71).

Tabla 3. Clones de alto riesgo en *Klebsiella pneumoniae* (modificado de Navon-Venezia *et al.*) (71)

Complejo clonal	ST	Mecanismos de resistencia con los que se ha relacionado	Nº de países en los que se ha detectado
258	258	Carbapenemasas: KPC, VIM β-lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV	35
	11	Carbapenemasas: KPC, OXA, NDM, VIM, IMP β-lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV, SFO β-lactamasas de tipo AmpC: DHA	35
	512	Carbapenemasas: KPC	11
15	15	Carbapenemasas: KPC, OXA, NDM, VIM, IMP β-lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV β-lactamasas de tipo AmpC: DHA, CMY	26
	14	Carbapenemasas: KPC, OXA, NDM β-lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV, TEM β-lactamasas de tipo AmpC: DHA, CMY, FOX	22
147	147	Carbapenemasas: KPC, OXA, NDM, VIM, IMP β-lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV β-lactamasas de tipo AmpC: DHA, CMY	30
37	37	Carbapenemasas: KPC, OXA, NDM, VIM β-lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV, TEM β-lactamasas de tipo AmpC: DHA	15
101	101	Carbapenemasas: KPC, OXA, NDM, VIM β-lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV, TEM β-lactamasas de tipo AmpC: DHA	25
17	17	Carbapenemasas: KPC, OXA, NDM, VIM β-lactamasas de espectro extendido: CTX-M, SHV, TEM β-lactamasas de tipo AmpC: DHA	11

La descripción de los factores de riesgo asociados a la colonización o infección por cepas de *K. pneumoniae* productora de BLEE ha sido objeto de múltiples estudios. En pacientes sanos los factores de riesgo asociados a colonización por enterobacterias productoras de BLEE según el metaanálisis publicado por Karanika *et al.* en el año 2016 en el que se incluyeron 66 estudios son el origen geográfico (Pacífico este y sudeste asiático), la antibioterapia en el último año (pero sin datos relacionados con el tipo de antibiótico), la realización de viajes internacionales (sobre todo a zonas de alta prevalencia de BLEE como India), sin embargo en este tipo de pacientes no se observó relación del estado de portador con ingresos hospitalarios previos o contacto con animales (113).

Friedmann *et al.* analizaron los factores de riesgo al ingreso de un paciente asociados a colonización por BLEE encontrando como tales la edad >65 años y la antibioterapia previa (114). En estudio publicado por Harris *et al.* los factores de riesgo asociados a la colonización por enterobacterias BLEE en pacientes ingresados en una unidad de cuidados intensivos fueron en uso previo de piperacilina/tazobactam o vancomicina, la edad >60 años y tener una enfermedad subyacente crónica (115). Otros factores que han sido asociados con colonización o infección han sido: la estancia previa en una unidad de cuidados intensivos, la exposición previa a múltiples antibióticos (fluoroquinolonas, β -lactámicos, aminoglucósidos y cotrimoxazol), la necesidad de ventilación mecánica invasiva y cirugía previa (7,116–118). El estado de portador de enterobacterias productoras de BLEE produce un incremento del riesgo de infección en más de tres veces por estos microorganismos frente a pacientes no colonizados (117).

La demostrada asociación de bacterias MR con el aumento en la morbi-mortalidad de los pacientes, estancia hospitalaria y coste sanitario, así como la limitación de las opciones terapéuticas explica la importancia clínica del control de estos microorganismos en hospitales y centros socio-sanitarios (119). La identificación de pacientes colonizados permite poner en marcha estrategias de control de infección para evitar la diseminación de estos microorganismos a otros pacientes y el riesgo de infección asociado.

La identificación de pacientes colonizados en la actualidad se puede realizar a través de dos vías: los cultivos de vigilancia epidemiológica tradicionales y las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos. En ambos casos la muestra más adecuada para la identificación de portadores de enterobacterias BLEE es el frotis rectal o perianal ya que el tracto gastrointestinal es el reservorio habitual de estos microorganismos en el ser humano (120).

En el cultivo de vigilancia tradicional se utilizarán medios de cultivo suplementados en antibióticos, cefalosporinas en el caso de búsqueda de enterobacterias BLEE que nos permiten seleccionar estos microorganismos de la flora fecal y realizar su identificación y estudio de sensibilidad. Se ha debatido mucho si es necesario dar la información del antibiograma obtenido al médico solicitante ya que puede llevar a un tratamiento innecesario del paciente, pero lo cierto es que conocer el antibiograma ayuda en la decisión del tratamiento empírico a iniciar en un paciente grave que puede encontrarse en situación de sepsis o shock séptico, y en el que el riesgo de mortalidad en el fracaso terapéutico es alto. El cultivo de vigilancia tradicional permite conservar las cepas para estudios que puedan ser necesarios en un futuro (como las técnicas de tipificación molecular en el caso de sospecha de brote) pero tiene como inconveniente que el resultado habitualmente se obtiene a las 24-48 horas tras la obtención de la muestra.

Las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos tienen como principales ventajas la mayor sensibilidad frente al cultivo y su inmediatez, pudiendo obtener resultados incluso en menos de dos horas desde la obtención de la muestra, pero únicamente nos identificarán los genes de resistencia diseñados en el ensayo y que además en caso de resultado positivo habitualmente requerirán un cultivo posterior para los estudios de sensibilidad antibiótica o tipificación molecular. La detección precoz puede traducirse en una disminución de la transmisión y en consecuencia una menor morbi-mortalidad, pero estas técnicas resultan mucho más caras que las basadas en cultivo y el análisis coste-eficacia debe ser realizado en cada situación (121).

Los puntos clave del control de un brote hospitalario por microorganismos MR se sostienen sobre cuatro pilares: el seguimiento de las precauciones estándar entre las que se incluye fundamentalmente la higiene de manos (122), seguida de la instauración de precauciones de contacto en pacientes colonizados (123), la identificación de estos pacientes mediante cultivos de vigilancia epidemiológica (124), la realización de una intervención educativa adecuada dirigida al personal sanitario (125), y la limpieza exhaustiva de superficies (126).

Mucho más discutida es otra de las estrategias descritas en la literatura: la utilización de descontaminación digestiva selectiva (DDS), que parece tener utilidad para erradicar el estado de portador orofaríngeo e intestinal de bacilos gramnegativos, así como disminuir la tasa de infección global por estos microorganismos (127); sin embargo, también se ha relacionado con aparición de resistencias a los componentes de la solución de DDS en *K. pneumoniae* productora de BLEE tras un uso prolongado (128).

En la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe en octubre de 2010 se inició un programa de vigilancia epidemiológica activa que se mantiene hasta la fecha actual debido a la situación inicial de endemia presente causada por *Acinetobacter baumannii*. Así, se realizan cultivos de vigilancia epidemiológica con periodicidad semanal a todos aquellos pacientes con estancia en la unidad superior a dos días, y al ingreso a los pacientes con factores de riesgo conocidos para microorganismos MR. El objetivo de estos cultivos es detectar la presencia de *Acinetobacter baumannii* MR, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenemas, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y enterobacterias con β -lactamasas adquiridas (BLEE, AmpC plasmídica, carbapenemasas) para el aislamiento de contacto de los pacientes colonizados.

A partir de diciembre de 2011 se observó un incremento de los aislados de *K. pneumoniae* productora de BLEE, detectándose más de 100 pacientes colonizados o infectados hasta junio de 2014. Esta observación obligó a realizar un análisis epidemiológico de las causas (factores de riesgo, búsqueda de vector o reservorio, etc.) y consecuencias (morbi-mortalidad, aislamientos, higiene, tratamientos empíricos, política de antibióticos, etc.) que tuvo en nuestros enfermos, además de requerir una descripción del agente etiológico implicado (estudios de clonalidad y tipificación molecular del mecanismo de resistencia) y de las medidas de control establecidas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos enunciados a continuación pretenden analizar en profundidad la situación epidemiológica tanto desde el punto de vista microbiológico como clínico en la Unidad de Cuidados Intensivos, contribuyendo con sus resultados al control de la infección nosocomial en el centro.

1. Estudio microbiológico de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE en la Unidad de Cuidados Intensivos en el periodo comprendido entre octubre de 2011 y junio de 2014.
 - a. Estudios de epidemiología molecular de los aislados.
 - b. Caracterización molecular del mecanismo de resistencia a β -lactámicos de los aislados de *K. pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido.
 - c. Estudio de la presencia de genes transmisibles de resistencia a colistina (*mcr*)
 - d. Estudio de factores de virulencia asociados a la cápsula polisacáridica de *K. pneumoniae*.
 - e. Estudio mediante secuenciación genómica de otros mecanismos de resistencia y factores de virulencia de la cepa implicada en el brote nosocomial en estudio.
 - f. Descripción de la epidemiología de este microorganismo en la Unidad (estudios de incidencia y prevalencia)
2. Estudio de las características clínico-epidemiológicas de los pacientes colonizados/infectados por *K. pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido asociada al brote nosocomial en el periodo comprendido entre octubre de 2011 y junio de 2014:
 - a. Estudio de casos y controles (pacientes colonizados por el clon de *K. pneumoniae* productora de BLEE asociado al brote nosocomial frente a pacientes no colonizados por este microorganismo)
 - b. Realizar un estudio comparativo de las características clínicas observadas entre los enfermos con aislamiento del clon de *K. pneumoniae* productora de BLEE asociado al brote nosocomial que desarrollaron un proceso infeccioso frente a los que no lo desarrollaron.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Dados los objetivos del trabajo el apartado de metodología se ha subdividido en dos partes principales, la primera de ellas relacionada con el estudio microbiológico realizado para describir la epidemiología de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE en la Unidad de Cuidados Intensivos y la segunda relacionada con el estudio de factores de riesgo asociados a la colonización o infección por este microorganismo.

3.1. Estudio microbiológico

Durante el periodo de estudio 4067 pacientes ingresaron en la Unidad de Cuidados Intensivos (5370 ingresos hospitalarios) con una estancia media de 4,85 días, una edad media de 61 años, siendo el 64,9% varones. Durante el periodo de estudio el 3,64% de los pacientes desarrollaron una colonización o infección por *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE.

Tipo de estudio: Estudio descriptivo retrospectivo de la epidemiología de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE en el periodo comprendido entre el 1 de diciembre de 2011 al 30 de junio de 2014 en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (HU y P La Fe).

Pacientes: Durante el periodo de estudio 158 de los pacientes que ingresaron en UCI fueron diagnosticados de colonización o infección por *K. pneumoniae* BLEE, de 137 de estos pacientes fue posible recuperar la cepa para su estudio microbiológico. Tras los estudios de tipificación molecular se logró establecer que grupo de pacientes se habían visto afectados por el brote y sus características de describirán en el apartado de resultados.

3.1.1. Revisión de los resultados microbiológicos

Se revisaron los resultados de los cultivos de vigilancia epidemiológica realizados de forma rutinaria en la UCI del HU y P La Fe para determinar que pacientes habían presentado colonización o infección por *K. pneumoniae* que por su fenotipo de sensibilidad fuera subsidiaria de tener una β -lactamasa de espectro extendido. Las cepas aisladas en cultivos de vigilancia son congeladas en glicerol a -20°C de forma rutinaria en el cepario del Servicio de Microbiología.

Así mismo se revisaron los resultados de sensibilidad de los aislamientos *Klebsiella pneumoniae* de muestras clínicas a fin de realizar un informe acumulado de sensibilidad de algunos antibióticos β -lactámicos (cefalosporinas de 3ª generación, aztreonam, penicilinas

asociadas a inhibidores y carbapenemas) para poder establecer comparaciones con otras poblaciones. Para ellos se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

- Análisis de los datos efectuado mediante el programa WHONET, siguiendo las recomendaciones del documento “Preparación de informes acumulados de sensibilidad a los antimicrobianos” (129).
- Inclusión de resultados validados e informados.
- Inclusión de porcentajes de sensibilidad de antibióticos/aislados con $N \geq 30$.
- Exclusión de resultados procedentes de cultivos de vigilancia epidemiológica, que sobreestimarían los porcentajes de resistencia.
- Inclusión de un resultado de paciente por cada interpretación de antibiótico considerando diferencias de interpretación mayores (siguiendo las recomendaciones del *Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance* (ESGARS) de la *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) y por episodio (definiendo este último en un espacio temporal de 30 días, independientemente del sitio anatómico de recogida).
- Los puntos de corte de sensibilidad utilizados corresponden a los publicados por el *Clinical Laboratory and Standards Institute* en el documento *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* del año 2014 (M100-S24)(130).

3.1.2. Estudio de sensibilidad

Se repitió el antibiograma mediante disco-difusión siguiendo metodología y puntos de corte establecidos por CLSI en su documento M100-S24 de 2014 (130). Los antibiogramas obtenidos fueron interpretados y fotografiados para que esta imagen fuera de ayuda en la selección de las cepas a estudiar (una por fenotipo y paciente). Para facilitar la interpretación de los antibiogramas presentados en el apartado de resultados en la **Figura 1** se muestra un antibiograma indicando la posición de los antibióticos en el mismo. Durante la realización de esta tesis se modificó la plantilla del antibiograma sustituyendo el disco de ampicilina/sulbactam por gentamicina. Para la confirmación de la producción de BLEE se utilizó la prueba de difusión del doble disco.



Figura 1. Plantilla del antibiograma

Prueba de difusión del doble disco: Este método consiste en la realización de un antibiograma convencional situando un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μ g) a una distancia aproximada de 30 mm de discos con carga estándar (30 μ g) de cefotaxima, ceftazidima y aztreonam. La ampliación del halo de inhibición de estos últimos en las proximidades del disco de amoxicilina/ácido clavulánico indica la presencia de BLEE (131). En la **Figura 2** se muestra un resultado positivo en esta prueba.



Figura 2. Prueba de difusión del doble disco (resultado positivo)

Ante una disminución de sensibilidad a los antibióticos carbapenémicos probados se procedió a realizar el estudio fenotípico de detección de carbapenemasas mediante el test de discos combinados.

Prueba de discos combinados: Para realizar esta técnica se utilizará el kit de discos combinados KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica, Taastrup, Dinamarca) siguiendo las siguientes consideraciones:

- Las carbapenemasas de clase A hidrolizan todos los β -lactámicos y son inhibidas por el ácido fenil-borónico, por tanto los estudios fenotípicos para la caracterización de estas carbapenemasas se basan en la recuperación de la actividad de los antibióticos carbapenémicos en presencia de este compuesto. La detección de carbapenemasas se realizará comparando el halo de inhibición de tabletas de meropenem con y sin ácido fenil-borónico. Esta técnica tiene una alta sensibilidad pero baja especificidad ya que existen cepas productoras de β -lactamasas tipo AmpC con disminución de sensibilidad a carbapenemasas debida a disminución de la permeabilidad por pérdida de porinas en las que la AmpC que también darían resultados positivos en esta prueba. La adición de discos de meropenem con cloxacilina (capaz de inhibir las β -lactamasas de tipo AmpC pero no las carbapenemasas de clase A) se evita este problema. Si se detecta recuperación de la actividad de meropenem (halo ≥ 5 mm) con ácido fenil borónico y cloxacilina la disminución de sensibilidad se atribuirá a la producción de β -lactamasas de tipo AmpC + pérdida de porinas, si se detecta recuperación de la actividad sólo en presencia de ácido fenil-borónico se sospechará la presencia de una carbapenemasa de clase A. En la **Figura 3** se muestra un resultado positivo para carbapenemasas de clase A (121).
- Las carbapenemasas de clase B se inhiben por la acción de EDTA o ácido dipicolínico (quelantes que se unen al ion Zinc presente en su centro activo impidiendo su actividad), por tanto la comparación del halo de inhibición de un disco de meropenem frente a un disco de meropenem combinado con ácido dipicolínico o EDTA permite la detección de estas carbapenemasas. La recuperación de la actividad de meropenem asociándolo con el inhibidor (incremento del halo de inhibición ≥ 5 mm) se interpretará como producción de una carbapenemasa de clase B. En la **Figura 4** se muestra un resultado positivo para carbapenemasas de clase B (121).
- Las carbapenemasas de tipo OXA-48 no se inhiben por la acción de ninguno de estos agentes (ácido fenil-borónico, cloxacilina o agentes quelantes) pero sí que suelen presentar

un alto nivel de resistencia a temocilina y piperacilina/tazobactam. Por tanto en ausencia de sinergia con inhibidores y resistencia a piperacilina/tazobactam y temocilina deberá sospecharse la presencia de una carbapenemasa de tipo OXA-48, aunque esta sospecha deberá ser confirmada mediante un método genotípico, ya que estas resistencias no son marcadores específicos de estas carbapenemasas (121).

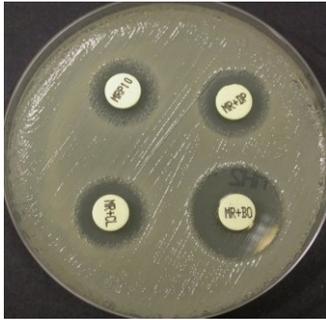


Figura 4. Carbapenemasa de clase A



Figura 3. Carbapenemasa de clase B (MBL).

Sensibilidad a colistina: En aquellos casos en los que se observó una desaparición del halo de inhibición de colistina en el antibiograma realizado por disco-difusión se realizó un estudio de sensibilidad complementario a este antibiótico utilizando la técnica de microdilución comercial Sensititre™ FRCOL (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, E.E.U.U.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.3. Microbiología molecular

Extracción de ADN por calor: En todos los casos, salvo especificación, para los estudios de microbiología molecular en los que se requería extracción del ADN bacteriano se utilizó esta técnica por su simplicidad. El proceso utilizado fue: elaboración de una suspensión de un asa de la bacteria (1 μ L) en 1 mL de agua bidestilada, calentamiento de dicha suspensión a 100°C durante 10 minutos, enfriamiento en hielo durante 5 minutos seguido de centrifugación durante 2 minutos a 13.000 rpm para separar el sobrenadante que contenía el ADN bacteriano.

Composición de la mezcla de reacción: Debido a que la composición de la mezcla de reacción suele ser la misma en todas las reacciones de amplificación de ADN, salvo la concentración de cloruro magnésico o de los diferentes oligonucleótidos que puede ser variable, en la **Tabla 4** se detalla la composición habitual que se utilizó en los diferentes estudios moleculares. Salvo especificación directa, esta fue la composición utilizada en todas las técnicas.

Tabla 4. Composición Mezcla de reacción (20 muestras)

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
Buffer (GoTaq Flexi Buffer) 5x	200	1x
MgCl ₂	80	2 mM
dATP	2	0.2 mM
dTTP	2	0.2 mM
dCTP	2	0.2 mM
dGTP	2	0.2 mM
Oligonucleótido/s - F	5	0.5 µM
Oligonucleótido/s- R	5	0.5 µM
H ₂ O bidestilada libre de RNAsas	hasta 800 µL	

Composición de la reacción de PCR: En todos los casos, salvo especificación, se utilizó por cada reacción de PCR: 40 µL de mezcla de reacción + 0,5 µL Taq polimerasa GoTaq (Promega, Madison, WI, EEUU) + 10 µL de DNA.

Electroforesis: Salvo especificación expresa la electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 2% previamente marcado con PeqGreen (PeqLab, Reino Unido) (6 µL por cada 100 mL de agarosa fundida). La duración habitual de la electroforesis fue de 40 minutos con un voltaje de 100 v. El marcador de peso molecular utilizado (Promega, Madison, WI, EEUU) generaba 6 bandas a 50, 150, 300, 500, 750 y 1000 pb. La visualización de los geles se realizó en el sistema de visualización Proxima 2500-T (Isogen, Alemania) a 302 nm.

Secuenciación: Los pasos a seguir para realizar la secuenciación de Sanger por electroforesis capilar son idénticos independientemente de la región que se pretenda secuenciar, exponiéndose a continuación:

- 1) *Amplificación* de la región que se pretende secuenciar utilizando los oligonucleótidos y protocolo de PCR adecuados (detallados en cada apartado).
- 2) *Electroforesis en gel de agarosa* al 2% para comprobar que la amplificación había sido correcta.
- 3) *Purificación* del producto amplificado utilizando el sistema QIAQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 4) *Medición del ADN* utilizando en espectrofotómetro Nanodrop Lite, que mide la concentración de ácido nucleico a 260 nm y la pureza con una relación de absorbancias entre 260/280. La relación A₂₆₀/A₂₈₀ es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima si tiene un valor entre 1.8-2.0.

Calidad del DNA obtenido: Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación $A_{260}/A_{280} > 1.6$. Un valor $A_{260}/A_{280} < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un relación $A_{260}/A_{280} > 2.1$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. A 230 nm absorben contaminantes como como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. Se considera que el ADN es puro cuando el ratio A_{260}/A_{230} se sitúa en torno 1.5-2.2. Un ratio menor de 1.5 indicaría presencia de contaminantes en la muestra, pero esta relación resulta mucho más variable que la relación A_{260}/A_{280} dependiendo de factores como la concentración de ADN o de la composición del tampón de resuspensión de la muestra.

- 5) *Reacción de secuenciación:* Se utilizó Genome Lab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, CA, EEUU). La reacción de secuenciación se realizó utilizando aproximadamente 100 ng de DNA por reacción diluido en 11 μ L de agua bidestilada + 1 μ L de oligonucleótido (5 μ M) + 9 μ L Quick Start Kit. Este kit contiene dNTPs, ddNTPs marcados, Tris-HCl, $MgCl_2$, tampón de reacción a pH= 8,9, pirofosfatasa y ADN polimerasa I termosecuensasa). Esta reacción se realizó por duplicado por cada secuencia a estudiar, una por cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*). Los oligonucleótidos empleados en la reacción de secuenciación fueron los mismos que los utilizados en la reacción de amplificación salvo indicación expresa. La curva térmica de la reacción de secuenciación es: 96°C 2 min, 30x (96°C 20s, 50°C 20s, 60° 4 min).
- 5) *Precipitación del ADN* utilizando el kit AgentCourt CleanSEQ (Beckman Coulter, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 6) *Electroforesis capilar* de la secuenciación empleando el sistema Genome Lab GeXP (Beckman Coulter, CA, EEUU).
- 7) *Análisis de las secuencias* obtenidas mediante el programa DNA Baser Sequence Assembler (Heracle BioSoft, Rumanía).
- 8) *Asignación de alelos o variantes del gen* utilizando la base de datos del Instituto Pasteur disponible en <https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>.

3.1.3.1. *Electroforesis en campo pulsado (PFGE)*

La electroforesis en campo pulsado se realizó utilizando el sistema CHEF DR III (Bio-Rad, CA, EEUU) a 6 voltios con tiempos de pulso de 0,5 - 50 s y rampa lineal a una temperatura de 12°C durante 23 horas después de la digestión del DNA cromosómico total con el enzima de restricción XbaI. La visualización se realizó en el sistema ChemiDoc XRS+ (BioRad, CA, EEUU) tras tinción con GelRed 1x en TBE 0,5x (Biotium, CA, EEUU) en TBE 0,5x durante una hora. Todo el procedimiento se siguió utilizando el protocolo de electroforesis en campo pulsado para bacterias gramnegativas facilitado por el Laboratorio de Intrahospitalarias del Centro Nacional de Microbiología.

El análisis se realizó utilizando el programa BioNumerics v.7.6 software (Applied Maths, Bélgica) utilizando el coeficiente de Dice como método de análisis y el dendograma UPGMA con una tolerancia de 0,5% y optimización de 1.5%. Se consideró que dos cepas estaban relacionadas si presentaban al menos un 85% de semejanza genética.

3.1.3.2. *Rep-PCR – Diversilab™*

Para el estudio mediante Rep-PCR se realizó una extracción del ADN cromosómico utilizando las columnas de extracción UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MoBio, Qiagen, Alemania). Posteriormente se realizó la reacción de Rep-PCR utilizando el sistema comercial Diversilab™ (bioMérieux, Francia) con un equipo de *fingerprinting* genérico de bacterias siguiendo las recomendaciones del fabricante para la reacción de rep-PCR, carga de la matriz microfluidica y análisis de resultados. El software empleado para el análisis de resultados genera una matriz de proximidad utilizando la correlación de Pearson para calcular la semejanza entre las muestras incluidas en la prueba, generando un dendograma e imágenes de los geles virtuales. Se exigió un porcentaje de semejanza entre cepas de al menos un 95% para considerar que formaban parte de la misma agrupación clonal.

3.1.3.3. *Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)*

Técnica de RAPD: Se empleó el kit comercial Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (GE Health Care Life Sciences, PA, EEUU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de ADN genómico utilizada por reacción fue de 50 ng. Se utilizaron los 6 cebadores incluidos en el kit con todas las cepas a estudiar. El protocolo de PCR utilizado fue: 95ª 5 min, 45x (95°C 1 min, 36°C 1 min, 72°C 2 min). La electroforesis se realizó durante 2 horas con un voltaje de 60 v. en un gel de agarosa al 2% al que se le había adicionado GelRed (Biotium, CA, EEUU) a una

concentración 1x. La visualización se realizó en el sistema ChemiDoc XRS+ (BioRad, CA, EEUU). Se consideraron cepas relacionadas si presentaban al menos un 85% de semejanza genética mediante el análisis con Bionumerics (coeficiente de Dice, dendograma UPGMA con parámetros de tolerancia de 1,5% y optimización de 0,5%).

3.1.3.4. Multi-locus sequence typing (MLST)

En esta técnica se incluyeron cepas representativas de los perfiles obtenidos en la electroforesis en campo pulsado. Esta técnica se realizó mediante secuenciación de Sanger por electroforesis siguiendo el esquema descrito en el trabajo publicado por Diancourt *et al.* (104). Los genes secuenciados, oligonucleótidos y tamaño de las secuencias se recogen en la **Tabla 5**. Todas las reacciones de amplificación se realizaron con una temperatura de anillamiento de 50°C salvo para el gen *gapA* cuya temperatura fue 60°C. El protocolo de la reacción de la amplificación fue 94°C 2 min, 35x (94°C 20s, 50/60°C 30s, 72°C 30s), 72°C 5 min.

Tabla 5. Genes y cebadores utilizados en la técnica MLST.

Locus	Cebadores	Tamaño secuencia (pb)
<i>rpoB</i> (beta-subunit of RNA polymerase)	F: GGCGAAATGGCWGAGAACCA R: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	485 - 502
<i>gapA</i> (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	F: TGAAATATGACTCCACTCACGG R: CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	443 - 460
<i>mdh</i> (malate dehydrogenase)	F CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG R: CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	465 - 480
<i>pgi</i> (phosphoglucose isomerase)	F: GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC R: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	426 - 434
<i>phoE</i> (phosphorine E)	F: ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG R: TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	411 - 421
<i>infB</i> (translation initiation factor 2)	F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	316 - 319
<i>tonB</i> (periplasmic energy transducer)	F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	390 - 432

Los cebadores utilizados en la reacción de secuenciación fueron los mismos que en la reacción de amplificación salvo en *infB* F y *pgi* F y R, que se detallan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Oligonucleotidos empleados en la secuenciación de MLST diferentes a los de amplificación.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>infB</i> F	ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC
<i>pgi</i> F	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
<i>pgi</i> R	TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT

3.1.3.5. Caracterización molecular de β -lactamasas de espectro extendido

El estudio molecular para la caracterización de las β -lactamasas de espectro extendido se realizó en cepas representativas de los perfiles obtenidos en PFGE teniendo en cuenta la existencia de diferentes fenotipos de resistencia. La extracción de ADN se realizó por calor según el procedimiento detallado anteriormente. En la **Tabla 7** se detallan los nucleótidos utilizados en todas las técnicas de este apartado y en la **Figura 5** se muestra el algoritmo de trabajo:

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la caracterización molecular de las BLEE.

Diana	Secuencia	Producto de amplificación (pb)	Referencia
PCR multiplex BLEE			
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 1	AATCACTGCGCCAGTTCAGCT	479	(132)
	GAACGTTTCGTCTCCAGCTGT		
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 9	TACCGCAGATAATACGCAGGTG	355	(132)
	CAGCGTAGGTTCACTGCGATCC		
<i>bla</i>_{SHV}	AACGGAACTGAATGAGGCGCT	141	
	TCCACCATCCACTGCAGCAGCT		
PCR individual			
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 1	GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	800	(133)
	CCGTTTCCGCTATTACAAAC		
<i>bla</i>_{CTX-M-3/15/22}	GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	876	(133)
	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG		(134)
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 9	ATGGTGACAAAGAGAGTGCAAC	876	(135)
	TTACAGCCCTTCGGCGATG		
<i>bla</i>_{SHV}	ATGCGTTATATTCGCTGTGTATT	868	Centro Nacional Microbiología
	CGCCGGCTTAGCGTTGCCAGT		
<i>bla</i>_{TEM}	ATAAAATTCTGAAGACGAAA	1080	(136)
	GACAGTTACCAATGCTTAATC		
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 2	CGACGCTACCCCTGCTATT	552	(100)
	CCAGCGTCAAGATTTTCAGG		
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 8	TCGCGTTAAGCGGATGATGC	666	(100)
	AACCCACGATGTGGGTAG		

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados en la caracterización molecular de las BLEE (continuación).

Diana	Secuencia	Producto de amplificación (pb)	Referencia
<i>bla</i>_{CTX-M} grupo 25	GCACGATGACATTCGGG AACCCACGATGTGGGTAG	327	(100)
<i>bla</i>_{CTX-M}	CRATGTGCAGYACCAAGTAA CGCRATATCRTTGGTGGTG	540	(137)
<i>bla</i>_{GES}	ATGCGCTTCATTCACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	860	(138)
<i>bla</i>_{SFO}	ATCAGCAGCAACTGTCCG ACGCTTATCGCTTGGGAAT	447	(139)
<i>bla</i>_{PER}	ATGAATGTCATCACAAAATG TCAATCCGGACTCACT	927	(140)
<i>bla</i>_{VEB}	CATTTCGGATGCAAAGCGT CGAAGTTTCTTTGGACTCTG	648	(140)
<i>bla</i>_{OXA} grupo 2	GACCAAGATTTGCGATCAGCAATGCG CYTTGACCAAGCGCTGATGTTTCYACC	256	(141)
<i>bla</i>_{OXA} grupo 10	CGCCAGAGAAGTTGGCGAAGTAAG GAAACTCCAATTGATTAAGTGGG	138	(141)



Figura 5. Algoritmo de trabajo de detección de BLEE.

3.1.3.5.1. PCR de β -lactamasas de espectro extendido multiplex

En primer lugar se realizó una PCR múltiplex para detectar la presencia de los genes SHV, CTX-M grupo 1 y CTX-M grupo 9 ya que son las BLEE más frecuentemente detectadas según los datos nacionales. Se tuvo en cuenta que todas las cepas de *Klebsiella pneumoniae* debían producir amplificación para el gen SHV por la SHV cromosómica que poseen y que les confiere la resistencia a ampicilina. En la **Tabla 7** se detallan por oligonucleótidos empleados seleccionados del trabajo de Chia *et al.* publicado en el año 2005 (132). El protocolo de PCR utilizado fue: 94° 5 min, 25 x (94°C 45s, 63°C 45s, 72°C 45s), 72°C 10 min.

3.1.3.5.2. PCR y secuenciación de CTX-M grupo 1

En todas las cepas que presentaban una banda de amplificación de 479 pb en la PCR multiplex previamente realizada se realizó una PCR y secuenciación del gen CTX-M grupo 1 para determinar de qué variante se trataba. Los oligonucleótidos empleados fueron seleccionados del trabajo de Pagani *et al.* en el año 2003 (133) y se detallan en la **Tabla 7**. El protocolo de PCR utilizado fue: 94° 5 min, 35 x (94°C 50s, 50°C 40s, 72°C 1 min), 72°C 5 min.

3.1.3.5.3. PCR y secuenciación de CTX-M-3/15/22

En todas aquellas cepas que presentaban una PCR positiva para CTX-M grupo 1 y la secuenciación de este gen nos indicaba que se trataba de una variante relacionada con CTX-M-3 o CTX-M-15 se realizó una nueva secuenciación utilizando una combinación de oligonucleótidos de dos trabajos (133,134) detallados en la **Tabla 7** puesto que el producto secuenciado tiene un tamaño de 876 pb que permite diferenciar con un mayor rigor la variante alélica. El protocolo de PCR utilizado fue: 94° 5 min, 35 x (94°C 45s, 55°C 45s, 72°C 75s), 72°C 10 min.

3.1.3.5.4. PCR y secuenciación de CTX-M grupo 9

En todas las cepas que presentaban una banda de amplificación de 355 pb en la PCR multiplex previamente realizada se realizó una PCR y secuenciación del gen CTX-M grupo 9 para determinar de qué variante se trataba. Los oligonucleótidos empleados fueron seleccionados del trabajo de Batchelor *et al.* del año 2005 (135) y se describen en la **Tabla 7**. El protocolo de PCR utilizado fue: 94° 5 min, 30 x (94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 45s), 72°C 10 min.

3.1.3.5.5. PCR y secuenciación de SHV

La secuenciación del gen SHV se realizó en todas aquellas cepas que únicamente dieron una banda de amplificación de 141 pb en la PCR multiplex de BLEE o que dieron un resultado positivo para SHV y CTX-M grupo 9. La secuencia de oligonucleótidos empleados fue facilitada por el Laboratorio de Antibióticos del Centro Nacional de Microbiología y se detalla en la **Tabla 7**. El protocolo de PCR utilizado fue: 94° 5 min, 30 x (94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 45s), 72°C 10 min.

3.1.3.5.6. PCR y secuenciación TEM

En cepas representativas de todos los perfiles obtenidos mediante PFGE y fenotipos de resistencia se estudió la presencia de β -lactamasas tipo TEM. La secuencia de oligonucleótidos utilizada se detalla en la **Tabla 7** (136). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C 5 min, 35x(94°C 30s, 50°C 30s, 72°C 1 min), 72° 10 min. Todas las cepas en las que se obtuvo un resultado positivo fueron posteriormente secuenciadas mediante secuenciación de Sanger por electroforesis capilar.

3.1.3.5.7. Amplificación de otras β -lactamasas de espectro extendido

β -lactamasas de espectro extendido CTX-M grupo 2, grupo 8 y grupo 25: En todas aquellas cepas en las que no se detectó la presencia de β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M grupo 1, CTX-M grupo 9, SHV o TEM se realizó la PCR para la detección de β -lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M pertenecientes a los grupos 2, 8 y 25. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla 7** (100). El protocolo de PCR utilizado fue 94° 5 min, 35 x (94°C 45s, 52°C 45s, 72°C 1 min), 72°C 10 min.

β -lactamasas de espectro extendido derivadas de OXA-2 y OXA-10: En todas aquellas cepas en las que no se logró identificar la presencia de β -lactamasas de espectro extendido con ninguno de los protocolos anteriores se estudió la presencia de estas β -lactamasas. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se detallan en la **Tabla 7** (141). El protocolo de PCR utilizado fue 94° 5 min, 30x (94°C 30s, 60°C 40s, 72°C 1 min), 72°C 7 min.

β -lactamasas de espectro extendido CTX-M: En aquellos casos en los que no se obtuvo un resultado positivo con todas las técnicas anteriormente descritas se utilizaron oligonucleótidos degenerados del *bla_{CTX-M}* para determinar si pudiera tratarse de una β -lactamasa tipo CTX-M no detectada previamente. La secuencia de oligonucleótidos utilizada se detalla en la **Tabla 7** (137). El protocolo de PCR utilizado fue 94°C 5 min, 35x (94°C 30s, 53°C 30s, 72°C 1 min), 72°C 10 min.

β-lactamasas de espectro extendido GES: En todas aquellas cepas en las que no se logró identificar la presencia de β-lactamasas de espectro extendido con ninguno de los protocolos anteriores se estudió la presencia de β-lactamasas tipo GES, poco descritas en *Klebsiella pneumoniae*. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se detallan en la **Tabla 7** (138). El protocolo de PCR utilizado fue 94°C 5 min, 40x (94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 10 min.

β-lactamasas de espectro extendido SFO: En todas aquellas cepas en las que no se logró identificar la presencia de β-lactamasas de espectro extendido con ninguno de los protocolos anteriores se estudió la presencia de β-lactamasas tipo SFO, muy poco frecuentes en *Klebsiella pneumoniae*. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se detallan en la **Tabla 7** (139). El protocolo de PCR utilizado fue 94°C 5 min, 35x (94°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 7 min.

β-lactamasas de espectro extendido PER y VEB: En todas aquellas cepas en las que no se logró identificar la presencia de β-lactamasas de espectro extendido con ninguno de los protocolos anteriores se estudió la presencia de β-lactamasas tipo PER, poco descritas en *Klebsiella pneumoniae*. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas se detallan en la **Tabla 7** (140). El protocolo de PCR utilizado fue 94°C 5 min, 30x (94°C 40s, 60°C 40s, 72°C 1 min), 72°C 7 min.

3.1.3.6. Caracterización molecular de β-lactamasas derivadas de OXA-1

La β-lactamasa OXA-1 y sus variantes pueden comprometer la sensibilidad a penicilinas asociadas a inhibidores como amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam, fármacos habitualmente activos en cepas productoras de BLEE. Se decidió complementar el estudio de la resistencia a β-lactámicos analizando la presencia de estas β-lactamasas mediante PCR y posterior secuenciación tipo Sanger por electroforesis capilar en cepas representativas de cada perfil y fenotipo de resistencia.

Los oligonucleótidos empleados se detallan en la **Tabla 8** (142). Las condiciones de PCR empleadas fueron: 94°C 5 min, 30x (94°C 30s, 62°C 90s, 72°C 60s), 72°C 10 min.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados en la detección de β-lactamasas tipo OXA-1.

Diana	Secuencia	Producto de amplificación (pb)	Referencia
<i>bla_{OXA}</i> grupo 1	ACACAATACATATCAACTTCGC AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	813	(142)

3.1.3.7. Detección de β -lactamasas tipo AmpC plasmídica

Las β -lactamasas tipo AmpC, cromosómicas en muchas enterobacterias como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* o *Serratia marcescens*, producen resistencia a ampicilina, amoxicilina/clavulánico, cefoxitina y cefalosporinas de 2ª generación y comprometen la sensibilidad a cefalosporinas de 3ª generación por hiperexpresión debida a desregulación. Estas enzimas pueden encontrarse en otras enterobacterias sin AmpC cromosómica, aunque con menor frecuencia que las BLEE, debido a su adquisición a través de elementos genéticos móviles [denominándose habitualmente AmpC plasmídicas (AmpCp)] y en ocasiones se han asociado a brotes nosocomiales (121,143).

En este estudio, en los casos en los que se observó un patrón fenotípico sugestivo de la presencia de una β -lactamasa de tipo AmpC además de la BLEE (resistencia a cefoxitina y amoxicilina/clavulánico), se realizó la detección de β -lactamasas de tipo AmpCp utilizando los oligonucleótidos y condiciones de PCR descritos por Pérez-Pérez *et al.* (143) y recogidos en la **Tabla 9**. En este trabajo se describe una PCR multiplex para detectar seis grupos de AmpCp, pero debido a la semejanza de los pesos moleculares de los productos amplificados, esta PCR multiplex se subdividió en tres según se recogen en la **Tabla 9**, la concentración de MgCl₂ fue de 1,5 mM. Las condiciones de PCR para las tres reacciones fueron: 94°C 5 min, 25x (94°C 30s, 64°C 30s, 72°C 1 min), 72°C 7 min.

Tabla 9. Oligonucleotidos empleados y concentración de los mismos en la detección de AmpCp.

PCR	Diana	Secuencia	Concentración PCR	Producto de amplificación (pb)
Multiplex 1	<i>bla_{MOX}</i>	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	0,6 μ M	520
		CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
	<i>bla_{ACC}</i>	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	0,5 μ M	346
		TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
	<i>bla_{FOX}</i>	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	0,4 μ M	190
		CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
Multiplex 2	<i>bla_{CIT}</i>	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	0,6 μ M	462
		TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
	<i>bla_{EBC}</i>	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	0,5 μ M	302
		CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
<i>bla_{DHA}</i>	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	0,6 μ M	405	
	CCGTACGCATACTGGCTTTGC			

3.1.3.8. Detección de carbapenemasas

La detección de carbapenemasas mediante PCR se realizó en todas aquellas cepas que presentaban un resultado positivo en la detección fenotípica. Con este objetivo, se utilizó una PCR multiplex de detección de carbapenemasas tipo VIM, IMP, NDM, KPC y OXA-48-like utilizando los oligonucleótidos descritos en el trabajo de Poirel *et al.* (144) y recogidos en la **Tabla 10**. Las condiciones de PCR fueron: 94°C 5 min, 36x (94°C 30s, 52°C 40s, 72°C 50s), 72°C 5 min.

Tabla 10. Oligonucleótidos empleados en la detección de carbapenemasas.

Diana	Secuencia	Producto de amplificación (pb)
<i>bla</i> _{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232
	GGTTTAAAYAAAACAACCACC	
<i>bla</i> _{VIM}	GATGGTGTGGTTCGCATA	390
	CGAATGCGCAGCACCAG	
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438
	CATCAAGTTCAACCAACCG	
<i>bla</i> _{NDM}	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
	CGGAATGGCTCATCACGATC	
<i>bla</i> _{KPC}	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798
	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	

3.1.3.9. Detección de genes plasmídicos de resistencia a colistina (*mcr*)

Como ya se ha descrito con anterioridad, la emergencia de la resistencia transmisible a colistina (genes *mcr*) ha puesto en jaque a los microbiólogos clínicos, ya que hasta entonces la resistencia a este microorganismo se observaba en pacientes que habían estado expuestos a este antibiótico. El estudio de la sensibilidad in vitro a colistina presenta muchos problemas, siendo los principales la irregular difusión en agar de este antibiótico, la interacción con cationes del medio y la adsorción a diferentes materiales de laboratorio, por lo que ninguna de las técnicas empleadas habitualmente en los laboratorios de microbiología clínica es adecuada para el estudio de su sensibilidad, ya que aunque la microdilución en caldo clásica es la técnica recomendada por el EUCAST, no se puede incorporar con facilidad en la rutina asistencial.

En nuestro centro, a pesar de no existir puntos de corte para este antibiótico, se utilizó una tableta de colistina de 10 µg en el antibiograma, que nos ayudó en la detección de casos en los que pueda existir resistencia a colistina. En la actualidad ya se han incorporado otras técnicas basadas en colorimetría o microdilución para la detección de la resistencia a este antibiótico, pero no estaban a nuestro alcance durante el desarrollo de este estudio.

Ante estos hechos, se decidió realizar una PCR multiplex descrita por Rebelo *et al.* (145) que detectaba los genes transmisibles de resistencia a colistina *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5*. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla 11**. Las condiciones empleadas en la PCR fueron: 94°C 5 min, 25x (94°C 30 s, 58°C 90s, 72°C 60s), 72°C 10 min. En este caso la concentración de la agarosa empleada en la electroforesis fue 1,5% debido al elevado peso molecular de algunos de los productos de amplificación.

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados en la detección de genes transmisibles de resistencia a colistina *mcr*.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto de amplificación (pb)
<i>mcr-1</i>	AGTCCGTTTGTCTTGGGC	320
	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	
<i>mcr-2</i>	CAAGTGTTGGTTCGCAGTT	715
	TCTAGCCCGACAAGCATAACC	
<i>mcr-3</i>	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929
	AATGGAGATCCCCGTTTTT	
<i>mcr-4</i>	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1116
	TTGGTCCATGACTACCAATG	
<i>mcr-5</i>	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644
	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	

3.1.3.10. Estudio de factores de virulencia asociados a la cápsula polisacáridica

La presencia de cápsula polisacáridica, como ya se ha comentado con anterioridad, es uno de los factores de virulencia asociados a *Klebsiella pneumoniae* y determinados tipos capsulares como K1 y K2 se han asociado con el patotipo hipervirulento. Por tanto, para conocer y entender correctamente la epidemiología de *K. pneumoniae* consideramos necesario el estudio de la presencia de estos tipos capsulares mediante PCR. Con este objetivo se realizó una PCR para cada tipo capsular tal y como se describe en el artículo de Turton *et al.* (146) utilizando como control interno de amplificación una región ITS 16s-23s de *Klebsiella pneumoniae*, así mismo se incluyó el estudio de otros dos genes asociados a hipervirulencia: el gen *rmpA* (regulador del fenotipo mucoide A) y el gen *wcaG* (relacionado con síntesis de fucosa capsular, que incrementa la habilidad de la bacteria para evadir la fagocitosis). Los oligonucleótidos utilizados se describen en la **Tabla 12**. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 94°C 5 min, 35x (94°C 30s, 58°C 90s, 72°C 90s), 72°C 10 min.

Tabla 12. Oligonucleótidos empleados en el estudio de factores de virulencia asociados a la cápsula polisacáridica.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto de amplificación (pb)
Tipo capsular K1	GGTGCTCTTACATCATTGC	1283
	GCAATGGCCATTTGCGTTAG	
Tipo capsular K2	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG	641
	CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	
Tipo capsular K5	TGGTAGTGATGCTCGCGA	280
	CCTGAACCCACCCAATC	
Tipo capsular K54	CATTAGCTCAGTGGTTGGCT	881
	GCTTGACAAACACCATAGCAG	
Tipo capsular K57	CTCAGGGCTAGAAGTGTCAT	1037
	CACTAACCCAGAAAGTCGAG	
Tipo capsular K20	CGGTGCTACAGTGCATCATT	741
	GTTATACGATGCTCAGTCGC	
<i>rmpA</i>	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	516
	CTTGCATGAGCCATCTTCA	
<i>wcaG</i>	GGTTGGKTCAGCAATCGTA	169
	ACTATTCCGCAACTTTTGC	
Control interno <i>K. pneumoniae</i>	ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT	130
	TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTC	

3.1.3.11. *Secuenciación genómica*

Para conocer en mayor profundidad la cepa asociada al brote nosocomial, se realizó la secuenciación completa del genoma, realizando en nuestro centro la extracción de DNA a partir de cultivo en caldo Tripticasa-Soja a 37% toda la noche. La extracción y purificación se realizó utilizando las columnas de extracción de ADN genómico GenElute BACTERIAL Genomic DNA Kit (Sigma Aldrich, MO, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se realizó en buffer EB (10 mM Tris-HCl pH 8,5). Posteriormente se cuantificó la cantidad de ADN obtenido y se analizó la calidad mediante Nanodrop 2000 estimando la relación de absorbancia 260/280 y la absorbancia 260/230. También se realizó una electroforesis en gel de agarosa a una concentración 1% para verificar la integridad del ADN. La concentración mínima de ADN genómico necesaria para llevar a cabo la secuenciación es de 10 ng/ μ L (ya que la concentración se determinó con Nanodrop, que puede sobreestimar la concentración de ADN).

La secuenciación genómica se realizó en un laboratorio externo (MicrobesNG, Reino Unido) en el que la secuenciación se realiza utilizando lecturas 2x250 paired-end en las plataformas de Illumina MiSeq o HiSeq 2500. Las lecturas se depuraron con Trimmomatic y la calidad se evaluó mediante scripts internos combinados con el siguiente software: Samtools, BedTools y bwa-mem.

En el análisis se identificó el genoma de referencia más cercano disponible utilizando Kraken y se mapearon las lecturas utilizando BWA mem para asegurar la calidad de los datos. Además se realizó un ensamblaje de novo de las lecturas utilizando SPAdes y se mapearon de nuevo en los contigs resultantes utilizando BWA mem para obtener otra vez datos de calidad. Los contigs se reordenaron y reorientaron en relación con el genoma de referencia basándose en el alineamiento del genoma completo MUMmer y se realizó una anotación automatizada utilizando Prokka. Los resultados del flujo de análisis se proporcionaron utilizando formatos de archivo bioinformáticos estándar, incluyendo fasta, gbk, gff y fastq.

La evaluación del ensamblaje se realizó mediante el programa QUAST, que nos proporciona datos tales como:

- Número de contigs: Número de contigs total del ensamblaje
- Número de contigs de ≥ 0 pb.
- Número de contigs de ≥ 1000 pb.
- Longitud total: Número total de bases en el ensamblaje
- Longitud total del contig más largo

- GC(%): Número de nucleótidos G y C en el ensamblaje dividido por longitud total
- N50: Longitud mínima de los contigs necesarios para cubrir la mitad del ensamblaje.
- N75: Longitud mínima de los contigs necesarios para cubrir el 75% del ensamblaje.
- L50: Número de contigs de longitud igual o mayor a N50 (Mínimo número de contigs para cubrir la mitad del ensamblaje).
- L75: Número de contigs de longitud igual o mayor a N75 (Mínimo número de contigs para cubrir el 75% del ensamblaje).

El archivo fasta obtenido fue analizado con la base de datos del instituto Pasteur para determinar la presencia de otros genes de resistencia antibiótica y factores de virulencia.

Además también se realizó un análisis con las herramientas bioinformáticas disponibles en Internet: ResFinder, PlasmidFinder y KmerResistance (alojadas en la página web del Center for Genomic Epidemiology, Dinamarca) para detectar plásmidos y de nuevo mecanismos de resistencia vehiculados en elementos genéticos móviles (147–150). Este análisis se realizó partiendo tanto del ensamblaje realizado en el laboratorio externo como de los datos primarios de las lecturas de Illumina obtenidas depuradas (*raw data*) para comparar los resultados obtenidos.

3.1.4. Medidas de control del brote

Las medidas de control instauradas siguiendo las recomendaciones de la Comisión de Infección Nosocomial y Política de Antibióticos y del Servicio de Medicina Preventiva fueron:

Medidas de control de infección generales: Las habituales en las unidades de cuidados intensivos: higiene de manos antes y después de cualquier acto relacionado con el paciente o su entorno y en la colocación y manejo de dispositivos invasores (151). Así mismo se siguen las recomendaciones de los programas Bacteriemia Zero y Neumonía Zero de la Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) (152,153).

Aislamiento de contacto: El aislamiento de contacto se realiza a todos los pacientes con factores de riesgo de colonización por microorganismos multirresistentes (procedencia de otro centro hospitalario o residencia, ingreso hospitalario reciente, etc.) denominándose aislamiento preventivo. Este tipo de aislamiento se retira si los resultados de cultivos de vigilancia al ingreso del paciente resultan negativos. Ante el diagnóstico de colonización o infección por microorganismos multirresistentes (enterobacterias productoras de BLEE o carbapenemasas,

Pseudomonas aeruginosa o *Acinetobacter baumannii* multirresistentes, *Staphylococcus aureus* resistente a metilina o *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina) se indica aislamiento de contacto estricto. El aislamiento de contacto se retira tras la obtención de tres muestras de vigilancia consecutivas (una por semana) negativas.

Cultivos medioambientales: En la búsqueda de un reservorio ambiental del microorganismo, se realizó un muestreo ambiental de superficies de la UCI utilizando la técnica de la gasa estéril. Los cultivos fueron incubados a 35°C durante 48 horas, y posteriormente se realizó un subcultivo en medio cromogénico selectivo para enterobacterias productoras de BLEE. La identificación y estudio de antibiograma de las colonias obtenidas del cultivo, se realizaron según los métodos estandarizados habituales utilizados en el laboratorio de microbiología.

Estudio de portadores: Se realizó un muestreo aleatorio para la práctica de cultivos de la superficie de manos del personal de la UCI (médico, de enfermería, auxiliares de enfermería, técnicos de radiología, celadores). Para realizar el cultivo, los sujetos de estudio colocaron los dedos, como marca de impresión digital, en una placa de cultivo con medio de Levine (medio de agar selectivo y diferencial de microorganismos gramnegativos).

Además de estas medidas, también se incluyeron otras que se han descrito como efectivas en el control de brotes: la limpieza exhaustiva de las superficies de la Unidad, la administración de solución de descontaminación selectiva (compuesta por colistina, gentamicina y anfotericina B o nistatina) a través de sonda nasogástrica, y la realización de sesiones formativas al personal sanitario de UCI por parte de enfermeras del servicio de Medicina Preventiva y de facultativos del Equipo de Control de Infección Nosocomial (ECIN) para la concienciación de la situación de brote nosocomial.

3.1.5. Recogida de datos

Se recogieron datos de estancia hospitalaria de los años 2011 a 2014 solicitados al Servicio de Documentación Clínica y Archivos, para determinar la densidad de incidencia de este microorganismo, así como el número mensual de pacientes críticos ingresados, solicitándolo a la UCI para el cálculo de prevalencia e incidencia mensual.

Se recogieron datos de hospital y unidad de procedencia, edad, sexo, diagnóstico al ingreso, muestras positivas al diagnóstico de la colonización/infección, tipo de infección y evolución de los pacientes colonizados/infectados por el brote nosocomial en estudio. El cuaderno de recogida de datos se encuentra disponible en el **Anexo I**.

3.1.6. Análisis de los datos

Se realizará una descripción de los resultados microbiológicos obtenidos y de los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio. Teniendo en cuenta los datos microbiológicos obtenidos se calcularán la densidad de incidencia de colonización e infección anual, así como la incidencia y prevalencia mensuales. Con los datos obtenidos se estimará la variable presión de colonización semanal (definida como la relación entre casos prevalentes de colonización/infección y casos en riesgo esa semana, que eran aquellos a los que se les había solicitado cultivos de vigilancia). Esta variable será utilizada en el estudio de casos y controles que se describirá a continuación.

Se realizará una descripción de los efectos de las medidas de control instauradas (disminución del número de casos, emergencia de resistencias, etc.)

3.1.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos utilizados para la descripción de las características clínico-epidemiológicas de los pacientes se realizaron con el programa Stata 13 (StataCorp, College Station, TX, EE.UU.). En todos los análisis se emplearon pruebas de significación bilaterales, considerándose como significativa una probabilidad de error α ($p < 0,05$). Las pruebas utilizadas para la comprobación del supuesto de normalidad fueron la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors y la prueba de Shapiro-Wilks (cuando el tamaño muestral era inferior a 30).

Las variables continuas con distribución normal se han descrito empleando la media y la desviación estándar, mientras que para las variables cuantitativas de distribución no normal se ha empleado la mediana y el rango intercuartil. Las variables cualitativas se definen mediante frecuencia y porcentajes.

3.2. Estudio observacional descriptivo

3.2.1. Objetivo del estudio

El objetivo fundamental de esta parte del estudio es describir los factores de riesgo que pudieran estar relacionados con la colonización por *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE asociada al brote nosocomial. Así mismo se pretende realizar un subanálisis para determinar qué factores de riesgo pudieran estar relacionados con el desarrollo de un proceso infeccioso por este microorganismo.

3.2.2. Diseño del estudio

Estudio de casos y controles retrospectivo unicéntrico de ámbito hospitalario (Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe) en el periodo comprendido entre el 1 de octubre de 2011 y el 30 de junio de 2014.

3.2.3. Marco

Desde febrero de 2011 la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es una unidad de 36 camas, distribuidas en 3 *boxes* adyacentes de 12 camas, que comparten personal médico y de enfermería, así como equipamiento médico e instrumental. En esta unidad se realizan de forma habitual medidas destinadas al control de la infección nosocomial, detalladas previamente. A principios del año 2011 se produjo el traslado del Hospital Universitario La Fe a un edificio de nueva construcción. En la antigua unidad de cuidados intensivos, *Acinetobacter baumannii* multirresistente era el microorganismo considerado endémico y la presencia de *Klebsiella pneumoniae* BLEE se consideraba un hecho excepcional. Tras el traslado, *A. baumannii* se consideró erradicado de esta unidad dejando la UCI libre de endemias y brotes (154).

3.2.4. Pacientes

Como ya se ha comentado con anterioridad, durante el periodo de estudio el 3,71% de los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe desarrollaron una colonización o infección por *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE.

3.2.4.1. Definición de los casos

Se consideró como “caso” cualquier paciente colonizado o infectado por *K. pneumoniae* productora de BLEE asociada al brote nosocomial en estudio. Se definió “paciente infectado” como enfermo con cultivo positivo y criterios clínicos de infección según lo considerado por el médico responsable del paciente. Se definió “paciente colonizado” al enfermo con cultivos de

vigilancia epidemiológica o de muestras clínicas positivos para este microorganismo sin criterios clínicos de infección.

La detección de los pacientes colonizados se realizó a través del estudio mediante cultivos de vigilancia microbiológica realizados semanalmente en la UCI. Estos cultivos se realizan en medios cromogénicos selectivos para la detección de bacilos gramnegativos con resistencia a cefalosporinas de tercera generación (ChromID® ESBL, BioMérieux, Francia), posteriormente se realiza su identificación mediante una batería de pruebas bioquímicas o MALDI-TOF MS (Vitek MS, BioMérieux, Francia) y el estudio de sensibilidad mediante disco-difusión que incluye la prueba de detección de BLEE del doble disco.

Las definiciones de las infecciones nosocomiales empleadas en la Unidad de Cuidados Intensivos y que nos permitieron definir un paciente como infectado fueron:

Infección respiratoria asociada a ventilación mecánica: La neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM) se define por la presencia de infiltrados pulmonares o progresión de condensación preexistente en la radiografía de tórax, junto con dos de las siguientes variables clínicas: temperatura $>38^{\circ}\text{C}$, leucocitosis ($>12000/\text{mm}^3$) o leucopenia ($<4000/\text{mm}^3$) y secreciones respiratorias purulentas (155). El diagnóstico de traqueobronquitis asociada a ventilación mecánica (TAVM) se establece con la presencia de criterios clínicos en ausencia de criterios radiológicos. Para el diagnóstico de distrés respiratorio agudo solo es necesaria la presencia de una variable clínica.

Infección urinaria en paciente sondado: Este diagnóstico se realiza según los criterios de Costel modificados por Laupland *et al.* (156). Se define por cultivo positivo (>100.000 UFC/mL de uno o dos microorganismos) a partir de las 48 horas de permanencia de la sonda urinaria. Además requiere la presencia de signos o síntomas compatibles con infección urinaria (temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$, disuria o molestias suprapúbicas) o bioquímica de orina compatible (piuria o nitritos positivos) (157).

Bacteriemia relacionada con catéter (BRC): Este diagnóstico se realiza teniendo en cuenta los criterios publicados por la IDSA en el año 2009 (158) y los medios disponibles en el laboratorio de Microbiología de nuestro centro. Los criterios diagnósticos son manifestaciones clínicas de infección (fiebre, escalofríos o hipotensión) y ausencia de otros focos de infección posibles, al menos un hemocultivo positivo de sangre extraída por venopunción y uno de los siguientes: 1) aislamiento del mismo microorganismo con un recuento suficiente en el cultivo semicuantitativo (técnica Maki >15 UFC) o cuantitativo (Sonicación >100 UFC) de la punta del

catéter y 2) tiempo diferencial de positividad superior a 2 horas a favor del hemocultivo extraído del catéter frente al hemocultivo obtenido por venopunción.

El diagnóstico de otras infecciones no mencionadas en esta relación se realiza siguiendo los criterios de *Centers for Disease Control and Prevention* (Atlanta, EEUU).

3.2.4.2. Selección de los controles

Emparejamiento: Se seleccionó un paciente por cada caso, debido a la dificultad de la recogida de los datos, emparejado por edad, sexo, tiempo de estancia en UCI y escala APACHE II a partir de una base de datos que contenía estas variables facilitada por la Unidad de Cuidados Intensivos.

Regresión logística: En primer lugar se realizó una regresión logística binaria incluyendo todos los pacientes que estuvieron ingresados en UCI durante ese periodo y de los que se disponía de estas cuatro variables para determinar si constituían factores de riesgo o protectores para la colonización por *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE relacionada con el brote nosocomial. Igualmente estas variables fueron incluidas posteriormente en el análisis estadístico del estudio de casos y controles.

Selección de controles mediante R: Debido a que entre los pacientes ingresados en UCI en el periodo de estudio no existían controles idénticos a nuestros casos, imposibilitando realizar un emparejamiento individual, se decidió realizar un emparejamiento por frecuencia, en el que la frecuencia relativa de los distintos valores de las variables por las que se empareja es similar en los grupos que se comparan. Para la realización de esta selección se ha utilizado el paquete *MatchIt* del software estadístico R con la aproximación “nearest” (159).

3.2.5. Recogida de datos clínicos

Los datos relacionados con los pacientes definidos como casos y controles se recogieron a través de la revisión de la historia clínica informatizada y los resultados microbiológicos almacenados en las bases de datos del Servicio de Microbiología en un cuaderno de recogida de datos diseñado a tal efecto (**Anexo I**) y posteriormente pasados a una base de datos en Access 2013 también elaborada para esta tesis.

Las variables seleccionadas para su recogida se engloban en 9 apartados: a) datos demográficos, b) comorbilidad presente al ingreso en UCI, c) factores de riesgo al ingreso, d)

diagnóstico de la colonización por *K. pneumoniae* productora de BLEE, e) diagnóstico de la infección por *K. pneumoniae* productora de BLEE, f) diagnóstico de la colonización/infección por otros microorganismos multirresistentes, g) tratamiento antibiótico durante el ingreso hospitalario, h) procedimientos quirúrgicos y dispositivos invasivos durante su estancia en UCI e i) evolución y alta del paciente. Se prefirió incluir variables numéricas de fechas de inicio y fin en lugar de días de duración para evitar errores en cálculos estadísticos posteriores y facilitar la descripción de nuevas variables. Las variables relacionadas como factores de riesgo al ingreso se establecieron según lo publicado en la literatura científica (116,118,160,161).

Las variables que se consideraron como posibles factores de riesgo de colonización o infección fueron la edad, el sexo, las comorbilidades presentes al ingreso, los factores de riesgo de colonización por bacterias multirresistentes al ingreso, los procedimientos quirúrgicos durante el ingreso, días y tipos de dispositivos invasivos, días y tipos de antibioterapia recibida u otros tratamientos que pudieran favorecer o impedir la colonización (inhibidores de la bomba de protones, antiH2, corticoides, inmunosupresores, clorhexidina oral, solución de descontaminación digestiva selectiva) y la colonización por otras bacterias multirresistentes (incluyendo la colonización por otra cepa de *K. pneumoniae* BLEE no asociada al brote).

3.2.6. Tamaño muestral

El tamaño muestral está delimitado por el número de casos de colonización/infección detectados en ese periodo.

3.2.7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos utilizados para la descripción de las características clínico-epidemiológicas de los pacientes, la comparación entre pacientes colonizados por determinados clones, o entre pacientes colonizados e infectados y para las comparaciones intrasujeto en los pacientes infectados, se realizaron con el programa Stata 13 (StataCorp, College Station, TX, EE.UU.).

En todos los análisis se emplearon pruebas de significación bilaterales, considerándose como significativa una probabilidad de error α ($p < 0,05$). Las pruebas utilizadas para la comprobación del supuesto de normalidad fueron la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors y la prueba de Shapiro-Wilks (cuando el tamaño muestral era inferior a 30).

Las variables continuas con distribución normal se han descrito empleando la media y la desviación estándar, mientras que para las variables cuantitativas de distribución no normal se

ha empleado la mediana y el rango intercuartil. Las variables cualitativas se definen mediante frecuencia y porcentajes. La comparación de proporciones entre variables cualitativas se ha realizado mediante el estadístico de chi-cuadrado o sus correspondientes correcciones, como la corrección de Fisher cuando las frecuencias esperadas son inferiores a 5. Para la comparación de variables de exposición cuantitativas con variables de respuesta cualitativas se ha empleado regresión logística, y en el caso de variables de exposición cualitativas y respuesta cuantitativa se ha utilizado t de Student para muestras independientes (si la respuesta cuantitativa presenta distribución normal) o la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (si la respuesta cuantitativa no presenta una distribución normal). Para estimar la probabilidad de supervivencia se ha utilizado el método de Kaplan-Meier, utilizando la prueba de Mantel-Cox para la comparación de curvas de supervivencia. El análisis multivariante para encontrar factores asociados a la colonización o la infección se realizó empleando un modelo de regresión logística penalizado por elastic net (162). Una segunda regresión logística se ajustó con las variables seleccionadas por elastic net, para obtener los OR junto con su intervalo de confianza al 95%. Para una mejor interpretación se representó el efecto de las variables mediante figuras de efectos parciales junto con sus intervalos de confianza. Este análisis multivariante se realizó con el software estadístico R (3.5.3).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Medidas de densidad de incidencia, prevalencia e incidencia mensual

En el año 2012 se produjo un incremento de más de 10 veces en el número de colonizaciones por *K. pneumoniae* BLEE por 1.000 días de estancia respecto al año anterior en la UCI del H. Universitario y Politécnico La Fe, esta tasa se mantuvo en el año 2013 y se multiplicó casi por dos en 2014 (periodo del que únicamente se ha analizado medio año). Respecto al número de infecciones, en el año 2012 el incremento respecto al año 2011 fue de casi 7 veces, como queda reflejado en la **Tabla 13**. Este incremento en el número de casos de colonización e infección es el que motivó el desarrollo de esta tesis.

Tabla 13. Medidas de densidad de incidencia de infecciones y colonizaciones por *K. pneumoniae* BLEE en UCI.

AÑO	INFECCIONES/1.000 DÍAS DE ESTANCIA EN UCI	COLONIZACIONES/1.000 DÍAS DE ESTANCIA EN UCI
2011	0,29	0,58
2012	2,11	6,06
2013	1,01	6,94
2014	2,69	10,04

En la **Tabla 14** se presenta el informe de sensibilidad acumulado de *Klebsiella pneumoniae* en muestras clínicas de pacientes ingresados en Unidad de Cuidados Intensivos durante el periodo de estudio, como puede observarse el porcentaje de sensibilidad a cefalosporinas de 3ª generación rondaba el 50%.

Tabla 14. Informe acumulado de sensibilidad *Klebsiella pneumoniae* durante el periodo de estudio.

	2012 n=58	2013 n=83	2014 n=53	Global n=194	Global (sangre y LCR) n=47
Ceftriaxona	52,8	52,6	34,7	48,3	34,1
Ceftazidima	58,6	62,7	42,9	56,0	38,3
Aztreonam	51,1	55,2	44,4	51,6	44,2
Amoxicilina/Clavulánico	57,9	59,3	54,7	57,7	23,9
Piperacilina/Tazobactam	69,4	66,2	28,6	56,2	29,8
Ertapenem	95,8	92,6	87,0	92,1	82,6
Imipenem	100	96,4	92,9	96,5	91,5

Durante el periodo comprendido entre octubre de 2010 y junio de 2014, 148 pacientes que estuvieron ingresados en UCI fueron diagnosticados de colonización o infección por este microorganismo. De estos 148, 6 pacientes presentaron cultivos positivos tras el alta de esta Unidad. En la **Figura 6** se muestra la prevalencia e incidencia mensual de *K. pneumoniae* BLEE en forma de porcentaje respecto el total de pacientes ingresados (no considerándose los casos diagnosticados tras el alta de UCI). Desde febrero de 2011 (mes y año del traslado de nuestro

hospital) hasta que se inicia el periodo de estudio de este proyecto la detección de *K. pneumoniae* BLEE en la Unidad de Cuidados Intensivos resultaba casi anecdótica (únicamente un caso en julio de 2011).

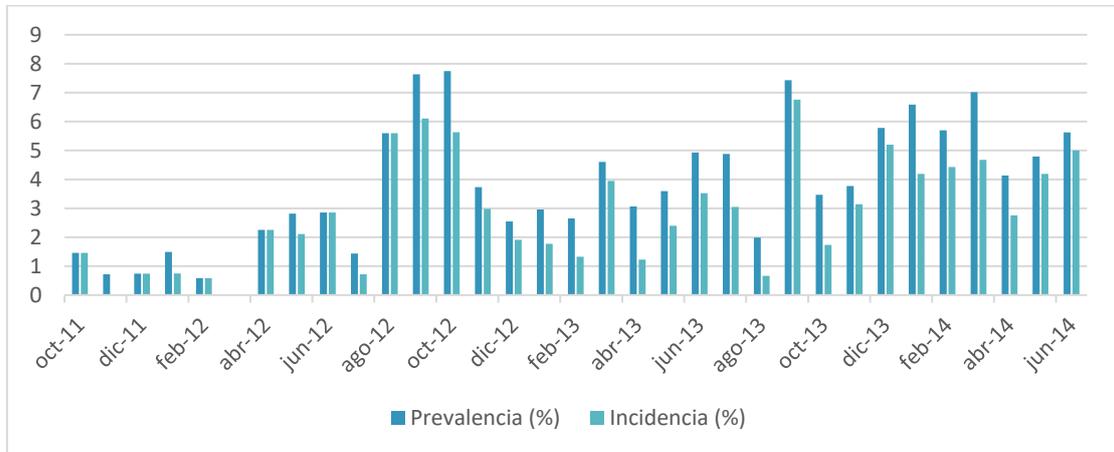


Figura 6. Prevalencia e incidencia mensual (%) de infección/colonización por *K. pneumoniae* productora de BLEE

El estudio de portadores de bacterias multirresistentes mediante cultivos de vigilancia se inició en la unidad de cuidados intensivos en octubre de 2011. En la **Figura 7** se muestran los casos prevalentes divididos en cuatro grupos: a) pacientes que únicamente presentaron muestras clínicas positivas en el mes de estudio, b) pacientes que únicamente presentaron cultivos de vigilancia positivos, c) pacientes que presentaron tanto cultivos de vigilancia como muestras clínicas positivas en el mes de estudio, d) pacientes que se consideraban portadores por resultados previos pero no presentaban ninguna muestra positiva en el mes estudiado.

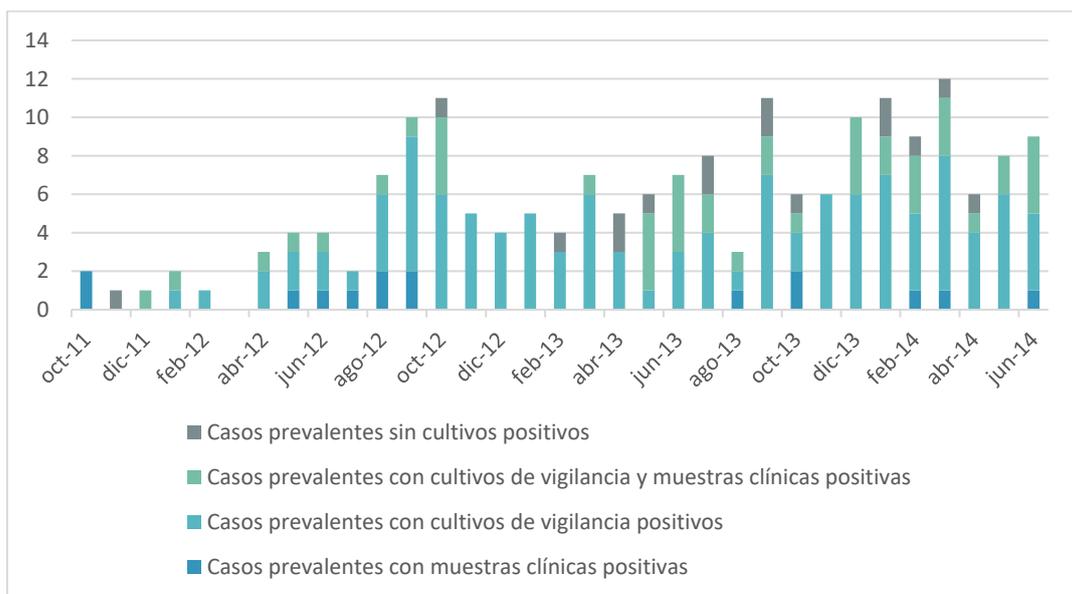


Figura 7. Casos prevalentes en función del tipo de muestras positivas.

4.2. Estudio de sensibilidad acumulado

De los 148 pacientes diagnosticados de colonización/infección por *K. pneumoniae* BLEE durante el periodo de estudio, fue posible recuperar la cepa para los estudios a continuación descritos en 129 pacientes (87,16%), observándose diferencias en el antibiograma entre diferentes cepas de un mismo paciente, por lo que finalmente se incluyeron 149 aislados. A continuación se muestra en la **Tabla 15** la sensibilidad de estos aislados estudiada mediante disco-difusión.

Tabla 15. Estudio de sensibilidad.

	% Sensibilidad (CLSI 2014)
Ampicilina	0
Amoxicilina/Clavulánico	26,8
Piperacilina/Tazobactam	26,8
Cefoxitina	60,4
Cefuroxima	0
Ceftriaxona	0,7
Ceftazidima	4
Aztreonam	4
Ertapenem	94,6
Imipenem	97,3
Ciprofloxacino	7,4
Cotrimoxazol	3,4
Tobramicina	13,4
Amikacina	70,5
Gentamicina	16,7

En todos los casos se demostró la presencia de una BLEE mediante el test del doble disco. En 8 aislados se observó una disminución de sensibilidad (o resistencia) a ertapenem, y en 4 también se veía afectada la sensibilidad a imipenem, pero en el estudio fenotípico de la producción de carbapenemasas solo se detectó la presencia de una carbapenemasa tipo MBL en dos de los aislados. En 10 de los aislados se observó inexistencia de halo de inhibición con un disco de colistina (carga 10 µg). Este resultado fue comprobado por una técnica de microdilución comercial observando CMIs iguales o superiores a 64 mg/L en todos los casos, además fue posible estudiar la presencia de genes *mcr* (variantes alélicas de la 1 a la 5) mediante PCR como se explicará más adelante. Se realizará una descripción más detallada del estudio de sensibilidad tras la descripción de resultados de los estudios de tipificación molecular y caracterización de la resistencia a β-lactámicos.

4.3. Estudios de tipificación molecular

4.3.1. Electroforesis en campo pulsado.

Los estudios realizados mediante electroforesis en campo pulsado mostraron la agrupación de las 149 cepas estudiadas en 21 perfiles distintos (contemplando un 85% de semejanza genética para considerar dos cepas como relacionadas). Debido al elevado número de cepas en estudio fue necesario realizar 15 experimentos diferentes para poder establecer correctamente las relaciones entre los diferentes perfiles. En la **Figura 8** se muestran los resultados del estudio realizado mediante PFGE. La columna N representa el número de pacientes en cada perfil.

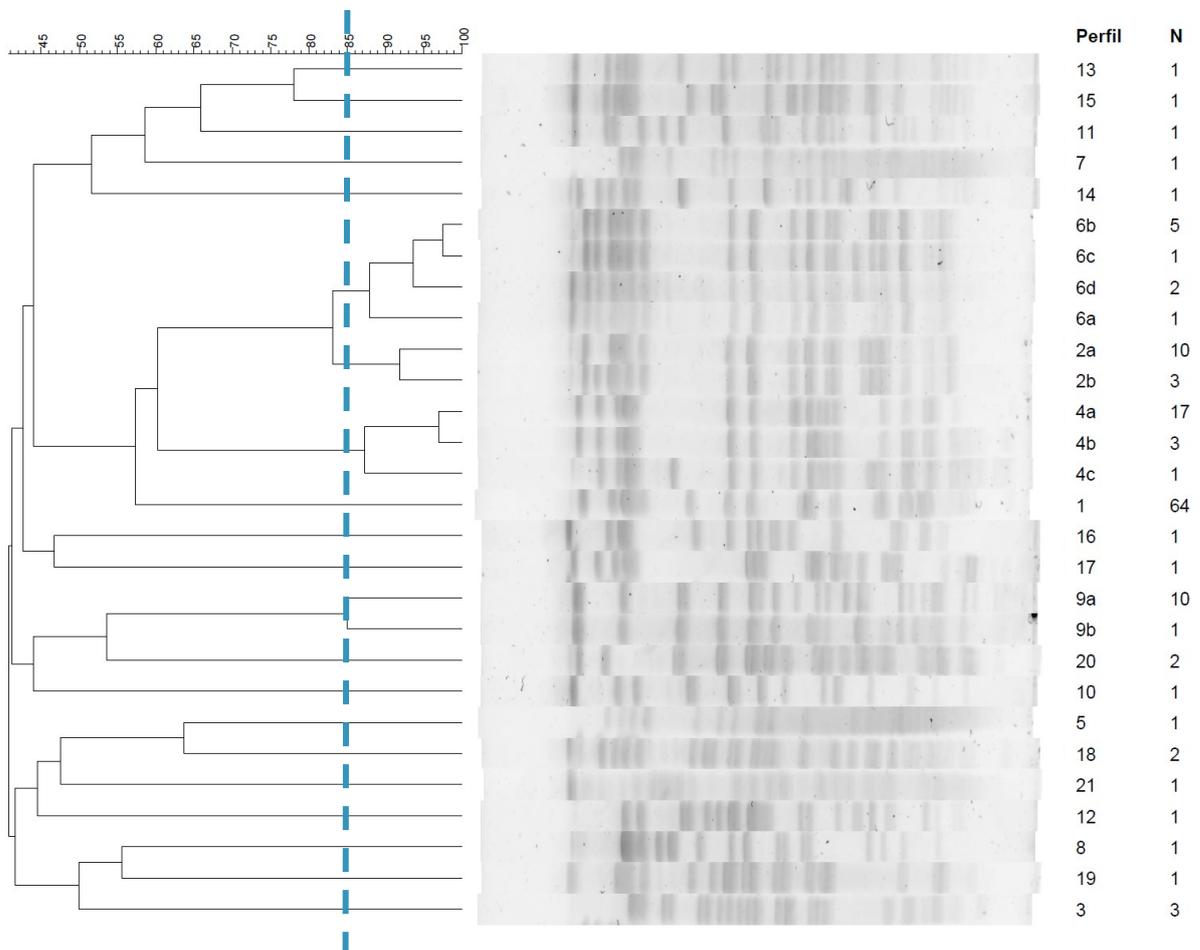


Figura 8. Dendrograma de PFGE

Como puede observarse en la imagen, 64 de las cepas estudiadas (43%) se encontraban englobadas dentro del mismo perfil (Perfil 1). Además se detectó la presencia de 4 perfiles más que incluían más de 5 aislados cada uno (Perfiles 2, 4, 6 y 9). Las características de los pacientes colonizados/infectados por el clon 1 y los factores de riesgo para la colonización por la cepa perteneciente a este clon serán explicados en profundidad mediante un estudio de casos y controles.

En la **Figura 9** se puede observar los casos incidentes de colonización o infección por *Klebsiella pneumoniae* BLEE en función del perfil al que pertenecen.

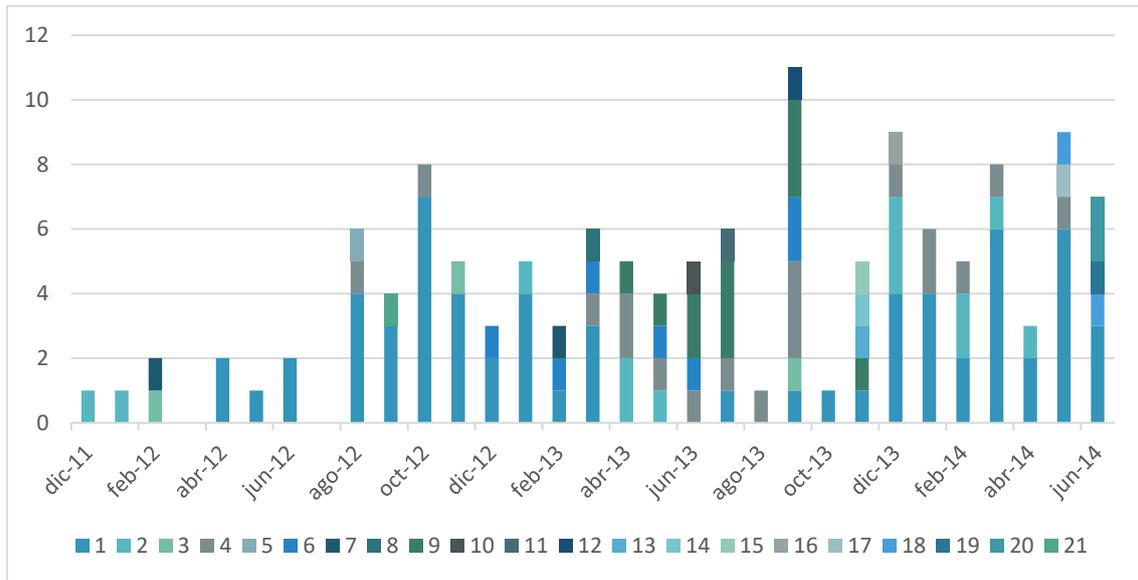


Figura 9. Casos incidentes de *K. pneumoniae* BLEE por perfil de PFGE.

En la gráfica puede observarse que los casos incidentes de *K. pneumoniae* BLEE pertenecientes al perfil 1 se distribuyen a lo largo de todo el periodo de estudio, si bien es cierto que parecen desaparecer los casos nuevos entre abril y junio de 2013. En la **Figura 10** se muestran los casos incidentes y prevalentes mensuales, pudiendo comprobar que este brote se ha producido en dos oleadas y observando la existencia de casos aislados entre julio y noviembre de 2013 sin que hubiera otro paciente en la unidad colonizado, lo que hace pensar en la existencia de algún reservorio. Al finalizar el periodo de estudio el brote aún no se había logrado erradicar.

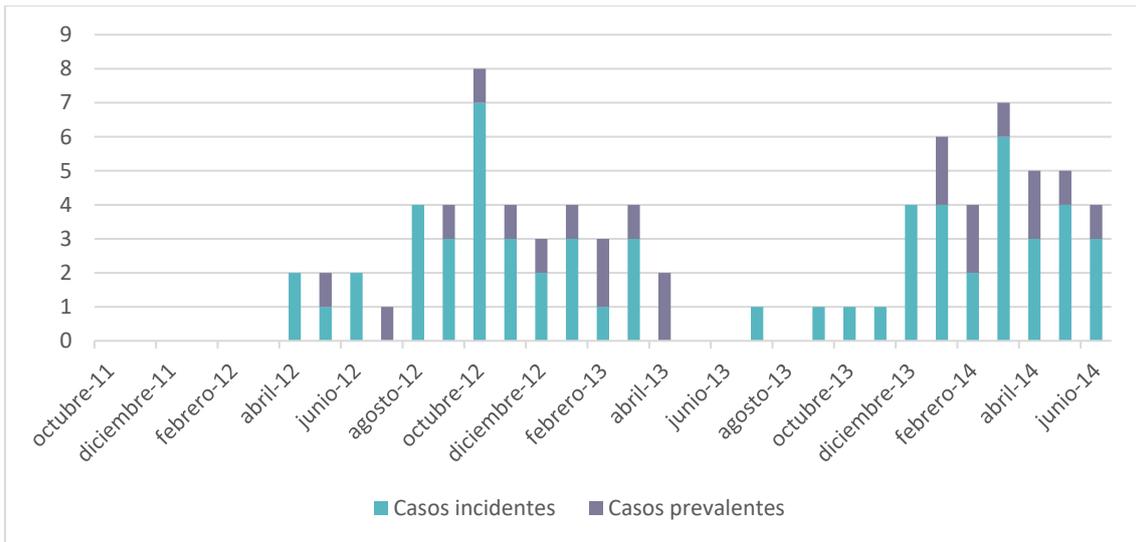


Figura 10. Casos incidentes y prevalentes mensuales de *K. pneumoniae* BLEE - Perfil 1

La **Figura 11** muestra la presión de colonización semanal de *K. pneumoniae* BLEE asociada a perfil 1 y su relación con los casos incidentes detectados.

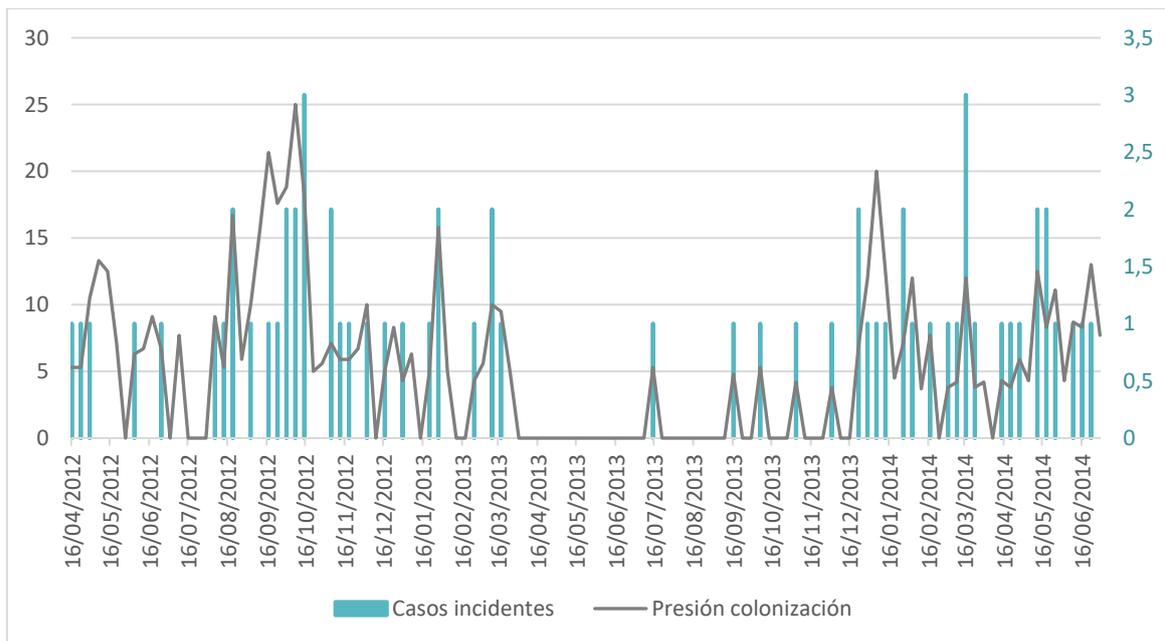


Figura 11. Presión de colonización y casos incidentes de *K. pneumoniae* BLEE asociada al perfil 1.

4.3.1.1. Casos iniciales de los perfiles con 3 o más pacientes afectados

Perfil 1 (primera oleada): El primer paciente detectado colonizado por *K. pneumoniae* BLEE del perfil 1 de PFGE era un varón de 35 años que ingresó en la Unidad de Cuidados Intensivos el 2 de abril de 2012 por sepsis procedente de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, este paciente había recibido antibioterapia antes del ingreso en UCI y había sido diagnosticado de una neoplasia, por la que había recibido corticoterapia. Dos semanas después de ingresar, en los cultivos de vigilancia realizados se detectó *K. pneumoniae* BLEE (los previos realizados la semana anterior habían sido negativos), lo que hace pensar que la colonización se produjo intraUCI y este paciente, a pesar de ser el primer caso detectado, no es el caso índice del brote. El paciente permaneció ingresado en la UCI durante 18 días.

Perfil 2: El primer caso detectado fue un varón de 38 años que ingresó en la UCI el 8 de noviembre de 2011 por insuficiencia respiratoria procedente de Neumología, diagnosticándose durante su estancia en la UCI de tuberculosis. El paciente no presentaba factores de riesgo para colonización por microorganismos multirresistentes al ingreso pero sí que precisó ventilación mecánica, sondaje vesical y catéteres intravasculares, así como antibioterapia prolongada durante el ingreso en la unidad. El primer cultivo positivo para *K. pneumoniae* BLEE aparece el 19 de diciembre (las 5 semanas anteriores habían sido negativos), por lo que tampoco parece tratarse del caso índice de este brote. La estancia en la UCI se prolongó durante 73 días, falleciendo durante su estancia en planta de hospitalización.

Perfil 3: El primer caso fue una mujer de 64 años que ingresó en el hospital el 21 de enero de 2012 en la planta de Neumología, requiriendo ingreso en UCI el 3 de febrero de 2012 por insuficiencia respiratoria. La paciente presentaba como factores de riesgo para la colonización por microorganismos multirresistentes, además de una estancia previa en el hospital de más de 5 días, varias enfermedades crónicas por las que requería asistencia sanitaria continuada (diabetes mellitus, insuficiencia cardíaca, enfermedad pulmonar crónica) y cura de heridas en domicilio. Los primeros cultivos de vigilancia realizados a la paciente, 3 días después de su ingreso, resultaron positivos para este microorganismo. La duración de la estancia de la paciente en la UCI fue de 4 días.

Perfil 4: El primer caso detectado fue un varón de 37 años que ingresó el 23 de abril en el hospital para trasplante cardíaco, requiriendo ingresos en UCI y Reanimación. Tras una larga estancia en la unidad de media y larga estancia el paciente requirió de nuevo ingreso en UCI el 8 de agosto de 2012. En los primeros cultivos de vigilancia realizados en este ingreso se detectó este microorganismo, no habiéndose detectado durante el ingreso anterior en UCI, por lo que

la adquisición se pudo producir en su estancia previa en las unidades de críticos, pero también durante su estancia en sala de hospitalización, incluyendo una sala de media y larga estancia. La estancia del paciente en la UCI en este segundo ingreso fue de 5 días, pero su estancia en el hospital fue de 228 días.

Perfil 6: Varón de 53 años que ingresó en UCI procedente de la sala de Neurología el 29 de noviembre de 2012 por insuficiencia respiratoria por neumonía por *Streptococcus pneumoniae* requiriendo ventilación mecánica invasiva, cateterización de vía venosa central, sonda nasogástrica y sondaje vesical. Como factores de riesgo para colonización por microorganismos multirresistentes el paciente presentaba diabetes mellitus. El primer cultivo positivo para *K. pneumoniae* BLEE se detectó el 10 de diciembre de 2012 (dos semanas desde el ingreso, con unos cultivos de vigilancia previos negativos) por lo que tampoco parece el caso índice de este clon, 12 días más tarde el paciente presentó una bacteriemia por este microorganismo. La estancia en la UCI del paciente fue de 57 días, falleciendo a los 4 días del alta de esta unidad.

Perfil 9: Varón de 67 años que ingresó en UCI el 18 de abril de 2013 por deterioro neurológico relacionado con hematoma subdural diagnosticado a principios de mes. Por este motivo, el paciente había requerido ingreso previo en la Unidad de Reanimación y en la sala de Neurocirugía. La colonización se detectó en los cultivos de vigilancia realizados el primer día de ingreso por lo que sí que parece ser el caso índice de este brote.

4.3.2. Rep-PCR (Diversilab™)

En los estudios iniciales del brote, en 46 de las cepas pertenecientes a 44 pacientes se realizó el estudio de tipificación molecular mediante esta técnica. La rep-PCR se realizó en tres experimentos diferentes, y para la separación de los fragmentos mediante electroforesis en la matriz microfluídica se utilizaron 8 chips diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 16** comparándolos con la PFGE y los dendogramas obtenidos se encuentran el **Anexo II**. Al comparar los resultados con los obtenidos mediante PFGE observamos importantes discrepancias en la clasificación. En la rep-PCR encontramos una muy baja reproducibilidad de la técnica: la misma cepa, analizada en diferentes experimentos mostraba un patrón de bandas discordante, con porcentajes de semejanza inferiores al 95%, cuando deberían ser idénticas, tal como se puede verificar en la **Tabla 17** y en la **Figura 12**. Debido a esta baja reproducibilidad observada, se consideró que si la misma cepa de un paciente se encontraba en dos agrupaciones clonales descritas en días diferentes, éstas conformaban un mismo clon.

Tabla 16. Resultados Diversilab™ comparado con PFGE

Aislado	Perfil Rep-PCR	Perfil PFGE
183	A	2 a
391	A	2b
437	A	1
438	A	1
479	A	1
545	A	1
592	A	1
604	A	1
605	A	1
606	A	1
614	A	4a
637	A	1
640	A	1
643	A	1
665	A	1

Aislado	Perfil Rep-PCR	Perfil PFGE
772	A	1
789	A	1
802	A	1
817	A	1
818	A	1
830	A	1
920	A	1
1000	A	1
1021	A	1
1163	A	6d
1238	A	1
1263	A	1
1284	A	1
1285	A	4a
1413	A	2b

Aislado	Perfil Rep-PCR	Perfil PFGE
843	B	1
844	B	3
941	C	6d
1210	C	6c
660	D	4a
1230	D	4b
737	F	1
1022	F	1

Aislado	Perfil Rep-PCR	Perfil PFGE
136	No grupo	2a
1103	No grupo	6b
1542	No grupo	9
234	No grupo	3
676	No grupo	1
909	No grupo	6b
1261	No grupo	8
551	No grupo	1

Tabla 17. Comparación de resultados de cepas de *K. pneumoniae* de un mismo paciente realizados en días diferentes.

Número de aislado	Porcentaje de semejanza
604	92,1
605	87,1
747	68,8
438	55,7
479	76,4
437	57
136	56,2
183	72,4
737	83,4
234	77,4

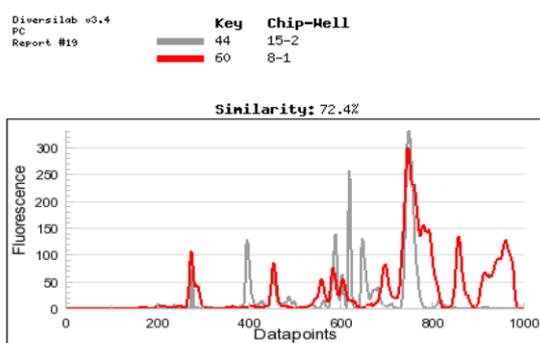


Figura 12. Comparación del patrón electroforético del aislado 183 en dos experimentos.

4.3.3. Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)

La técnica de RAPD se realizó en 28 cepas representativas de todas las agrupaciones y subagrupaciones caracterizadas en la PFGE con seis oligonucleótidos iniciadores diferentes, en la **Figura 13** puede observarse el dendograma generado en el análisis. En el **Anexo III** se encuentra el mismo dendograma con las imágenes obtenidas de la electroforesis. Como puede verse, está técnica agrupaba como semejantes perfiles diferentes por PFGE (2b y 6d, 14 y 15, 7 y 21) y nos separaba perfiles relacionados por PFGE (2b y 2a y todos los subgrupos del 6 y del 9).

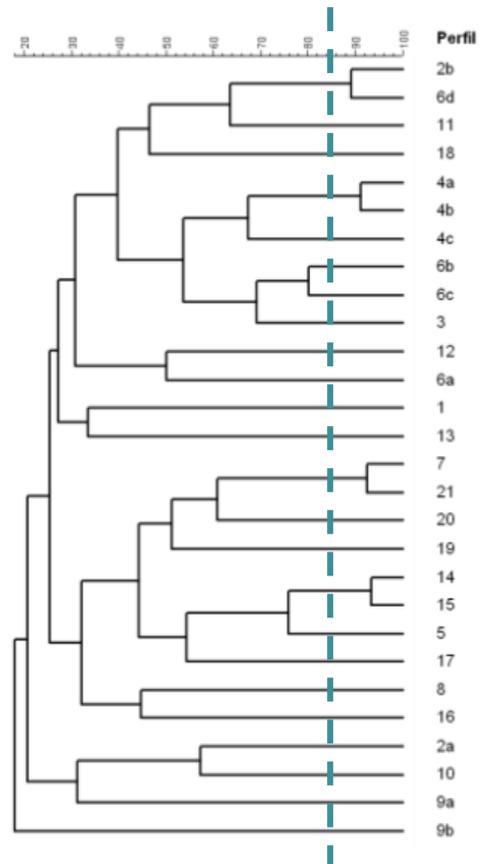


Figura 13. Dendograma generado mediante RAPD comparado con los perfiles de PFGE.

4.3.4. Multilocus sequence typing (MLST)

En la **Tabla 18** se muestran los resultados obtenidos mediante MLST estudiando 52 cepas representativas de todos los perfiles observados en la PFGE.

Tabla 18. Resultados MLST en cepas representativas de todos los perfiles de PFGE.

	Perfil PFGE	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	ST
437	1	3	3	1	1	1	1	31	437
125H	1	3	3	1	1	1	1	31	437
1055	1	3	3	1	1	1	1	31	437
2214	1	3	3	1	1	1	1	31	437
843	1	3	3	1	1	1	1	31	437
136	2a	3	3	1	1	1	1	4	11
183	2a	3	3	1	1	1	1	4	11
2044	2a	3	3	1	1	1	1	4	11
391	2b	3	3	1	1	1	1	4	11
1413	2b	3	3	1	1	1	1	4	11
234	3	2	1	62	3	10	4	110	405
844	3	2	1	62	3	10	4	110	405
1874	3	2	1	62	3	10	4	110	405
614	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
660	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
1242	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
1249	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
1590	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
1746	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
1779	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
1784	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
2179	4a	3	3	1	1	1	1	4	11
1230	4b	3	3	1	1	1	1	4	11
2443	4b	3	3	1	1	1	1	4	11
763	4c	3	3	1	1	1	1	4	11
746	5	1	1	1	1	1	1	1	15
1845	6a	3	3	1	1	1	1	4	11
979	6b	3	3	1	1	1	1	4	11
1526	6b	3	3	1	1	1	1	4	11
1619	6b	3	3	1	1	1	1	4	11
1870	6b	3	3	1	1	1	1	4	11
1210	6c	3	3	1	1	1	1	4	11
1163	6d	3	3	1	1	1	1	4	11
1079	7	4	1	2	52	1	1	7	307
1261	8	2	3	5	1	12	4	9	33
1565	9a	3	4	6	1	7	4	38	147
1658	9a	3	4	6	1	7	4	38	147
1713	9a	3	4	6	1	7	4	38	147
1879	9a	3	4	6	1	7	4	38	147
1614	9b	3	4	6	1	7	4	38	147
1636	10	7	1	5	46	1	1	84	281
1684	11	2	1	2	4	9	1	14	39
2097	12	2	1	2	1	10	1	120	449
2037	13	4	1	2	52	1	1	7	307
2049	14	2	60	210	1	1	1	402	2850
2029	15	4	1	2	52	1	1	7	307
2082	16	18	22	55	22	269	13	194	2721
2452	17	60	24	21	27	47	17	67	2722
2503	18	1	1	1	1	1	1	1	15
2567	19	2	1	2	1	1	7	13	403
2612	20	3	4	6	1	7	4	38	147
642	21	3	1	1	68	4	1	39	471

En los resultados observados en el estudio mediante MLST, cabe destacar que se detectaron dos nuevas combinaciones de alelos, correspondientes a los perfiles 2082 y 2452 y denominadas ST2721 y ST2722, así como dos nuevos alelos de los genes *mdh* y *tonB* en la cepa representativa del perfil 14. Estos dos nuevos alelos corresponden a variantes de los alelos *mdh70* (T⁹ → A⁹) y *tonB4* (C²⁰⁵ → T²⁰⁵). La combinación de alelos descrita en esta cepa corresponde al nuevo ST2850. Estas nuevas combinaciones y variantes alélicas fueron remitidas y comprobadas por el Instituto Pasteur (klebsiellaMLST@pasteur.fr) y ya se encuentran alojadas en su base de datos.

Sin lugar a dudas, cabe destacar la presencia de clones de alto riesgo entre los circulantes en la Unidad de Cuidados Intensivos. El ST11 se ha detectado en 3 perfiles (38 pacientes), el ST147 en dos perfiles de PFGE (13 pacientes) y el ST15 también en dos perfiles (3 pacientes). El perfil 1, que corresponde a casi la mitad de los pacientes, pertenece al ST437, *single locus variant* del ST258 (cambio en alelo de *tonB*: 79 por 31).

4.4. Caracterización molecular de la resistencia a β -lactámicos

4.4.1. PCR multiplex BLEE

Esta técnica se realizó sobre 59 cepas representativas de los 21 perfiles de PFGE, en la **Tabla 19** se describen los resultados obtenidos por perfiles.

Tabla 19. Resultados obtenidos mediante PCR multiplex de BLEE por perfiles de PFGE.

Perfil	Nº aislados estudiados	Resultado
1	4	SHV
2a	4	SHV
2b	1	SHV
3	3	SHV + CTX-M grupo 1
4a	11	SHV + CTX-M grupo 1
4b	2	SHV + CTX-M grupo 1
4c	1	SHV + CTX-M grupo 1
5	1	SHV
6a	1	SHV + CTX-M grupo 1
6b	4	SHV + CTX-M grupo 1
6c	1	SHV + CTX-M grupo 1
6d	2	SHV + CTX-M grupo 1
7	1	SHV + CTX-M grupo 1
8	1	SHV + CTX-M grupo 1
9a	6	SHV + CTX-M grupo 9
9b	1	SHV + CTX-M grupo 9
10	1	SHV + CTX-M grupo 1
11	1	SHV + CTX-M grupo 1
12	1	SHV + CTX-M grupo 1
13	1	SHV + CTX-M grupo 1
14	1	SHV + CTX-M grupo 9
15	1	SHV + CTX-M grupo 1
16	1	SHV + CTX-M grupo 1
17	1	SHV
18	2	SHV
19	1	SHV + CTX-M grupo 1
20	2	SHV + CTX-M grupo 9
21	1	SHV + CTX-M grupo 1

Los resultados obtenidos muestran un predominio de BLEE tipo CTX-M grupo 1, detectándose en 13 perfiles de PFGE, en tres perfiles se detectó la presencia de BLEE de tipo CTX-M grupo 9 y en 5 únicamente se producía amplificación del gen de SHV. Como ya se ha comentado con anterioridad, *K. pneumoniae* presenta una β -lactamasa tipo SHV cromosómica por lo que es necesario realizar la secuenciación de este gen para determinar si además ha adquirido otra β -lactamasa tipo SHV con actividad BLEE.

4.4.2. PCR y secuenciación BLEE tipo CTX-M grupo 1

La PCR y secuenciación de BLEE tipo CTX-M grupo 1 se realizó en 33 cepas representativas de los 13 perfiles (con sus subperfiles correspondientes) en los que se había detectado este gen en la PCR multiplex. En aquellos casos en los que la secuenciación utilizando los oligonucleótidos iniciadores descritos por Pagani *et al.* (133), indicaban la presencia de una variante de CTX-M-3 se complementaron los resultados con la secuenciación utilizando uno de los oligonucleótidos descrito por Carattoli *et al.* (134). Los resultados se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Resultados PCR y secuenciación CTX-M grupo 1 por perfiles de PFGE.

Perfil PFGE	Nº cepas estudiadas	Resultado
3	1	CTX-M-15
4a	9	CTX-M-1
4b	2	CTX-M-1
6a	1	CTX-M-3
6b	4	CTX-M-3
6c	1	CTX-M-3
6d	2	CTX-M-3
7	1	CTX-M-15
8	1	CTX-M-15
10	1	CTX-M-15
11	1	CTX-M-15
12	1	CTX-M-3
13	1	CTX-M-15
15	1	CTX-M-15
16	1	CTX-M-15
19	1	CTX-M-15
21	1	CTX-M-15

4.4.3. PCR y secuenciación BLEE tipo CTX-M grupo 9

La PCR y secuenciación de BLEE tipo CTX-M grupo 9 se realizó en 8 cepas representativas de los 3 perfiles detectados mediante PFGE, en la **Tabla 21** se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 21. Resultados PCR y secuenciación CTX-M grupo 9 por perfiles de PFGE.

Perfil PFGE	Nº cepas estudiadas	Resultado
9a	4	CTX-M-9
9b	1	CTX-M-9
14	1	CTX-M-14
20	2	CTX-M-9

4.4.4. PCR y secuenciación β -lactamasa tipo SHV

La PCR y secuenciación de β -lactamasa tipo SHV se realizó en 18 cepas representativas de los 8 perfiles que había dado como resultado SHV o SHV + CTX-M grupo 9 en la PCR multiplex de BLEE. En la **Tabla 22** se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 22. Resultados de secuenciación del gen SHV por perfiles de PFGE.

Perfil PFGE	Resultado PCR multiplex BLEE	Nº cepas estudiadas	Resultado	Clasificación Bush Jacoby
1	SHV	6	SHV-12	2be
2a	SHV	3	SHV-12	2be
2b	SHV	3	SHV-11	2b
5	SHV	1	SHV-2	2be
9a	SHV + CTX-M grupo 9	1	SHV-12	2be
9b	SHV + CTX-M grupo 9	1	SHV-11	2b
14	SHV + CTX-M grupo 9	1	SHV-56	2br
17	SHV	1	SHV-7	2be
18	SHV	1	SHV-2	2be

Como puede observarse 3 perfiles o subperfiles presentaban SHV no clasificadas como BLEE según la clasificación de Bush-Jacoby: 2b, 9b y 14. Tanto en el 9b como en el 14 se había detectado una β -lactamasa de espectro extendido del grupo 9 de CTX-M, pero en el subperfil 2b se requería un estudio más amplio para determinar que enzima o grupo de enzimas estaba implicado en el fenotipo BLEE observado en el antibiograma (**Figura 14**).



Figura 14. Antibiograma de aislados incluidos en perfil de PFGE 2b.

4.4.5. PCR y secuenciación de β -lactamasas de tipo TEM

En la búsqueda del mecanismo de resistencia que afectaba a los aislados pertenecientes al subperfil 2b se decidió realizar la PCR y secuenciación de β -lactamasas de tipo TEM, ya que algunas de ellas tienen fenotipo BLEE, en 34 cepas representativas de todos los perfiles y subperfiles de PFGE. Las 14 cepas con resultado positivo en la PCR fueron posteriormente secuenciadas utilizando los mismos oligonucleótidos. En la **Tabla 23** se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 23. Resultados de la PCR y secuenciación de TEM.

Perfil PFGE	Resultado obtenidos hasta el momento	Nº cepas estudiadas	Resultado	Secuenciación
1	SHV-12	1	Negativo	-
2a	SHV-12	2	Negativo	-
2b	SHV-11 (No BLEE)	3	Negativo	-
3	CTX-M-15	3	Positivo	TEM-1
4a	CTX-M-1	1	Negativo	-
4b	CTX-M-1	1	Negativo	-
4c	CTX-M-1	1	Negativo	-
5	SHV-2	1	Positivo	TEM-1
6a	CTX-M-3	1	Negativo	-
6b	CTX-M-3	1	Negativo	-
6c	CTX-M-3	1	Negativo	-
6d	CTX-M-3	1	Negativo	-
7	CTX-M-15	1	Positivo	TEM-1
8	CTX-M-15	1	Positivo	TEM-1
9a	CTX-M-9 + SHV-12	1	Negativo	-
9b	CTX-M-9 + SHV-11	1	Negativo	-
10	CTX-M-15	1	Positivo	TEM-1
11	CTX-M-15	1	Positivo	TEM-1
12	CTX-M-3	1	Negativo	-
13	CTX-M-15	1	Positivo	TEM-1
14	CTX-M-14 + SHV-56	1	Negativo	TEM-1
15	CTX-M-15	1	Positivo	TEM-1
16	CTX-M-15	1	Positivo	TEM-1
17	SHV-7	1	Negativo	-
18	SHV-2	1	Negativo	-
19	CTX-M-15	1	Positivo	TEM-1
20	CTX-M-9	1	Negativo	-
21	CTX-M-15	2	Positivo	TEM-1

La β -lactamasa de tipo TEM detectada, TEM-1, se clasifica dentro del grupo 2b de Bush y Jacoby y carece de actividad BLEE, pudiendo producir resistencia a ampicilina y cefalosporinas de primera generación.

4.4.6. PCR de otras β -lactamasas de espectro extendido

Se realizó la PCR de β -lactamasas de tipo CTX-M de los grupos 2, 8 y 25 en 2 cepas representativas del perfil 2b obteniendo resultados negativos en todos los casos. El estudio utilizando oligonucleótidos degenerados de CTX-M para detectar cualquier tipo de β -lactamasa de este grupo en dos cepas clasificadas en 2b también obtuvo resultados negativos.

Posteriormente se realizó la PCR de las β -lactamasas de espectro extendido descritas habitualmente en *Pseudomonas aeruginosa* derivadas de OXA-2, OXA-10 y PER en 2 cepas representativas de 2b y presentaron resultados negativos. La PCR de las β -lactamasas muy poco frecuentes GES y SFO también dio resultados negativos. Con los resultados obtenidos no se logró caracterizar la BLEE presente en este grupo de aislados.

4.4.7. PCR y secuenciación de OXA-1

En una gran parte de los aislados se observaba disminución de la sensibilidad a amoxicilina/clavulánico y piperacilina/tazobactam por lo que se estudió la presencia de OXA-1 o sus derivadas mediante PCR y secuenciación. La PCR de OXA-1 se realizó en 78 cepas representativas de los 21 perfiles (52,3% de las cepas del estudio), obteniendo resultados positivos en 40 cepas representativas de 10 perfiles. La secuenciación de OXA-1 se realizó en al menos una cepa de cada perfil. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24. Resultados de la PCR y secuenciación de OXA-1.

Perfil PFGE	Resultado obtenidos hasta el momento	Nº cepas estudiadas	Resultado	Nº cepas secuenciadas	Secuenciación
1	SHV-12	5	Positivo	5	OXA-1
2a	SHV-12	10	Positivo	2	OXA-1
2b	SHV-11 (No BLEE)	3	Positivo	3	OXA-1
3	CTX-M-15 + TEM-1	3	Positivo	3	OXA-1
4a	CTX-M-1	17	Negativo	-	-
4b	CTX-M-1	3	Positivo	2	OXA-1
4c	CTX-M-1	1	Positivo	1	OXA-1
5	SHV-2 + TEM-1	5	Negativo	-	-
6a	CTX-M-3	1	Negativo	-	-
6b	CTX-M-3	6	Positivo	1	OXA-1
6c	CTX-M-3	1	Negativo	-	-
6d	CTX-M-3	2	Positivo	0	-
7	CTX-M-15 + TEM-1	1	Negativo	-	-
8	CTX-M-15 + TEM-1	1	Negativo	-	-
9a	CTX-M-9 + SHV-12	5	Negativo	-	-
9b	CTX-M-9 + SHV-11	1	Negativo	-	-
10	CTX-M-15 + TEM-1	1	Positivo	1	OXA-1
11	CTX-M-15 + TEM-1	1	Positivo	1	OXA-1
12	CTX-M-3	1	Positivo	2	OXA-1
13	CTX-M-15 + TEM-1	1	Positivo	1	OXA-1
14	CTX-M-14 + SHV-56 + TEM-1	1	Negativo	-	-

Tabla 24. Resultados de la PCR y secuenciación de OXA-1 (continuación).

Perfil PFGE	Resultado obtenidos hasta el momento	Nº cepas estudiadas	Resultado	Nº cepas secuenciadas	Secuenciación
15	CTX-M-15 + TEM-1	1	Negativo	-	-
16	CTX-M-15 + TEM-1	1	Negativo	-	-
17	SHV-7	1	Negativo	-	-
18	SHV-2	1	Negativo	-	-
19	CTX-M-15 + TEM-1	1	Positivo	1	OXA-1
20	CTX-M-9	1	Negativo	-	-
21	CTX-M-15-TEM-1	2	Positivo	1	OXA-1

4.4.8. PCR β -lactamasas tipo AmpC

En la revisión de antibiogramas se observó resistencia a cefoxitina y amoxicilina/clavulánico en 13 cepas pertenecientes a los perfiles 1 y 6, por lo que se consideró que debía estudiarse la presencia de β -lactamasas tipo AmpC mediante PCR. En la **Figura 15** pueden observarse los antibiogramas de estas cepas.

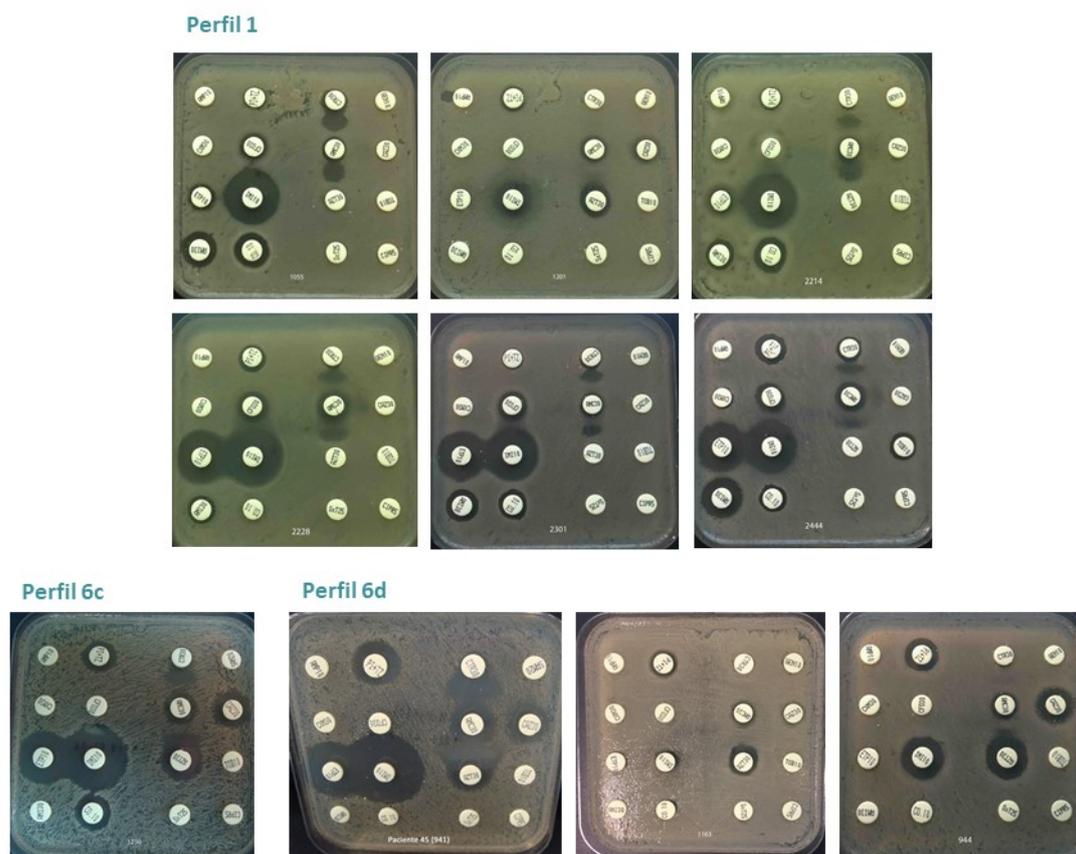


Figura 15. Antibiogramas de los aislados estudiados para descartar la presencia de β -lactamasas tipo AmpC.

Todos los aislados pertenecientes al clon 1 presentaron resultados negativos en esta prueba, pero los aislados estudiados pertenecientes al clon 6 presentaban una β -lactamasa AmpC tipo DHA. Por este motivo se decidió realizar la prueba al resto de aislados englobados en este perfil pero en otros subperfiles (6a y 6b) aunque fenotípicamente no parecieran presentar esta β -lactamasa. Los resultados de esta nueva prueba en las cepas restantes presentaron resultados negativos. En la **Figura 16** pueden observarse los antibiogramas de algunas de estas cepas.



Figura 16. Antibiograma de alguna de las cepas del perfil 6 no productoras de β -lactamasas tipo DHA.

4.4.9. PCR de carbapenemasas

En los estudios fenotípicos se observó la presencia de metalo- β -lactamasas en dos cepas que tras los estudios de tipificación molecular quedaron englobadas en el perfil 20 (ST147) y presentaban una β -lactamasa de tipo CTX-M-9. El estudio mediante PCR multiplex de carbapenemasas demostró que se trataba de una metalo- β -lactamasa tipo VIM. La presencia de carbapenemasas en enterobacterias en la UCI en el momento de aparición de estos casos constituía una situación excepcional, pudiendo considerar que estos dos casos son de los primeros productores de carbapenemasa detectados en este servicio. En la **Figura 17** se muestra el antibiograma de estos aislados.



Figura 17. Cepas productoras de carbapenemasa tipo VIM y CTX-M-9 pertenecientes al perfil 20 y ST147.

El primer caso detectado era un paciente varón de 36 años trasladado procedente de la unidad de cuidados intensivos de otro hospital por requerimiento de oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO). La procedencia de otra UCI, una estancia en ese hospital de más de 5 días y haber recibido antibioterapia previa eran los factores de riesgo para microorganismos multirresistentes que presentaba este paciente. El segundo caso se detectó una semana más tarde en el mismo *box*, mientras el primer paciente permanecía ingresado.

4.5. Resistencia a colistina mediada por genes *mcr*

La resistencia a colistina mediada por genes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* y *mcr-5* fue estudiada en las 149 cepas que componen este estudio obteniendo resultados negativos en todos los casos. Podemos pensar que los casos en los que observamos una desaparición del halo de inhibición (**Figura 18**), se deben a mecanismos no transmisibles que pueden estar asociados al consumo de este antibiótico, ya fuera como antibiótico pautado para el tratamiento del paciente o como uno de los componentes de la solución de descontaminación digestiva selectiva. Esta situación se daba en 5 de los 7 pacientes (10 aislados) en los que se detectó esta desaparición del halo de inhibición de colistina.

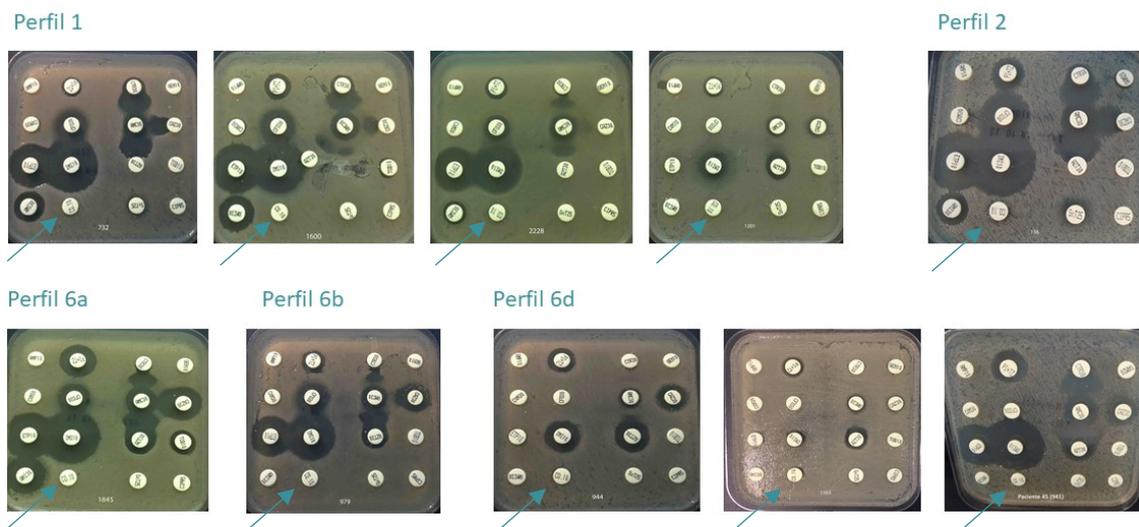


Figura 18. Antibiogramas de las cepas con desaparición del halo de inhibición a colistina.

4.6. Factores de virulencia asociados a la cápsula polisacáridica

La presencia de los subtipos capsulares K1, K2, K5, K20, K54 y K57, así como los genes *rmpA* y *wcaG*, reconocidos como factores de virulencia asociados a la cápsula de *K. pneumoniae* fueron estudiados mediante PCR multiplex (146). De los 57 aislados estudiados, representativos de todos los perfiles y subperfiles hallados en la PFGE, únicamente resultaron positivos cinco: los 3 del perfil 4b y el del perfil 7, ambos positivos para el subtipo capsular K1, y el aislado del perfil 11, positivo para el subtipo capsular K2 (Tabla 25). Ninguno de los pacientes desarrolló un proceso infeccioso causado por este microorganismo durante su estancia en la unidad de medicina intensiva.

Tabla 25. Resultados estudio de factores de virulencia asociados a la cápsula mediante PCR.

Perfil	Nº aislados estudiados/Nº aislados perfil PFGE	Resultado
1	8/64	Negativo
2a	4/10	Negativo
2b	2/3	Negativo
3	3/3	Negativo
4a	7/17	Negativo
4b	3/3	K1
4c	1/1	Negativo
5	1/1	Negativo
6a	1/1	Negativo
6b	3/6	Negativo
6c	1/1	Negativo
6d	1/3	Negativo
7	1/1	K1
8	1/1	Negativo
9a	4/11	Negativo
9b	1/1	Negativo
10	1/1	Negativo
11	1/1	K2
12	1/1	Negativo
13	1/1	Negativo
14	1/1	Negativo
15	1/1	Negativo
16	1/1	Negativo
17	1/1	Negativo
18	1/2	Negativo
19	1/1	Negativo
20	1/2	Negativo
21	1/2	Negativo

4.7. Resumen de los resultados de la caracterización molecular

En la **Tabla 26** se presentan los resultados de todo el estudio de caracterización molecular realizado sobre los 149 aislados de *K. pneumoniae* productora de BLEE de los 129 pacientes que estuvieron ingresados en la unidad de medicina intensiva en el periodo comprendido entre octubre de 2011 y junio de 2014 inclusive.

Tabla 26. Resumen de los resultados de la caracterización molecular de la resistencia y factores de virulencia asociados a la cápsula.

Perfil PFGE	Caracterización resistencia β -lactámicos	Virulencia	MLST	N aislados	N pacientes
1	SHV-12 + OXA-1	-	ST437	71	64
2a	SHV-12 + OXA-1	-	ST11	10	10
2b	OXA-1	-	ST11	3	3
3	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	-	ST405	3	3
4a	CTX-M-1	-	ST11	17	17
4b	CTX-M-1 + OXA-1	K1	ST11	3	3
4c	CTX-M-1 + OXA-1	-	ST11	1	1
5	SHV-2 + TEM-1	-	ST15	1	1
6a	CTX-M-3	-	ST11	1	1
6b	CTX-M-3 + OXA-1	-	ST11	6	5
6c	CTX-M-3 + DHA	-	ST11	1	1
6d	CTX-M-3 + OXA-1 + DHA	-	ST11	3	2
7	CTX-M-15 + TEM-1	K1	ST307	1	1
8	CTX-M-15 + TEM-1	-	ST33	1	1
9a	CTX-M-9 + SHV-12	-	ST147	11	10
9b	CTX-M-9	-	ST147	1	1
10	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	-	ST281	1	1
11	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	K2	ST39	1	1
12	CTX-M-3 + OXA-1	-	ST449	1	1
13	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	-	ST307	1	1
14	CTX-M-14 + SHV-56 + TEM-1	-	ST2850	1	1
15	CTX-M-15 + TEM-1	-	ST307	1	1
16	CTX-M-15 + TEM-1	-	ST2721	1	1
17	SHV-7	-	ST2722	1	1
18	SHV-2	-	ST15	2	2
19	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	-	ST403	1	1
20	CTX-M-9 + VIM	-	ST147	2	2
21	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	-	ST471	2	1

4.8. Informe acumulado de sensibilidad

A continuación en la **Tabla 27** se muestra el informe acumulado de sensibilidad en función de los perfiles obtenidos en la PFGE.

Tabla 27. Informe acumulado de sensibilidad por perfiles de PFGE.

	Clon 1 – ST437 SHV-12 + OXA-1 n=71	Clon 2a – ST11 SHV-12 + OXA-1 n= 10	Clon 2b – ST11 OXA-1 n=3	Clon 3 – ST405 CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1 n=3
Ampicilina	0	0	0	0
Amoxicilina/Clavulánico	1,4	0	100	100
Piperacilina/Tazobactam	1,4	0	100	100
Cefoxitina	50,7	20	100	100
Cefuroxima	0	0	0	0
Ceftriaxona	0	0	0	0
Ceftazidima	0	0	0	0
Aztreonam	0	0	0	0
Ertapenem	95,8	100	100	100
Imipenem	98,6	100	100	100
Ciprofloxacino	0	0	0	100
Cotrimoxazol	0	0	0	0
Tobramicina	0	0	0	0
Amkacina	85,9	10	0	100
Gentamicina	0	0	-	0

	Clon 4a - ST11 CTX-M-1 n=17	Clon 4b – ST11 CTX-M-1 + OXA-1 Serotipo K1 n=3	Clon 4c – ST11 CTX-M-1 + OXA-1 n=1	Clon 6a – ST11 CTX-M-3 n= 1	Clon 6b – ST11 CTX-M-3 + OXA-1 n=6
Ampicilina	0	0	0	0	0
Amoxicilina/Clavulánico	58,8	0	0	0	0
Piperacilina/Tazobactam	58,8	0	0	0	0
Cefoxitina	70,6	66,7	100	100	66,7
Cefuroxima	0	0	0	0	0
Ceftriaxona	0	0	0	0	0
Ceftazidima	11,8	0	0	0	0
Aztreonam	11,8	0	0	0	0
Ertapenem	100	100	100	100	83,3
Imipenem	100	100	100	100	100
Ciprofloxacino	0	0	0	0	16,7
Cotrimoxazol	17,6	0	0	0	0
Tobramicina	100	0	0	0	0
Amkacina	100	33,3	0	100	0
Gentamicina	100	50	100	0	0

	Clon 6c - ST11 CTX-M-3 + DHA n=1	Clon 6d – ST11 CTX-M-3 + DHA + OXA-1 n=3	Clon 9a – ST147 CTX-M-9 + SHV-12 n=11	Clon 9b – ST147 CTX-M-9 n=1
Ampicilina	0	0	0	0
Amoxicilina/Clavulánico	0	0	100	100
Piperacilina/Tazobactam	0	0	100	100
Cefoxitina	0	0	100	100
Cefuroxima	0	0	0	0
Ceftriaxona	0	0	0	0
Ceftazidima	0	0	0	100
Aztreonam	0	0	0	100
Ertapenem	100	33,3	100	100
Imipenem	100	66,7	100	100
Ciprofloxacino	0	0	0	0
Cotrimoxazol	0	0	0	0
Tobramicina	0	0	0	0
Amkacina	0	0	63,6	100
Gentamicina	-	0	0	0

Tabla 27. Informe acumulado de sensibilidad por perfiles de PFGE (continuación).

	Clon 18 – ST15 SHV-2 n=2	Clon 20 – ST147 CTX-M-9 + VIM n=2	Clon 21 – ST471 CTX-M-15 + OXA-1+ TEM-1 n=2
Ampicilina	0	0	0
Amoxicilina/Clavulánico	0	0	50
Piperacilina/Tazobactam	0	0	50
Cefoxitina	100	0	50
Cefuroxima	0	0	0
Ceftriaxona	0	0	0
Ceftazidima	0	0	50
Aztreonam	0	0	50
Ertapenem	100	0	100
Imipenem	100	0	100
Ciprofloxacino	0	0	50
Cotrimoxazol	0	0	0
Tobramicina	100	0	0
Amikacina	0	0	100
Gentamicina	0	0	0

En la **Tabla 28** se muestra la sensibilidad de los perfiles de PFGE con un único aislado.

Tabla 28. Informe de sensibilidad de los perfiles de PFGE con un único aislado.

	5	7	8	10	11	12	13	14	15	16	17	19
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amoxicilina/Clavulánico	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
Piperacilina/Tazobactam	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S
Cefuroxima	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftriaxona	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidima	S	I	I	I	I	I	I	R	R	S	R	R
Aztreonam	S	I	I	I	I	I	I	R	R	S	R	R
Ertapenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacino	R	R	I	S	S	S	R	S	R	S	S	I
Cotrimoxazol	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R
Tobramicina	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Amikacina	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Gentamicina						R	R	S	R	R	R	R

4.9. Resultados secuenciación genómica completa

Durante el desarrollo de esta tesis se tuvo la oportunidad de realizar la secuenciación genómica completa de dos cepas, para ello se seleccionaron dos aislados pertenecientes al perfil 1 de PFGE que era el mayoritario entre los estudiados y estaba asociado al brote que se pretendía analizar en profundidad. Los aislados analizados se seleccionaron del principio y final del periodo de estudio (abril de 2012 y febrero de 2014). En la **Figura 19** se presenta el antibiograma de ambos aislados. El motivo por los que decidió realizar el estudio del segundo fue por la aparición de nuevas resistencias respecto al primer caso.

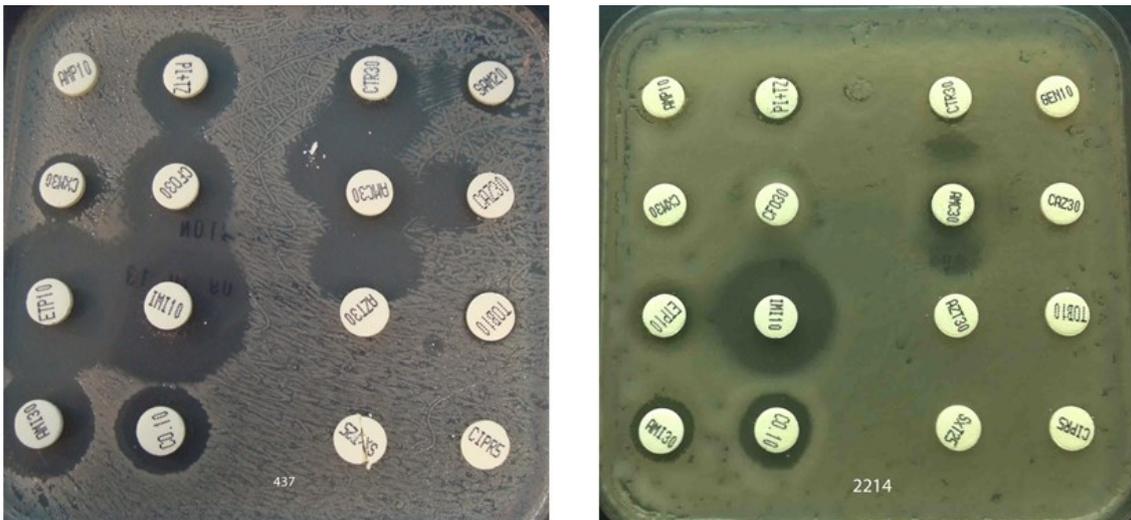


Figura 19. Antibiograma de los aislados de *K. pneumoniae* en los que se realizó secuenciación genómica.

La evaluación mediante QAST del ensamblaje realizado en el laboratorio externo se muestra en la **Tabla 29**.

Tabla 29. Evaluación QAST del ensamblaje.

	Aislado 1	Aislado 2
Número de contigs (≥ 0 pb)	166	115
Número de contigs (≥ 1.000 pb)	64	60
Contigs	73	68
Contig más largo	663.931	664.167
Longitud total	5.662.465	5.659.645
Longitud total (≥ 0 pb)	5.694.279	5.672.654
Longitud total (≥ 1.000 pb)	5.656.102	5.653.863
GC(%)	56,87	56,86
N50	329556	329556
N75	120023	155401
L50	7	7
L75	15	14

En primer lugar con los datos obtenidos se realizó un primer análisis del archivo fasta obtenido utilizando la base de datos del Instituto Pasteur, que contiene marcadores de resistencia y factores de virulencia asociados a este microorganismo. Los resultados se muestran en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Análisis del archivo fasta utilizando la base de datos del Instituto Pasteur.

	Aislado 1	Aislado 2
MLST	ST437	ST437
Resistencia a betalactámicos	SHV-11 OXA-1	OXA-1
Resistencia a aminoglucósidos	<i>aac(3)-IIa</i> <i>ant(3'')-Ia</i> <i>aph(3')-Ia-a1</i>	<i>aac(3)-IIa</i> <i>ant(3'')-Ia</i> <i>aph(3')-Ia-a1</i>
Genes relacionados con resistencia a quinolonas y aminoglucósidos	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
Genes relacionado con resistencia a quinolonas	<i>gyrA9</i> <i>parc10</i> <i>qnrS1</i>	<i>gyrA9</i> <i>parc10</i> <i>qnrS1</i>
Factores de virulencia	wzi109-K36 genes <i>mrk (A-J)</i> <i>marA1, marR10</i>	wzi109-K36 genes <i>mrk (A-J)</i> <i>marA1, marR10</i>
Bombas de eflujo	<i>acrA23, acrB27, acrR2</i> <i>rob3</i> <i>envR3, fis1</i> <i>sdiA6</i> <i>soxR2, soxS2</i> <i>rarA14</i> <i>oqxB26</i>	<i>acrA23, acrB27, acrR2</i> <i>rob3</i> <i>envR3, fis1</i> <i>sdiA6</i> <i>soxR2, soxS2</i> <i>rarA14</i> <i>oqxA24, oqxB26</i>
Otros genes de resistencia antibiótica	<i>fosA1</i>	
Resistencia a metales pesados	<i>terB13, terE4, terW4</i>	<i>terB13, terE4, terW4</i>

Sin lugar a dudas, lo primero que llama la atención de estos resultados es la no detección de la β -lactamasa de espectro extendido SHV-12, que había sido detectada previamente por secuenciación de Sanger, en ninguna de las dos cepas. Podemos observar que además en la primera de las cepas se detecta una β -lactamasa tipo SHV-11, pero no así en el segundo aislado.

En estos aislados como podemos observar la resistencia a aminoglucósidos está mediada por hasta 4 enzimas modificadoras, y aunque alguna de ellas en principio podría afectar a amikacina, en nuestros aislados la sensibilidad a este antibiótico se mantenía.

La resistencia a quinolonas esta mediada en estos aislados por hasta 3 mecanismos diferentes: a) modificación de la diana b) modificación del antimicrobiano y c) protección de la diana. GyrA presenta 3 mutaciones en su secuencia, destacando S83I. ParC presenta 3 mutaciones, siendo la más importante S80I asociada a un alto nivel de resistencia a estos antibióticos. Además presenta dos mecanismos de resistencia mediados por plásmidos: la

enzima aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6′)-Ib-cr y la proteína QnrS1 que protege a la diana para evitar la unión del antibiótico. En la cepa 1 encontramos el gen *fosA1* que codifica a la proteína FosA implicada en la resistencia a fosfomicina por conjugación de ésta con glutation, pero no se encuentra presente en la cepa 2.

Además observamos que los dos aislados presentan la agrupación de genes *mrk* que codifican la producción de fimbrias de tipo 3, que como ya se ha comentado anteriormente aumentan la virulencia de este microorganismo por facilitar la formación de biopelículas. El tipo capsular detectado, K36, no se encuentra asociado a hipervirulencia.

A pesar de la detección de múltiples genes que codifican bombas de eflujo en este microorganismo, desconocemos el nivel de expresión de estos, por lo que pensamos que el mayor nivel de resistencia encontrado en el segundo aislado podría deberse a esa hiperexpresión en ausencia de la detección de otros mecanismos de resistencia transmisibles detectados. En el primer aislado no se ha detectado el gen *oqxA* pero probablemente se deba a que se encuentre dividido en 2 contigs.

Dada la no detección de SHV-12 a través del análisis realizado con la base de datos del instituto Pasteur, se decidió estudiar ambos aislados utilizando las herramientas online disponibles en la página web del Center of Genomic Epidemiology: ResFinder, KmerResistance y PlasmidFinder. Se decidió utilizar los archivos fasta (datos de ensamblaje) y fastq (lecturas depuradas) apareados cuando era posible para comparar los resultados obtenidos.

En la **Tabla 31** se muestran los resultados de ResFinder utilizando ambos archivos en los dos aislados. Como podemos observar los resultados obtenidos a través de ResFinder partiendo de un ensamblaje o partiendo de *raw data* apareados son similares, salvo por una clara diferencia, a partir de *raw data* en el aislado 2 es posible detectar la β -lactamasa de espectro extendido SHV-12, mientras que se identifica como SHV-13 (también β -lactamasa de espectro extendido) a partir del archivo fasta. Los resultados en cuanto a la resistencia a aminoglucósidos también son similares (puesto que *aadA2* y *ant(3'')-Ia* son sinónimos) salvo por la variación en la subclasificación de *aac(3)-IIa* (Pasteur), y *aac(3)-IId* en ResFinder, aunque en ResFinder nos indican que el porcentaje de concordancia de la secuencia con este gen es de 99,88%. Esta herramienta proporciona más información relativa a genes de resistencia adquiridos respecto a la base de datos del instituto Pasteur, pero no analiza las resistencias debidas a inserciones, mutaciones o deleciones.

Tabla 31. Resultados ResFinder.

	1 - fasta	1 - fastq	2-fasta	2-fastq
R β-lactámicos	OXA-1 (100%) SHV-182 (99,88%)	OXA-1 (100%) SHV-182 (99,88%)	OXA-1 (100%) SHV-13 (100%)	OXA-1 (100%) SHV-12 (100%) SHV-182 (99,88%)
R AG	<i>aadA2</i> (100%) <i>aph(3')-Ia</i> (100%) <i>aac(3)-IId</i> (99,88%)			
R AG y FQ	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (100%)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (100%)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (100%)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> (100%)
R quinolonas	<i>qnrS1</i> (100%)	<i>qnrS1</i> (100%)	<i>qnrS1</i> (100%)	<i>qnrS1</i> (100%)
R fosfomicina	<i>fosA</i> (99,27%)	<i>fosA</i> (99,27%)	<i>fosA</i> (99,27%)	<i>fosA</i> (99,27%)
R tetraciclinas	<i>tet(A)</i> (100%)	<i>tet(A)</i> (99,27%)	-	-
R sulfamidas	<i>sul1</i> (100%)	<i>sul1</i> (100%)	<i>sul1</i> (100%)	<i>sul1</i> (100%)
R rifampicina	<i>arr-3</i> (100%)	<i>arr-3</i> (100%)	<i>arr-3</i> (100%)	<i>arr-3</i> (100%)
R trimetoprim	<i>drfA12</i> (100%)	<i>drfA12</i> (100%)	<i>drfA12</i> (100%)	<i>drfA12</i> (100%)
R cloranfenicol	<i>catB3</i> (100%)	<i>catB3</i> (100%)	<i>catB3</i> (100%)	<i>catB3</i> (100%)
R macrólidos	<i>mphA</i> (100%)	-	<i>mphA</i> (100%)	<i>mphA</i> (100%)
Bombas eflujo	<i>oqxA, oqxB</i> (100%)	<i>oqxA, oqxB</i> (100%)	<i>oqxA, oqxB</i> (100%)	<i>oqxA, oqxB</i> (100%)

R: Resistencia; AG: aminoglucósidos; FQ: fluoroquinolonas

Utilizando otra estrategia de análisis diferente, KmerResistance, un mapeo que examina la co-ocurrencia de *k*-mers (fragmentos de la secuencia de ADN de longitud *k*) entre los datos de las lecturas de Illumina (lecturas depuradas apareadas y desapareadas - fastq) y la base de datos de genes de resistencia antibiótica, obtuvimos resultados distintos que se muestran en la **Tabla 32**, además en la misma tabla presentamos los resultados obtenidos comparándolos con los que se producen si se utiliza la misma estrategia de análisis a partir del ensamblaje realizado en el laboratorio externo (archivo fasta).

Tabla 32. Resultados análisis mediante KmerResistance

	1- fastq	1 - fasta	2-fastq	2-fasta
Resistencia β-lactámicos	OXA-1 SHV-11 SHV-12	OXA-1 SHV-182	OXA-1 SHV-12	OXA-1 SHV-12 SHV-182
Resistencia minoglucósidos	<i>aadA2</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>aac(3)-IId</i>	<i>aadA2</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>aac(3)-IId</i>	<i>aadA2</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>aac(3)-IId</i>	<i>aadA2</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>aac(3)-IId</i>
Resistencia aminoglucósidos y fluoroquinolonas	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
Resistencia quinolonas	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>	<i>qnrS1</i>
Resistencia fosfomicina	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>
Resistencia tetraciclinas	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	-	-
Resistencia sulfamidas	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>
Resistencia rifampicina	<i>arr-3</i>	<i>arr-3</i>	<i>arr-3</i>	<i>arr-3</i>
Resistencia trimetoprim	<i>drfA12</i>	<i>drfA12</i>	<i>drfA12</i>	<i>drfA12</i>
Resistencia cloranfenicol	<i>catB3</i>	<i>catB3</i>	<i>catB3</i>	<i>catB3</i>
Resistencia macrólidos	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>
Bombas eflujo	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>oqxA, oqxB</i>

Como podemos observar utilizando KmerResistance a partir de los datos fastq se detecta en ambas cepas la β -lactamasa de espectro extendido SHV-12, que no fue detectada utilizando la base de datos del Instituto Pasteur y sólo en una de las cepas utilizando ResFinder a partir del archivo fastq, por lo que podemos pensar que la secuencia de esta β -lactamasa se encuentra dividida entre 2 contigs obtenidos en el ensamblaje realizado en el laboratorio externo.

Center for Genomic Epidemiology dispone de otra herramienta que ayuda a la detección de plásmidos presentes en los aislados: PlasmidFinder, que realiza una búsqueda en una base de datos que contiene los replicones de 559 plásmidos encontrados en *Enterobacteriaceae* (excluyendo aquellas especies detectadas como endosimbiontes de insectos o nematodos, patógenos de plantas o peces, o que se encuentran en el suelo o la rizosfera). En la **Tabla 33** se presentan los resultados obtenidos al aplicarlo sobre los archivos fasta de nuestros aislados.

Tabla 33. Resultados del análisis mediante PlasmidFinder.

1	2
IncFII(K) (100%)	IncFII(K) (100%)
IncR (100%)	IncR (100%)
IncFIB(Mar) (99,84%)	IncFIB(Mar) (99,84%)
IncHI1B (99,82%)	IncHI1B (99,82%)
IncI1 (99,3%)	IncI1 (99,3%)
IncFIB(K) 99,11%	IncFIB(K) 99,11%

Con las herramientas de las que disponemos hemos llegado a establecer la relación de estos plásmidos con resistencia a metales pesados, encontrando asociación entre IncFII(K) y el *locus* Ars, asociado a la resistencia a arsénico o IncHI1B, asociado a la resistencia a telurito.

4.10. Medidas de control

4.10.1. Muestreo ambiental

A finales de agosto de 2012, ante el incremento observado en el número de casos de colonización/infección por *K. pneumoniae* productora de BLEE en UCI, se procedió a realizar un muestreo ambiental aleatorio mediante la técnica de la gasa estéril, obteniendo como resultados el aislamiento único de una cepa de *K. pneumoniae* productora de BLEE en el entorno de uno de los pacientes colonizados en ese momento en el *box* nº 2 y en la zona sucia de ese mismo *box* (**Tabla 34**). Lamentablemente, no fue posible recuperar las cepas para realizar los estudios de epidemiología molecular, aunque fenotípicamente estos aislados parecían compatibles con el perfil 1 de *Klebsiella pneumoniae* (*Kpn1*).

Tabla 34. Resultados del muestreo ambiental (agosto de 2012).

Localización (Box 1)	Resultado	Localización (Box 2)	Resultado
Entorno paciente colonizado	Negativo	Entorno paciente colonizado	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE
Entorno paciente colonizado	Negativo	Entorno paciente colonizado	Negativo
Entorno paciente no colonizado	Negativo	Entorno paciente no colonizado	Negativo
Entorno paciente no colonizado	Negativo	Pila	Negativo
Nutrición enteral	Negativo	Mesa control enfermería	Negativo
Pila	Negativo	Zona sucia (pila)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE
Mesa control enfermería	Negativo	Dispensador antiséptico	Negativo
Zona sucia (pila)	Negativo	Dispensador antiséptico	Negativo
Dispensador antiséptico	Negativo	Pulsador interno puerta 3	Negativo
Pulsador interno puerta 1	Negativo	Pulsador externo puerta 3	Negativo
Pulsador externo puerta 1	Negativo	Pulsador interno puerta 4	Negativo
Pulsador interno puerta 2	Negativo	Pulsador externo puerta 4	Negativo
Pulsador externo puerta 2	Negativo	Puerta almacén	Negativo
Otras localizaciones			
Gasómetro	Negativo	Carro limpieza	Negativo
Ecocardiógrafo	Negativo	Carro limpieza	Negativo

4.10.2. Estudio de portadores

Se realizaron cultivos dirigidos al estudio de portadores en el personal sanitario, detectando entre los 9 sujetos estudiados, un único portador de *K. pneumoniae* BLEE, que se encontraba atendiendo a un paciente colonizado en el momento de la toma. En la **Tabla 35** se presentan los resultados de este muestreo.

Tabla 35. Resultados del estudio de portadores.

Personal	Resultado	Personal	Resultado
Celador	Negativo	Enfermera paciente colonizado Box 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE
Microbiólogo	Negativo	Aux. enfermería paciente colonizado Box 2	Negativo
Aux. enfermería de paciente colonizado (Box 1)	Negativo	Jefe de servicio	Negativo
Técnico radiología	Negativo	Enfermero	Negativo
Médico adjunto	Negativo		

4.10.3. Otras medidas

Tras el establecimiento de medidas de control de brote (limpieza exhaustiva de la Unidad, administración de DDS a los pacientes colonizados, sesiones formativas impartidas y seguimiento estricto de las precauciones de contacto), se observó una disminución en la incidencia mensual de infecciones (ningún caso desde noviembre de 2012 a febrero de 2013) y un progresivo descenso en el número de colonizaciones detectadas hasta llegar a desaparecer en abril de 2013. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, en julio se detectó un nuevo

caso aislado y a partir de septiembre de 2013 se dió de nuevo un nuevo brote por esta cepa. Debe tenerse en cuenta que además de este clon circulante, en UCI en ese momento se estaban detectando más pacientes colonizados/infectados por *K. pneumoniae* BLEE de otros perfiles y era difícil saber por técnicas fenotípicas cual era la epidemiología real, sin disponer en esos momentos de técnicas genotípicas que permitieran aclarar la situación.

Una de las consecuencias que se observaron de las medidas aplicadas, fue la aparición de resistencia a colistina en algunos aislados, que en parte atribuimos a la administración de solución de descontaminación digestiva selectiva que contiene este fármaco.

4.11. Descripción de los pacientes afectados por el perfil 1

La mediana de edad de los pacientes colonizados/infectados por este microorganismo era de 57 años [rango intercuartílico (RI) 22] y el 65,6% eran hombres. La mediana de estancia en UCI fue de 17 días (RI 21) y como indicadores de gravedad se utilizaron las escala APACHE II, cuyo valor medio era de 21,02 [desviación estándar (DS) 7,99], la escala SAPS3 cuyo valor medio era de 66,22 (DS 13,53) y la escala SOFA, cuyo valor medio al ingreso en UCI era de 6,25 (DS 3,64), esta escala se realizó también en la fecha de diagnóstico de la colonización con un valor medio de 5,81 (DS 4,125), por lo que como se puede observar al diagnóstico de la colonización la situación clínica de los pacientes había mejorado ligeramente.

En la **Figura 20** se presenta la descripción de la procedencia de los pacientes que fueron colonizados o infectados por el perfil 1 de *Klebsiella pneumoniae* (*Kpn1*). El 67% de los pacientes ingresaron en UCI procedentes de unidades o servicios de nuestro hospital, pero hasta el 33% fueron remitidos de unidades de cuidados intensivos de otros hospitales de la Comunidad Valenciana.

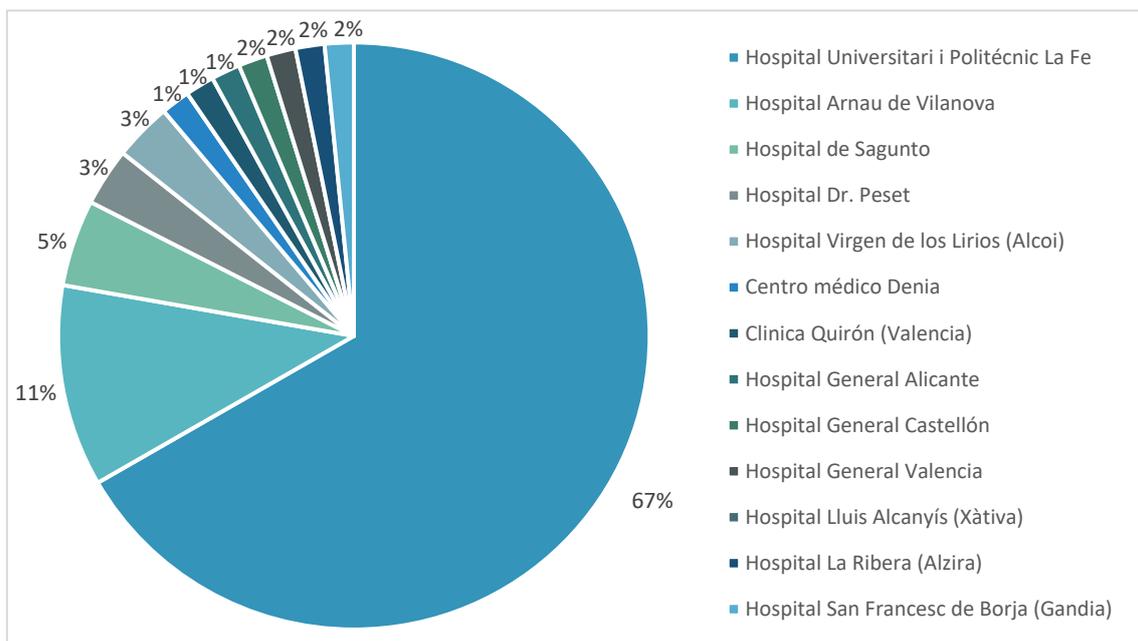


Figura 20. Hospitales de procedencia.

La mayor parte de los pacientes procedían de Urgencias (hasta el 40%), pero una gran parte de servicios médicos del hospital también se encuentran representados. En la **Figura 21** se presentan estos resultados.

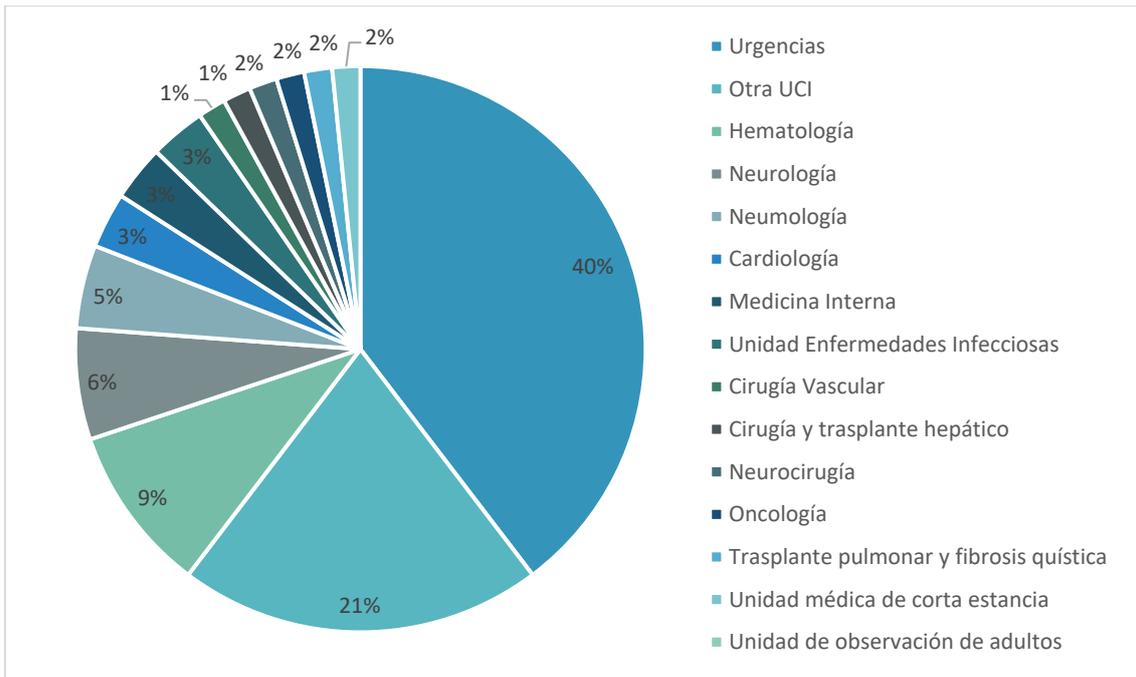


Figura 21. Unidad o servicio de procedencia.

En la **Figura 22** se presenta el motivo de ingreso en UCI de acuerdo a la clasificación establecida al ingreso en el Servicio de Medicina Intensiva, siendo la causa neurológica la principal.

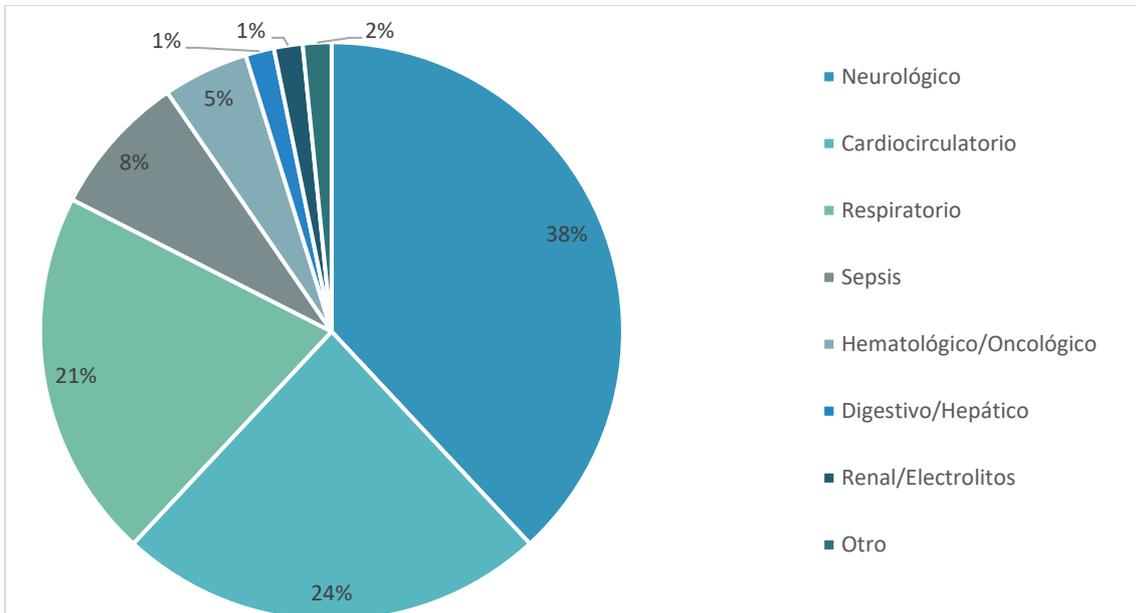


Figura 22. Motivo de ingreso en UCI.

La colonización por *Klebsiella pneumoniae* se detectó por primera vez en frotis rectal hasta en el 70%, solo en el 3% de los casos se detectó en una muestra clínica antes que en el cultivo de vigilancia. Estos datos se presentan en la **Figura 23**. La mediana de días hasta la colonización era de 8,5 (RI 11 días).

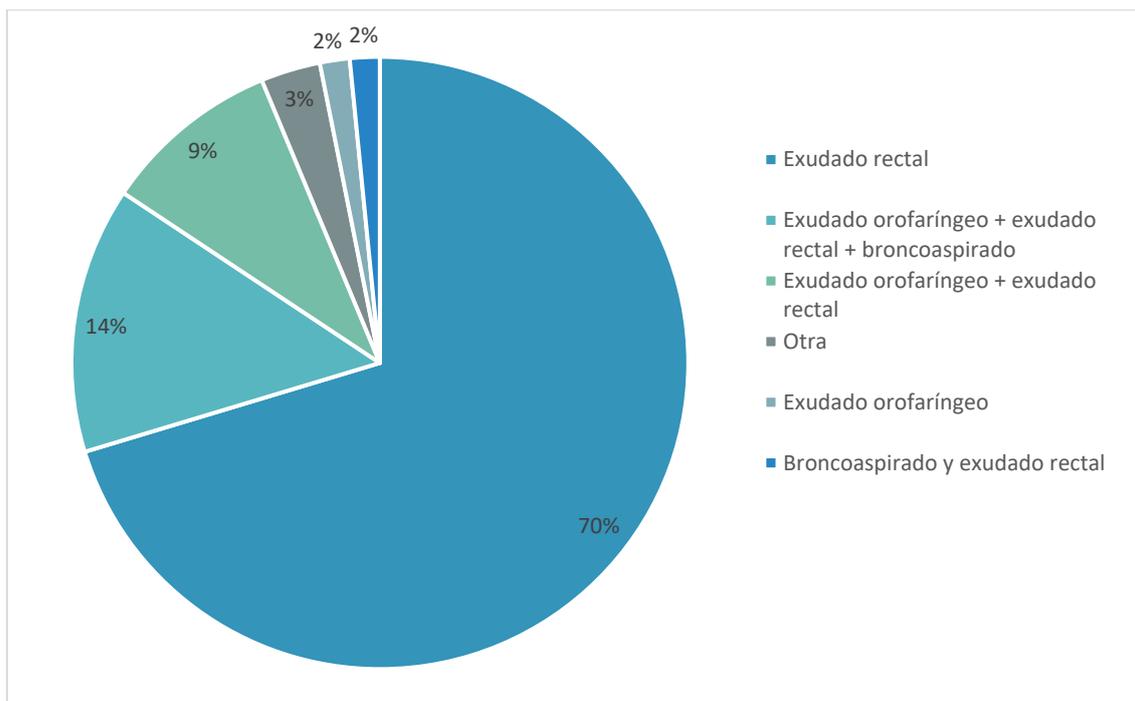


Figura 23. Tipo de muestra en la detección por primera vez de la colonización/infección.

Las enfermedades de base y factores de riesgo al ingreso en UCI de los 64 pacientes colonizados o infectados por *Kpn1* se describen en la **Tabla 36**.

Tabla 36. Enfermedades de base y factores de riesgo al ingreso en UCI.

	n	%
Enfermedades de base		
Insuficiencia renal	8	12,5
Insuficiencia hepática	3	4,7
Insuficiencia cardíaca	13	20,3
Enfermedad pulmonar crónica	13	20,3
Neoplasia	9	14,1
Neutropenia	2	3,1
Trasplante de órgano sólido	3	4,7
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	1	1,6
Tratamiento inmunosupresor	7	10,9
Diabetes mellitus	12	18,8
Afectación SNC y/o SNP	7	10,9
Factores de riesgo al ingreso en UCI		
Tratamiento antibiótico en los 90 días previos	26	40,6
>5 días de hospitalización hasta ingreso en UCI	17	26,6
Procedencia de centro sociosanitario	1	1,6
Tratamiento endovenoso domiciliario	0	0,0
Dialisis crónica	2	3,1
Cura de heridas en domicilio	3	4,7
Ulceras por presión	4	6,3
Reingreso en UCI	6	9,4
Reingreso en el hospital	5	7,8

SNC: Sistema nervioso central; SNP: Sistema nervioso periférico.

En la **Tabla 37** se presenta el tratamiento antibiótico recibido por los pacientes durante su estancia en UCI y desde el ingreso hasta el diagnóstico de la colonización.

Tabla 37. Tratamiento antibiótico de los pacientes

	Antes de la colonización			Durante el ingreso		
	n	Mediana	RI	n	Mediana	RI
Cefalosporinas 3ª generación	13	7,00	4,00	18	7,00	4,50
Amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam	44	5,50	6,00	52	7,50	7,00
Carbapenems	15	6,00	9,00	33	12,00	13,00
Aztreonam	2	10,50	-	4	13,00	10,75
Aminoglucósidos	21	4,00	3,50	29	6,00	6,50
Quinolonas	17	5,00	4,50	33	8,00	5,50
Glucopéptidos	9	6,00	11,00	16	8,00	12,00
Linezolid	19	5,00	5,00	28	8,50	8,75
Daptomicina	8	4,00	4,00	13	7,00	5,50
Colistina	6	3,50	9,75	13	13,00	13,50
Tigeciclina	1	1,00	-	3	7,00	-
Ampicilina/Sulbactam	1	4,00	-	1	27,00	-
Cotrimoxazol	3	22,00	-	4	18,50	48,50
Antifúngicos sistémicos	13	10,00	10,50	22	19,00	15,75
Solución de descontaminación digestiva selectiva	5	4,00	8,50	11	5,00	10,00

n: Número de pacientes que había recibido el tratamiento en el periodo estudiado; RI: rango intercuartílico

Así pues, 44 pacientes había recibido tratamiento con amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam antes del diagnóstico de la colonización con una mediana de días de tratamiento recibido de 5,50. Ocho pacientes más iniciaron el tratamiento con alguno de estos antibióticos después del diagnóstico de colonización.

De forma idéntica, en la **Tabla 38** se presentan los datos relativos a la presencia de dispositivos invasivos desde el ingreso hasta el diagnóstico de colonización y durante el ingreso en UCI.

Tabla 38. Dispositivos invasivos.

	Antes de la colonización			Durante el ingreso		
	n	Mediana	RI	n	Mediana	RI
Ventilación mecánica invasiva	48	9,00	12,75	51	12,00	23,00
Ventilación mecánica no invasiva	12	2,50	3,75	17	2,00	2,50
Catéter venoso central	58	11,50	16,00	59	28,00	28,00
Catéter arterial	35	8,00	8,00	37	14,00	16,00
Sonda urinaria	59	11,00	13,00	60	26,00	27,50
Sonda nasogástrica	48	11,00	14,25	51	21,00	29,00
Nutrición parenteral	42	6,00	9,25	51	11,00	20,00
Derivación ventricular externa	5	9,00	8,00	5	12,00	28,00
ECMO	3	14,00	-	3	23,00	-

Respecto a otros tratamientos que podrían condicionar la colonización por microorganismo MR, el 68,8% recibió profilaxis con clorhexidina oral (68,8%), el 50% requirió corticoides vía intravenosa, 2 pacientes (3,1%) requirieron corticoterapia inhalada y 8 pacientes (12,5%) necesitaron terapia inmunosupresora.

28 pacientes requirieron alguna intervención quirúrgica durante su estancia en UCI, estas intervenciones fueron clasificadas como neuroquirúrgicas en el 50% de los casos, el 50% restante se clasificó como “otras” (no neurocirugía ni cirugía intraabdominal).

Con respecto a la colonización por otros microorganismos multirresistentes antes de la colonización por *Kpn1*, doce pacientes (18,8%) presentaron colonización por *Escherichia coli* BLEE, catorce (21,9%) por *Acinetobacter baumannii* MR, seis (9,4%) por *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo-β-lactamasa, uno por *Pseudomonas aeruginosa* MR (no productora de carbapenemasa), dos por *Staphylococcus aureus* meticilin-resistente y tres por otro microorganismo multirresistente (entre los que destaca un paciente colonizado por *Klebsiella pneumoniae* BLEE perteneciente al ST471 – perfil 21)

En la **Figura 24** se presentan los tipos de infecciones detectadas en los 16 pacientes que presentaron un proceso infeccioso por este microorganismo, hasta en el 12 % de los casos se detectó una bacteriemia primaria por este microorganismo. La mediana de tiempo de ingreso hasta la infección fue de 15 días (RI 31,25 días). En la fecha de diagnóstico de la infección, la situación clínica de los pacientes había empeorado atendiendo a los resultados obtenidos en la escala SOFA ese día, cuyo valor medio era de 7,81 (DS 4,31).

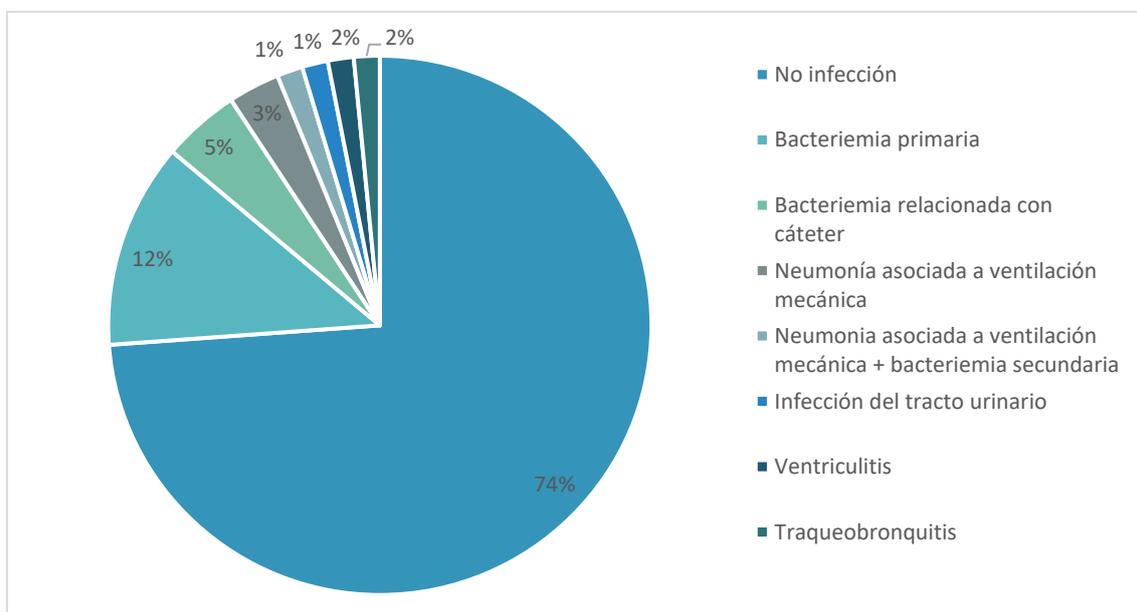


Figura 24. Tipos de infección causada por *Klebsiella pneumoniae* clon 1.

La evolución de los pacientes fue satisfactoria en el 81,3% de los casos (13 pacientes), los tres pacientes restantes (18,8%) fallecieron a causa de la infección (en dos de los casos la infección era una bacteriemia primaria, y en el tercero una bacteriemia relacionada con catéter). El tratamiento se consideró adecuado atendiendo al antibiograma en el 88,2% de los casos. En uno de los casos en los que el tratamiento no se consideró adecuado, el paciente evolucionó favorablemente (siendo el tipo de infección una bacteriemia relacionada con catéter).

El 32,8% de los pacientes colonizados (21 pacientes) fallecieron antes de los 30 días desde el ingreso en UCI, 15 (71,4%) tuvieron este desenlace durante su estancia en UCI, 5 en planta de hospitalización y un paciente falleció en su domicilio. Se consideró que la causa del fallecimiento estaba relacionada con alguna infección nosocomial en el 42,9% de los pacientes.

4.12. Análisis univariante del estudio de casos y controles

En primer lugar se compararon las características que habían sido tenidas en cuenta para realizar la selección de los controles y no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados se presentan a continuación en las **Tablas 39, 40 y 41**.

Tabla 39. Variables cuantitativas con distribución normal utilizadas en la selección de controles.

	Casos Media (DS)	Controles Media (DS)	RR ¹	IC 95% ¹		p
APACHE II	21,02 (8,00)	22,23 (8,23)	1,019	0,976	1,064	0,393

¹Estimación de riesgos de colonización por clon 1 frente a no colonización por este clon; APACHE II: *Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II*; RR: Riesgo relativo; IC: Intervalo de confianza.

Tabla 40. Variables cuantitativas con distribución no normal utilizadas en la selección de controles.

	Casos Mediana (RI)	Controles Mediana (RI)	p
Edad	57 (22)	56 (26)	0,454
Estancia en UCI	17 (21)	13 (21,50)	0,239

Tabla 41. Variables cualitativas utilizadas en la selección de controles.

	Casos (%) (n=64)	Controles (%) (n=64)	OR ¹	IC95% ¹		p
Sexo (Mujer)	42,2	34,4	0,718	0,351	1,468	0,467

Se analizaron las diferencias en variables cualitativas entre los dos grupos (**Tabla 42**), observando como el antecedente de diabetes mellitus parece proteger de la colonización por *Kpn1*.

Tabla 42. Variables cualitativas potenciales condicionantes de colonización por *Kpn1*.

	Casos (%) (n=64)	Controles (%) (n=64)	OR ¹	IC 95% ¹		p
<i>Antecedentes</i>						
Insuficiencia renal	12,5	9,4	1,381	0,450	4,234	0,778
Insuficiencia hepática	4,7	15,6	0,266	0,069	1,015	0,076
Insuficiencia cardiaca	20,3	14,1	1,558	0,614	3,954	0,483
Enfermedad pulmonar crónica	20,3	29,7	0,604	0,268	1,359	0,307
Neoplasia	14,1	20,3	0,642	0,253	1,629	0,483
Neutropenia	3,1	3,1	1,000	0,137	7,325	1,000
Trasplante de órgano sólido	4,7	7,8	0,580	0,133	2,538	0,718
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	1,6	4,7	0,323	0,033	3,188	0,619
Tratamiento inmunosupresor o enfermedad con inmunosupresión	10,9	18,8	0,532	0,195	1,454	0,320
Diabetes mellitus	18,8	40,6	0,337	0,151	0,752	0,011
Enfermedad del SNC y/o SNP	10,9	7,8	1,449	0,435	4,830	0,763
<i>Factores de riesgo al ingreso</i>						
Tratamiento antibiótico los 90 días previos al ingreso en UCI	40,6	51,6	0,643	3,319	1,294	0,287
≥ 5 Días de hospitalización previa al ingreso en UCI	26,6	29,7	0,857	0,396	1,853	0,844
Procedencia de centro socio-sanitario	1,6	0,0	-	-	-	1,000
Tratamiento endovenoso domiciliario	0,0	0,0	-	-	-	1,000
Diálisis crónica	3,1	1,6	2,032	0,180	22,990	1,000
Cura de heridas en domicilio	4,7	3,1	1,525	0,246	9,445	1,000
Úlceras por presión	6,3	7,8	0,787	0,201	3,074	1,000
Reingreso en UCI	9,4	9,4	1,000	0,305	3,283	1,000
Reingreso en el hospital	7,8	9,4	0,819	0,237	2,833	1,000
<i>Otros factores de riesgo en UCI</i>						
Inhibidores de la bomba de protones	98,4	95,3	3,098	0,314	30,608	0,619
AntiH2	10,9	20,3	0,482	0,178	1,301	0,223
Clorhexidina oral	68,8	75,0	0,733	0,338	1,591	0,556
Corticoides sistémicos	50,0	56,3	0,778	0,388	1,560	0,595
Corticoides inhalados	3,1	9,4	0,312	0,060	1,607	0,273
Tratamiento inmunosupresor durante estancia en UCI	12,5	23,4	0,467	0,182	1,194	0,166

¹Estimación del riesgo de colonización por clon 1; OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; SNC: Sistema nervioso central; SNP: Sistema nervioso periférico; UCI: Unidad de cuidados intensivos

Así mismo el tratamiento con carbapenemas o quinolonas parecen ser factores protectores en la colonización por este microorganismo y la colonización por otro microorganismo (en concreto por otro clon de *Klebsiella pneumoniae* BLEE) también resultó ser un factor protector como puede observarse en la **Tabla 42**. La necesidad de nutrición parenteral durante la estancia

en UCI también se presenta como factor protector y la realización de algún tipo de cirugía constituye un factor de riesgo para la colonización por *Kpn1*.

Tabla 42. Variables cualitativas potenciales condicionantes de colonización por *Kpn1* (continuación).

	Casos (%) (n=64)	Controles (%) (n=64)	OR ¹	IC 95% ¹		p
<i>Antibioterapia</i>						
Cefalosporinas 3ª generación	20,3	20,3	1,000	0,423	2,366	1,000
Amoxicilina/Clavulánico o Piperacilina/Tazobactam	68,8	62,5	1,320	0,635	2,744	0,577
Carbapenema	23,4	57,8	0,223	0,104	0,479	0,000
Aztreonam	3,1	6,3	0,484	0,085	2,741	0,680
Tigeciclina	1,6	4,7	0,323	0,033	3,188	0,619
Quinolonas	26,6	50,0	0,362	0,173	0,758	0,011
Linezolid	29,7	42,2	0,579	0,279	1,201	0,197
Daptomicina	12,5	14,1	0,873	0,314	2,427	1,000
Colistina	9,4	20,3	0,406	0,144	1,146	0,134
Ampicilina/Sulbactam	1,6	6,3	0,238	0,026	2,191	0,365
Aminoglucósidos	32,8	46,9	0,553	0,270	1,133	0,148
Glucopéptidos	14,1	15,6	0,884	0,333	2,344	1,000
Antifúngicos sistémicos	20,3	32,8	0,522	0,234	1,164	0,161
Solución de descontaminación digestiva selectiva (DDS)	7,8	7,8	1,000	0,275	3,637	1,000
<i>Colonización por otros microorganismos multirresistentes</i>						
<i>Escherichia coli</i> BLEE	18,8	14,1	1,410	0,549	3,624	0,634
<i>Acinetobacter baumannii</i> MR	21,9	20,3	1,098	0,470	2,569	1,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MBL	9,4	3,1	3,207	0,622	16,530	0,273
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	1,6	6,3	0,238	0,026	2,191	0,365
<i>Staphylococcus aureus</i> MR	3,1	1,6	2,032	0,180	22,990	1,000
Otro microorganismo MR	4,7	26,6	0,136	0,038	0,491	0,001
Otro clon de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE	1,6	14,1	0,097	0,012	0,790	0,017
<i>Dispositivos en UCI</i>						
Ventilación mecánica invasiva	75,0	76,6	0,918	0,409	2,063	1,000
Ventilación mecánica no invasiva	18,8	28,1	0,590	0,257	1,354	0,297
Sonda urinaria	92,2	93,8	0,787	0,201	3,074	1,000
Catéter venoso central	90,6	92,2	0,819	0,237	2,833	1,000
Catéter arterial	54,7	60,9	0,774	0,383	1,563	0,592
Nutrición parenteral	65,6	82,8	0,396	0,173	0,908	0,042
Drenajes	17,2	28,1	0,530	0,227	1,238	0,205
Sonda nasogástrica	75,0	76,6	0,918	0,409	2,063	1,000
Derivación ventricular externa	7,8	1,6	5,339	0,606	47,051	0,208
ECMO	4,7	6,3	0,738	0,158	3,437	1,000
<i>Otros procedimientos</i>						
Cirugía	45,3	28,1	2,117	1,016	4,413	0,066
Traqueostomía	23,4	34,4	0,584	0,269	1,268	0,242

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las escalas de gravedad SOFA y SAPS3 realizadas al ingreso en UCI (Tabla 43).

Tabla 43. Variables cuantitativas con distribución normal potenciales condicionantes de colonización por el clon 1 de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE.

	Casos Media (DS)	Controles Media (DS)	RR ¹	IC 95% ¹	p
SOFA al ingreso en UCI	6,3 (3,6)	7,1 (4,4)	0,950	0,871 1,036	0,245
SAPS3 al ingreso en UCI	66,2 (13,5)	67,1 (17,9)	0,997	0,975 1,019	0,766

¹Estimación de riesgos de colonización por clon a frente a no colonización por este clon;
SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*; SAPS 3: *Simplified Acute Physiology Score III*;
RR: Riesgo relativo; IC: Intervalo de confianza.

El tratamiento antibiótico también se analizó atendiendo al tiempo de duración del mismo para determinar si cada día de tratamiento antibiótico incrementaba o disminuía el riesgo de colonización por *Kpn1*, observando que cada día de tratamiento con carbapenemas, quinolonas, aminoglucósidos o cotrimoxazol disminuía el riesgo de colonización. Cada día de catéter venoso central, nutrición parenteral o sonda nasogástrica parecía disminuir el riesgo de colonización por *Kpn1* (Tabla 44).

Tabla 44. Variables cuantitativas con distribución no normal potenciales condicionantes de colonización por el clon 1 de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE.

	Casos Mediana (RI)	Controles Mediana (RI)	p
<i>Días de tratamiento hasta la colonización</i>			
Cefalosporinas de tercera generación	0 (0)	0 (0)	0,986
Amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam	4 (7)	4,50 (12)	0,483
Carbapenemas	0 (0)	6 (14)	0,000
Aztreonam	0 (0)	0 (0)	0,398
Ampicilina/Sulbactam	0 (0)	0 (0)	0,168
Tigeciclina	0 (0)	0 (0)	0,300
Quinolonas	0 (1)	0,50 (10)	0,002
Glucopéptidos	0 (0)	0 (0)	0,817
Linezolid	0 (2)	0 (6)	0,103
Daptomicina	0 (0)	0 (0)	0,710
Aminoglucósidos	0 (3)	0 (8)	0,020
Cotrimoxazol	0 (0)	0 (0)	0,015
Colistina	0 (0)	0 (0)	0,066
Antifúngicos sistémicos	0 (0)	0 (9)	0,079
Descontaminación digestiva selectiva	0 (0)	0 (0)	0,918
<i>Días de dispositivos hasta la colonización</i>			
Ventilación mecánica invasiva	5 (13)	9 (20)	0,110
Ventilación mecánica no invasiva	0 (0)	0 (1)	0,202
Catéter venoso central	11 (14)	19 (28)	0,003
Catéter arterial	2 (9)	5 (18)	0,097
Nutrición Parenteral	3 (10)	9,50 (16)	0,002
Sonda urinaria	9 (13)	16,50 (26)	0,003
Sonda nasogástrica	7 (15)	11 (25)	0,100
Drenaje	0 (0)	0 (2)	0,163
Derivación ventricular externa	0 (0)	0 (0)	0,096
ECMO	0 (0)	0 (0)	0,655
<i>Estancia en el hospital hasta ingreso en UCI</i>	0 (6,25)	0 (3)	0,721

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de estancia en UCI entre los pacientes que se colonizaron por *Kpn1* y los que no se colonizaron por este clon (Figura 25 y Tabla 45).

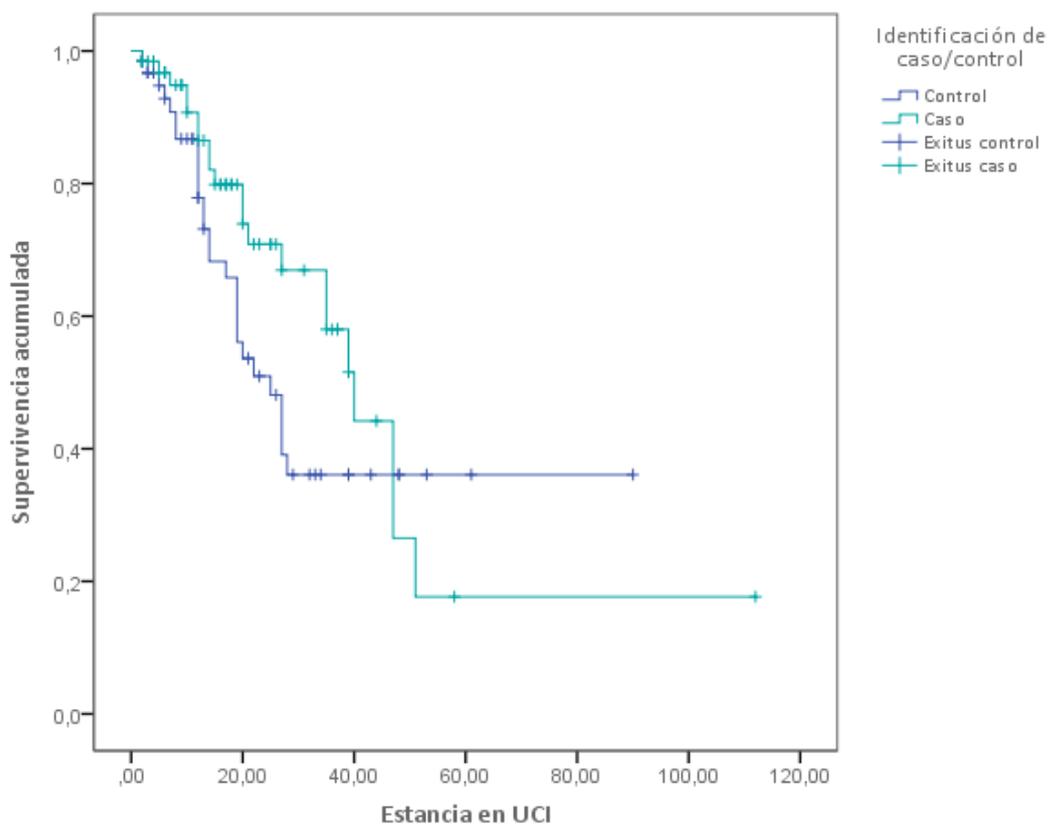


Figura 25. Comparación de la estancia en UCI entre casos y controles mediante gráfica de Kaplan Meier.

Tabla 45. Comparación del tiempo de estancia en UCI entre casos y controles.

Colonización <i>Kpn1</i>	Estancia media estimada	Error estándar	IC 95%	
No	42,937	5,686	31,793	54,081
Sí	46,204	7,870	30,779	61,630
Global	48,378	6,028	36,563	60,193
	χ^2	df	p	
log Rank (Mantel Cox)	1,906	1	0,167	

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de mortalidad a los 30 días del ingreso en UCI entre casos (32,8%) y controles (42,2%) (OR 0,669; IC95% 0,326 – 1,375; p=0,361).

4.13. Análisis multivariante del estudio de casos y controles

En el análisis multivariante se incluyeron todas las variables del análisis univariante (la antibioterapia y la presencia de dispositivos invasivos se incluyeron como variables cuantitativas). Mediante el modelo de regresión logística penalizado por elastic net las variables que resultaron significativas fueron el tratamiento con carbapenemas y la presencia de sonda urinaria (ambos factores protectores para la colonización por *Kpn1*), pero tras su análisis mediante regresión logística para el cálculo de OR e intervalo de confianza la única variable que resulta significativa es el tratamiento con carbapenemas. (**Tabla 46**).

Tabla 46. Modelo de regresión logística

Variables	B	Std..Error	expB	IC95%		p
(Intercept)	0.888	0.492	2.43	0.946	6.623	0.071
log1p (Carbapenema)	-0.682	0.186	0.506	0.345	0.718	<0.001
log1p (Sonda urinaria)	-0.105	0.207	0.901	0.595	1.352	0.613
AIC	160.498					

En la **Figura 26** observamos como a mayor número de días de tratamiento con carbapenemas el riesgo de colonización por *Kpn1* disminuye.

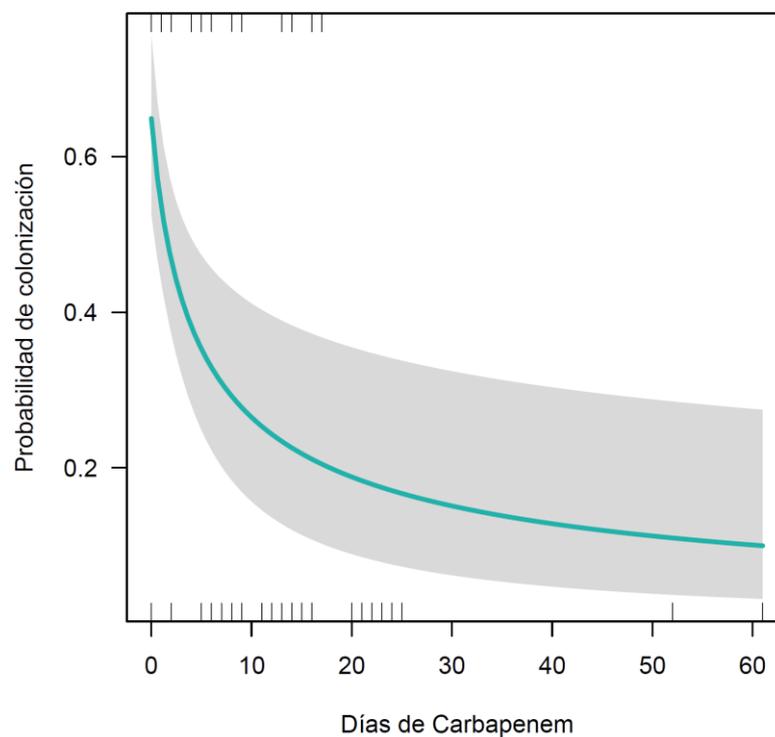


Figura 26. Probabilidad de colonización en función de los días de tratamiento con carbapenemas

4.14. Estudio comparativo de los pacientes que desarrollaron un proceso infeccioso por *Kpn1* frente a los que no lo desarrollaron

No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el desarrollo de infección entre los antecedentes de los pacientes colonizados por *Kpn1* o sus factores de riesgo al ingreso, pero la necesidad de ventilación mecánica invasiva o sonda nasogástrica sí que parecen ser factores de riesgo para el desarrollo de infección por *Kpn1* (Tabla 47).

Tabla 47. Variables cualitativas potenciales condicionantes de infección por el clon 1 de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE.

	Infección (%) (n=16)	No infección (%) (n=48)	OR ¹	IC 95% ¹		p
<i>Antecedentes</i>						
Sexo (Mujer)	37,5	33,3	1,200	0,370	3,892	0,769
Insuficiencia renal	6,3	14,6	0,390	0,044	3,444	0,667
Insuficiencia hepática	0,0	6,3	-	-	-	0,567
Insuficiencia cardíaca	6,3	25,0	0,200	0,024	1,678	0,157
Enfermedad pulmonar crónica	6,3	25,0	0,200	0,024	1,678	0,157
Neoplasia	12,5	14,6	0,837	0,155	4,510	1,000
Neutropenia	0,0	4,2	-	-	-	1,000
Trasplante de órgano sólido	0,0	6,3	-	-	-	0,567
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	0,0	2,1	-	-	-	1,000
Tratamiento inmunosupresor o enfermedad con inmunosupresión	6,3	12,5	0,467	0,052	4,201	0,669
Diabetes mellitus	18,8	18,8	1,000	0,235	4,261	1,000
Enfermedad del SNC y/o SNP	6,3	12,5	0,467	0,052	4,201	0,669
<i>Factores de riesgo al ingreso</i>						
Tratamiento antibiótico los 90 días previos al ingreso en UCI	37,5	41,7	0,840	0,262	2,689	1,000
≥ 5 Días de hospitalización previa al ingreso en UCI	25,0	27,1	0,897	0,245	3,288	1,000
Procedencia de centro socio-sanitario	0,0	2,1	-	-	-	1,000
Tratamiento endovenoso domiciliario	0,0	0,0	-	-	-	1,000
Diálisis crónica	6,3	2,1	3,133	0,185	53,207	3,133
Cura de heridas en domicilio	6,3	4,2	1,533	0,130	18,131	1,000
Úlceras por presión	0,0	8,3	-	-	-	0,564
Reingreso en UCI	0,0	12,5	-	-	-	0,323
Reingreso en el hospital	0,0	10,4	-	-	-	0,319
<i>Otros factores de riesgo en UCI</i>						
Inhibidores de la bomba de protones	97,9	100,0	-	-	-	1,000
AntiH2	6,3	12,5	0,467	0,052	4,201	0,669
Clorhexidina oral	68,8	68,8	1,000	0,295	3,389	1,000
Corticoides sistémicos	56,3	47,9	1,398	0,448	4,363	0,774
Corticoides inhalados	0,0	4,2	-	-	-	1,000
Tratamiento inmunosupresor durante estancia en UCI	12,5	12,5	1,000	0,181	5,533	1,000

Tabla 47. Variables cualitativas potenciales condicionantes de infección por el clon 1 de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE (continuación).

	Infeción (%) (n=16)	No infección (%) (n=48)	OR ¹	IC 95% ¹		p
<i>Dispositivos y procedimientos quirúrgicos antes de la colonización</i>						
Cirugía	50,0	29,2	2,429	0,761	7,754	0,143
Traqueostomía	31,3	20,8	1,727	0,487	6,126	0,498
Ventilación mecánica no invasiva	12,5	20,8	0,543	0,106	2,791	0,714
Ventilación mecánica invasiva	100,0	66,7	-	-	-	0,007
Catéter venoso central	100,0	87,5	-	-	-	0,323
Catéter arterial	68,8	50,0	2,200	0,663	7,297	0,251
Nutrición parenteral	75,0	62,5	1,800	0,504	6,432	0,545
Sonda urinaria	93,8	91,7	1,364	0,141	13,177	1,000
Sistema de drenaje	18,8	16,7	1,154	0,266	5,004	1,000
Sonda nasogástrica	100,0	66,7	-	-	-	0,007
Derivación ventricular externa	6,3	8,3	0,733	0,076	7,086	1,000
ECMO	12,5	2,1	6,714	0,566	79,659	0,152
<i>Tratamiento con antimicrobianos antes de la colonización</i>						
Cefalosporinas de 3ª generación	25,0	18,8	1,444	0,377	5,537	0,721
Amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam	50,0	75,0	0,333	0,103	1,082	0,117
Carbapenemas	18,8	25,0	0,692	0,168	2,850	0,742
Ampicilina/Sulbactam	6,3	0,0	-	-	-	0,250
Aztreonam	6,3	2,1	3,133	0,185	53,207	0,440
Tigeciclina	0,0	2,1	-	-	-	1,000
Quinolonas	37,5	22,9	2,018	0,599	6,805	2,018
Linezolid	31,3	29,2	1,104	0,324	3,764	1,000
Daptomicina	18,8	10,4	1,985	0,417	9,444	0,401
Glucopéptidos	18,8	12,5	1,615	0,354	7,379	0,679
Aminoglucósidos	25,0	35,4	0,608	0,170	2,179	0,547
Colistina	6,3	10,4	0,573	0,062	5,311	1,000
Antifúngicos sistémicos	25,0	18,8	1,444	0,377	5,537	0,721
Solución de descontaminación digestiva selectiva (DDS)	12,5	6,3	2,143	0,325	14,143	0,592
<i>Colonización por otros microorganismos multirresistentes antes de la colonización por Kpn1</i>						
<i>Escherichia coli</i> BLEE	18,8	18,8	1,000	0,235	4,261	1,000
<i>Acinetobacter baumannii</i> MR	18,8	22,9	0,776	0,187	3,226	1,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MBL	6,3	10,4	0,573	0,062	5,311	1,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR (no MBL)	0,0	2,1	-	-	-	1,000
<i>Staphylococcus aureus</i> MR	6,3	2,1	3,133	0,185	53,207	0,440
Otro microorganismo MR	6,3	4,2	1,533	0,130	18,131	1,000
Otro clon de <i>K. pneumoniae</i> BLEE	0,0	2,1	-	-	-	1,000

No se observaron diferencias entre tratamiento antibiótico recibido antes de la colonización o colonización por otros microorganismos multirresistentes entre ambos grupos de pacientes. La necesidad de traqueostomía, ventilación mecánica invasiva, catéter arterial o sonda nasogástrica parecía asociarse al desarrollo de un proceso infeccioso por *Kpn1*.

Tabla 47. Variables cualitativas potenciales condicionantes de infección por el clon 1 de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE (continuación).

	Infección (%) (n=16)	No infección (%) (n=48)	OR ¹	IC 95% ¹		p
<i>Dispositivos y procedimientos quirúrgicos antes de la infección</i>						
Cirugía	62,5	39,6	2,544	0,793	8,162	0,150
Traqueostomía	62,5	29,2	1,889	0,588	6,071	0,035
Ventilación mecánica no invasiva	18,8	27,1	1,000	0,097	10,354	0,740
Ventilación mecánica invasiva	100,0	72,9	-	-	-	0,027
Catéter venoso central	100,0	89,6	-	-	-	0,319
Catéter arterial	81,3	50,0	4,333	1,093	17,173	0,041
Nutrición parenteral	87,5	70,8	2,333	0,462	11,782	0,487
Sonda urinaria	93,8	93,8	1,000	0,097	10,354	1,000
Sistema de drenaje	31,3	27,1	1,224	0,356	4,204	0,756
Sonda nasogástrica	100,0	72,9	-	-	-	0,027
Derivación ventricular externa	6,3	8,3	0,733	0,076	7,086	1,000
ECMO	12,5	2,1	6,714	0,566	79,659	0,152
<i>Tratamiento con antimicrobianos antes de la infección</i>						
Cefalosporinas de 3ª generación	31,3	25,0	1,364	0,394	4,725	0,745
Amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam	62,5	83,3	0,333	0,094	1,181	0,095
Carbapenemas	43,8	39,6	1,187	0,378	3,729	0,777
Ampicilina/Sulbactam	6,3	0,0	-	-	-	0,250
Aztreonam	6,3	6,3	1,000	0,097	10,354	1,000
Tigeciclina	0,0	2,1	-	-	-	1,000
Quinolonas	50,0	47,9	1,087	0,350	3,371	1,000
Linezolid	62,5	35,4	3,039	0,941	9,815	0,081
Daptomicina	31,3	16,7	2,273	0,619	8,351	0,282
Glucopéptidos	25,0	25,0	1,000	0,271	3,694	1,000
Aminoglucósidos	43,8	39,6	1,187	0,378	3,729	0,777
Colistina	18,8	16,7	1,154	0,266	5,004	1,000
Antifúngicos sistémicos	31,3	27,1	1,224	0,356	4,204	0,756
Solución de descontaminación digestiva selectiva (DDS)	18,8	10,4	1,985	0,417	9,444	0,401

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la edad o los valores en las escalas de gravedad entre ambos grupos de pacientes (**Tabla 48**).

Tabla 48. Variables cuantitativas con distribución normal potenciales condicionantes de colonización por el clon 1 de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE.

	Infección Media (DS)	No infección Media (DS)	RR ¹	IC 95% ¹		p
Edad	54,6 (12,4)	57,0 (16,6)	0,990	0,955	1,027	0,595
APACHEII al ingreso en UCI	20,4 (6,7)	21,2 (8,4)	0,988	0,919	1,061	0,737
SAPS3 al ingreso en UCI	65,6 (12,8)	66,4 (13,9)	0,995	0,954	1,038	0,821
SOFA al ingreso en UCI	6,0 (3,6)	6,3 (3,7)	0,974	0,831	1,142	0,750

¹Estimación de riesgos de infección frente a no infección por *Kpn1*;
SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*; SAPS 3: *Simplified Acute Physiology Score III*; RR: Riesgo relativo; IC: Intervalo de confianza.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en otras variables cuantitativas como los días de tratamiento antibiótico o los días de requerimiento de dispositivos invasivos hasta la colonización entre ambos grupos de pacientes (**Tabla 49**).

Tabla 49. Variables cuantitativas con distribución no normal potenciales condicionantes de infección por el clon 1 de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE.

	Infección Mediana (RI)	No Infección Mediana (RI)	p
<i>Días de tratamiento hasta la colonización</i>			
Cefalosporinas de tercera generación	0 (0,75)	0 (0)	0,651
Amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam	0,50 (6,75)	4 (6,75)	0,231
Carbapenemas	0 (0)	0 (0,75)	0,723
Aztreonam	0 (0)	0 (0)	0,425
Ampicilina/Sulbactam	0 (0)	0 (0)	0,083
Tigeciclina	0 (0)	0 (0)	0,564
Quinolonas	0 (0)	0 (5,75)	0,223
Glucopéptidos	0 (0)	0 (0)	0,564
Linezolid	0 (4,25)	0 (2)	0,788
Daptomicina	0 (0)	0 (0)	0,403
Aminoglucósidos	0 (0,75)	0 (3)	0,387
Cotrimoxazol	0 (0)	0 (0)	0,310
Colistina	0 (0)	0 (0)	0,679
Antifúngicos sistémicos	0 (4,50)	0 (0)	0,675
Descontaminación digestiva selectiva	0 (0)	0 (0)	0,434
<i>Días de dispositivos hasta la colonización</i>			
Ventilación mecánica invasiva	6,50 (9,75)	4,50 (12,75)	0,171
Ventilación mecánica no invasiva	0 (0)	0 (0)	0,432
Catéter venoso central	11 (18)	11 (14,25)	0,981
Catéter arterial	2,50 (10,25)	0,50 (8,75)	0,541
Nutrición Parenteral	2,50 (9,75)	3 (10)	0,862
Sonda urinaria	10 (13,50)	9 (13,75)	0,653
Sonda nasogástrica	7 (13,75)	7 (15)	0,467
Derivación ventricular externa	0 (0)	0 (0)	0,842
ECMO	0 (0)	0 (0)	0,090
<i>Estancia en el hospital hasta ingreso en UCI</i>	0 (6,25)	0 (3)	0,721
<i>SOFA hasta la colonización</i>	8,50 (6)	4 (6)	0,052

Tabla 49. Variables cuantitativas con distribución no normal potenciales condicionantes de infección por el clon 1 de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE (continuación).

	Infección Mediana (RI)	No Infección Mediana (RI)	p
<i>Días de tratamiento hasta la infección</i>			
Cefalosporinas de tercera generación	0 (5)	0 (0)	0,625
Amoxicilina/clavulánico o piperacilina/tazobactam	5 (9,25)	6 (8)	0,190
Carbapenemas	0 (8,75)	0 (8)	0,583
Aztreonam	0 (0)	0 (0)	0,956
Ampicilina/Sulbactam	0 (0)	0 (0)	0,083
Tigeciclina	-	0 (0)	0,564
Quinolonas	0,5 (7,25)	0 (8)	0,914
Glucopéptidos	0 (0,75)	0 (1)	0,951
Linezolid	3,50 (10,75)	0 (5)	0,061
Daptomicina	0 (5,50)	0 (0)	0,201
Aminoglucósidos	0 (4,75)	0 (6)	0,868
Cotrimoxazol	-	0 (0)	0,237
Colistina	0 (0)	0 (0)	0,715
Antifúngicos sistémicos	0 (6)	0 (9)	0,860
Descontaminación digestiva selectiva	0 (0)	0 (0)	0,359
<i>Días de dispositivos hasta la infección</i>			
Ventilación mecánica invasiva	13 (26,25)	5 (19)	0,011
Ventilación mecánica no invasiva	0 (0)	0 (1)	0,444
Catéter venoso central	17 (31,75)	24 (23,5)	0,786
Catéter arterial	12,50 (17,25)	1 (13)	0,015
Nutrición Parenteral	7,50 (16,25)	4 (16)	0,330
Sonda urinaria	13 (31,25)	20,5 (28)	0,545
Sonda nasogástrica	14,50 (28,50)	10 (26)	0,097
Drenajes	0 (10)	0 (4)	0,681
Derivación ventricular externa	0 (0)	0 (0)	0,842
ECMO	0 (0)	0 (0)	0,090

Sin embargo, los paciente que desarrollaron un proceso infeccioso requirieron más días de ventilación mecánica invasiva o catéter arterial antes del diagnóstico de la infección que los que no lo desarrollaron (**Tabla 49**).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de estancia en UCI entre los pacientes que desarrollaron un proceso infeccioso por *Kpn1* y los que no lo desarrollaron (**Figura 27 y Tabla 50**).

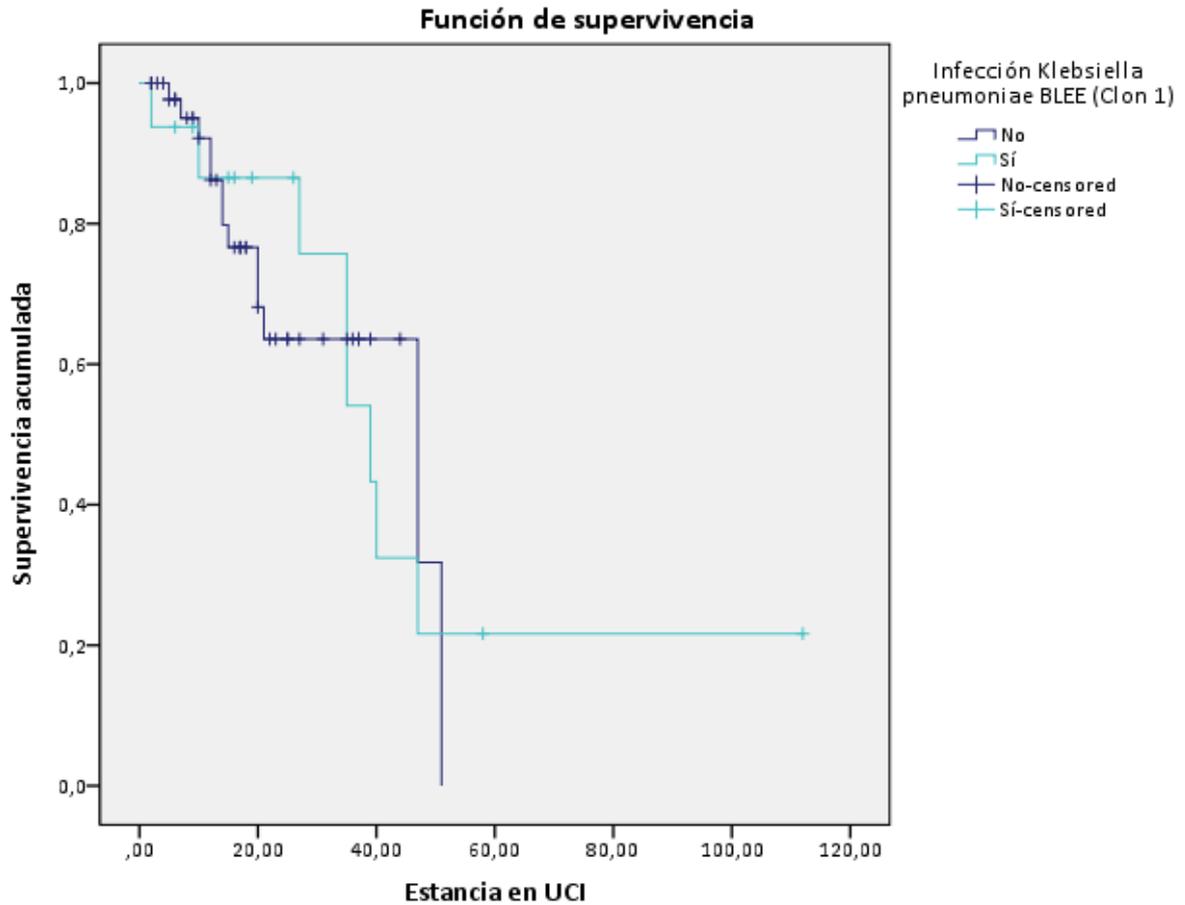


Figura 27. Comparación de la estancia en UCI entre los pacientes infectados y los colonizados por *Kpn1* mediante la gráfica de Kaplan-Meier.

Tabla 50. Comparación del tiempo de estancia en UCI entre infectados y colonizados por *Kpn1*.

Infección	Estancia media estimada	Error estándar	IC 95%	
No	36,484	3,349	29,920	43,047
Sí	49,200	10,966	27,705	70,694
Global	46,204	7,870	30,779	61,630
	χ^2	df	p	
log Rank (Mantel Cox)	0,015	1	0,902	

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de mortalidad a los 30 días del ingreso en UCI entre los pacientes que desarrollaron un proceso infeccioso (50%) por *Kpn1* y los que no los desarrollaron (27,1%) (OR 2,692; IC95% 0,837 – 8,662; $p=0,126$).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los brotes epidemiológicos intrahospitalarios causados por bacterias multirresistentes están asociados con aumento de la morbi-mortalidad y de la estancia hospitalaria de los pacientes afectados, así como del coste sanitario global (87), por lo que es imprescindible un análisis detallado de las características epidemiológicas, microbiológicas (163), clínicas, de comportamiento evolutivo y de medidas de control establecidas, como es el caso del brote por *K. pneumoniae* productora de BLEE acontecido en la UCI de nuestro centro, para intentar así desarrollar futuras estrategias de prevención y de intervención eficaces.

5.1. Epidemiología

El número de infecciones diagnosticadas a partir de cultivos positivos de muestras clínicas en 2012 se incrementó respecto al año anterior, y la sospecha de existencia de un brote nosocomial por esta bacteria fue suscitada por el incremento de casos de colonización diagnosticados a través de los cultivos de vigilancia epidemiológica, que permitieron conocer la verdadera dimensión del problema, por lo que es recomendable, como refieren algunos autores, su implementación dentro de un programa global de control de infección nosocomial (120).

En España, según datos del ECDC el % de aislados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de 3ª generación en muestras invasivas ha ido aumentando progresivamente desde el año 2005 (7,1%) hasta 2017 (21,4%). Entre 2011 y 2014 (años incluidos en el estudio), se incrementó del 13,4 al 18,0%. Así mismo la resistencia a carbapenemas en este tipo de muestras, aunque a una escala mucho menor, también ha ido aumentando, pasando de la ausencia de casos en 2005 hasta el 2,7% de 2017 (164). Según lo observado en nuestro estudio, el elevado porcentaje de resistencia a cefalosporinas (casi del 50% en algún periodo del estudio en muestras clínicas y cercano al 65% en muestras invasivas) en comparación con lo publicado también hacía sospechar de una situación epidemiológica anómala que debía ser estudiada en profundidad.

No es posible establecer comparaciones en el número de pacientes colonizados/infectados por *K. pneumoniae* productora de BLEE como el detectado en este estudio con otras valoraciones recogidas en la literatura referentes a UCI de adultos, ya que existen multitud de factores que pueden afectar a esta cifra; algunos autores apuntan tasas que van desde el 4,8% (165) al 38% (166) de los pacientes colonizados en situación de brote epidemiológico, mientras que otros refieren porcentajes desde el 1,43% al 11,7% (167), sin encontrarse en situación de brote. Incluso en este mismo trabajo la densidad de incidencia de colonizaciones por 1.000 días

de estancia en UCI observada en el año 2011 posiblemente se encuentre subestimada, dado que los cultivos de vigilancia epidemiológica, los cuales permiten conocer con exactitud que pacientes se encuentran colonizados, se iniciaron en octubre de ese mismo año.

Según los datos de ENVIN-HELICS 2012, la densidad de incidencia de infecciones por 1.000 días de estancia en la UCI de nuestro centro era de 9,47 en el periodo comprendido entre abril y junio de 2012, mientras que en el conjunto de las UCI españolas es de 9,36 (9). La densidad de incidencia de infección nosocomial por *K. pneumoniae* productora de BLEE observada en este trabajo en el año 2012 (2 infecciones/1.000 días de estancia) refleja el importante peso que ha supuesto el brote detectado causado por *K. pneumoniae* productora de BLEE en la infección nosocomial de la UCI del HU y P La Fe, posiblemente por invasión y desplazamiento del nicho ecológico previamente ocupado por *Acinetobacter baumannii*.

La prevalencia de infecciones asociadas a cuidados sanitarios en unidades de cuidados intensivos era del 28,1% según el estudio de prevalencia puntual realizado por el ECDC en hospitales de cuidados agudos en el año 2010 (168), esta cifra se asemeja bastante al porcentaje de pacientes colonizados por *Kpn1* que desarrollaban un proceso infeccioso por este microorganismo durante su estancia en UCI (25%). En el segundo estudio de prevalencia puntual europeo realizado en el año 2016 esta cifra parecía disminuir, el 19,2% de los pacientes de unidades críticas incluidos en el estudio desarrollaron una infección asociada a cuidados sanitarios (169).

A partir de estos datos epidemiológicos, y de su dinámica cambiante, se ha considerado que eran necesarios estudios de tipificación molecular para reconocer cuáles de los casos de colonización/infección por *K. pneumoniae* productora de BLEE detectados durante el brote formaban realmente parte del mismo.

5.2. Resultados microbiológicos

La PFGE sigue considerándose en la actualidad la técnica de referencia debido a su excelente poder discriminatorio, buena reproducibilidad y aplicabilidad a una amplia gama de patógenos, si embargo tiene mayor complejidad técnica y supone una elevada carga de trabajo adicional inasumible en algunos casos por los laboratorios asistenciales (163), además difícilmente permite el intercambio de datos entre laboratorios (170). En nuestro caso, esta técnica permitió entender la epidemiología de la unidad determinando la existencia de hasta 21 perfiles de PFGE diferentes, pero se requirió realizar un gran número de experimentos debido al importante número de cepas estudiadas y a la dificultad de comparar entre diferentes geles.

López-Canovas *et al.* consideran que la PFGE continua siendo el metodo de elección en epidemiología molecular mientras se realiza la transición a la secuenciación genómica, cuya principal limitación es su coste económico y la necesidad de equipos multidisciplinares adecuadamente entrenados en esta técnica (171). El elevado número de perfiles detectados muestra una situación de policlonalidad en situación de un gran brote como el demostrado. Esta situación epidemiológica compleja ya ha sido observada en otros entornos (172), a pesar de la existencia de brotes, obligando a utilizar técnicas complementarias a la bacteriología clásica para intentar identificar la cadena de transmisión. En el trabajo publicado por Snitkin *et al.* observamos que la secuenciación genómica ayuda a establecer la cadena de transmisión en un brote a partir de la observación de las mutaciones puntuales del genoma de *Klebsiella pneumoniae*, sin embargo la mayor parte de laboratorios asistenciales todavía se encuentran muy lejos de poder realizar esta técnica de forma rutinaria (107).

Otra de las técnicas empleadas en este caso basada en la rep-PCR, Diversilab™ (bioMérieux, Francia), presenta un poder discriminativo inferior al del la PFGE (173), pero teóricamente cuenta con una elevada reproducibilidad y robustez (170,174) incluso interlaboratorios (175), por lo que resulta útil para el estudio de brotes epidemiológicos. Sin embargo, la experiencia de este trabajo se aleja de estas afirmaciones, observando grandes discrepancias al analizar los resultados de una misma cepa cuando se estudia en dos momentos temporales diferentes. Esta baja reproducibilidad también fue observada Voets *et al.*, en la comparación que realizaron entre diferentes centros estudiando las mismas cepas (173), atribuyéndolo a la variación en el personal técnico, una baja amplificación en la PCR o baja concentración o calidad del ADN. La baja reproducibilidad observada obligó a un análisis detallado de la técnica, en la que se siguieron las recomendaciones del fabricante, encontrando como única diferencia fundamental con el resto de trabajos publicados, la utilización de un equipo genérico de amplificación del ADN de bacterias, en lugar del específico del género *Klebsiella*. Otros de los factores que podría afectar a los resultados es el punto de corte elegido al realizar el análisis, en nuestro estudio el punto de corte de 95% de semejanza que se utilizó para considerar un aislado de *K. pneumoniae* productor de BLEE como perteneciente a una agrupación clonal es similar al presentado en otros artículos (170,174–176); sin embargo, no se encuentra estandarizado, pudiendo encontrar trabajos en los que se emplean puntos de corte muy inferiores (177).

En nuestra experiencia los resultados de la rep-PCR permitieron confirmar de forma relativamente rápida la existencia de un brote; sin embargo, fue necesaria la utilización de un método con mayor poder de discriminación, como la PFGE, para aclarar las dudas suscitadas en los resultados obtenidos con la técnica Diversilab™. Por tanto, podemos convenir que la técnica

de Rep-PCR podría ser un procedimiento de primer escalón, pero en ningún caso sustituye a la técnica de referencia.

El RAPD es una técnica frecuentemente utilizada en los laboratorios de microbiología clínica por su sencillez y rapidez en la obtención de resultados. En nuestro caso, la técnica de RAPD se realizó en 28 cepas representativas de todos los perfiles y subperfiles obtenidos en la PFGE con el objetivo de comparar ambas técnicas, encontrando grandes discordancias entre los dos procedimientos. Sin embargo, Ashateri-Panah *et al.* señalan que el poder discriminatorio de esta técnica en *K. pneumoniae*, basándose en el índice de diversidad de Simpson, es alto y similar al obtenido mediante PFGE, presentando además una buena reproducibilidad por lo que la consideran una buena herramienta para el tipado molecular de esta especie (178). No obstante, estos autores, a diferencia de lo realizado en esta tesis, únicamente utilizaban un oligonucleótido iniciador y aplicaban un análisis óptico de los patrones de bandas. En el año 1996, Gori *et al.* realizaron también una comparación entre ambas técnicas, encontrando que, las cepas que se diferenciaban claramente por PFGE, presentaban también perfiles distintos en el RAPD por lo que consideraban esta técnica como una primera aproximación adecuada, ya que la PFGE mostraba más subperfiles que los observados en el RAPD, lo que se atribuía a que estos métodos exploran diferentes niveles de polimorfismos del ADN (179). Sin embargo, en el trabajo publicado por Ripabelli *et al.* (180) consideran esta técnica como “inadecuada y poco fiable, incluso en periodos de tiempo cortos” lo que se aproxima más a nuestras conclusiones con respecto a esta técnica.

El estudio mediante MLST permite establecer comparaciones en la epidemiología entre diferentes hospitales, provincias o países. En este trabajo, los resultados obtenidos se correlacionaban correctamente con los resultados de la PFGE, permitiendo comprender mejor la epidemiología de nuestro centro. La ventaja fundamental de esta técnica, a pesar de laboriosidad ya que en este caso se realizó mediante secuenciación de Sanger, es la reproducibilidad de los resultados obtenidos, puesto que el resultado final es una secuencia de ADN que puede ser almacenada y comparada fácilmente, a diferencia de los que ocurre con la PFGE. Entre los STs encontrados en nuestro estudio encontramos varios considerados clones de alto riesgo, como los ST11, ST15 y ST147, ampliamente distribuidos en el mundo tal y como puede observarse en las **Figuras 28, 29 y 30** (datos extraídos de la base de datos del Instituto Pasteur y de búsquedas en Pubmed utilizando como términos “*Klebsiella pneumoniae*” y “ST...”).

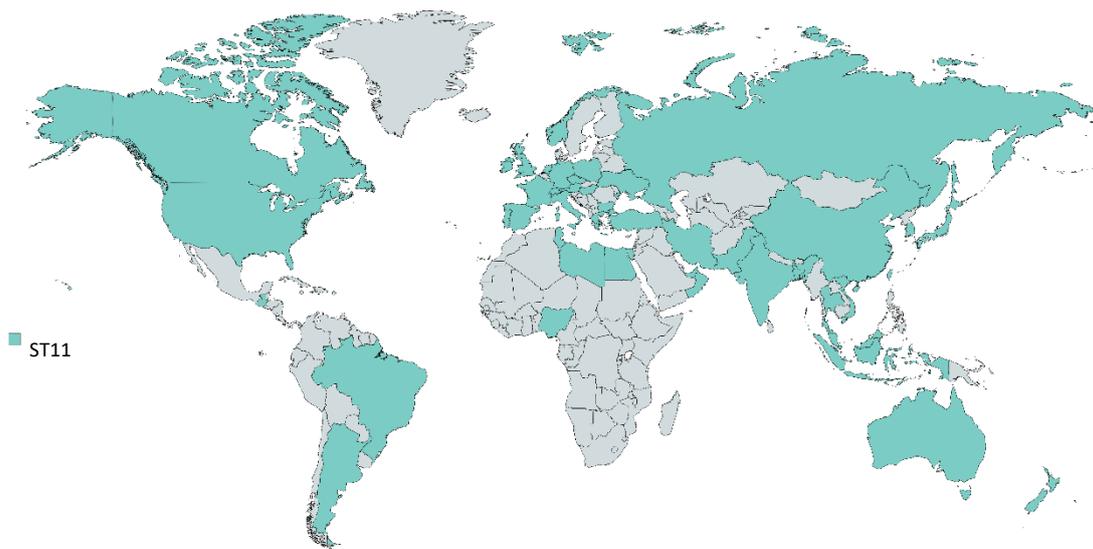


Figura 28. Distribución mundial de *Klebsiella pneumoniae* ST11.

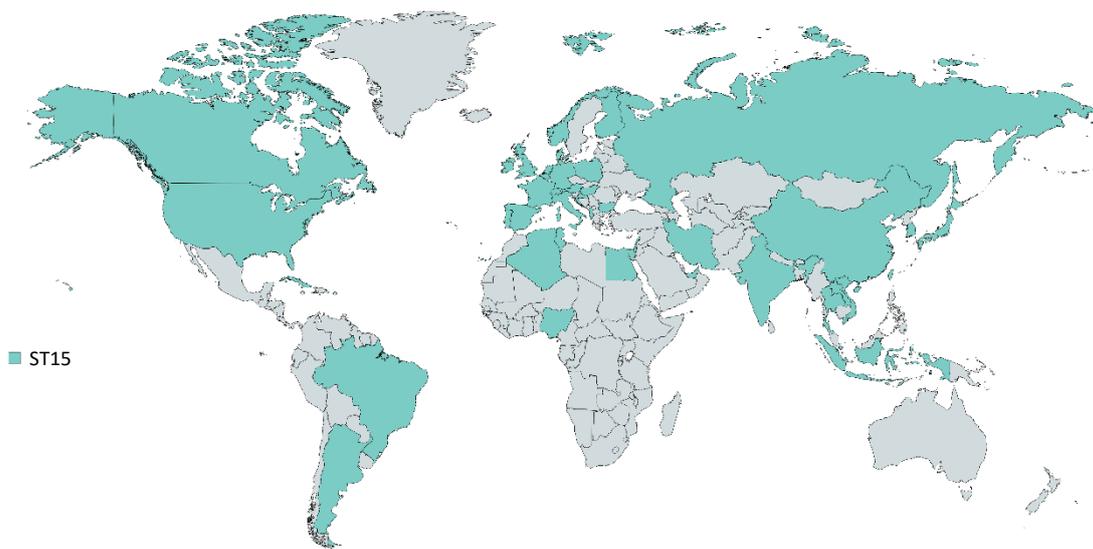


Figura 29. Distribución mundial de *Klebsiella pneumoniae* ST15.

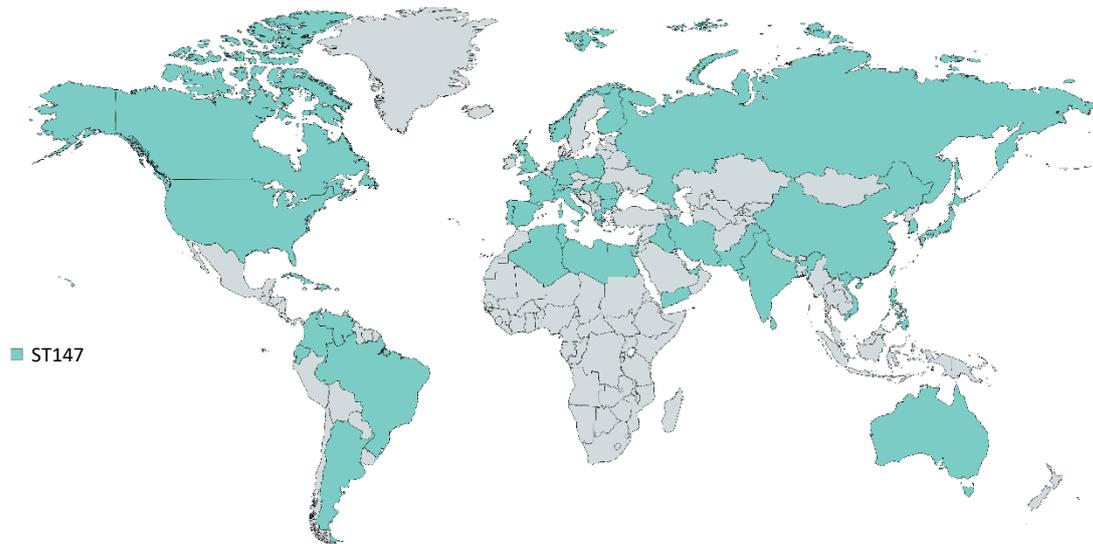


Figura 30. Distribución mundial de *Klebsiella pneumoniae* ST147.

Los ST11, ST15 y ST147 fueron descritos por primera vez en el año 2005 (año de publicación del esquema MLST para este microorganismo) en Hungría, Austria y Hungría, respectivamente. Como podemos observar la diseminación al resto de Europa y a otros continentes ha sido rápida, encontrándose relacionados con beta-lactamasas de espectro extendido (como en nuestro caso), carbapenemasas u otros mecanismos de resistencia.

El ST437, asociado en nuestro centro con un importante brote en la unidad de medicina intensiva, fue descrito por primera vez en el año 2010 en Brasil y posteriormente se ha encontrado en países europeos y asiáticos, como puede observarse en la **Figura 31**. En España este ST fue descrito por primera vez por Oteo *et al.* (181) en el año 2013 ligado a la producción de carbapenemasas tipo OXA-48-*like*, aunque también se ha relacionado con carbapenemasas de tipo NDM (77,182).

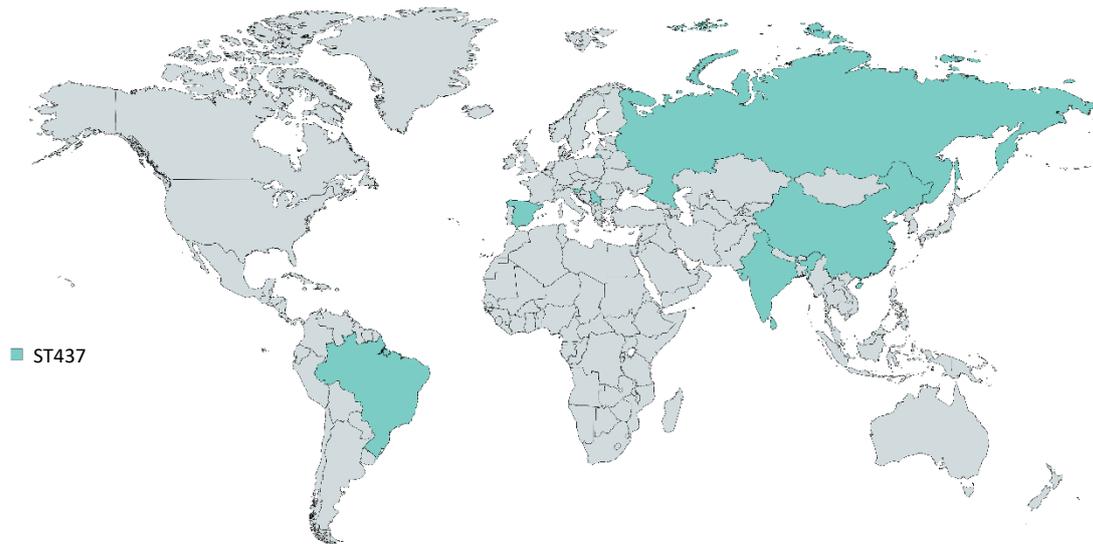


Figura 31. Distribución mundial de *Klebsiella pneumoniae* ST437.

En esta tesis se han encontrado varios STs no descritos hasta la fecha: ST2721, ST2722 y ST2850, todos ellos aislados únicamente en un paciente. Además se han detectado varios STs que a pesar de estar previamente descritos son, por lo publicado hasta la fecha, no frecuentes: ST33 (descrito en 2005 en Francia) y ST403 (descrito en 2009 en Senegal), ambos no encontrados en la literatura científica disponible, el ST471 descrito en 2010 en Dinamarca y únicamente encontrado en el trabajo de Saidani *et al.* del año 2018 en el que se le relacionaba como agente causal de mastitis en ganado bovino en Túnez (183) (como en nuestro caso, las cepas eran productoras de BLEE de tipo CTX-M-15), y el ST449 descrito por primera vez en 2010 por el Centro Nacional de Microbiología (aislado procedente de Gerona) y posteriormente descrito en Brasil. Otros STs detectados, como el ST405, el ST307 y el ST39, a pesar de estar distribuidos mundialmente no son considerados hasta el momento como clones de alto riesgo.

Observamos que varios de los ST detectados, como el 11, 15, 147 y 307 están presentes en más de un perfil obtenido mediante PFGE, pero como incapaces de determinar, con las herramientas de que disponemos, si estos perfiles pudieran estar directamente relacionados.

Si bien todas estas técnicas ayudan al microbiólogo clínico a estudiar la diversidad clonal de un microorganismo ante la sospecha de un brote epidemiológico, esta presunción suele estar fundada en un acúmulo de casos, detectados a través de los cultivos tradicionales, sean de muestras de infección o colonización, por una bacteria que suele presentar el mismo fenotipo en el antibiograma, por lo que consideramos que la bacteriología clásica sigue teniendo cabida e importancia, y constituye el punto de partida de los estudios de brotes a través de las primeras alertas.

Aunque el fenotipo en el antibiograma de las cepa del ST437 causante del brote nosocomial muestra la presencia de una BLEE y se había sugerido que no se trataba de una enzima de tipo CTX-M por el mayor grado de hidrólisis de ceftazidima y aztreonam que frente a ceftriaxona (184), el mecanismo exacto de resistencia fue determinado mediante estudios de biología molecular, identificando la presencia de una BLEE de tipo SHV. Desde la descripción de esta enzima en los años 80, se han caracterizado hasta la actualidad más de 100 tipos de SHV (185), describiéndose brotes nosocomiales causados por *K. pneumoniae* con este mecanismo de resistencia, habitualmente asociado a otras β -lactamasas (85,186–191).

Dentro del grupo de las β -lactamasas de tipo SHV encontramos tres grandes bloques según sus características moleculares y propiedades funcionales: a) aquellas capaces de hidrolizar penicilinas y primeras cefalosporinas (cefalotina y cefaloridina) y fuertemente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam, enmarcadas dentro del subgrupo 2b de la clasificación de Bush-Jacoby, b) β -lactamasas de amplio espectro incluidas en el grupo 2br que tienen resistencia adquirida al ácido clavulánico, y c) β -lactamasas incluidas en el subgrupo 2be, que son capaces de hidrolizar antibióticos oximino- β -lactámicos (192) y son las consideradas β -lactamasas de espectro extendido. Entre el primer y último grupo podemos encontrar incluso una única variación en la secuencia aminoácidica, y si bien la mayoría de sustituciones observadas en las β -lactamasas de espectro extendido de tipo SHV respecto a SHV-1 no afectan directamente a la capacidad hidrolítica de estas proteínas, si que resultan en la mejora o relajación del centro activo, permitiéndole reaccionar de una forma más eficiente con oximino- β -lactámicos (192). Por tanto, para identificar una β -lactamasa de tipo SHV como una β -lactamasa de espectro extendido es necesario realizar la secuenciación del gen *bla_{SHV}*. La mayoría de BLEE de tipo SHV presentan las sustituciones G238S y E240K. La mutación G238S conduce a una expansión del centro activo que mejora la unión y la acomodación de cefalosporinas de 3ª generación como cefotaxima y, en menor medida, ceftazidima (192). Esta sustitución se encuentra presente en todas las BLEE de tipo SHV encontradas en esta tesis (SHV-2, SHV-7 y SHV-12). Otra sustitución importante, E240K, permite una unión electrostática del centro activo con los residuos oximino de ceftazidima y aztreonam, facilitando su adecuado posicionamiento dentro de la β -lactamasa (192), esta sustitución se encuentra en dos de las tres BLEE de tipo SHV detectadas (SHV-7 y SHV-12). Otros polimorfismos que se encuentran en estas BLEE son I8F y R43SG en el caso de SHV-7, y L35Q en el caso de SHV-12.

Sin embargo, la distribución de los tipos de BLEE observada en este estudio, pues de los clones estudiados en 13 de 21 se detectó la presencia de una BLEE de tipo CTX-M grupo 1 y en 3 una BLEE de tipo CTX-M grupo 9, corrobora el cambio observado en la epidemiología de las

BLEE a nivel mundial, detectándose con mayor frecuencia enzimas de tipo CTX-M frente a las tradicionales TEM y SHV, en gran parte debido a la emergencia y diseminación de la enzima de tipo CTX-M-15 (193), presente en 10 de los 21 clones de nuestro estudio. La diseminación del gen que codifica esta enzima, *bla*_{CTX-M-15}, parece estar ligada a la transferencia de plásmidos con una estructura más o menos próxima y a la circulación de clones que presentan este mecanismo de resistencia (185), un ejemplo de ello es la diseminación de *E. coli* productor de CTX-M-15 perteneciente al ST131 y al grupo filogenético B2 que ha sido identificado como el predominante en muchos países, constituyendo un reservorio genético de esta β -lactamasa para otras especies, como *K. pneumoniae* (34). A diferencia de lo observado en los brotes causados por enterobacterias productoras de BLEE de tipo SHV o TEM que parecían restringirse a unidades específicas y tenían una mortalidad alta, los causados por enterobacterias productoras de CTX-M se distribuyen ampliamente en hospitales y parecen presentar una mortalidad menor (34). Este cambio epidemiológico en España se hace patente en el trabajo realizado por Oteo *et al.*, en el que se estudiaron cepas representativas de brotes causados por *Klebsiella pneumoniae* acaecidos en el año 2008 en cinco hospitales españoles, encontrando en todos los casos BLEE de tipo CTX-M-15, asociada a otros mecanismos de resistencia como OXA-1 o enzimas modificantes de aminoglucósidos (194).

Mucho se ha publicado acerca de la utilidad de las penicilinas asociadas a inhibidores como amoxicilina/ácido clavulánico o piperacilina/tazobactam en el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de BLEE, encontrando defensores de estos fármacos (195) y claros detractores que encuentran una mayor mortalidad asociada frente al tratamiento con carbapenemas (56), sin embargo en nuestro estudio se analizó la presencia de β -lactamasas de tipo OXA-1 que pudieran explicar la baja sensibilidad observada a estos fármacos (26,8%) encontrando su presencia en más del 70% de los aislados. En el trabajo publicado por Livermore *et al.* en 2019 en el que se analizaban cepas de *Escherichia coli* productoras de BLEE causantes de bacteriemia se encontró la presencia de β -lactamasas de tipo OXA-1 en más del 50% de los casos, asociándose a una elevación en las CMIs de estos antibióticos, por lo que los autores suscitan que la pregunta “¿Son las penicilinas asociadas a inhibidores activas frente a enterobacterias productoras de BLEE?” se encuentra fuera de lugar y la pregunta correcta sería “¿Mi aislado productor de BLEE produce también OXA-1?”, considerando que la presencia de esta β -lactamasa inclinaría la balanza al uso de carbapenema en el paciente grave (196).

La posible asociación de β -lactamasas AmpC plasmídicas en cepas productoras de BLEE, como la asociación de DHA y CTX-M-3 encontrada en uno de los perfiles de este estudio, es un hecho poco frecuente o poco demostrado en parte debido a que las β -lactamasas AmpC

plasmídicas se encuentran mucho menos extendidas que las BLEE, sin embargo Jacoby señala que las cepas productoras de AmpC plasmídica a menudo también presentan β -lactamasas de espectro extendido (197).

A pesar de la multitud de artículos que indican la cada vez más frecuente detección de carbapenemasas en enterobacterias (198) y su implicación en brotes nosocomiales en nuestro país (186,199), entre las 148 cepas estudiadas únicamente se ha encontrado 8 casos de disminución de sensibilidad a carbapenemas, 3 de ellos asociados al brote de *Kpn1*. Únicamente en las dos cepas pertenecientes al perfil 20 se detectó la presencia de carbapenemasas de tipo VIM, y la adquisición podría de esta cepa productora de carbapenemasa podría estar ligada a la estancia previa en otro hospital del primer paciente en el que se detectó este clon. El mecanismo de resistencia a carbapenemas en el resto de cepas con disminución de sensibilidad a carbapenemas podría deberse a la asociación de las β -lactamasas presentes (BLEE y/o AmpC) junto con una pérdida de alguna de las porinas presentes en la membrana externa: OmpK35 u OmpK36, como ya se ha descrito previamente en la literatura científica (200–202). Debemos recordar que en el periodo de estudio analizado en la UCI de nuestro centro la presencia de carbapenemasas resultaba un hecho excepcional, a semejanza del 1,65% de incidencia de colonización por enterobacterias productoras de carbapenemasas observado por Oteo *et al.* en unidades de críticos españolas y publicado en fechas semejantes (203).

En nuestro estudio se detectó la presencia de cepas que podrían presentar una disminución de sensibilidad a colistina por la ausencia del halo de inhibición con una tableta de colistina de 10 μ g, por lo que se decidió analizar la presencia de genes *mcr*, no encontrando este determinante de resistencia en ningún caso. En la actualidad, afortunadamente, en España este mecanismo de resistencia no parece encontrarse ampliamente diseminado en seres humanos, encontrando muy pocos trabajos en los que se haya detectado resistencia mediada por este mecanismo en nuestro país en muestras clínicas (204,205), si bien, cabe señalar que este gen se ha detectado en *Escherichia coli* en tres pacientes hematológicos de nuestro centro entre los años 2014 y 2015 (206).

En Asia el patotipo hipervirulento asociado a determinados serotipos capsulares, como K1, K2 o K5 es frecuente y se encuentra ligado fundamentalmente al CC23 y CC82 (207), en Europa este patotipo sigue siendo poco frecuente aunque algunos autores han reseñado casos esporádicos en algunos países como España (17). Este patotipo no suele asociarse a multirresistencia, sugiriéndose que los plásmidos de multirresistencia pueden no ser capaces de mantenerse en cepas hipervirulentas (208), aunque este hecho no acaba de ser bien explicado.

En nuestro caso el serotipo capsular K1 se encontraba ligado al ST11 y al ST307, no habitualmente relacionados con hipervirulencia y sí con multirresistencia (estas cepas eran productoras de CTX-M-1 y OXA-1, y CTX-M-15 y TEM-1, respectivamente). El serotipo capsular K2 se detectó en un clon perteneciente al ST39 productor de BLEE de tipo CTX-M-15 y las β -lactamasas TEM-1 y OXA-1, hecho también poco frecuente, ya que este serotipo se relaciona en muchos casos con el CC14, aunque a diferencia de K1 en el CC23, es habitual detectarlo en otros STs (207). En España, Cubero *et al.* estudiaron los episodios de bacteriemia causada por cepas hipermucoviscosas de *Klebsiella pneumoniae*, encontrando 53 de entre 878 aislados, en su caso las 16 cepas detectadas con serotipo K1 pertenecían al CC23, mientras que las 9 asociadas a K2 pertenecían a 5 STs diferentes (ST380, 86, 65, 25 y 493) (209).

Al analizar los resultados de sensibilidad por perfiles encontramos que muchos de ellos presentaban resistencia a quinolonas, cotrimoxazol o aminoglucósidos. La resistencia a aminoglucósidos se encuentra ligada habitualmente a la producción de enzimas modificantes de antibióticos, cuyos genes suelen encontrarse vehiculados en elementos genéticos móviles que contienen otros determinantes de resistencia, como β -lactamasas de espectro extendido, por lo que es habitual encontrar en cepas productoras de BLEE resistencia a aminoglucósidos (210). En el trabajo publicado por Fernández-Martínez *et al.* en el que se realizaba la caracterización molecular de mecanismos de resistencia a aminoglucósidos de los aislados productores de BLEE de los dos estudios nacionales de los años 2000 y 2006, se encontró que hasta el 74,8% de los aislados de *K. pneumoniae* presentaban resistencia al menos a un aminoglucósido, y que el 82,7% de los aislados portaban genes que codificaban enzimas modificantes de aminoglucósidos (211). En nuestro caso únicamente el 13,4% de los aislados presentaba sensibilidad a tobramicina y el 16,7 a gentamicina, mientras que la amikacina era el aminoglucósido que presentaba mayor sensibilidad, resultado similar al observado por Fernández-Martínez (211).

En esta tesis se encontró un 7,4% de sensibilidad a ciprofloxacino, este bajo porcentaje puede deberse a fenómenos de selección asociados a mutaciones en la ADN girasa o topoisomerasa, a la presencia de elementos genéticos móviles que incorporan determinantes de resistencia transmisibles a quinolonas, como los genes *qnr* o *aac(6')-Ib-cr*, a bombas de expulsión o a mecanismos mixtos. En el caso de los genes *qnr* suelen encontrarse en plásmidos de multirresistencia unidos a otros determinantes de resistencia como β -lactamasas de espectro extendido, β -lactamasas tipo AmpC o carbapenemasas, mientras que el gen *aac(6')-Ib-cr* suele encontrarse en un cassette formando parte de un integron o un plásmido de multirresistencia, siendo frecuente su asociación con la BLEE CTX-M-15 y la secuencia de inserción IS26 (212).

Según el estudio nacional publicado en el año 2011, la sensibilidad a ciprofloxacino en *K. pneumoniae* en cepas productoras de BLEE cayo del 88,5% del año 2000 al 37,8% del año 2006, lo que los autores atribuyen en parte a la diseminación del gen *aac(6′)-Ib-cr* (53).

Centrándonos en la cepa asociada al brote en estudio, *Kpn1*, los determinantes de resistencia hallados justificaban la resistencia combinada a β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos, presentando una fenotipo de multirresistencia frecuente en las de cepas de *K. pneumoniae* productora de BLEE. Según los datos del ECDC el porcentaje de cepas invasivas que presentaban resistencia a cefalosporinas de 3ª generación variaba entre el 13,4% y el 18% entre 2011 y 2014 y el porcentaje de cepas con resistencia combinada a cefalosporinas de 3ª generación, quinolonas y amiglucósidos variaba entre el 8,3% y 10,1%, por lo que más del 50% de los aislados invasivos con resistencia a cefalosporinas de 3ª generación presentaban también resistencia a los otros dos grupos de antibióticos. En el trabajo de Fernández-Martínez *et al.* el gen *aac(6′)-Ib-cr*, detectado en *Kpn1* y asociado a resistencia en aminoglucósidos y quinolonas se encontraba presente en el 41,9% de los aislados (211). En este mismo trabajo se demostraba la presencia de más de un gen de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en el 37,3% de los aislados de *K. pneumoniae* BLEE, al igual que en *Kpn1* en la que se detectaban hasta cuatro genes que codifican este tipo de enzimas.

Los estudios de secuenciación genómica sin lugar a dudas permiten entender y explicar mejor los fenómenos de resistencia antibiótica que encontramos en cepas clínicas, ya que las técnicas de PCR y secuenciación tradicionales implican una búsqueda intencionada de un determinante de resistencia, sin embargo es fundamental el desarrollo de flujos de trabajo adecuados para el ensamblaje correcto de las lecturas obtenidas y su adecuada anotación, ya que como se ha puesto de manifiesto en este trabajo con SHV-12 en *Kpn1* un ensamblaje inadecuado llevaría a falsos negativos en determinados determinantes de resistencia. Este fenómeno se pone de manifiesto en el trabajo publicado por Doyle *et al.* en el que se analizaban los mismos datos de secuenciación genómica por parte de 9 equipos participantes diferentes, observando hasta un 20% de falsos positivos y un 14% de falsos negativos cuando se comparaba la predicción en la resistencia antibiótica con los estudios de sensibilidad fenotípicos (213).

La importancia clínica de los datos epidemiológicos y microbiológicos presentados radica en que condicionan la evolución y pronóstico de los pacientes ingresados en las UCI. Por tanto, es necesario que se analicen en mayor profundidad las características de los enfermos que se han colonizado o han desarrollado infección por *K. pneumoniae* productora de BLEE durante su estancia en estas unidades.

5.3. Estudio poblacional

La población analizada en el estudio colonizada por el clon *Kpn1* presenta una serie de características diferenciales respecto a la población general que ingresa en la UCI de nuestro hospital: se trata de un grupo de pacientes más jóvenes (mediana de edad 57 años frente a la general de 63 años), presentan mayores valores en las escalas de gravedad (APACHE II de 21,0 frente a 17,6 y SAPS 3 de 67,0 frente a 53,3), tiene estancias más prolongadas que la mediana de la población (17 días frente a 3 días de la población de UCI) así como una elevada frecuencia de comorbilidades, y unos porcentajes en cuanto a los factores de riesgo para la colonización por microorganismos MR nada desdeñables, por ejemplo, el 40,6% de los pacientes había recibido un tratamiento antibiótico en los últimos 90 días. No se observaron diferencias respecto al sexo (65,6% varones respecto al 64,9% de la población de UCI en el periodo de estudio).

Si comparamos los datos poblacionales obtenidos de los pacientes colonizados por el clon *Kpn1* con la población de las UCIs españolas descrita en los estudios ENVIN 2011-2014 (8–11) también encontramos que nuestra población es más joven (mediana de edad 57 años frente a los 66 de los estudios ENVIN) y presenta un índice de gravedad APACHE II muy superior al de la población ingresada en las UCIs españolas, así mismo el porcentaje de pacientes que presenta factores de riesgo al ingreso para la colonización o infección por bacterias multirresistentes y la presencia de dispositivos invasivos es también superior (**Tabla 51**), además la estancia en la unidad se multiplica por más de cuatro y la mortalidad por tres, todos estos factores pueden considerarse que son causa o consecuencia de la colonización por microorganismos multirresistentes.

En el análisis univariante del estudio de casos y controles encontramos que padecer diabetes mellitus, haber recibido tratamiento con carbapenemas o quinolonas, la colonización por otro microorganismo, requerir nutrición parenteral, catéter venoso central o sonda urinaria resultaban factores protectores de la colonización por *Kpn1*. A revisar la literatura, muchos estudios demuestran la asociación de diabetes mellitus con un mayor riesgo de procesos infecciosos debido a la alteración de la respuesta inmune (214) o con la presencia de un patotipo hipervirulento de *Klebsiella pneumoniae* (215), sin embargo en este trabajo constituye un factor protector de la colonización por este clon de *Klebsiella pneumoniae* en particular, y ello podría deberse a que los pacientes que presentan diabetes mellitus tienen ya un riesgo incrementado de colonización por microorganismos multirresistentes antes de ingresar en la UCI, que podrían estar ocupando el nicho ecológico de *Kpn1*.

Tabla 51. Comparación población de las UCIs españolas 2011-2014 (estudios ENVIN) con la población colonizada o infectada por *Kpn1*.

	ENVIN 2011	ENVIN 2012	ENVIN 2013	ENVIN 2014	<i>Kpn1</i>
Mediana de edad (años)	66	66	66	66	57
% hombres	65,94	65,4	64,6	65,4	65,6
Media APACHE II	14,82	14,78	14,57	14,61	21,02
Antibioterapia previa (%)	21,28	21,6	21,75	21,69	40,6
Cirugía previa (%)	28,20	29,7	31,19	31,07	45,3
Diabetes mellitus (%)	-	-	23,4	25,48	18,8
Insuficiencia renal (%)	-	-	10,67	11,65	12,5
Inmunodepresión (%)	-	-	7,72	7,50	10,9
Neoplasia (%)	-	-	13,38	15,07	14,1
Cirrosis (%)	-	-	3,54	3,61	4,7
EPOC (%)	-	-	11,71	13,34	20,3
Trasplante de órgano sólido (%)	-	-	1,39	1,49	4,7
Neutropenia (%)	1,18	1,12	1,59	1,38	3,1
Cateter venoso central (%)	64,7	64,2	63,12	62,2	90,6
Ventilación mecánica (%)	43,4	42,6	41,9	41,73	75,0
Sonda urinaria (%)	72,5	72,5	73,2	72,84	92,2
Derivación ventricular externa (%)	1,64	1,61	1,66	1,65	7,8
Mediana estancia (días)	4	4	4	4	17
Mortalidad (%)	10,61	10,66	9,73	9,60	32,8

Como es lógico, el tratamiento con carbapenemas disminuye el riesgo de colonización por *Kpn1* ya que constituye una de las limitadas alternativas de tratamiento para la infección causada por este microorganismo, sin embargo la asociación protectora con fluoroquinolonas no esta tan clara debido a la resistencia que presenta *Kpn1* a este grupo de antibióticos, es más algunos autores asocian el consumo de quinolonas con una alta prevalencia de *K. pneumoniae* productora de BLEE (216), posiblemente debido a la resistencia cruzada con este grupo de antibióticos.

Según el estudio univariante, la colonización por otros microorganismos multirresistentes, especialmente otro clon de *Klebsiella pneumoniae* BLEE, parecía proteger frente a la colonización por *Kpn1*, este hecho podría deberse a la ocupación del mismo nicho ecológico, aunque también hay trabajos que demuestran que la microbiota presente en el tracto digestivo puede incrementar la resistencia a la colonización por microorganismos MR (217), lo que explica que se considere al trasplante fecal como una posible opción terapéutica para la colonización por estos microorganismos (218).

Analizando la literatura, la presencia de dispositivos incrementa el riesgo de colonización por microorganismos multirresistentes, sin embargo en nuestro trabajo, los días de cateterización venosa central o sondaje urinario y la necesidad de nutrición parenteral resultan factores protectores (166), lo que es explicable por el tipo de análisis realizado ya que se recogen

los datos hasta que se produce el evento en estudio (la colonización) y en los controles este hecho no se produce durante su estancia en la UCI. La necesidad de cirugía también constituye un factor de riesgo para la colonización según nuestro análisis, lo que refrenda lo encontrado en la literatura (219,220).

Al realizar el estudio multivariante, el único factor que realmente protege de la colonización por *Kpn1* es el tratamiento con carbapenemas, aunque pueda incrementar el riesgo de colonización/infección por bacterias resistentes a este grupo de antibióticos (221).

En una época en la que los microorganismos MR ya no se encuentran ligados a un ámbito puramente nosocomial (222,223), la realización de cultivos de vigilancia a todos los pacientes desde el ingreso en UCI permitiría diferenciar claramente si la detección posterior de colonización o infección por una bacteria MR es realmente de adquisición intrahospitalaria, asociada a cuidados sanitarios o comunitaria. La mejor definición de estos hechos permitiría, a su vez, ajustar mejor el tratamiento empírico en caso de sospecha clínica de infección y detectar con una mayor rapidez un brote hospitalario en estas unidades de pacientes críticos. En el estudio de Harris *et al.* (115), realizado desde 2001 a 2005, en el que se analizaba la tasa de colonización por bacterias productoras de BLEE al ingreso en UCI, se detectó un 2% de pacientes colonizados, mientras que el trabajo de Ajao *et al.* (224), estudiando un periodo más largo (desde el año 2001 a 2009), se detectó un 4%. Estas cifras, tras la diseminación global observada de mecanismos de resistencia en enterobacterias, posiblemente sean superiores en la actualidad.

Entre los principales objetivos del estudio, otro de ellos era determinar si existía algún factor previo o presente en el momento de la colonización que pudiera estar relacionado con el posterior desarrollo de infección en los pacientes colonizados por el clon asociado al brote. Así, aunque en el análisis univariante diversos factores parecían influir en este evento, en el análisis multivariante no se halló ningún modelo adecuado que predijera el desarrollo de infección en los pacientes colonizados. Sin embargo, según la literatura, el uso de dispositivos (catéteres vasculares, tubo endotraqueal, sonda nasogástrica, sonda urinaria, derivación ventricular externa, etc.) presenta una clara asociación con el desarrollo de infección (225), íntimamente relacionado en muchos casos con la presencia de biopelículas (226). No obstante, estos hechos no pudieron ser observados en este trabajo probablemente debido al escaso tamaño muestral, aunque en 9 de las 17 infecciones diagnosticadas se encontró relación con el uso de dispositivos.

5.4. Búsqueda de reservorio ambiental y estudio de portadores

El elevado número de casos de colonización/infección asociados al brote (64 pacientes afectados) está relacionado con la dilatada duración temporal del mismo, que podría explicarse por la detección de un posible y cercano reservorio ambiental del microorganismo, como fue la pila de la zona sucia de uno de los *boxes* (nº 2) en UCI, aunque el principal reservorio de esta bacteria se consideró que era el propio tracto gastrointestinal de los pacientes colonizados. Algunos autores han demostrado recientemente la presencia de un reservorio ambiental para *K. pneumoniae* causante de brote epidémico (227,228), y en ambos trabajos se asociaba a sistemas de drenaje de agua.

La técnica de la gasa estéril utilizada para el muestreo ambiental en este estudio ha demostrado un mayor rendimiento en la recuperación de microorganismos, como *Acinetobacter baumannii*, que el simple hisopado de superficies (229), a pesar de no considerarse el método de elección sugerido por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

La detección de un portador entre el personal sanitario, que en el momento del muestreo acababa de estar en contacto con uno de los pacientes colonizados, no hace más que reforzar la importancia del seguimiento estricto de las precauciones de contacto en todo momento, y más aun en situación de brote. El método microbiológico para el estudio de portadores en nuestro contexto, la impresión de los dedos en placas de agar, fue seleccionado por su sencillez, además de ser una de las técnicas recomendadas por la SEIMC; no obstante, otras técnicas [como la inmersión de las manos en bolsas con caldo de cultivo (BHI)] han demostrado una mayor rentabilidad diagnóstica (230) .

5.5. Medidas de vigilancia y control

La existencia de un ECIN en el centro y la presencia activa de un representante de la UCI especialmente comprometido en la implantación y seguimiento de las medidas de control del brote acordadas, condujo a la reducción progresiva del número de pacientes colonizados, lo que demuestra la trascendencia y eficacia del trabajo en equipo multidisciplinar para la vigilancia y el control de la infección nosocomial. Muchos estudios refrendan que las medidas de control basadas en el trabajo multidisciplinar se han demostrado eficaces en la lucha contra los brotes causados por bacterias multirresistentes (231,232). El papel del microbiólogo clínico dentro de los equipos de control de infección nosocomial es fundamental, ya que son ellos los que en un

primer momento detectan la colonización o infección por microorganismos multirresistentes, dando la alerta al resto del equipo (233).

La higiene de manos continua siendo la piedra angular en la prevención de la transmisión de bacterias multirresistentes. En el trabajo recientemente publicado por Kovacs-Litman *et al.* se pone de manifiesto el importante papel de la higiene de manos en la prevención de brotes y se reseña el hecho de que tras la aparición de un brote se observa una mejoría en el cumplimiento de ésta (234).

Los estudios de vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes permiten la identificación precoz de los pacientes colonizados y la puesta en marcha de medidas para evitar la transmisión, disminuyendo el riesgo de colonización del resto de pacientes y el posterior desarrollo de infección. En este trabajo observamos que gran parte de los pacientes presentaba cultivos de vigilancia epidemiológica positivos sin muestras clínicas positivas, por lo que constituían un reservorio que, sin la realización de vigilancia activa, hubiera permanecido oculto facilitando el incremento de las infecciones nosocomiales.

El aislamiento de contacto de los pacientes colonizados por bacterias multirresistentes es una de las estrategias frecuentemente utilizadas para reducir la transmisión de estos microorganismos, siendo una de las principales medidas que se establecen en las guías, pero en algunas ocasiones el aislamiento del paciente conlleva a un deterioro de la atención sanitaria por la disminución de las entradas en la habitación por parte del personal sanitario.

Una de las medidas más controvertidas para la erradicación de bacterias multirresistentes en el tracto digestivo de los pacientes colonizados es la administración de soluciones de descontaminación digestiva selectiva, que contienen diferentes antibióticos, entre los que cabe reseñar colistina. En nuestro trabajo se ha observado en algunos casos la aparición de resistencia a este antibiótico en *K. pneumoniae* BLEE sin poder asegurar que se deba a la administración de esta mezcla de antibióticos. Según el trabajo de Silvestri *et al.* la administración de DDS constituye una herramienta útil para la prevención de infecciones graves y reducir la mortalidad en pacientes críticos (127) sin embargo otros autores resaltan la rápida aparición de resistencia a colistina tras la administración de DDS (128).

5.6. Limitaciones del estudio

- A pesar de que con el estudio realizado se ha logrado caracterizar la epidemiología de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasa de espectro extendido, sería necesario prolongar el estudio para conocer su evolución teniendo en cuenta que en años siguientes se produjo la emergencia de la carbapenemasa OXA-48 en cepas de *K. pneumoniae* BLEE.
- La realización de técnicas de secuenciación genómica en todas las cepas incluidas en el estudio hubiera aportado una mayor información acerca de los mecanismos de resistencia y factores de virulencia presentes en *K. pneumoniae*, y hubiera contribuido a establecer la cadena de transmisión en *Kpn1*, que debido al elevado número de casos es desconocida.
- La realización del análisis estadístico del estudio de casos y controles ha resultado compleja debido al diferente tiempo de exposición a determinados factores que podrían constituir de riesgo para la colonización por *Kpn1* entre los casos (hasta el desarrollo del evento que los caracteriza como tales, la colonización) y los controles (toda la estancia en UCI).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- El estudio realizado ha permitido corroborar la existencia de hasta 21 clones circulantes y hasta 4 brotes activos de *Klebsiella pneumoniae* BLEE en la unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.
- La realización de PFGE ha resultado esencial para conocer la epidemiología de la unidad, y se ha observado que las técnicas de Rep-PCR o RAPD no han resultado de utilidad en este estudio.
- Si bien se han detectado los clones de alto riesgo ST11 y ST147 entre los causantes de brotes en esta unidad, el brote que afectó a un mayor número de pacientes fue causado por el ST437, no considerado como clon de alto riesgo en la actualidad.
- Se han descrito tres nuevos secuenciotipos de *K. pneumoniae*: 2721, 2722 y 2850, que han sido incluidos en la base de datos del Instituto Pasteur.
- La caracterización de β -lactamasas de espectro extendido realizada en este estudio es un fiel reflejo de la epidemiología de nuestro país, ya que CTX-M-15, CTX-M-3 y SHV-12 han sido las BLEE detectadas con mayor frecuencia.
- La presencia de OXA-1 en más del 70% de los aislados de *K. pneumoniae* productora de BLEE y el 26,8% de sensibilidad a piperacilina/tazobactam, obliga a descartar a este antibiótico como tratamiento en las infecciones causadas por este microorganismo.
- A pesar de la gran cantidad de información generada mediante la secuenciación genómica, el adecuado análisis de los datos es fundamental para interpretar correctamente los resultados.
- En el estudio de casos y controles se establece como único factor protector para la colonización por *Kpn1* el tratamiento con carbapenemas, no encontrándose ningún factor de riesgo demostrado entre las variables analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. The Genus *Klebsiella*: Taxonomic History and Structure. In: Rosenberg E, Stackenbrandt E, Thompson F, Lory S, Delong E, editors. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Third. Singapore: Springer; 2006. p. 159–96.
2. Farmer J, Boatwright K, Michael Janda J. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, Pfaller M, editors. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington D.C.: ASM Press; 2007. p. 649–69.
3. Sociedad Española de Medicina Preventiva. Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España. EPINE [Internet]. 2011; Available from: <http://hws.vhebron.net/epine/>
4. Sociedad Española de Medicina Preventiva. Estudio EPINE-EPPS 2014 Informe global de España Resumen. EPINE [Internet]. 2014; Available from: <http://hws.vhebron.net/epine/>
5. Sociedad Española de Medicina Preventiva. Estudio EPINE-EPPS 2016: Informe global de España. Resumen provisional. [Internet]. Vol. 2016, EPINE. 2016. Available from: <http://hws.vhebron.net/epine/>
6. Sociedad Española de Medicina Preventiva. Estudio EPINE-EPPS 2017: Informe global de España Resumen. [Internet] Vol. 2017, EPINE. 2017. Available from: <http://hws.vhebron.net/epine/>
7. Cartelle M, Tomas M del M, Pertega S, Beceiro A, Dominguez MA, Velasco D, *et al.* Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4242–9.
8. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva ENVIN HELICS Informe 2011. 2012.
9. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva ENVIN HELICS Informe 2012. 2013.
10. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva ENVIN HELICS Informe 2013. 2014.
11. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva ENVIN HELICS Informe 2014. 2015.
12. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva ENVIN HELICS Informe 2015. 2016.
13. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva ENVIN HELICS Informe 2016. 2017.

14. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva ENVIN HELICS Informe 2017. 2018.
15. Sociedad Española de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias. Estudio nacional de vigilancia de infección nosocomial en servicios de medicina intensiva ENVIN HELICS Informe 2018. 2019.
16. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):629–61.
17. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha C-J, *et al.* Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(November).
18. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin Infect Dis.* 2004;39(3):309–17.
19. Scheuerman O, Schechner V, Carmeli Y, Gutiérrez-Gutiérrez B, Calbo E, Almirante B, *et al.* Comparison of Predictors and Mortality between Bloodstream Infections Caused by ESBL-Producing *Escherichia coli* and ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2018;39(6):660–7.
20. Kim D, Park BY, Choi MH, Yoon EJ, Lee H, Lee KJ, *et al.* Antimicrobial resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* affecting 30 day mortality in patients with bloodstream infection. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(1):190–9.
21. Fais T, Delmas J, Barnich N, Bonnet R, Dalmaso G. Colibactin: More than a new bacterial toxin. *Toxins (Basel).* 2018;10(4):16–8.
22. Li J, Ren J, Wang W, Wang G, Gu G, Wu X, *et al.* Risk factors and clinical outcomes of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(4):679–89.
23. Rossolini GM, Mantengoli E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(SUPPL. 6):2–8.
24. Sonnevend Á, Ghazawi A, Hashmey R, Haidermota A, Girgis S, Alfaresi M, *et al.* Multihospital occurrence of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 147 with an ISEcp1-Directed blaOXA-181 Insertion in the mgrB Gene in the United Arab Emirates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7):1–9.
25. Chen L, Todd R, Kiehlbauch J, Walters M, Kallen A. Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* - Washoe County, Nevada, 2016. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66(1):33.
26. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268–81.
27. Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, *et al.* La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(10):666–70.

28. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):440–58.
29. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May;289(1036):321–31.
30. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(SUPPL. 1):3–10.
31. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969–76.
32. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211–33.
33. Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases : Definition , Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.* 2015;17:11–22.
34. Calbo E, Garau J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: The CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiol.* 2015;10(6):1063–75.
35. Evans BA, Amyes SGB. OXA Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):241–63.
36. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(5):962–9.
37. Miró E, Mirelis B, Navarro F, Rivera A, Mesa RJ, Roig MC, *et al.* Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1152–5.
38. Danel F, Hall LMC, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 1995;35:281–94.
39. Akinci E, Vahaboglu H. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(11):1251–8.
40. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(3):573–81.
41. Zhou K, Yu W, Shen P, Lu H, Wang B, Rossen JWA, *et al.* A novel Tn1696-like composite transposon (Tn6404) harboring bla IMP-4 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate carrying a rare ESBL gene bla SFO-1. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–7.
42. Fernández A, Pereira MJ, Suárez JM, Poza M, Treviño M, Villalón P, *et al.* Emergence in Spain of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum β -lactamase. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):822–8.
43. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended- spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):622–32.
44. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Euro Surveill Bull Eur sur les Mal Transm = Eur Commun Dis Bull.* 2008 Nov;13(47).

45. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(4):587–604.
46. Díaz MÁ, Hernández JR, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual Á. Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Nov;27(9):503–10.
47. Cantón R, Loza E, Aznar J, Barrón-Adúriz R, Calvo J, Castillo FJ, *et al*. Antimicrobial susceptibility trends and evolution of isolates with extended spectrum β -lactamases among Gram-negative organisms recovered during the SMART study in Spain (2011-2015). *Rev Española Quimioter*. 2018;31(2):136–45.
48. Diestra K, Coque TM, Miro E, Oteo J, Nicolau CJ, Campos J, *et al*. [Characterization and molecular epidemiology of ESBL in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in 11 Spanish hospitals (2004)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(7):404–10.
49. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, *et al*. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012 May;18(5):413–31.
50. Paterson DL, Ko W-C, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, *et al*. International prospective study of Klebsiella pneumoniae bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial infections. *Ann Intern Med*. 2004 Jan;140(1):26–32.
51. Hernández JR, Pascual A, Cantón R, Martínez-Martínez L. Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003;21(2):77–82.
52. Hernández JR, Martínez-Martínez L, Cantón R, Coque TM, Pascual A. Nationwide Study of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Producing Extended-Spectrum β - Lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):2122–5.
53. Ruiz de Alegría C, Rodríguez-Baño J, Cano ME, Hernández-Bello JR, Calvo J, Román E, *et al*. Klebsiella pneumoniae strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: microbiological and clinical features. *J Clin Microbiol*. 2011 Mar;49(3):1134–6.
54. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, *et al*. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):165–74.
55. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008 Mar;8(3):159–66.
56. Harris PNA, Tambyah PA, Lye DC, Mo Y, Lee TH, Yilmaz M, *et al*. Effect of Piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-Day Mortality for Patients With E coli or Klebsiella pneumoniae Bloodstream Infection and Ceftriaxone Resistance A randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2018;320(10):984–94.
57. Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, Oren I, Kassis I, Finkelstein R. Carbapenem resistance among Klebsiella pneumoniae isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Jul;30(7):666–71.

58. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, *et al.* Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 2010 Nov;15(46).
59. Perez F, Van Duin D. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a menace to our most vulnerable patients. *Cleve Clin J Med.* 2013 Apr;80(4):225–33.
60. Pulzova L, Navratilova L, Comor L. Alterations in Outer Membrane Permeability Favor Drug-Resistant Phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2016;23(4):413–20.
61. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Conejo M del C, Pascual Á, Tomás JM, *et al.* Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3332–5.
62. Tsai Y-K, Fung C-P, Lin J-C, Chen J-H, Chang F-Y, Chen T-L, *et al.* *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1485–93.
63. García-Sureda L, Doménech-Sánchez A, Barbier M, Juan C, Gascó J, Albertí S. OmpK26, a Novel Porin Associated with Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4742–7.
64. García-Sureda L, Juan C, Doménech-Sánchez A, Albertí S. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1803–5.
65. Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. AcrAB efflux system: Expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(12):3984–6.
66. Hentschke M, Wolters M, Sobottka I, Rohde H, Aepfelbacher M. ramR mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(6):2720–3.
67. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):177–83.
68. Schneiders T, Amyes SGB, Levy SB. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(9):2831–7.
69. Rodríguez-Martínez JM, de Alba PD, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernández-Cuenca F, *et al.* Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(1):68–73.
70. Walsh TR. Emerging carbapenemases : a global perspective. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(S3):S8–14.
71. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):252–75.

72. Tortola MT, Lavilla S, Miro E, Gonzalez JJ, Larrosa N, Sabate M, *et al.* First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two enterobacteriaceae isolates in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Aug;49(8):3492–4.
73. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005 Apr;18(2):306–25.
74. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, *et al.* Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Feb;68(2):317–21.
75. López-Cerero L, Egea P, Gracia-Ahufinger I, González-Padilla M, Rodríguez-López F, Rodríguez-Baño J, *et al.* Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(6):538–40.
76. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Ortega A, Zamarrón P, Saez D, *et al.* The spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:3392–9.
77. Seara N, Oteo J, Carrillo R, Pérez-blanco V, Mingorance J, Gómez-gil R, *et al.* International Journal of Antimicrobial Agents Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(2):169–73.
78. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1791–8.
79. Spanish Agency of Medicine and Medical Devices. Strategic Action Plan to reduce the risk of selection and dissemination of antibiotic resistance. Spanish Government. 2015.
80. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(3):318–27.
81. Infectious Disease Society of America. The 10 × '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. *Clin Infect Dis.* 2010;50(8):1081–3.
82. Shields RK, Chen L, Cheng S, Chavda KD, Press EG, Snyder A, *et al.* Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Born blaKPC-3 mutations during treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(3):1–11.
83. Humphries RM, Hemarajata P. Resistance to ceftazidime-Avibactam in *klebsiella pneumoniae* due to porin mutations & the increased expression of KPC-3. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):10–1.
84. The PEW Charitable Trusts. Antibiotics Currently in Global Clinical Development [Internet]. Antibiotic Resistance Project. 2019. Available from: <http://www.pewtrusts.org/en/multimedia/data-visualizations/2014/antibiotics-currently-in-clinical-development>
85. Sanchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, Munoz-Algarra M, Isidoro B, Vindel A, *et al.* Nosocomial outbreak of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of multilocus sequence type 15: molecular basis, clinical risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):420–7.

86. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012 Dec;11:32.
87. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Oct;25(4):682–707.
88. Cannatelli A, D’Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, *et al*. In Vivo Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB Regulator. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5521–6.
89. Liu Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L, Zhang R, Spencer J, *et al*. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161–8.
90. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Butaye P, Goossens H, Malhotra-kumar S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June. *Eurosurveillance*. 2016;21(27):pii=30280.
91. Yin W, Li, H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. 2017;8(3):e00543-17.
92. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, *et al*. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*. 2017;22(31):pii=30589.
93. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in *d*-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72:3317–24.
94. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, *et al*. *mcr-1* and *mcr-2* variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(10):2745–9.
95. Yang YQ, Li YX, Lei CW, Zhang AY, Wang HN. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(7):1791–5.
96. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, *et al*. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* article. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1).
97. Bradford PA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Wise MG, Hackel M, Sahm F. Correlation of Beta-Lactamase Production and Colistin Resistance among Enterobacteriaceae Isolates from a Global Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(3):1385–92.
98. Institute for Higiene and Environmental Medicine Charité - University Medicine Berlin. Outbreak Database [Internet]. [cited 2019 Apr 5]. Available from: <https://www.outbreak-database.com>
99. Kader AA, Kumar A, Kamath KA. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in patients and asymptomatic healthy individuals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007 Sep;28(9):1114–6.

100. Calbo E, Freixas N, Xercavins M, Riera M, Nicolas C, Monistrol O, *et al.* Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control. *Clin Infect Dis.* 2011 Mar;52(6):743–9.
101. Fernández Cuenca F, López Cerero L, Pascual Hernández Á. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl 1):20–5.
102. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233–9.
103. Duck WM, Steward CD, Banerjee SN, McGowan JE, Tenover FC. Optimization of computer software settings improves accuracy of pulsed-field gel electrophoresis macrorestriction fragment pattern analysis. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3035–42.
104. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178–82.
105. Dekker JP, Frank KM. Next-generation epidemiology: Using real-time core genome multilocus sequence typing to support infection control policy. *J Clin Microbiol.* 2016;54(12):2850–3.
106. Zhou H, Liu W, Qin T, Liu C, Ren H. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2017;8(MAR):1–9.
107. Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F, NISC Comparative Sequencing Program, Henderson DK, *et al.* Tracking a Hospital Outbreak of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Whole-Genome Sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4(148):148ra116-148ra116.
108. Parkhill J, Wren BW. Bacterial epidemiology and biology - lessons from genome sequencing. *Genome Biol.* 2011;12:230.
109. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk JM, Laurent F, *et al.* Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance.* 2013;18(4):1–15.
110. Balloux F, Brønstad Brynildsrud O, van Dorp L, Shaw LP, Chen H, Harris KA, *et al.* From Theory to Practice: Translating Whole-Genome Sequencing (WGS) into the Clinic. *Trends Microbiol.* 2018;26(12):1035–48.
111. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high- risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565–91.
112. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST : Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol.* 2004;186(5):1518–30.
113. Karanika S, Karantanos T, Arvanitis M, Grigoras C, Mylonakis E. Fecal colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and risk factors among healthy individuals: A systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2016;63(3):310–8.

114. Friedmann R, Raveh D, Zartzer E, Rudensky B, Broide E, Attias D, *et al.* Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(6):534–42.
115. Harris AD, McGregor JC, Johnson JA, Strauss SM, Moore AC, Standiford HC, *et al.* Risk Factors for Colonization with Producing Bacteria and Intensive Care Unit Admission. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(8):1144–9.
116. Demirdag K, Hosoglu S. Epidemiology and risk factors for ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: a case control study. *J Infect Dev Ctries.* 2010 Nov;4(11):717–22.
117. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, *et al.* Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(1):53–8.
118. Wener KM, Schechner V, Gold HS, Wright SB, Carmeli Y. Treatment with fluoroquinolones or with beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations is a risk factor for isolation of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella* species in hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May;54(5):2010–6.
119. Santos RP, Mayo TW, Siegel JD. Healthcare Epidemiology: Active Surveillance Cultures and Contact Precautions for Control of Multidrug-Resistant Organisms: Ethical Considerations. *Clin Infect Dis.* 2008;47(1):110–6.
120. Cano ME, Domínguez MA, Ezpeleta Baquedano C, Martínez-Martínez L, Padilla Ortega B, Ramírez de Arellano E. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2007. Report No.: 26.
121. Oteo J, Bou G, Chaves F, Oliver A. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35(10):613–86.
122. Pittet D, Allegranzi B, Boyce J. The World Health Organization Guidelines on Hand Hygiene in Health Care and their consensus recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009 Jul;30(7):611–22.
123. Landelle C, Pagani L, Harbarth S. Is patient isolation the single most important measure to prevent the spread of multidrug-resistant pathogens? *Virulence.* 2013 Feb;4(2):163–71.
124. Ben-David D, Maor Y, Keller N, Regev-Yochay G, Tal I, Shachar D, *et al.* Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010 Jun;31(6):620–6.
125. Ciobotaro P, Oved M, Nadir E, Bardenstein R, Zimhony O. An effective intervention to limit the spread of an epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an acute care setting: from theory to practice. *Am J Infect Control.* 2011 Oct;39(8):671–7.
126. Munoz-Price LS, Hayden MK, Lolans K, Won S, Calvert K, Lin M, *et al.* Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010 Apr;31(4):341–7.
127. Silvestri L, van Saene HKF. Selective decontamination of the digestive tract: an update of the evidence. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth.* 2012;4(1):21–9.

128. Halaby T, Al Naiemi N, Kluytmans J, van der Palen J, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Emergence of colistin resistance in Enterobacteriaceae after the introduction of selective digestive tract decontamination in an intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jul;57(7):3224–9.
129. Calvo Montes J, Canut Blasco A, Martínez-Martínez L, Rodríguez Díaz J. Preparación de informes acumulados de sensibilidad a los antimicrobianos. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2014. Report No.: 51
130. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 - S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. Wayne, Pennsylvania; 2014.
131. García Rodríguez JA, Cantón R, Gómez-Lus ML, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Avil C, Vila J. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Picazo JJ, editor. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2000. Report No.: 12.
132. Chia JH, Chu C, Su LH, Chiu CH, Kuo AJ, Sun CF, *et al.* Development of a multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M β -lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol.* 2005;43(9):4486–91.
133. Pagani L, Amico ED, Migliavacca R, Andrea MMD, Giacobone E, Amicosante G, *et al.* Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of Enterobacteriaceae from a Hospital in Northern Italy. *J Clin Microbiol.* 2003;41(9):4264–9.
134. Carattoli A, García-Fernández A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, *et al.* Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases isolated in Rome, Italy. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):103–8.
135. Batchelor M, Hopkins K, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, *et al.* bla CTX-M Genes in Clinical *Salmonella* Isolates Recovered from Humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(4):1319–22.
136. Weill FX, Demartin M, Tandé D, Espié E, Rakotoarivony I, Grimont PAD. SHV-12-like extended-spectrum- β -lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2432–7.
137. Weill F-X, Lailier R, Praud K, Kérouanton A, Fabre L, Brisabois A, *et al.* Emergence of Extended-Spectrum- β -Lactamase (CTX-M-9) -Producing Multiresistant Strains of *Salmonella enterica* Serotype Virchow in Poultry and Humans in France. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5767–73.
138. Amirkamali S, Naserpour-farivar T, Azarhoosh K. Distribution of the bla OXA , bla VEB-1 , and bla GES-1 genes and resistance patterns of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin , Iran. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(November 2016):315–20.
139. Guo Q, Wang P, Ma Y, Yang Y, Ye X, Wang M. Co-production of SFO-1 and DHA-1 β -lactamases and 16s rRNA methylase armA in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(10):2361–6.

140. Al-Agamy MH, Jeannot K, El-Mahdy TS, Samaha HA, Shibl AM, Plésiat P, *et al.* Diversity of Molecular Mechanisms Conferring Carbapenem Resistance to *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Saudi Arabia. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2016;2016(4379686):1–7.
141. Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA β -lactamases. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(4):356–9.
142. Cubero M, Calatayud L, Tubau F, Ayats J, Peña C, Martín R, *et al.* Clonal spread of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-1 betalactamase in a Spanish hospital. *Int Microbiol.* 2013;16(4):227–33.
143. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2153–62.
144. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(1):119–23.
145. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance.* 2018;23(6):17–00672.
146. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton C V. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *J Med Microbiol.* 2010;59(5):541–7.
147. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640–4.
148. Clausen PTLC, Zankari E, Aarestrup FM, Lund O. Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2484–8.
149. Carattoli A, Zankari E, Garcíá-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, *et al.* In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895–903.
150. Clausen PTLC, Aarestrup FM, Lund O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics.* 2018;19(1):1–8.
151. Organización Mundial de la Salud (OMS). Higiene de manos ¿Por qué, cómo, cuándo? 2010. p. 7.
152. Álvarez Lerma F, Sánchez García M, Lorente L, Gordo F, Añón JM, Álvarez J, *et al.* Guidelines for the prevention of ventilator-associated pneumonia and their implementation. The Spanish “Zero-VAP” bundle. *Med Intensiva.* 2014;38(4):226–36.
153. Palomar Martínez M, Álvarez Lerma F, Riera Badía MA, León Gil C, López Pueyo MJ, Díaz Tobajas C, *et al.* Prevención de la bacteriemia relacionada con catéteres en UCI mediante una intervención multifactorial. Informe del estudio piloto. *Med Intensiva.* 2010;34(9):581–9.

154. Lopez-Ferraz C, Ramírez P, Gordon M, Marti V, Gil-Perotin S, Gonzalez E, *et al.* Impact of microbial ecology on accuracy of surveillance cultures to predict multidrug resistant microorganisms causing ventilator-associated pneumonia. *J Infect.* 2014;69(4):333–40.
155. Chastre J, Fagon J. State of the Art Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:867–903.
156. Laupland KB, Bagshaw SM, Gregson DB, Kirkpatrick AW, Ross T, Church DL. Intensive care unit-acquired urinary tract infections in a regional critical care system. *Crit Care.* 2005 Apr;9(2):R60-5.
157. Shuman EK, Chenoweth CE. Recognition and prevention of healthcare-associated urinary tract infections in the intensive care unit. *Crit Care Med.* 2010 Aug;38(8 Suppl):S373-9.
158. Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O’Grady NP, *et al.* Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009 Jul;49(1):1–45.
159. Ho DE, Imai K, King G, Stuart EA. MatchIt : Nonparametric Preprocessing for Parametric Causal Inference. *J Stat Softw.* 2011;42(8).
160. American Thoracic Society, Infectious Disease Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Feb;171(4):388–416.
161. Blanquer J, Aspa J, Anzueto A, Ferrer M, Gallego M, Rajas O, *et al.* Normativa SEPAR: neumonía nosocomial. *Arch Bronconeumol.* 2011 Oct 1;47(10):510–20.
162. Friedman J, Hastie T, Tibshirani R. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw.* 2010;33(1):1–22.
163. MacCanell D. Bacterial Strain Typing. *Clin Lab Med.* 2013 Sep 1;33(3):629–50.
164. European Centre for Disease Prevention and Control. Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial resistance [Internet]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc>
165. Carrër A, Lassel L, Fortineau N, Mansouri M, Anguel N, Richard C, *et al.* Outbreak of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* in the Intensive Care Unit of a French Hospital . *Microb Drug Resist.* 2009;15(1):47–54.
166. Peña C, Pujol M, Ricart A, Ardanuy C, Ayats J, Liñares J, *et al.* Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *J Hosp uinfection.* 1997;35:9–16.
167. Decre D, Gachot B, Lucet JC, Arlet G, Bergogne-Berezin E, Regnier B. Clinical and Bacteriologic Epidemiology of Extended-Spectrum s-Lactamase –Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae* in a Medical Intensive Care Unit. *Clin Infect Dis.* 1998;27(4):834–44.
168. Zarb P, Coignard F, Griskeviciene J, Muller A, Vankerchhoven V, Weist K, *et al.* The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Eurosurveillance.* 2012;17(46).

169. Suetens C, Latour K, Kärki T, Ricchizzi E, Kinross P, Moro ML, *et al.* Prevalence of healthcare-associated infections, estimated incidence and composite antimicrobial resistance index in acute care hospitals and long-term care facilities: results from two European point prevalence surveys, 2016 to 2017. *Eurosurveillance*. 2018;23(46):1–17.
170. Deplano A, Denis O, Rodriguez-Villalobos H, De Ryck R, Struelens MJ, Hallin M. Controlled performance evaluation of the diversilab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*. 2011 Oct [cited 2013 Oct 28];49(10):3616–20.
171. Lopez-Canovas L, Martinez Benitez MB, Herrera Isidron JA, Flores Soto E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Anal Biochem*. 2019;573:17–29.
172. Valverde A, Coque TM, García-San Miguel L, Baquero F, Cantón R. Complex molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: A long-term perspective from a single institution in Madrid. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(1):64–72.
173. Voets GM, Leverstein-van Hall MA, Kolbe-Busch S, van der Zanden A, Church D, Kaase M, *et al.* International Multicenter Evaluation of the DiversiLab Bacterial Typing System for *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*. 2013;51(12):3944–9.
174. Fluit a C, Terlingen a M, Andriessen L, Ikawaty R, Van Mansfeld R, Top J, *et al.* Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species. *J Clin Microbiol*. 2010 Nov;48(11):3979–89.
175. Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, *et al.* Microbial DNA Typing by Automated Repetitive-Sequence-Based PCR. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):199–207.
176. Overdeest ITM a, Willemsen I, Elberts S, Verhulst C, Rijnsburger M, Savelkoul P, *et al.* Evaluation of the DiversiLab typing method in a multicenter study assessing horizontal spread of highly resistant gram-negative rods. *J Clin Microbiol*. 2011 Oct;49(10):3551–4.
177. Filippa N, Carricajo A, Grattard F, Fascia P, El Sayed F, Defilippis JP, *et al.* Outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying qnrB1 and blaCTX-M15 in a French intensive care unit. *Ann Intensive Care*. 2013;3(1):1–4.
178. Ashayeri-Panah M, Eftekhari F, Ghamsari MM, Parvin M, Feizabadi MM. Genetic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: Comparison of pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *Brazilian J Microbiol*. 2013;44(3):823–8.
179. Gori A, Espinasse F, Deplano A, Nonhoff C, Nicolas MH, Struelens MJ. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 1996;34(10):2448–53.
180. Ripabelli G, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Flocco R, Scutellà M, *et al.* Tracking Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from an Italian Hospital: Molecular Epidemiology and Surveillance by PFGE, RAPD and PCR-Based Resistance Genes Prevalence. *Curr Microbiol*. 2018;75(8):977–87.
181. Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, *et al.* Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):317–21.

182. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Carmen Turrientes M, Díaz-Agero C, López-Fresneña N, Bonten M, *et al.* Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from colonized patients in a university hospital in Madrid, Spain, during the R-GNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(11):3039–43.
183. Saidani M, Messadi L, Soudani A, Daaloul-Jedidi M, Châtre P, Ben Chehida F, *et al.* Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Clinical Bovine Mastitis in Tunisia. *Microb Drug Resist.* 2018;24(8):1242–8.
184. Calvo J, Cantón R, Fernández Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. 2011. (Procedimientos en Microbiología Clínica). Report No.: 38.
185. Carrèr A, Nordmann P. Klebsiella pneumoniae CTX-M-15: Vers une modification de l'épidémiologie des β -lactamases à spectre étendu. *Pathol Biol.* 2011;59(6):133–5.
186. Pano-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, *et al.* Infections caused by OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Jan;68(1):89–96.
187. Oteo J, Garduño E, Bautista V, Cuevas O, Campos J. Antibiotic-resistant Klebsiella pneumoniae in Spain: Analyses of 718 invasive isolates from 35 hospitals and report of one outbreak caused by an SHV-12-producing strain [4]. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(1):222–4.
188. Ruiz E, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Olarte I, Esteban I, Rocha-Gracia R, *et al.* Outbreak caused by a multi-resistant Klebsiella pneumoniae strain of new sequence type ST341 carrying new genetic environments of aac(6')-Ib-cr and qnrS1 genes in a neonatal intensive care unit in Spain. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(7):464–9.
189. Dashti AA, Jadaon MM, Amyes SGB. Retrospective Study of an Outbreak in a Kuwaiti Hospital of Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae Possessing the New SHV-112 extended-Spectrum Beta-Lactamase. *J Chemother.* 2014;22(5):335–8.
190. Kassis-Chikhani N, Decré D, Ichai P, Sengelin C, Geneste D, Mihaila L, *et al.* Outbreak of Klebsiella pneumoniae producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(7):1539–40.
191. González C, Gil F, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Suárez M, *et al.* Brote por Klebsiella pneumoniae multirresistente y productora de beta-lactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. *Rev Chil Infectología.* 2011;28(1):28–34.
192. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: Neglected yet ubiquitous. *Front Microbiol.* 2016;7(SEP).
193. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance.* 2008;13(47):1–11.
194. Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, *et al.* Emergence of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(3):524–8.

195. Ng TM, Khong WX, Harris PNA, De PP, Chow A, Tambyah PA, *et al.* Empiric piperacillin-tazobactam versus carbapenems in the treatment of bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae. *PLoS One*. 2016;11(4):1–11.
196. Livermore DM, Day M, Cleary P, Hopkins KL, Toleman MA, Wareham DW, *et al.* OXA-1 β -lactamase and non-susceptibility to penicillin/ β -lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(2):326–33.
197. Jacoby GA. AmpC B-Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161–82.
198. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: Epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2011;53(1):60–7.
199. Robustillo Rodela A, Díaz-Agero Pérez C, Sanchez Sagrado T, Ruiz-Garbajosa P, Pita López MJ, Monge V. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: Control measures. *Eurosurveillance*. 2012;17(7):1–6.
200. Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayestarán JI, Alberti S, *et al.* Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2831–7.
201. Lee K, Yong D, Choi YS, Yum JH, Kim JM, Woodford N, *et al.* Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid-mediated CMY-2 and DHA-1 β -lactamases co-mediated by porin loss. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(2):201–6.
202. Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges J V., Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, *et al.* Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(1):76–9.
203. Oteo J, Alcaraz R, Bou G, Conejo C, Díaz-lamas AM, Fernández-martínez M, *et al.* Rates of faecal colonization by carbapenemase-producing enterobacteriaceae among patients admitted to ICUs in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(10):2916–8.
204. Prim N, Rivera A, Rodríguez-Navarro J, Español M, Turbau M, Coll P, *et al.* Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. *Eurosurveillance*. 2016;21(13):11–3.
205. Heras-Cañas VJ, López-Cerero L, Díaz de-Alba P, Pascual Á. Low prevalence of *mcr-1* positive Enterobacteriaceae isolates in a health area. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(7):467–8.
206. Lalaoui R, Djukovic A, Bakour S, Sanz J, Gonzalez-Barbera EM, Salavert M, *et al.* Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-1* gene, in *Escherichia coli* isolated from high-risk patients with acute leukemia in Spain. *J Infect Chemother*. 2019;25(8):605-609.
207. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, *et al.* Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*. 2009;4(3).
208. Hennequin C, Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(3):333–41.

209. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Dominguez MA, Liñares J, *et al.* Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013). *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(2):154–60.
210. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside Modifying Enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010;13(6):151–71.
211. Fernández-Martínez M, Ruiz del Castillo B, Lecea-Cuello MJ, Rodríguez-Baño J, Pascual Á, Martínez-Martínez L, *et al.* Prevalence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended Spectrum β -Lactamases Collected in Two Multicenter Studies in Spain. *Microb Drug Resist.* 2018;24(4):367–76.
212. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr.* 2014;2(2).
213. Doyle RM, O’sullivan DM, Aller SD, Bruchmann S, Clark T, Pelegrin AC, *et al.* Discordant bioinformatic predictions of antimicrobial resistance from whole-genome sequencing data of bacterial isolates: An inter-laboratory study. *Microb Genomics.* 2020;6(2):1–13.
214. Dryden M, Baguneid M, Eckmann C, Corman S, Stephens J, Solem C, *et al.* Pathophysiology and burden of infection in patients with diabetes mellitus and peripheral vascular disease: Focus on skin and soft-tissue infections. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:S27–32.
215. Lan Y, Zhou M, Jian Z, Yan Q, Wang S, Liu W. Prevalence of pks gene cluster and characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced bloodstream infections. *J Clin Lab Anal.* 2019;33(4):1–7.
216. Bermejo J, Bencomo B, Arnesi N, Lesnaberes P, Borda N, Notario R. Alta correlación entre el consumo de ciprofloxacina y la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Chil infectología.* 2006;23(4):316–20.
217. Buffie CG, Pamer EG. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(11):790–801.
218. Tavoukjian V. Faecal microbiota transplantation for the decolonization of antibiotic-resistant bacteria in the gut: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect.* 2019;102(2):174–88.
219. Kumar M, Dutta R, Saxena S, Singhal S. Risk factor analysis in clinical isolates of ESBL and MBL (Including NDM-1) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in a tertiary care hospital. *J Clin Diagnostic Res.* 2015;9(11):DC08-DC13.
220. Sjøgaard M, Heide-Jørgensen U, Vandenbroucke JP, Schønheyder HC, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Risk factors for extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* urinary tract infection in the community in Denmark: a case-control study. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(12):952–60.
221. Mathers AJ, Vegesana K, German-Mesner I, Ainsworth J, Pannone A, Crook DW, *et al.* Risk factors for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene acquisition and clinical outcomes across multiple bacterial species. *J Hosp Infect.* 2020;104(4):456–68.
222. Rodríguez-Baño J, Ngugro MD. Extended-spectrum β -lactamases in ambulatory care: A clinical perspective. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(SUPPL. 1):104–10.

223. Janvier F, Mérens A, Delaune D, Soler C, Cavallo JD. Portage digestif d'entérobactéries résistantes aux céphalosporines de troisième génération dans une population d'adultes jeunes asymptomatiques : évolution entre 1999 et 2009. *Pathol Biol.* 2011;59(2):97–101.
224. Ajao AO, Johnson JK, Harris AD, McGregor JC, Thom KA, Furuno JP. Risk of Acquiring Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing *Klebsiella* Species and *Escherichia coli* from Prior Room Occupants in the Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(5):453–8.
225. Peter J, Guggenbichler O, Assadian, Michael Boeswald AK. Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials – catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections. Inzidenz und klinische Folgen implantatassoziiierter nosokomialer. *GMS Krankenhhyg Interdisziplinär.* 2011;6(1):1–19.
226. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *An Sist Sanit Navar.* 2005;28(2):163–75.
227. Tofteland S, Naseer U, Lislevand JH, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. *PLoS One.* 2013;8(3):1–8.
228. Vergara-López S, Domínguez MC, Conejo MC, Pascual Á, Rodríguez-Baño J. Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(11).
229. Corbella M, Pujol M, Argerich MJ, Ayats J, Sendra M, Pena C, *et al.* Environmental sampling of *Acinetobacter baumannii*: moistened swabs versus moistened sterile gauze pads. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015;20(7):458–60.
230. Ezpeleta-Baquedano C, Barrios-Andrés JL, Delgado-Iribarren García-Campero A. Control microbiológico ambiental. Cercenado E, Cantón R, editors. *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2013. Report No.: 31.
231. Valencia-Martín R, Gonzalez-Galan V, Alvarez-Marín R, Cazalla-Foncueva AM, Aldabó T, Gil-Navarro M V., *et al.* A multimodal intervention program to control a long-term *Acinetobacter baumannii* endemic in a tertiary care hospital. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8(1):1–11.
232. Salaripour M, McKernan P, Devlin R. A multidisciplinary approach to reducing outbreaks and nosocomial MRSA in a university-affiliated hospital. *Healthc Q.* 2006;9(Special Issue):54–60.
233. López-Cerero L, Fernández-Cuenca F, Pascual A. El laboratorio de Microbiología en la vigilancia y el control de las infecciones nosocomiales. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(1):44–51.
234. Kovacs-Litman A, Muller MP, Powis JE, Ricciuto D, McGeer A, Williams V, *et al.* Association between hospital outbreaks and hand hygiene: Insights from electronic monitoring. *Clin Infect Dis.* 2020;1–21.

ANEXO I - CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

1. DATOS DEMOGRÁFICOS

Paciente: Fecha de nacimiento: Sexo: Hombre Mujer Fecha de ingreso: Tipo de registro: Caso Control

Hospital de procedencia:

Unidad de procedencia:

Fecha de ingreso en UCI:

Motivo de ingreso en UCI:

- | | |
|--|--|
| <input type="radio"/> Cardiocirculatorio | <input type="radio"/> Metabólico/endocrinológico |
| <input type="radio"/> Respiratorio | <input type="radio"/> Hematológico/oncológico |
| <input type="radio"/> Neurológico | <input type="radio"/> Sepsis |
| <input type="radio"/> Digestivo/hepático | <input type="radio"/> Tóxicos/biológicos/físicos |
| <input type="radio"/> Renal/Electrolitos | <input type="radio"/> Otros |

Apache II: SAPS 3: SOFA: **Antecedentes médicos**

- | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|
| Insuficiencia renal | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Insuficiencia hepática | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Insuficiencia cardíaca | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Enfermedad pulmonar crónica | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Diabetes mellitus | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Afectación SNC y/o SNP | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Neoplasia | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Neutropenia | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Trasplante órgano sólido | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Trasplante progenitores hematopoyéticos | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |
| Tratamiento inmunosupresor | <input type="radio"/> No | <input type="radio"/> Sí |

Factores de riesgo al ingreso en UCI

- Tratamiento antibiótico en los 90 días previos No Sí
- >5 días de hospitalización en ingreso actual No Sí
- Procedencia de centro socio-sanitario No Sí
- Tratamiento endovenoso domiciliario No Sí
- Diálisis crónica No Sí
- Cura de heridas en domicilio o centro de AP No Sí
- Úlceras por presión No Sí
- Reingreso en UCI No Sí
- Reingreso en el hospital (<15 días) No Sí

Estudio de colonización

***Klebsiella pneumoniae* BLEE**

- Colonización por *Klebsiella pneumoniae* BLEE No Sí

Fecha de colonización:

Escala SOFA:

- Adquisición intraUCI No Sí

Semana de seguimiento:

Presión de colonización semana previa:

Aislamiento en:

- Exudado orofaríngeo Exudado orofaríngeo y rectal
- Exudado rectal Broncoaspirado y exudado rectal
- Broncoaspirado Ex. orofaríngeo, rectal y broncoaspirado
- Exudado orofaríngeo y broncoaspirado Otro

Ubicación del paciente:

- Unidad de cuidados intensivos Planta de hospitalización
- Urgencias Domicilio

***Escherichia coli* BLEE**

Colonización por *Escherichia coli* BLEE

No Sí

Fecha de colonización:

Escala SOFA:

Adquisición intraUCI

No Sí

Semana de seguimiento:

Aislamiento en:

- | | |
|--|--|
| <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo | <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo y rectal |
| <input type="radio"/> Exudado rectal | <input type="radio"/> Broncoaspirado y exudado rectal |
| <input type="radio"/> Broncoaspirado | <input type="radio"/> Ex. orofaríngeo, rectal y broncoaspirado |
| <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo y broncoaspirado | <input type="radio"/> Otro |

Ubicación del paciente:

- | | |
|---|---|
| <input type="radio"/> Unidad de cuidados intensivos | <input type="radio"/> Planta de hospitalización |
| <input type="radio"/> Urgencias | <input type="radio"/> Domicilio |

***Acinetobacter baumannii* MR**

Colonización por *Acinetobacter baumannii* MR

No Sí

Fecha de colonización:

Escala SOFA:

Adquisición intraUCI

No Sí

Semana de seguimiento:

Aislamiento en:

- | | |
|--|--|
| <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo | <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo y rectal |
| <input type="radio"/> Exudado rectal | <input type="radio"/> Broncoaspirado y exudado rectal |
| <input type="radio"/> Broncoaspirado | <input type="radio"/> Ex. orofaríngeo, rectal y broncoaspirado |
| <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo y broncoaspirado | <input type="radio"/> Otro |

Ubicación del paciente:

- | | |
|---|---|
| <input type="radio"/> Unidad de cuidados intensivos | <input type="radio"/> Planta de hospitalización |
| <input type="radio"/> Urgencias | <input type="radio"/> Domicilio |

***Pseudomonas aeruginosa* MBL**Colonización por *Pseudomonas aeruginosa* MBL No SíFecha de colonización: Escala SOFA: Adquisición intraUCI No SíSemana de seguimiento:

Aislamiento en:

- | | |
|--|--|
| <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo | <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo y rectal |
| <input type="radio"/> Exudado rectal | <input type="radio"/> Broncoaspirado y exudado rectal |
| <input type="radio"/> Broncoaspirado | <input type="radio"/> Ex. orofaríngeo, rectal y broncoaspirado |
| <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo y broncoaspirado | <input type="radio"/> Otro |

Ubicación del paciente:

- | | |
|---|---|
| <input type="radio"/> Unidad de cuidados intensivos | <input type="radio"/> Planta de hospitalización |
| <input type="radio"/> Urgencias | <input type="radio"/> Domicilio |

***Pseudomonas aeruginosa* MR**Colonización por *Pseudomonas aeruginosa* MR No SíFecha de colonización: Escala SOFA: Adquisición intraUCI No SíSemana de seguimiento:

Aislamiento en:

- | | |
|--|--|
| <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo | <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo y rectal |
| <input type="radio"/> Exudado rectal | <input type="radio"/> Broncoaspirado y exudado rectal |
| <input type="radio"/> Broncoaspirado | <input type="radio"/> Ex. orofaríngeo, rectal y broncoaspirado |
| <input type="radio"/> Exudado orofaríngeo y broncoaspirado | <input type="radio"/> Otro |

Ubicación del paciente:

- | | |
|---|---|
| <input type="radio"/> Unidad de cuidados intensivos | <input type="radio"/> Planta de hospitalización |
| <input type="radio"/> Urgencias | <input type="radio"/> Domicilio |

Staphylococcus aureus MRColonización por *Staphylococcus aureus* MR No SíFecha de colonización: Escala SOFA:

Adquisición intraUCI

 No SíSemana de seguimiento:

Aislamiento en:

- Exudado orofaríngeo
- Exudado rectal
- Broncoaspirado
- Exudado orofaríngeo y broncoaspirado

- Exudado orofaríngeo y rectal
- Broncoaspirado y exudado rectal
- Ex. orofaríngeo, rectal y broncoaspirado
- Otro

Ubicación del paciente:

- Unidad de cuidados intensivos
- Urgencias

- Planta de hospitalización
- Domicilio

Otro microorganismo MR

Colonización por otro microorganismo

 No Sí

Tipo de microorganismo:

Mecanismo de resistencia:

Fecha de colonización: Escala SOFA:

Adquisición intraUCI

 No SíSemana de seguimiento:

Aislamiento en:

- Exudado orofaríngeo
- Exudado rectal
- Broncoaspirado
- Exudado orofaríngeo y broncoaspirado

- Exudado orofaríngeo y rectal
- Broncoaspirado y exudado rectal
- Ex. orofaríngeo, rectal y broncoaspirado
- Otro

Ubicación del paciente:

- Unidad de cuidados intensivos
- Urgencias

- Planta de hospitalización
- Domicilio

PROCESO INFECCIOSO POR BACTERIA MULTIRRESISTENTE

Klebsiella pneumoniae BLEEInfección por *Klebsiella pneumoniae* BLEE: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma: No SíEvolución del proceso infeccioso Curación Exitus relacionadoSegunda infección por *Klebsiella pneumoniae* BLEE: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma: No SíEvolución del proceso infeccioso Curación Exitus relacionado

Escherichia coli BLEEInfección por *Escherichia coli* BLEE: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma:

 No Sí

Evolución del proceso infeccioso

 Curación Exitus relacionadoSegunda infección por *Escherichia coli* BLEE: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma:

 No Sí

Evolución del proceso infeccioso

 Curación Exitus relacionado

Acinetobacter baumannii MRInfección por *Acinetobacter baumannii* MR: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma:

 No Sí

Evolución del proceso infeccioso

 Curación Exitus relacionadoSegunda infección por *Acinetobacter baumannii* MR: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma:

 No Sí

Evolución del proceso infeccioso

 Curación Exitus relacionado

***Pseudomonas aeruginosa* MBL**Infección por *Pseudomonas aeruginosa* MBL: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma: No SíEvolución del proceso infeccioso Curación Exitus relacionadoSegunda infección por *Pseudomonas aeruginosa* MBL: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma: No SíEvolución del proceso infeccioso Curación Exitus relacionado

Pseudomonas aeruginosa MRInfección por *Pseudomonas aeruginosa* MR No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma:

 No Sí

Evolución del proceso infeccioso

 Curación Exitus relacionadoSegunda infección por *Pseudomonas aeruginosa* MR: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma:

 No Sí

Evolución del proceso infeccioso

 Curación Exitus relacionado

Staphylococcus aureus MRInfección por *Staphylococcus aureus* MR No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma:

 No Sí

Evolución del proceso infeccioso

 Curación Exitus relacionadoSegunda infección por *Staphylococcus aureus* MR: No SíFecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma:

 No Sí

Evolución del proceso infeccioso

 Curación Exitus relacionado

Otro microorganismo MRInfección por otro microorganismo MR No Sí

Tipo de microorganismo:

Mecanismo de resistencia:

Fecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma: No SíEvolución del proceso infeccioso Curación Exitus relacionadoSegunda infección por otro microorganismo MR: No Sí

Tipo de microorganismo:

Mecanismo de resistencia:

Fecha de infección: Escala SOFA en la fecha de infección:

Tipo de infección:

- | | |
|---|--|
| <input type="radio"/> Bacteriemia primaria | <input type="radio"/> Neumonía asociada a ventilación mecánica |
| <input type="radio"/> Bacteriemia relacionada con catéter | <input type="radio"/> Neumonía nosocomial |
| <input type="radio"/> Bacteriemia secundaria | <input type="radio"/> Ventriculitis |
| <input type="radio"/> Infección del tracto urinario | |

Tratamiento adecuado según antibiograma: No SíEvolución del proceso infeccioso Curación Exitus relacionado

ALTA HOSPITALARIA

Fecha de alta de UCI:

Fecha de alta del hospital:

Exitus a los 30 días: No Sí

Lugar donde se produjo el exitus:

Unidad de cuidados intensivos Planta de hospitalización Domicilio

Fecha de exitus:

Exitus en relación con infección nosocomial No Sí

	Sí/No	Fecha de inicio	Fecha de fin
Cefalosporinas 3ª y 4ª generación			
Amoxicilina-ácido clavulánico /Piperacilina-tazobactam			
Ampicilina/sulbactam			
Carbapenem			
Aztreonam			
Aminoglucósidos			
Tigeciclina			
Quinolonas			
Glucopéptidos			
Linezolid			

	Sí/No	Fecha de inicio	Fecha de fin
Daptomicina			
Colistina			
Cotrimoxazol			
Antifúngicos sistémicos			
Descontaminación digestiva selectiva (DDS)			

- Inhibidores de bomba de protones No Sí
- Clorhexidina oral No Sí
- AntiH2 No Sí
- Corticoides sistémicos No Sí
- Corticoides inhalados No Sí
- Inmunosupresores No Sí

Primera cirugía: No Sí Fecha:

Tipo de cirugía : Abdominal Neurocirugía Otro

Segunda cirugía: No Sí Fecha:

Tipo de cirugía : Abdominal Neurocirugía Otro

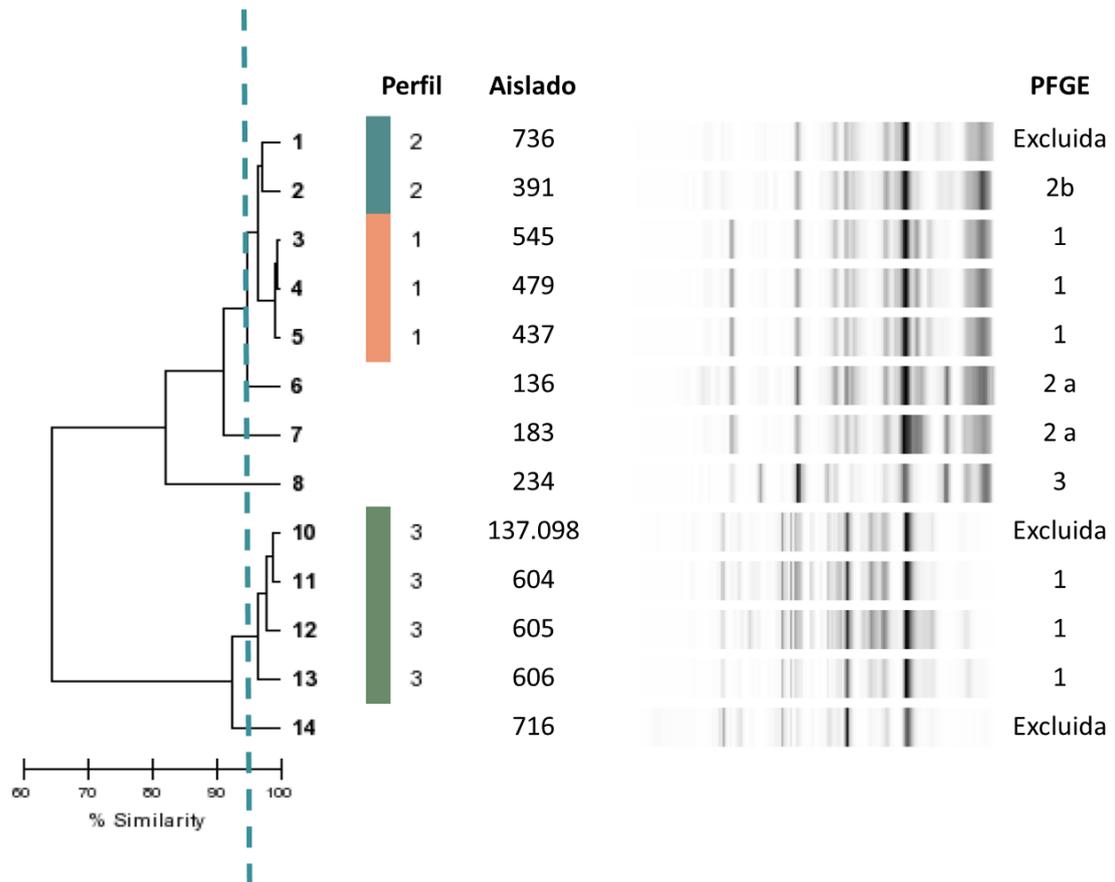
Traqueostomía : No Sí

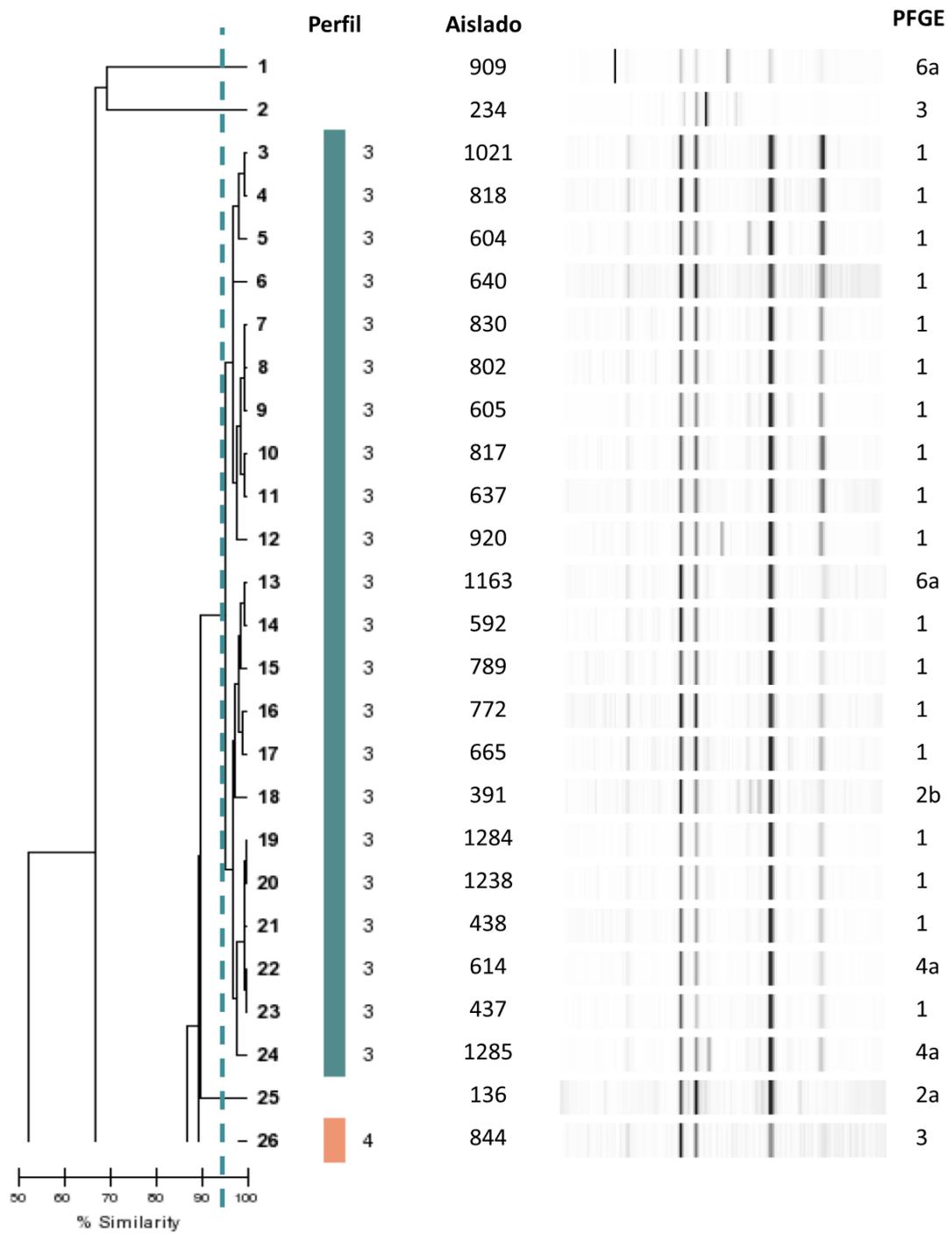
Fecha de colocación de traqueostomía:

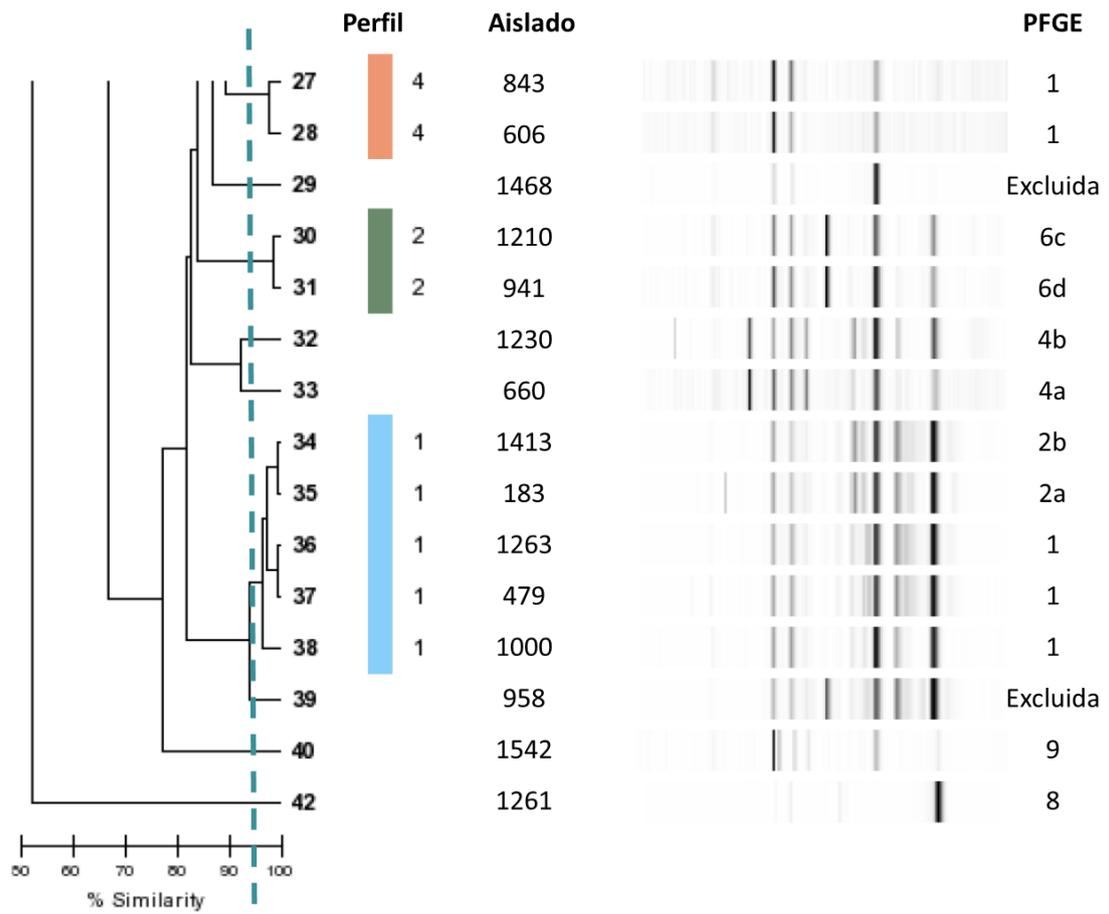
Fecha de cierre de traqueostomía:

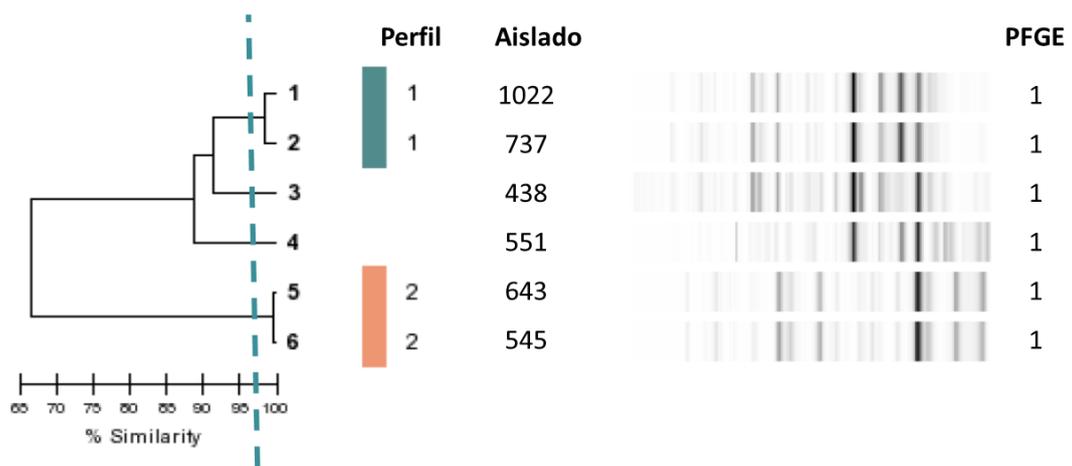
	Fecha de inicio	Fecha de fin
Ventilación mecánica invasiva <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Ventilación mecánica no invasiva <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Sonda urinaria <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Catéter venoso central <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Catéter arterial <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Nutrición parenteral <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Drenaje <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Sonda nasogástrica <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Derivación ventricular externa <input type="radio"/> No <input type="radio"/> Sí	<input type="text"/>	<input type="text"/>

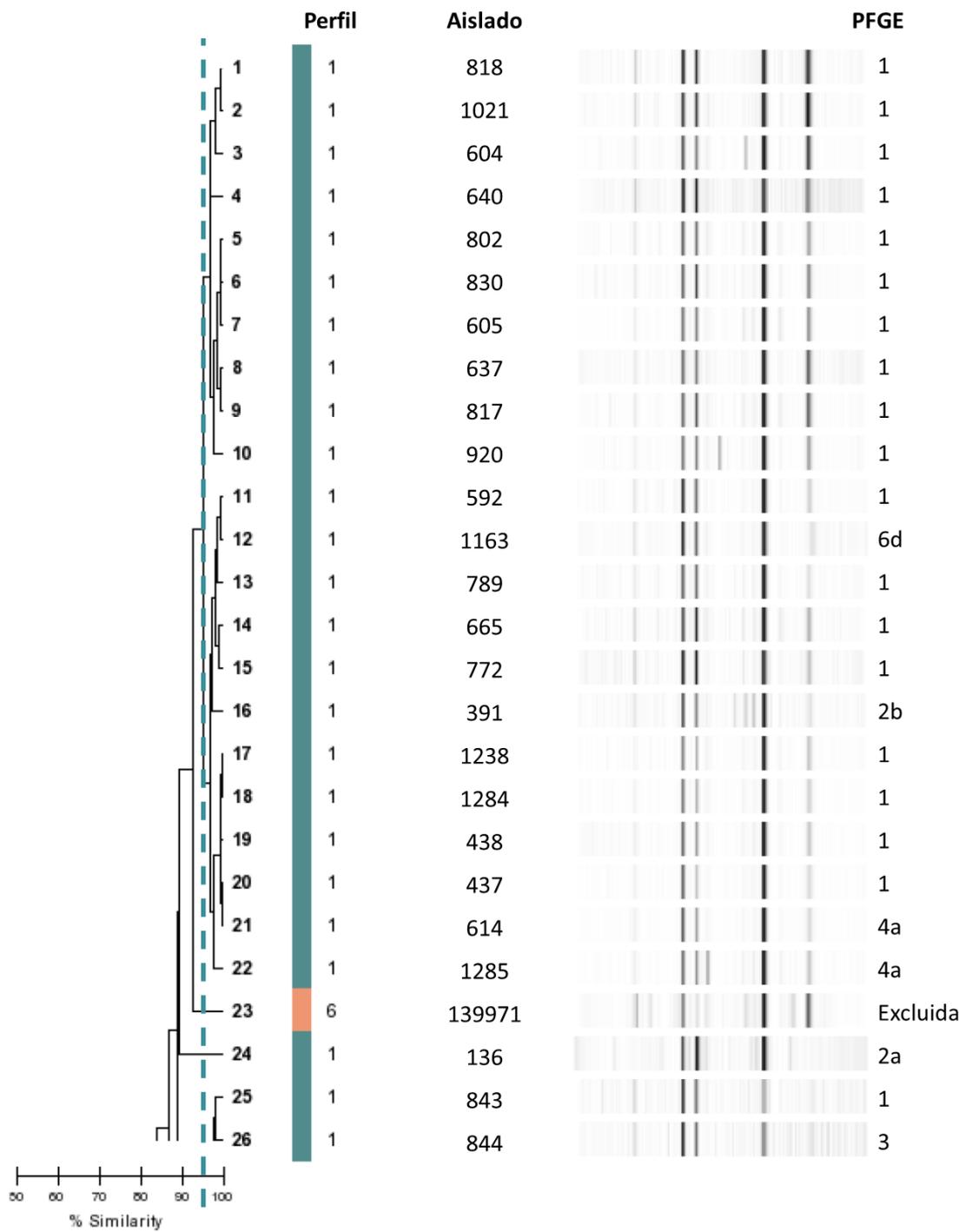
ANEXO II – DENDOGRAMAS OBTENIDOS MEDIANTE REP-PCR (DIVERSILAB™)

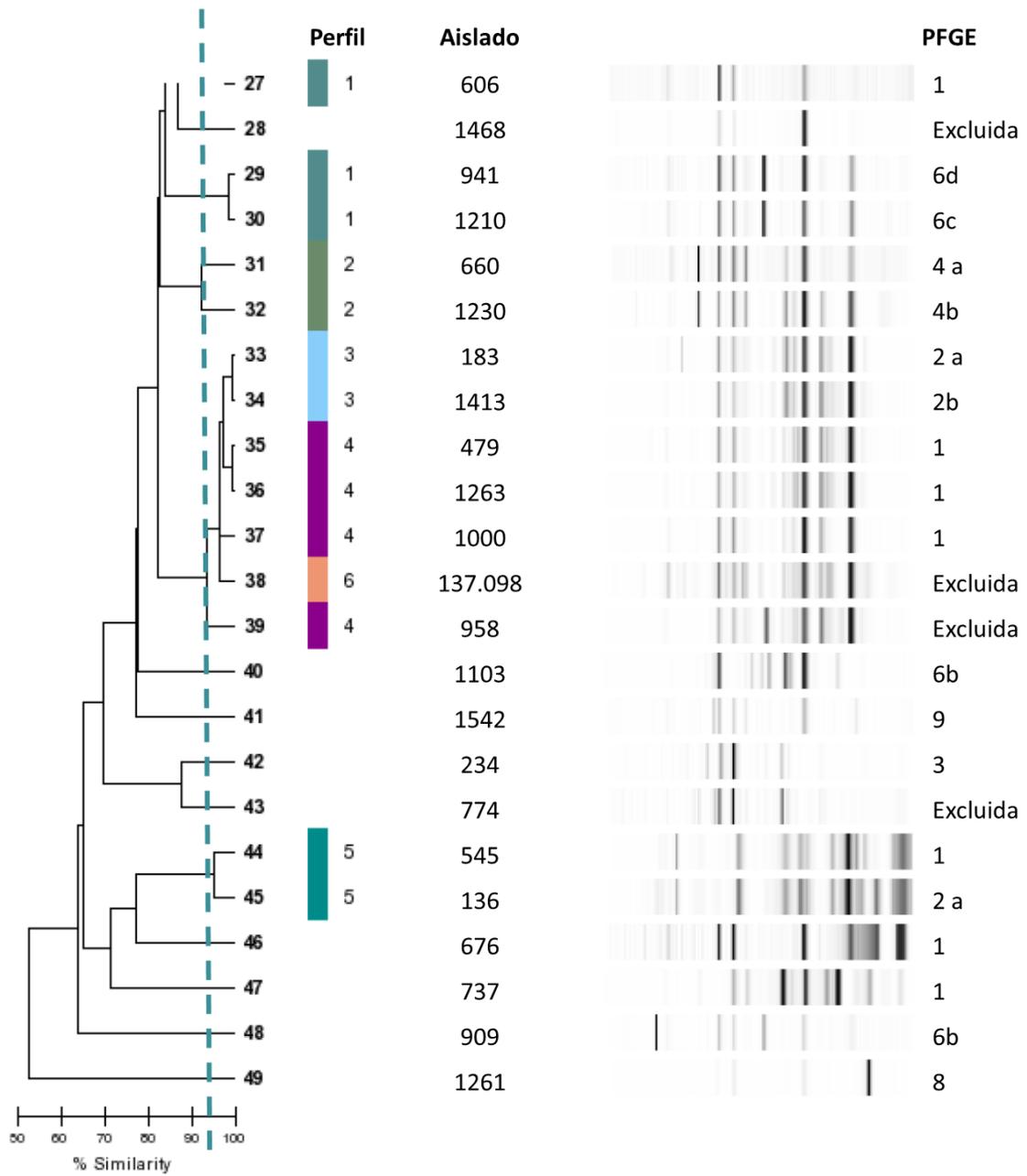








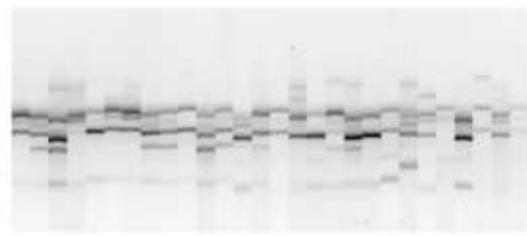




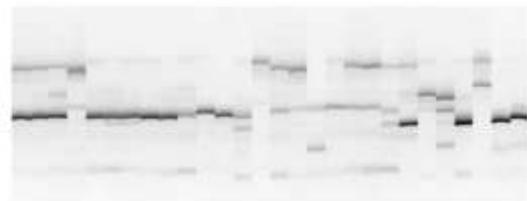
ANEXO III – DENDOGRAMA OBTENIDO MEDIANTE RAPD

1 A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

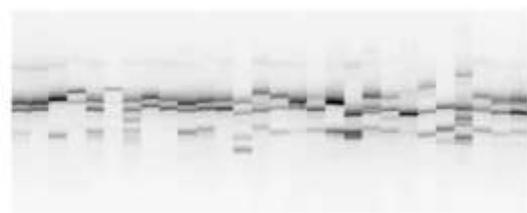
RAPD Profile 1



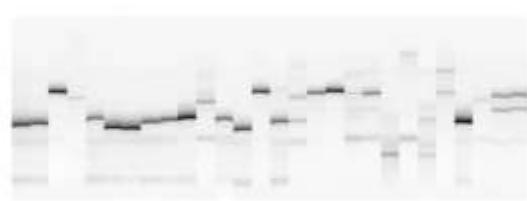
RAPD Profile 2



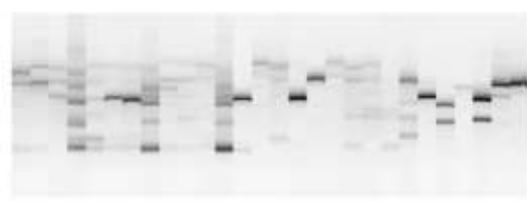
RAPD Profile 3



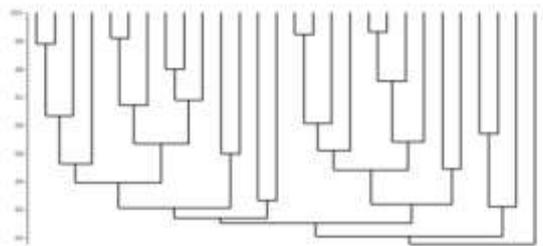
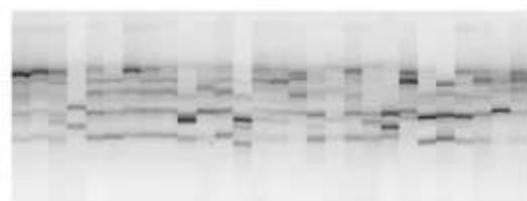
RAPD Profile 4



RAPD Profile 5



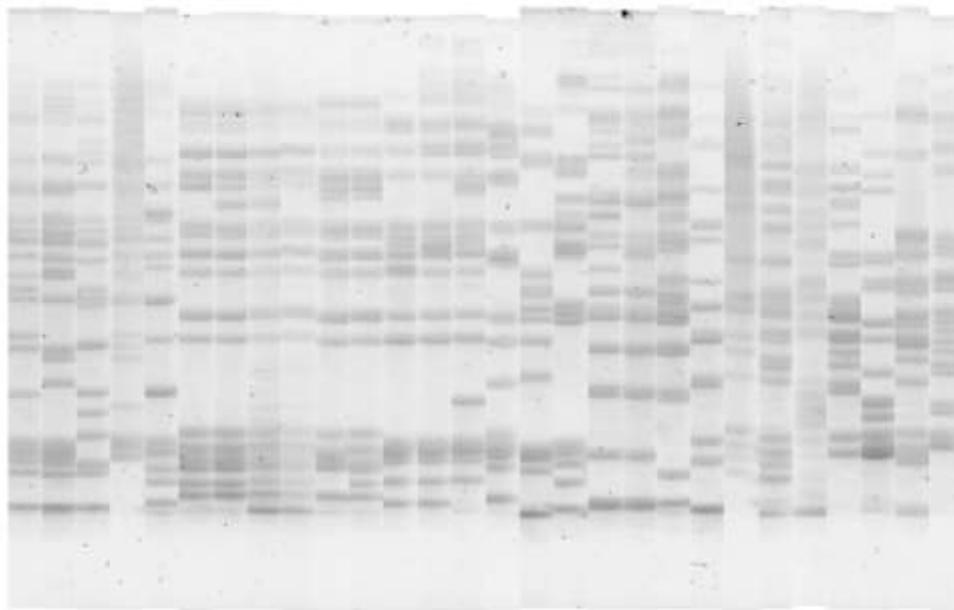
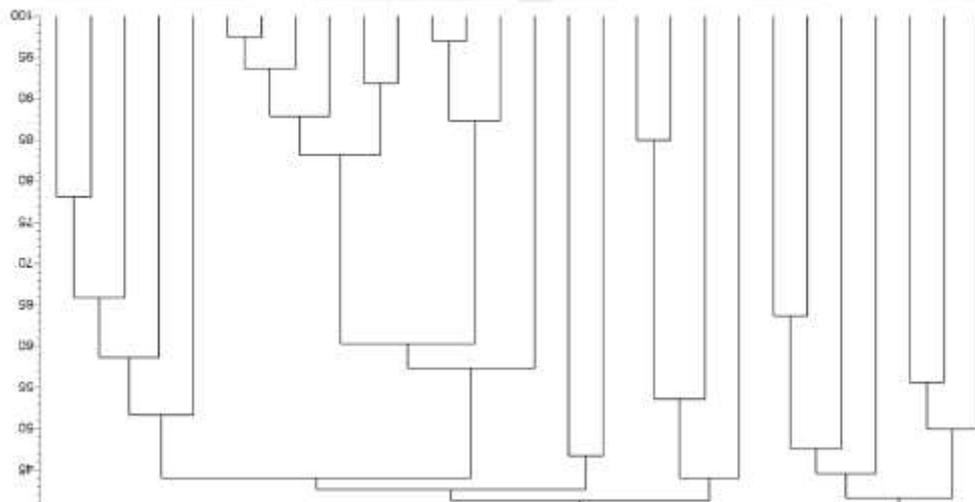
RAPD Profile 6



ANEXO IV – DENDOGRAMA DE PFGE, MLST Y GENES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

PFGE_XbaI_16bits

PFGE_XbaI_16bits



MLST	Mecanismo de resistencia	Perfil	N
ST307	CTX-M-15 + OXA-1	13	1
ST307	CTX-M-15	15	1
ST39	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	11	1
ST307	CTX-M-15	7	1
ST2850	CTX-M-14 + SHV-56	14	1
ST11	CTX-M-3 + OXA-1	6b	5
ST11	CTX-M-3 + DHA	6c	1
ST11	CTX-M-3 + DHA + OXA-1	6d	2
ST11	CTX-M-3	6a	1
ST11	SHV-12 + OXA-1	2a	10
ST11	OXA-1	2b	3
ST11	CTX-M-1	4a	17
ST11	CTX-M-1 + OXA-1	4b	3
ST11	CTX-M-1 + OXA-1	4c	1
ST437	SHV-12 + OXA-1	1	64
ST2721	CTX-M-15	16	1
ST2722	SHV-7	17	1
ST147	CTX-M-9 + SHV-12	9a	10
ST147	CTX-M-9	9b	1
ST147	CTX-M-9 + VIM	20	2
ST281	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	10	1
ST15	SHV-2	5	1
ST15	SHV-2	18	2
ST471	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	21	1
ST449	CTX-M-3 + OXA-1	12	1
ST33	CTX-M-15	8	1
ST403	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	19	1
ST405	CTX-M-15 + OXA-1 + TEM-1	3	3

