

Klebsiella pneumoniae productora de betalactamasas de espectro extendido en la Unidad de Cuidados Intensivos de Neonatos del Hospital Universitario Miguel Servet: factores de riesgo y epidemiología molecular

“Klebsiella pneumoniae extended-spectrum beta-lactamase in neonatal intensive care unit of Hospital Universitario Miguel Servet: risk factors and molecular epidemiology”

Trabajo Fin de Máster
Máster en Iniciación a la Investigación en Medicina

Universidad de Zaragoza
Septiembre 2016

Autor:

Elena Morilla Morales

Directores:

Dr Antonio Rezusta López

Dra Sofía Samper Blasco

Dra Ana Isabel López Calleja



Universidad
Zaragoza



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	4
RESUMEN	5
PALABRAS CLAVE	6
INTRODUCCIÓN	7
1. Niños prematuros.....	7
2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE.....	9
2.1 Epidemiología.....	9
2.2. Factores de virulencia.....	9
2.3. Betalactamasas de espectro extendido	10
2.4. Factores de riesgo relacionados con la adquisición de patógenos productores de BLEE.	11
2.5. Cuadros clínicos	12
2.6. Tratamiento antibiótico de infecciones por bacterias productoras de BLEE	13
2.7 Estrategias para controlar la infección.....	14
3. Situación epidemiológica de <i>K. pneumoniae</i> BLEE	15
4. Tipado molecular	18
4.1 Métodos basados en la restricción del ADN.....	18
4.2 Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos	19
4.3 Métodos basados en la secuenciación de ADN	20
4.4 Criterios de selección de técnicas de tipificación molecular	20
OBJETIVOS	22
1. Objetivo principal	22
2. Objetivos específicos.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
1. Diseño del estudio	23
1.1 Tipo de estudio y ámbito de desarrollo	23
1.2 Tipos de muestra y procesamiento.....	23
1.3 Métodos de identificación y estudio de sensibilidad	23
1.4 Variables incluidas en el estudio	24
2. Análisis estadístico	25
2.1 Análisis descriptivo.....	25
2.2 Análisis bivariado	25
2.3 Análisis multivariante o regresión logística	25

3. Tipado molecular	26
4. Limitaciones del estudio.....	27
5.Aspectos éticos	27
RESULTADOS.....	29
1. Total de pacientes estudiados	29
2. Aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> BLEE.....	29
3. Infecciones por <i>K. pneumoniae</i> BLEE.....	30
4. Predicción de la infección mediante frotis rectal	30
5. Factores de riesgo.....	31
5.1 Factores de riesgo intrínsecos	32
5.2 Factores de riesgo relacionados con los días de ingreso en UCIN	35
6. Sensibilidad antibiótica.....	39
7. Tipado molecular	40
DISCUSIÓN.....	48
1. Importancia <i>K. pneumoniae</i> BLEE en la UCIN: colonización e infección.....	48
2. Utilidad del frotis rectal en la predicción de la infección y como medida de control de brotes.....	48
3. Factores de riesgo relacionados con la infección por <i>K. pneumoniae</i> BLEE	50
4. Sensibilidad antibiótica y mecanismo de resistencia	53
5. Tipado molecular	54
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS	57
REFERENCIAS	58

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CNM: Centro Nacional de Microbiología

CTX-M-15: Cefotaxima Munich tipo 15

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

HUMS: Hospital Universitario Miguel Servet

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

IDCODE: Código de identificación de paciente

ITU: Infección del tracto urinario

Kp-BLEE: *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido

MALDI-TOF: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight

MDR: Multirresistente

MLST: Multi Locus Sequence Typing

NACHRI: National Association of Children's Hospitals and Related Institutions

NNIS: National Nosocomial Infections Surveillance

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: Electroforesis en campo pulsado

SHV: Sulfidril variable

SIL: Sistema informático del laboratorio

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal

UPGMA: Unweighted Pair Group with Arithmetic Averages

VM: Ventilación mecánica

RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

Las infecciones causadas por bacilos gram negativos son frecuentes en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN). Además, el uso de antibióticos de amplio espectro favorece la selección de cepas resistentes, las cuales se asocian con una mayor morbi-mortalidad. En concreto, *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido (Kp-BLEE) se ha relacionado con la aparición de brotes en las UCIN.

OBJETIVOS:

Analizar la incidencia de Kp-BLEE en la UCIN del Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) de Zaragoza y su repercusión clínica y epidemiológica.

METODOLOGÍA:

Estudio retrospectivo de los pacientes ingresados en la UCIN del HUMS con aislamiento de Kp-BLEE en muestras epidemiológicas y/o clínicas entre enero de 2012 y junio de 2015. Recogida de datos demográficos y clínicos de interés de la historia clínica informatizada que se analizan estadísticamente mediante análisis bivariante y multivariante. Selección de cepas en el periodo de estudio para su tipificación molecular mediante electroforesis por campo pulsado (PFGE).

RESULTADOS:

En el periodo de estudio, se aísla Kp-BLEE en 87 pacientes. La tasa de colonización es del 16%, mientras que la tasa de infección es del 2,4% y la de bacteriemia del 1,7%. Mediante el cribado rectal es posible predecir la bacteriemia por Kp-BLEE en el 75% de los casos.

Los factores de riesgo que se relacionan con la infección por Kp-BLEE son la baja edad gestacional, el bajo peso al nacimiento, la larga estancia en la UCIN y los procesos invasivos (la duración del catéter epicutáneo y de ventilación mecánica (VM)). La duración de la estancia en la UCIN es el único factor de riesgo que se asocia

independientemente con la infección por Kp-BLEE, aumentando el riesgo de infección 1,028 por cada día de ingreso.

Tras el tipado molecular mediante PFGE se detectan cuatro patrones genéticos diferentes en la UCIN.

CONCLUSIONES:

Kp-BLEE presenta una importante repercusión clínica y epidemiológica en la UCIN del HUMS. La bacteriemia es la principal infección producida por Kp-BLEE. El frotis rectal es muy útil en la predicción de la infección y permite la instauración rápida del tratamiento antibiótico correcto. El tipado molecular de los aislados es fundamental para conocer los patrones genéticos circulantes y establecer las relaciones epidemiológicas entre los diferentes aislamientos.

PALABRAS CLAVE

Klebsiella pneumoniae, betalactamasas de espectro extendido, Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal, factores de riesgo, tipado molecular.

INTRODUCCIÓN

1. Niños prematuros

El progreso médico ha incrementado considerablemente la supervivencia de los niños prematuros y con enfermedades de base. Estos pacientes requieren hospitalizaciones prolongadas en la UCIN donde son sometidos a múltiples procesos invasivos, lo que aumenta el riesgo de padecer infecciones nosocomiales¹.

La sepsis neonatal es la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños prematuros (<37 semanas de gestación) y con muy bajo peso al nacer (<1500 g). La detección precoz y administración de antibioterapia empírica adecuada son factores muy importantes en su evolución².

Se define sepsis como el aislamiento de una bacteria patógena en un hemocultivo de un paciente con signos y síntomas clínicos de bacteriemia. En los neonatos existen dos tipos de sepsis³:

- La sepsis precoz o temprana ocurre en las primeras 72 horas de vida. Habitualmente se debe a una transmisión vertical por ascenso de líquido amniótico contaminado o adquisición de bacterias, durante el parto, que están colonizando o produciendo una infección del tracto inferior genital femenino⁴. Los patógenos más habituales son *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*⁵.
- La sepsis tardía aparece tras las 72 horas de vida, se puede adquirir por transmisión vertical, comenzando con una colonización que desemboca en infección; o por transmisión horizontal por el contacto directo con el personal sanitario o reservorios ambientales. También se han descrito casos por contacto directo con los familiares, la prevalencia es baja en países como Noruega⁶ o alta como en Madagascar que considerando todas la enterobacterias sería del 18,6%⁷. Los patógenos más frecuentes son estafilococos coagulasa negativos (48%), otros grampositivos (22%), gramnegativos (18%) y hongos (12%); aunque estos porcentajes varían en cada país y en función del nivel de desarrollo^{8,9}.

Los niños prematuros presentan importantes factores de riesgo³:

- Inmunosupresión por bajos niveles de IgG materna por la pérdida de transferencia transplacentaria que ocurre en el tercer trimestre, además la opsonización y función del complemento está disminuida.
- Barrera epitelial de mucosas inmadura, delgada y delicada, frágil por lo que aporta poca protección; además es frecuentes realizar intervenciones quirúrgicas en estos pacientes.
- Procedimientos invasivos (catéter central, VM y nutrición parenteral).

La UCIN representa un ambiente relativamente libre de bacterias resistentes ya que ingresan niños procedentes del paritorio inmediatamente tras el nacimiento. Los neonatos adquieren el microbioma de sus madres, las cuales generalmente son mujeres sanas no colonizadas por bacterias resistentes. Sin embargo, las madres portadoras de enterobacterias productoras de BLEE, incluso no habiendo tomado antibióticos previamente, son un factor de riesgo importante de morbi-mortalidad, aspecto que podría sugerir la necesidad de realizar cribado rectal en las madres^{7,10,11}.

En la UCIN la implantación de medidas para controlar la infección se debe realizar con mayor énfasis que otras UCI ya que el manejo de los pacientes es muy complicado¹¹.

En las UCIN son frecuentes las infecciones causadas por bacilos gram negativos, ya que forman parte de la flora intestinal y la infección se produce habitualmente por translocación¹². Además, el uso de antibióticos de amplio espectro favorece la selección de cepas resistentes, las cuales se asocian con una mayor morbi-mortalidad; y como consecuencia con un mayor coste sanitario. En concreto, Kp-BLEE se ha relacionado con la aparición de brotes en las UCIN^{13,14}.

Stapleton et al. en su revisión de 75 brotes producidos *Enterobacteriaceae* productoras de BLEE en las UCIN, encuentra 1185 colonizados y 860 infecciones, con 139 muertes. Los microorganismos predominantes fueron 69% *Klebsiella* spp, 13% *Enterobacter* spp, 11% *E. coli*, *Salmonella* spp el 4% y *Serratia marcescens* el 3%¹⁵.

2. *Klebsiella pneumoniae* BLEE

2.1 Epidemiología

K. pneumoniae pertenece al género *Klebsiella*, incluido en la familia *Enterobacteriaceae*. Es considerado patógeno humano desde finales del siglo XIX cuando se aisló por primera vez por Edwin Klebs. Se divide en tres subespecies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* es la especie más prevalente e importante clínicamente^{13,16}.

Klebsiella spp. es una bacteria de distribución mundial. El ser humano es el principal reservorio¹⁶. La tasa de colonizados a nivel comunitario es del 5-38% en recto y 1-6% en nasofaringe, habitualmente no se encuentra en la piel. Esta tasa aumenta drásticamente en el ambiente hospitalario, y se relaciona directamente con los días de estancia hospitalaria. Es patógeno oportunista que afecta primariamente a individuos que están hospitalizados y que padecen enfermedades graves como diabetes mellitus o obstrucción pulmonar crónica¹³.

En la UCIN es frecuente aislar *K. pneumoniae* en el 7% de los niños, de las cuales el 67% son Kp-BLEE¹⁷. Sin embargo durante un brote se puede aislar hasta en el 32% de los pacientes¹⁸.

Esto es debido principalmente al uso de antimicrobianos y adquiere gran importancia clínica tras un estudio donde se observó que la infección en colonizados era cuatro veces superior en comparación con los no colonizados¹⁹. Además es capaz de sobrevivir en las superficies y, temporalmente, en las manos de los trabajadores sanitarios, lo que facilita su transmisión horizontal entre los pacientes ingresados en la unidad, favoreciendo la aparición de brotes^{13,14}.

2.2. Factores de virulencia

K. pneumoniae presenta cinco factores de virulencia que contribuyen a su patogenia: serotipo capsular, fenotipo mucoso (hypermucoviscosity), lipopolisacáridos, sideróforos y pili¹⁶.

Como punto crítico en la patología infecciosa, el microorganismo debe acercarse lo máximo posible a las superficies mucosas del huésped y mantener esa proximidad para que se produzca el ataque celular. Las fimbrias o pili son proyecciones filamentosas de la superficie bacteriana que median su adhesión a las células del hospedador¹³. La mayoría de los aislados de Kp-BLEE presentan una fimbria específica denominada KPF-28. Además el plásmido que codifica para BLEE está involucrado en la expresión de KPF-28. Su expresión promueve la adherencia y la colonización del intestino, favoreciendo su diseminación y la aparición de brotes nosocomiales²⁰.

2.3. Betalactamasas de espectro extendido

En las enterobacterias el mecanismo de resistencia más importante frente a los antibióticos betalactámicos, por su frecuencia y eficacia, es la producción de betalactamasas. Son enzimas capaces de hidrolizar el anillo betalactámico inactivando los antibióticos. Las BLEE son activas frente a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam) causando resistencias a estos antibióticos. Sin embargo, son sensibles a cefamicinas (cefoxitina, cefotetán), carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem) y los inhibidores de betalactamasas (clavulánico, sulbactam, tazobactam)²¹.

Los genes que codifican las BLEE se encuentran en plásmidos, también denominados elementos móviles, facilitando su diseminación debido a que se pueden transmitir entre diferentes especies de bacilos gran negativos *in vivo*. Estos plásmidos además presentan genes de resistencia a otros antimicrobianos como son fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas y trimetoprim-sulfametoxazol. Por tanto, las bacterias que contienen esos plásmidos suelen ser resistentes a múltiples antibióticos²¹⁻²³.

Las BLEE se pueden clasificar en diferentes clases moleculares según Ambler²⁴ y grupos funcionales según Bush y Jacoby²⁵. La mayoría pertenecen a la clase molecular A y grupo funcional 2be. Entre ellas se encuentran fundamentalmente las TEM y SHV, derivadas de betalactamasas con un menor espectro de hidrólisis y la familia CTX-M, procedente de betalactamasas cromosómicas del género *Kluyvera*^{21,23}.

La historia de las BLEE comienza en Alemania en 1983, tras la introducción de la cefotaxima se aíslan cepas de *K. pneumoniae* con resistencia transferible a oximino-cefalosporinas relacionadas con SHV, se les denominaron SHV-2. Las betalactamasas TEM tipo BLEE se descubrieron en Francia en 1984 y en USA en 1988. Estas enzimas presentan una o más sustituciones en la secuencia aminoacídica, con lo que se produce un incremento en su espectro de hidrólisis. Desde entonces estas enzimas se han descrito cada vez con más frecuencia en todos los países. En España se detectaron por primera vez en el año 1988. Inicialmente predominaron en Europa las BLEE tipo SHV, pero a finales de los 80 apareció una nueva familia, la CTX-M. En la década de los 90 estas enzimas se encontraron en distintas especies de *Enterobacteriaceae* produciendo brotes nosocomiales, pero a partir del 2000 se han convertido en las más frecuentes, tanto en infecciones nosocomiales como comunitarias^{21,23}.

La detección rápida de resistencias y su caracterización es una prioridad en los laboratorios de microbiología clínica, ya que ayuda a establecer el tratamiento antibiótico adecuado e instaurar las medidas de aislamiento pertinentes para evitar su diseminación a otros pacientes. Su detección no siempre es fácil, depende de la expresión fenotípica, condicionada por la cantidad de enzima producida y la presencia o no de otros mecanismos de resistencia²¹.

Aunque las BLEE son un problema global, enzimas y genotipos específicos suelen estar asociadas a regiones geográficas, hospitales y unidades concretas, por tanto es importante conocer los patrones propios de resistencias²³.

La detección de las BLEE se basa en la resistencia a oximino-cafalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima) y la capacidad de los inhibidores de betalactamasas de bloquear esa resistencia²¹.

2.4. Factores de riesgo relacionados con la adquisición de patógenos productores de BLEE

Diferentes estudios epidemiológicos sugieren que el uso de antimicrobianos de amplio espectro, como las cefalosporinas de tercera generación, es el principal factor que contribuye a la aparición de cepas multirresistentes^{17,22}.

Otros muchos factores se han relacionado con la colonización y la infección por Kp-BLEE. El catéter arterial y el venoso central, la colonización gastrointestinal por bacterias productoras de BLEE, la estancia prolongada en UCI, el bajo peso en niños prematuros, el uso previo de antibióticos y la VM son los factores más frecuentes^{14,22}. Se ha demostrado que el estado de portador es más frecuente en pacientes hospitalizados, y que la tasa de colonización está relacionada directamente con la duración de la estancia hospitalaria^{22,26}.

Se han descrito numerosos brotes producidos por Kp-BLEE en las UCIN. Los pacientes colonizados asintomáticos pueden ser el principal reservorio. La transmisión ocurre de forma horizontal entre pacientes a través del contacto con el personal sanitario. Además, el material para el cuidado de los pacientes contaminado se ha implicado en la transmisión^{14,22}. Muchos estudios han demostrado como factor importante una baja adherencia a las políticas de control. Los brotes por Kp-BLEE se caracterizan por altas tasas de ataque y un gran número de colonizados. Los neonatos con mayor riesgo de colonización son aquellos con estancia prolongada en la unidad, baja edad gestacional y bajo peso al nacer^{15,22}.

2.5. Cuadros clínicos

La importancia de los bacilos gram negativos como agentes productores de infecciones nosocomiales en la UCIN está bien documentada. *K. pneumoniae* puede causar sepsis precoz y, más comúnmente, sepsis tardía, también conjuntivitis, neumonía, infección del tracto urinario (ITU) e infección de herida quirúrgica²².

K. pneumoniae produce aproximadamente el 4% de sepsis tardías en niños de bajo peso y el 6% del total de infecciones. Según datos del National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) de 1996, *K. pneumoniae* produce el 2.9% de bacteriemias, el 2.9% de las infecciones del tracto respiratorio superior, el 9.8% de las infecciones gastrointestinales, el 5.7% de neumonías y el 6.3% de las infecciones de herida quirúrgica. En 1999, una encuesta realizada por el CDC/National Association of Children's Hospitals and Related Institutions (NACHRI) demostró que *K. pneumoniae* era causa del 1.7% de sepsis, el 20% de infecciones respiratorias, el 8.3% ITUS y el 5.6%

otras infecciones²². En la UCIN Kp-BLEE es el segundo agente productor de infección con un 17,1%, después de *Staphylococcus* coagulasa negativo con un 20,7%²⁷.

2.6. Tratamiento antibiótico de infecciones por bacterias productoras de BLEE

El tratamiento de las infecciones producidas por Kp-BLEE puede ser un reto y está en constante evolución. El tipo de BLEE junto con el lugar y la gravedad de la infección deben ser considerados en la elección del tratamiento antibiótico. Por tanto, vigilar activamente los organismos productores de BLEE es crítico para describir la epidemiología local de una determinada institución y de los centros de referencia o como medida de control^{11,15,22,28}.

Las cefalosporinas de amplio espectro fueron inicialmente desarrolladas para el tratamiento de bacterias productoras de betalactamasas. Sin embargo, la aparición de BLEE ha limitado su uso en infecciones graves. Se han descrito fracasos terapéuticos y altas tasas de mortalidad asociados con el uso de cefalosporinas de amplio espectro, cuando se informó sensible *in vitro*; por tanto no se recomienda su uso en bacteriemias y otras infecciones complicadas. Pero sí son eficaces en el tratamiento de infecciones leves como ITU y neumonía^{22,23,29}.

Los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico y tazobactam, han demostrado ser capaces de inhibir *in vitro* las BLEE. Su asociación con una penicilina de amplio espectro, presenta una acción antimicrobiana de amplio espectro capaz de inhibir a una gran variedad de bacterias, incluidas las BLEE. Pero se han descrito fracasos de tratamiento por diferentes razones: la presencia de un posible gran absceso que contiene un gran número de microorganismos, la hiperproducción de BLEE o mutantes deficitarios en porinas que limita el acceso del antibiótico en la bacteria^{22,23,29}.

El incremento en la morbilidad y mortalidad y las hospitalizaciones prolongadas por una infección por Kp-BLEE, se debe principalmente al retraso en establecer el tratamiento antimicrobiano adecuado^{22,23}.

Los plásmidos además de llevar el gen que codifica para BLEE, suele estar acompañado de resistencia a otros antimicrobianos. En concreto, se ha descrito la relación entre BLEE y resistencia a ciprofloxacino, que se observa hasta en el 18% de las cepas^{22,23}.

Actualmente, los carbapenémicos son los antibióticos de elección en el tratamiento de estas infecciones. Son estables frente a las BLEE y además presentan pequeño tamaño que permite su entrada en la bacteria a través de porinas^{22,23}.

2.7 Estrategias para controlar la infección

Para controlar la diseminación de cepas productoras de BLEE, se deben implantar intervenciones apropiadas en el control de la infección en todos los pacientes con infección y/o colonización por estas bacterias. En estas medidas se incluyen una efectiva higiene de manos, precauciones de contacto en el manejo de los pacientes y cultivos de vigilancia epidemiológica semanales^{11,23}.

Durante un brote prolongado, se debe realizar una amplia investigación para buscar reservorios adicionales en pacientes colonizados, en el personal sanitario y pueden ser necesarias muestras ambientales. Aunque la investigación epidemiológica habitualmente falla en la detección del origen común del brote^{14,15,22,30} (Figura 1). También es importante el uso racional de antibióticos, especialmente las cefalosporinas de amplio espectro. Esto es particularmente importante en unidades en las que se usa cefotaxima en el tratamiento de la sepsis tardía²².

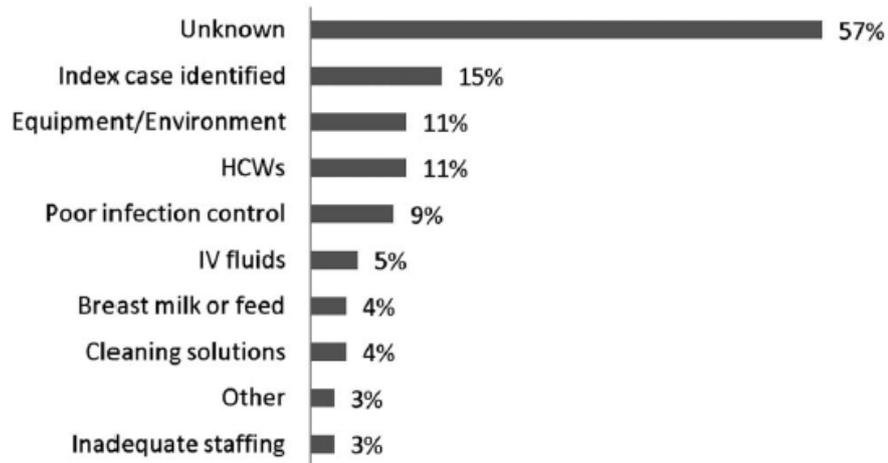


Figure 2 Frequency of reported source of outbreaks (n=75). IV, intravenous. HCW, health care workers.

Figura 1. Frecuencia de origen del brote informado. Tomada de: Stapleton et al¹⁵.

3. Situación epidemiológica de *K. pneumoniae* BLEE

Según datos del último informe del European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) de 2014, la distribución a nivel Europeo de *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de 3ª generación en infecciones invasivas es la siguiente (Figura 2)³¹:

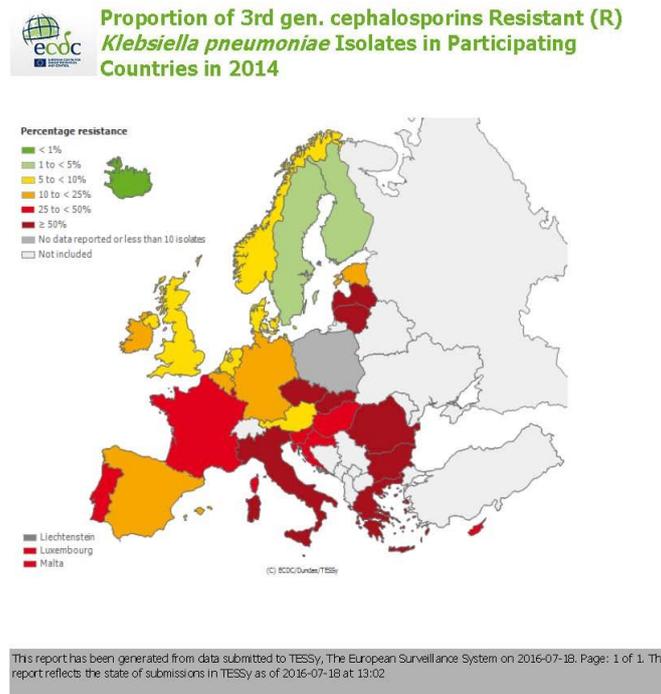


Figura 2. Proporción de *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de 3ª generación en los países participantes en 2014.

Los países del centro y sur de Europa presentan tasas muy elevadas de resistencia a cefalosporinas de 3ª generación, incluso superiores al 50%. Mientras que los países del norte presentan porcentajes más bajos, inferiores al 10%. España se encuentra en una situación intermedia, con tasas del 10 a <25%³¹.

Además, esta base de datos nos permite ver la evolución de las proporciones a lo largo de los años. En el caso de España, en 2005 había un 7,1% de *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de 3ª generación y en 2014 este dato ha aumentado hasta un 18% (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución proporción de *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de 3ª generación en España, 2005-2014. Tomada de: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>

Country	Year	Antibiotic Group	S	I	R	Total N	%S	%I	%R
Spain	2005	3rd gen. cephalosporins	52	0	4	56	92.9 %	0.0 %	7.1 %
Spain	2006	3rd gen. cephalosporins	507	2	53	562	90.2 %	0.4 %	9.4 %
Spain	2007	3rd gen. cephalosporins	553	1	59	613	90.2 %	0.2 %	9.6 %
Spain	2008	3rd gen. cephalosporins	562	1	76	639	87.9 %	0.2 %	11.9 %
Spain	2009	3rd gen. cephalosporins	556	2	70	628	88.5 %	0.3 %	11.1 %
Spain	2010	3rd gen. cephalosporins	1041	1	119	1161	89.7 %	0.1 %	10.2 %
Spain	2011	3rd gen. cephalosporins	987	5	153	1145	86.2 %	0.4 %	13.4 %
Spain	2012	3rd gen. cephalosporins	957	3	193	1153	83.0 %	0.3 %	16.7 %
Spain	2013	3rd gen. cephalosporins	995	0	246	1241	80.2 %	0.0 %	19.8 %
Spain	2014	3rd gen. cephalosporins	1033	4	228	1265	81.7 %	0.3 %	18.0 %

Respecto a *K. pneumoniae* multirresistente (MDR) (resistencia a cefalosporinas de 3ª generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos) el mapa de Europa varía (Figura 3)³¹:

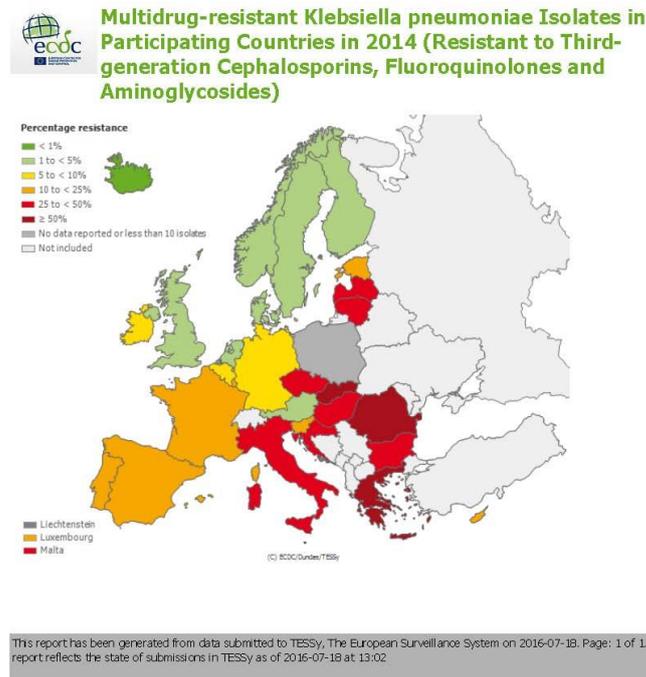


Figura 3. Proporción de *K. pneumoniae* MDR (resistente a cefalosporinas de 3ª generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos) en los países participantes en 2014.

Los países del sur de Europa mantienen una proporción muy elevada de resistencia, superiores al 25% e incluso al 50% en países como Turquía. Los países del

centro presentan tasas intermedias, inferiores al 25%. Mientras que los países del norte tienen proporciones bastante bajas, inferiores al 5%. España tiene una tasa del 10 a <25%³¹.

La proporción de *K. pneumoniae* MDR en España ha ido aumentando a lo largo de los años, en 2005 nos encontramos con 3,6% y en 2014 con 10% (Tabla 2).

Tabla 2. Evolución proporción de *K. pneumoniae* MDR en España, 2005-2014. Tomada de: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>

Country	Year	Antibiotic Group	MDR	Total N	%MDR
Spain	2005	Multiple drug resistance	2	56	3,6 %
Spain	2006	Multiple drug resistance	6	561	1,1 %
Spain	2007	Multiple drug resistance	33	612	5,4 %
Spain	2008	Multiple drug resistance	27	638	4,2 %
Spain	2009	Multiple drug resistance	30	627	4,8 %
Spain	2010	Multiple drug resistance	55	1161	4,7 %
Spain	2011	Multiple drug resistance	95	1145	8,3 %
Spain	2012	Multiple drug resistance	102	1150	8,9 %
Spain	2013	Multiple drug resistance	139	1241	11,2 %
Spain	2014	Multiple drug resistance	127	1265	10,0 %

4. Tipado molecular

Las técnicas de tipificación molecular son útiles en la vigilancia y control de brotes porque permiten conocer la relación entre aislados, identificar reservorios y determinar vías de transmisión^{16,32,33}. Se clasifican en tres grandes grupos:

4.1 Métodos basados en la restricción del ADN

La PFGE es la técnica de referencia de tipificación debido a que tiene un elevado poder de discriminación. Esta técnica proporciona mediante un sistema de electroforesis la visualización de los fragmentos del genoma tras la restricción enzimática. El patrón de bandas es único para cada cepa^{16,32}.

La PFGE es una variación de la electroforesis clásica que permite separar y analizar grandes fragmentos de ADN (superiores a los 2106 pb). La PFGE incorpora un cambio periódico de la dirección del campo eléctrico entre dos o más ángulos preestablecidos, lo que se denomina un pulso. Esto facilita la reorientación de las moléculas grandes y permite su separación³⁴.

Un punto crítico de la técnica es la extracción del ADN para su análisis. Las células se incluyen e inmovilizan en dados de agarosa. En el interior del dado, se produce la lisis celular y su tratamiento con proteasas para liberar el ADN de las proteínas que lo acompañan. Después, parte del dado se introduce en el pocillo del gel y se procede a la electroforesis. Se suelen utilizar geles de concentraciones semejantes a las usadas en electroforesis normal, aunque se emplean agarosas especialmente puras³⁴.

La combinación de la técnica de PFGE con el empleo de las enzimas de restricción permite distinguir distintos aislados de una misma especie bacteriana mediante la comparación de la movilidad de los fragmentos de ADN. También puede ser de ayuda cuando se quiere analizar plásmidos de gran tamaño que no son distinguibles mediante las electroforesis convencionales³⁴.

Entre las limitaciones más importantes de la PFGE están el elevado coste del equipo, su laboriosidad y el tiempo necesario para analizar los patrones así como la necesidad de un programa informático para analizar los patrones^{16,33}.

Desde el desarrollo de esta técnica, se han creado diferentes redes nacionales e internacionales, mediante la asociación de laboratorios de investigación. Estas redes colaboran en el desarrollo, la validación y la aplicación de métodos de tipificación normalizados y la realización de estudios sobre la distribución geográfica y la propagación de diferentes patógenos por medio de la red llamada PulseNet Internacional. En el caso de PFGE disponen de protocolos de libre acceso para tipificar *E. coli*, *Shigella* y *Salmonella*³⁵.

4.2 Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos

Existen numerosas técnicas de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la más utilizada es la PCR de secuencias de ADN repetidas (REP-PCR).

Esta técnica se fundamenta en la utilización de cebadores que hibridan de forma específica con unas secuencias de ADN repetitivas (secuencias rep), de función desconocida, que se encuentran dispersas por todo el genoma de muchas bacterias. Estas secuencias tienen una longitud variable, que oscila entre 35 y 40 pb. La variabilidad en los perfiles de bandas de ADN generados mediante REP-PCR viene determinada por el número de secuencias repetitivas y por la distancia que hay entre dichas secuencias (se amplifica la región de ADN que separa las secuencias REP)³³.

Estas técnicas son más económicas, menos laboriosas (algunas son semiautomatizadas y están comercializadas), y suelen generar patrones de bandas relativamente más fáciles de interpretar que la PFGE³³.

4.3 Métodos basados en la secuenciación de ADN

De los métodos de tipificación basados en la secuenciación de ADN, con el que existe más experiencia es con el MLST (*multilocus sequencing typing*). Esta técnica se fundamenta en la secuenciación parcial de 6 o 7 genes metabólicos muy conservados que están sujetos a escasa presión selectiva, como ocurre con algunos genes relacionados con el metabolismo o con factores de virulencia y los genes ribosomales^{16,33}.

Aunque es una técnica muy laboriosa y costosa tiene la ventaja de que los resultados obtenidos (secuencias tipo) son objetivables, se pueden almacenar en formato electrónico y se pueden intercambiar entre laboratorios muy distantes geográficamente, lo que permite poder comparar perfiles o secuencias tipo entre aislados de distintos países o continentes^{16,33}.

Actualmente, se empiezan a utilizar técnicas de secuenciación del genoma completo junto con el análisis epidemiológico para establecer lo ocurrido durante un brote³⁰.

4.4 Criterios de selección de técnicas de tipificación molecular

El poder de discriminación de las técnicas de PCR puede ser inferior o similar al de la PFGE. Tanto la PFGE como las técnicas de PCR tienen que optimizarse o

estandarizarse en el laboratorio para garantizar una buena reproducibilidad. Para el estudio de brotes pequeños y de corta evolución, en los que interesa obtener una información con rapidez, es preferible utilizar una técnica de PCR. En brotes más complejos y de mayor duración, en los que interesa conocer además la evolución o dinámica de los clones con el tiempo, es más rentable utilizar la PFGE. Los métodos de tipificación basados en la secuenciación del ADN, como el MLST, se utilizan para estudios epidemiológicos globales o para analizar la estructura poblacional de los microorganismos^{16,30,33}.

OBJETIVOS

1. Objetivo principal

Analizar la incidencia de Kp-BLEE en la UCIN del HUMS de Zaragoza entre enero de 2012 y junio de 2015 y su repercusión clínica y epidemiológica.

2. Objetivos específicos

- Estudiar la incidencia de la colonización y/o infección por Kp-BLEE, principalmente bacteriemia.
- Evaluar la utilidad de los controles epidemiológicos, en concreto el frotis rectal, en la predicción de la infección y como medida de prevención de brotes.
- Analizar los factores de riesgo asociados con la infección por Kp-BLEE.
- Analizar los perfiles de sensibilidad de los aislamientos clínicos y epidemiológicos.
- Realizar tipado molecular de una selección de cepas para conocer los patrones genéticos circulantes y estudiar posibles brotes.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio

1.1 Tipo de estudio y ámbito de desarrollo

Estudio retrospectivo de los pacientes ingresados en la UCIN del HUMS con aislamiento de Kp-BLEE en muestras epidemiológicas y/o clínicas entre enero de 2012 y junio de 2015.

El HUMS es el hospital de referencia para el Sector II de Zaragoza y por su grado de especialización en algunos procesos para todo Aragón. Es un complejo con 1345 camas y está formado por cuatro edificios: Hospital General, Hospital Traumatología, Hospital Materno-Infantil y Consultas Externas. La UCIN se encuentra en el Hospital Materno-Infantil y presenta 14 cunas con equipos de cuidados de alto riesgo para el recién nacido y una media de 216 ingresos anuales. Generalmente los neonatos ingresan en la UCIN desde la sala de partos, pero ocasionalmente también procedentes de otra planta u otros centros.

1.2 Tipos de muestra y procesamiento

Se realiza frotis rectal semanal a los pacientes ingresados en la UCIN que se remite al laboratorio de Microbiología.

Las muestras epidemiológicas se siembran en agar McConkey con 1 mg/L de cefotaxima³⁶ para detectar los aislados productores de BLEE.

Las diferentes muestras clínicas (hemocultivo, orina, etc.) se procesan según los procedimientos establecidos en el laboratorio.

1.3 Métodos de identificación y estudio de sensibilidad

La identificación bacteriana se realiza mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI Biotyper™, Bruker Daltonics).

El cribado de BLEE en las muestras epidemiológicas se realiza por método disco-placa con cefpodoxima en ausencia y presencia de ácido clavulánico. Se considera un resultado positivo cuando el halo de cefpodoxima con ácido-clavulánico es ≥ 5 mm respecto a cefpodoxima sola³⁷.

El estudio de la sensibilidad antibiótica y la confirmación de BLEE se lleva a cabo por paneles comerciales mediante el sistema automatizado MicroScan WalkAway (Beckman®). Se determina el rango de concentración mínima inhibitoria (CMI). El resultado se interpreta según normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) hasta mayo de 2014 y del European Comite on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) desde mayo de 2014. Se considera que la cepa es portadora de BLEE cuando existe una reducción de la CMI superior o igual a tres diluciones dobles en presencia de ácido clavulánico para cefotaxima y/o ceftazidima respecto a la CMI de la cefalosporina sin ácido clavulánico³⁷.

1.4 Variables incluidas en el estudio

Recogida de datos demográficos y clínicos de interés de la historia clínica informatizada. Recogida de datos microbiológicos del sistema informático del laboratorio (SIL)^{14,26,38-40}:

- **Factores de riesgo intrínsecos:**
 - Sexo
 - Edad gestacional (semanas)
 - Tipo de parto: Cesárea o Eutóctico
 - Peso al nacimiento (gramos)
- **Factores de riesgo relacionados con el ingreso:**
 - Días de ingreso en UCIN
 - Tiempo de colonización (días): tiempo que transcurre desde el ingreso del paciente en la UCIN hasta la detección de Kp-BLEE en el cribado rectal.

- Infección y/o colonización por Kp-BLEE
- Antibioterapia previa al aislamiento de Kp-BLEE
- Procesos invasivos: catéter epicutáneo (días), VM (horas) y nutrición parenteral

2. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utiliza el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) (SPSS Inc., Chicago, Illinois) versión 15.0 para Windows.

2.1 Análisis descriptivo

Se realiza una distribución de frecuencias para las variables cualitativas y se calculan las medias y desviaciones estándar para las variables cuantitativas.

2.2 Análisis bivariado

Se realiza un estudio bivalente para establecer la relación de cada una de las variables analizadas con la presencia de infección por Kp-BLEE respecto a solo colonización.

En el caso de variables cualitativas, se aplica el test de Chi-cuadrado de Pearson, con la corrección de Yates o la Prueba exacta de Fisher (en tablas 2x2, cuando no se cumplen las hipótesis para la Chi-cuadrado) si fuera necesario.

En el caso de variables cuantitativas, se ha utilizado la técnica no paramétrica de la U de Mann-Whitney ya que la muestra no cumple criterios de normalidad.

El nivel de confianza escogido para los diferentes test es del 95%.

2.3 Análisis multivariante o regresión logística

Este tipo de análisis se utiliza para contrastar conjuntamente el efecto de una serie de factores sobre la presencia o ausencia de un suceso.

En este caso, aquellas variables que muestren asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el análisis bivariado se incluyen en el análisis multivariante que

se realiza mediante regresión logística (por pasos hacia adelante) siendo la variable dependiente la presencia de infección por Kp-BLEE (No/Sí).

3. Tipado molecular

Se seleccionan un total de 43 aislados de Kp-BLEE para tipado molecular por PFGE. Se incluyen todos los aislamientos de muestras clínicas del periodo de estudio (24 aislamientos) y además 11 muestras epidemiológicas de estos pacientes y otros 8 solo colonizados que coinciden en el periodo de estudio en la UCIN.

El protocolo seguido es una modificación del protocolo para Salmonella de PulseNet. Consta de diferentes pasos que se describen a continuación³⁵:

- **Día 1:** resiembra de los aislados a partir de archivo conservado a -80°C en medio triptosa-soja glicerol en agar sangre (Oxoid™) e incubación a 35°C durante 18-24 horas.
- **Día 2:** resiembra de los aislados en Lysogeny Broth (Sigma®) e incubación a 35°C durante 18-24 horas.
- **Día 3:** elaboración de tacos de agarosa (Seakem gold agarosa, BioRad®) donde se inmovilizan las células bacterianas. Incubación durante 2 horas en agitación con proteinasa K (Sigma®) y buffer de lisis. Lavados con agua estéril y tris-EDTA (National Diagnostic®) para eliminar residuos.
- **Día 4:** Restricción del DNA genómico con la enzima *XbaI* (TaKaRa Biotechnology®) durante 2.5 horas a 37°C^{32,41}. La PGFE se realiza con el sistema CHEF III (Bio-rad), con tiempo de inicio 2.2 y tiempo final de 63.8 durante 17 horas.
- **Día 5:** Tinción del gel, lavado, visión de imagen en transiluminador con luz Ultravioleta (Syngene Bio Imagine, Gene Flash) y guardar imagen en formato TIF.

Los patrones genéticos obtenidos se analizan mediante el programa informático BioNumerics versión 6 (Applied Biomaths, Sint-Martens-Latem, Belgium). El grado de similitud se calcula con el coeficiente de Dice con una tolerancia de 1.5% y

optimización 2%. El método usado para el análisis de los cluster es UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Averages). Se establece más del 80% de homología entre aislados relacionados. La relación entre cepas se determina con los criterios de Tenover et al³².

Se envían aislados seleccionados al Centro Nacional de Microbiología para tipado molecular por REP-PCR y detección del mecanismo de resistencia. Se seleccionan al menos un aislado de cada patrón detectado para establecer que no existe relación entre ellos. Y además se seleccionan dos aislados de cada cluster definido por PFGE para confirmar que están relacionados genotípicamente.

4. Limitaciones del estudio

- Generalmente no se realiza frotis rectal en el momento del ingreso, se desconoce el estado inicial del paciente respecto a colonización y no siempre está garantizado que se realice a los tres días de nacimiento, ya que se realiza un día concreto a la semana.
- Al realizarse el frotis semanalmente, muchos de los pacientes de corto ingreso (<7 días) no tienen cribado rectal.
- Cuando un paciente tiene un resultado positivo para Kp-BLEE no se repite la toma, no conocemos la evolución y si se descoloniza.
- Existen periodos en los que no se ha podido realizar cribado rectal semanal: en el primer año tras la implantación de las medidas (13/03/12-15/05/12 y 24/09/12-17/10/12) y a lo largo del tiempo de estudio periodos de 10-12 días.
- Problemas para poner a punto la técnica de PFGE: es una técnica muy laboriosa, que requiere mucho tiempo e importantes recursos materiales.

5. Aspectos éticos

El tratamiento de los datos se va a realizar de acuerdo a la normativa de protección de datos de carácter personal y de tratamiento automatizado de los

mismos (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. BOE nº 298. 14712/1999).

Se guardará la confidencialidad, se usarán solo datos disociados al realizar la base de datos y no se publicarán datos que puedan identificar a ningún paciente.

RESULTADOS

1. Total de pacientes estudiados

Entre enero de 2012 y junio de 2015, 755 pacientes ingresaron en la UCIN del HUMS. Se realizaron 1435 frotis rectales en 519 (69%) pacientes. No se realizó cribado rectal en 236 pacientes, en el 84,7 % de los casos los pacientes tuvieron un ingreso ≤ 7 días. El porcentaje de pacientes sin cribado rectal en ingresos >7 días, ha disminuido del 22% en 2012 hasta 6,7% en 2015. Además los dos pacientes sin cribado rectal con ingreso >7 días del año 2015 tuvieron un ingreso de 8 y 9 días respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Pacientes sin cribado rectal.

Año	Pacientes sin cribado rectal	Ingreso ≤ 7 días	Ingreso >7 días
2012	100	78	22
		78,0%	22,0%
2013	58	52	6
		89,7%	10,3%
2014	48	42	6
		87,5%	12,5%
jun-15	30	28	2*
		93,3%	6,7%
Total	236	200	36
		84,7%	15,3%

*9 y 10 días de ingreso

2. Aislamientos de *K. pneumoniae* BLEE

En el periodo de estudio, se aisló Kp-BLEE en muestras clínicas y/o epidemiológicas en 87 pacientes: 15 pacientes (17%) presentaron infección y colonización rectal, 3 pacientes (3.5%) presentaron únicamente infección (no se disponía de frotis rectal) y 69 pacientes (79%) estaban colonizados pero no llegaron a presentar infección.

Se detectaron 84/519 (16%) pacientes colonizados por Kp-BLEE y 18 pacientes infectados (2.4% del total de 755 pacientes ingresados y 21% del total de 84 pacientes colonizados) (Tabla 4).

Tabla 4. Características de los pacientes ingresados en UCIN.

	N	%
Pacientes ingresados en UCIN	755	100,0%
Pacientes con cribado rectal	519	68,7%
Pacientes con aislamiento Kp-BLEE	87	11,5%*
Pacientes colonizados por Kp-BLEE	84	16,2%**
Pacientes infectados por Kp-BLEE	18	2,4%*
Pacientes con bacteriemia por Kp-BLEE	13	1,7%*

* Porcentaje respecto al total de pacientes ingresados en UCIN

** Porcentaje respecto al total de pacientes con cribado rectal

3. Infecciones por *K. pneumoniae* BLEE

Las infecciones por Kp-BLEE, afectaron a 13 pacientes con bacteriemia (58%), cinco conjuntivitis, tres infección del tracto urinario (ITU), uno presentó neumonía, uno infección de herida y otro infección del catéter. Algunos pacientes presentaron diferentes tipos de infección (Tabla 5).

Tabla 5. Localización de la infección en los 18 pacientes con aislamiento de Kp-BLEE.

Casos	Tipo infección	Casos	Tipo infección
1	Bacteriemia	10	Bacteriemia
2	Bacteriemia	11	ITU
3	Bacteriemia	12	Bacteriemia
4	Bacteriemia	13	Bacteriemia ITU
5	Bacteriemia	14	Bacteriemia por catéter Infección de herida
6	Conjuntivitis	15	Bacteriemia
7	Bacteriemia Conjuntivitis	16	Bacteriemia
8	Conjuntivitis	17	Bacteriemia Neumonía
9	ITU	18	Conjuntivitis

4. Predicción de la infección mediante frotis rectal

De las 13 bacteriemias por Kp-BLEE del periodo de estudio, fue posible predecir la infección con el frotis rectal en 9 casos (75%). En un paciente con bacteriemia asociada

a catéter el frotis rectal fue negativo, y en los otros tres pacientes se desconoce el estado de colonización al no haberse realizado frotis rectal (Tabla 6). El 10% de los pacientes colonizados desarrolló bacteriemia

Tabla 6. Bacteriemia por Kp-BLEE.

Casos	Sexo	Gestación (semanas)	Peso al nacimiento (g)	Días en UCIN	Bacteriemia	Colonización y días previos a la sepsis	Antibióticos previos a la sepsis y días de uso
1	H	26	850	80	Sí	Sí (3)	Ampicilina (7), Gentamicina (7)
2	H	26	730	92	Sí	Sí (6)	Ampicilina (6), Gentamicina (6)
3	H	37	2.480	9	Sí	ND	Ampicilina (7), Gentamicina (7)
4	H	37	2.620	37	Sí	Sí (0)	Ampicilina (9), Gentamicina (9)
5	H	25	600	21*	Sí	ND	Ampicilina (6), Gentamicina (6)
6	M	25	650	80	Sí	Sí (5)	Ampicilina (7), Gentamicina (7)
7	H	27	975	41	Sí	Sí (11)	Ampicilina (6), Gentamicina (6)
8	H	26	680	8*	Sí	ND	Ampicilina (6), Gentamicina (6)
9	M	28	1.000	32	Sí	Sí (5)	Ampicilina (8), Gentamicina (8)
10	H	25	740	63	Sí	ND**	Ampicilina (8), Gentamicina (8)
11	H	26	800	49	Sí	Sí (5)	Ampicilina (8), Gentamicina (8)
12	M	27	810	73	Sí	Sí (26)	Ampicilina (7), Gentamicina (7)
13	H	25	700	92	Sí	Sí (3)	Ampicilina (7), Gentamicina (7)

H=Hombre, M=Mujer, ND=No determinado

*Exitus

**Bacteriemia relacionada con catéter

De los cinco pacientes con conjuntivitis, tres presentaban un cultivo epidemiológico positivo para Kp-BLEE previamente a la aparición de conjuntivitis, y en los otros dos pacientes el cribado rectal fue positivo dos días después de obtener la muestra conjuntival (los cribados rectales de la semana previa fueron negativos).

El resto de infecciones (tres ITU, una neumonía y una infección de herida) se pudieron predecir todas con el frotis rectal.

5. Factores de riesgo

Se ha realizado un estudio bivalente con los 87 pacientes con aislamiento de Kp-BLEE con la variable: Infección por Kp-BLEE (no/sí); y una serie de características en estudio. Las variables fueron clasificadas en dos grupos: factores de riesgo intrínsecos y factores de riesgo relacionados con el ingreso en la UCIN.

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7. Se resaltan en color rojo las variables que tienen un resultado estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$).

Tabla 7. Resultados análisis bivalente.

Variables	Test	p-valor (≤ 0.05)	Hip. Altern
Sexo	Chi-cuadrado	0,127	NO
Tipo de parto	Chi-cuadrado	0,073	NO
Edad gestacional (semanas)	Mann-Whitney	0,002	SÍ
Peso al nacimiento (gramos)	Mann-Whitney	0,001	SÍ
Tiempo de colonización (días)	Mann-Whitney	0,215	NO
Días de estancia en UCIN	Mann-Whitney	0,004	SÍ
Duración de epicutáneo (días)	Mann-Whitney	0,007	SÍ
Ventilación mecánica	Chi-cuadrado	0,062	NO
Duración de la VM (horas)	Mann-Whitney	0,035	SÍ
Nutrición parenteral	Fisher	1,000	NO
Tratamiento antibiótico previo	Fisher	0,579	NO

A continuación se exponen los resultados detallados para cada una de las variables analizadas en el estudio.

5.1 Factores de riesgo intrínsecos

Sexo

Del total de pacientes estudiado con aislamiento de Kp-BLEE, 49 pacientes (56,3%) eran hombres y 38 (43,7%) mujeres.

Tabla 8. Estudio del sexo en relación con la infección por Kp-BLEE.

		Infección Kp-BLEE			Significación Chi-cuadrado
		No (solo colonización)	Sí (colonización o no)	Total	
Sexo	Hombre	36 52,2%	13 72,2%	49 56,3%	0,127
	Mujer	33 47,8%	5 27,8%	38 43,7%	
	Total	69 100,0%	18 100,0%	87 100,0%	

En los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE, 36 (52,2%) eran hombres y 33 (47,8%) mujeres. En el caso de los pacientes con infección, 13 pacientes (72,2%) eran hombres y 5 (27,8%) mujeres. Aunque la proporción de hombres en los pacientes con infección por Kp-BLEE es superior a la de mujeres, no existe significación estadística entre el sexo y la infección por Kp-BLEE ($p=0,127$) (Tabla 8).

Tipo de parto

Del total de pacientes con aislamiento de Kp-BLEE, 50 pacientes (57,5%) nacieron mediante parto eutócico y 37 (42,5%) por cesárea.

Tabla 9. Estudio del tipo de parto en relación con la infección por Kp-BLEE.

		Infección Kp-BLEE			Significación Chi-cuadrado
		No (solo colonización)	Sí (colonización o no)	Total	
Tipo de parto	Eutócico	43 62,3%	7 38,9%	50 57,5%	0,073
	Cesárea	26 37,7%	11 61,1%	37 42,5%	
	Total	69 100,0%	18 100,0%	87 100,0%	

En los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE, nacieron por parto eutócico 43 (62,3%) y por cesárea 26 (37,7%). En el caso de los pacientes con infección, 7 pacientes (38,9%) nacieron por parto eutócico y 11 (61,1%) por cesárea. La proporción de pacientes que nacieron por cesárea con infección por Kp-BLEE es superior a la proporción de nacidos por parto vaginal. Aunque no existe significación estadística entre el tipo de parto y la infección por Kp-BLEE el valor de p está cerca del límite de significación ($p=0,073$) (Tabla 9).

Edad gestacional

La distribución de la población con aislamiento de Kp-BLEE en función de la edad gestacional se representa en la siguiente figura. El neonato que nació más prematuro fue en la semana 24 y el más tardío en la semana 38 de gestación. La mediana es de 29 semanas (Figura 4).

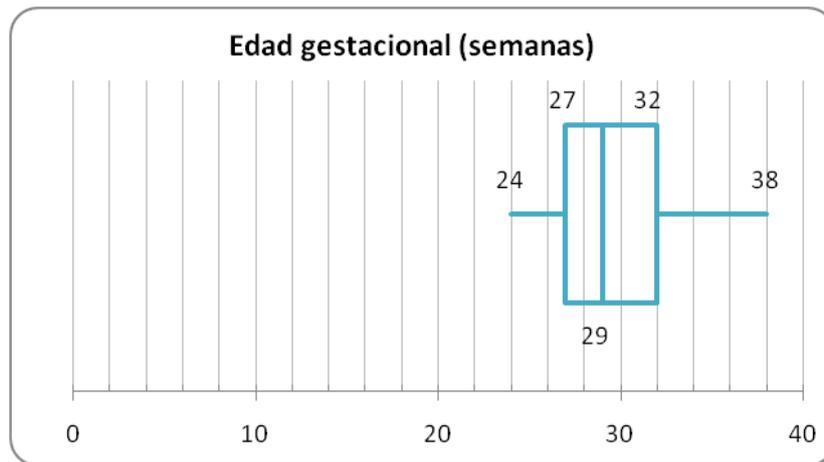


Figura 4. Distribución edad gestacional.

Los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE presentan una media de edad gestacional de $30,27 \pm 3,39$ semanas (intervalo confianza 95% (IC95%): 29,45-31,09) superior a aquellos con infección por Kp-BLEE ($27,89 \pm 3,98$ semanas (IC95% 25,90-29,86)). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,002$).

Peso al nacimiento

El peso al nacimiento de los pacientes con aislamiento de Kp-BLEE presenta un amplio rango de distribución. La mediana es de 1120 gramos. El 75% de los pacientes están incluidos en el rango de 480 a 1425 gramos (Figura 5).

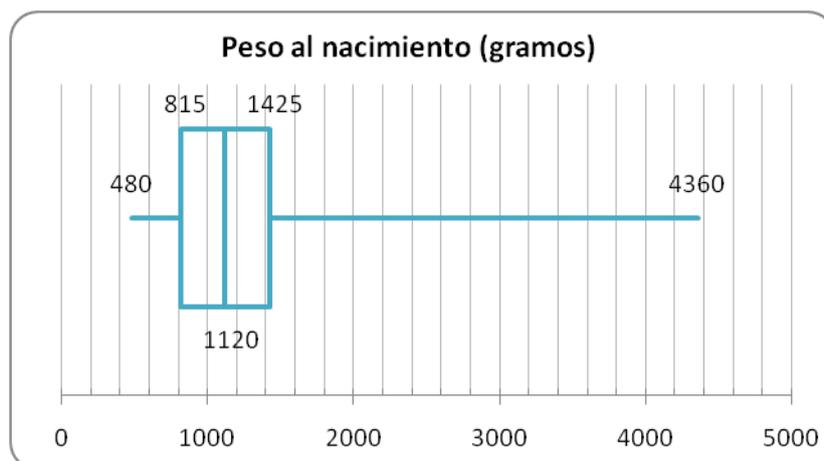


Figura 5. Distribución del peso al nacer.

Los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE presentan una media de $1371,62 \pm 744,32$ gramos (IC95%: 1192,82-1550,43) superior a los pacientes con

infección por Kp-BLEE, $1002,50 \pm 576,63$ gramos (IC95%: 715,75-1289,25). Existen diferencias significativas en el peso al nacimiento en función de que se tenga o no infección por Kp-BLEE ($p=0,001$).

5.2 Factores de riesgo relacionados con los días de ingreso en UCIN

Tiempo de colonización

El día de colonización no se puede establecer exactamente ya que el frotis se realiza sólo un día a la semana, por lo que puede haberse producido antes de la detección. Con los datos disponibles, la mediana del tiempo de colonización por Kp-BLEE de nuestra población es de 10 días. El percentil 25 es de 7 días y el percentil 75 de 19,25 días (Figura 6).

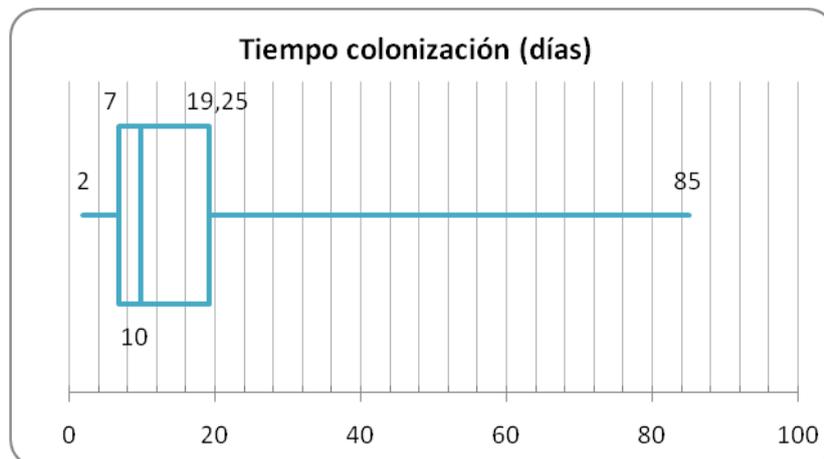


Figura 6. Distribución del tiempo de colonización.

Los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE presentan una media de $17,65 \pm 16,33$ días para la colonización (IC95%: 13,73-21,57) mientras que en los pacientes con infección por Kp-BLEE es de $13,67 \pm 12,72$ días (IC95%: 6,62-20,71), estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,215$).

Días de estancia en UCIN

La duración de la estancia en UCIN de los pacientes con aislamiento de Kp-BLEE presenta una mediana de 31 días. El valor más bajo es de 7 días mientras que el valor más alto es 130 días (Figura 7).

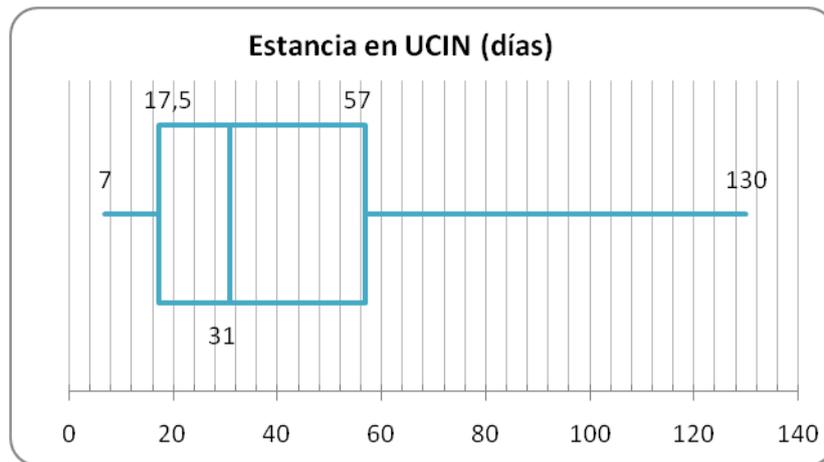


Figura 7. Distribución duración estancia en la UCIN.

Los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE presentan una media de estancia en la UCIN de $34,77 \pm 24,16$ días (IC95%: 28,96-40,57). Los pacientes con infección por Kp-BLEE presentan una media de $55,39 \pm 28,35$ días (IC95%: 41,29-69,49). Los pacientes con infección presentan una estancia en la UCIN más prolongada, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,004$).

Procedimientos invasivos

- **Duración catéter epicutáneo:** del total de pacientes con aislamiento de Kp-BLEE, 85 (98%) pacientes eran portadores de catéter epicutáneo.

En los pacientes sólo colonizados la media de la duración del catéter epicutáneo es de $25,03 \pm 18,91$ días (IC95%: 20,49-29,57), mientras que en los pacientes con infección por Kp-BLEE esta media es superior ($37,78 \pm 18,94$ días (IC95%: 28,36-47,20)), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,007$).

- **Ventilación mecánica (cualitativa):** del total de la población de estudio 41 (47%) pacientes precisaron ventilación mecánica.

Tabla 10. Estudio de la ventilación mecánica en relación con la infección por Kp-BLEE.

		Infección Kp-BLEE			Significación Chi-cuadrado
		No (solo colonización)	Sí (colonización o no)	Total	
Ventilación mecánica	No	40 58,0%	6 33,3%	46 52,9%	0,062
	Sí	29 42,0%	12 66,7%	41 47,1%	
	Total	69 100,0%	18 100,0%	87 100,0%	

En los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE, 29 (42,0%) precisaron ventilación mecánica. Mientras que de los 18 pacientes con infección precisaron de ventilación mecánica 12 (66,7%). No alcanzando estas diferencias la significación estadística ($p=0,062$) (Tabla 10).

De todos modos, esta variable es de escala ordinal, por tanto, también se la va a tratar cuantitativamente en el siguiente apartado.

- **Duración de la ventilación mecánica en horas (cuantitativa):** En los pacientes sólo colonizados la media de la duración es de $128,50 \pm 282,49$ horas (IC95%: 60,63-196,36). Los pacientes con infección por Kp-BLEE la media es de $258,11 \pm 355,664$ horas (IC95%: 81,24-434,98). La media es superior en los pacientes con infección, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,035$).
- **Nutrición parenteral:** del total de la población de estudio 78 (89,7%) pacientes precisaron de nutrición parenteral.

Tabla 11. Estudio de la nutrición parenteral en relación con la infección por Kp-BLEE.

		<i>Infección Kp-BLEE</i>			<i>Significación Fisher</i>
		No (solo colonización)	Sí (colonización o no)	Total	
Nutrición parenteral	No	7 10,1%	2 11,1%	9 10,3%	1,000
	Sí	62 89,9%	16 88,9%	78 89,7%	
	Total	69 100,0%	18 100,0%	87 100,0%	

En los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE, 7 (10,1%) no precisaron de nutrición parenteral y 62 (89,9%) sí. En el caso de los pacientes con infección, 2 pacientes (11,1%) no precisaron de nutrición parenteral y 16 (88,9%) sí. No existe significación estadística entre la nutrición parenteral y la infección por Kp-BLEE ($p=1,000$) (Tabla 11).

Tratamiento antibiótico previo

En relación al tratamiento antibiótico, del total de la población de estudio 82 (94%) pacientes recibieron tratamiento antibiótico previo al aislamiento de Kp-BLEE.

Tabla 12. Estudio del tratamiento antibiótico previo en relación con la infección por Kp-BLEE.

		<i>Infección Kp-BLEE</i>			<i>Significación Fisher</i>
		No (solo colonización)	Sí (colonización o no)	Total	
Antibiótico previo	No	5 7,2%	0 0,0%	5	0,579
	Sí	64 92,8%	18 100,0%	82	
	Total	69 100,0%	18 100,0%	87 100,0%	

En los pacientes sólo colonizados por Kp-BLEE, 64 (92,8%) recibieron tratamiento antibiótico previo al aislamiento de Kp-BLEE. En el caso de los pacientes con infección, los 18 (100,0%) pacientes recibieron tratamiento previo al aislamiento de Kp-BLEE. Aunque la proporción de pacientes que recibieron tratamiento antibiótico previo en

los pacientes con infección por Kp-BLEE es superior, no existe significación estadística ($p=0,579$) (Tabla 12).

Mortalidad

Dos de los 87 pacientes con aislamiento de Kp-BLEE fallecieron en el periodo de estudio (2.3%). Ambos presentaron bacteriemia por Kp-BLEE:

- **Primer caso:** Fallecimiento por fallo multiorgánico tras persistencia de enterocolitis necrotizante a pesar de mejoría de marcadores de infección tras tratamiento de sepsis secundaria.
- **Segundo caso:** Fallecimiento por shock refractario por enterocolitis necrotizante y sepsis secundaria por Kp-BLEE.

Análisis multivariante o regresión logística

Evaluamos el efecto de una serie de variables (consideradas conjuntamente) sobre el hecho de presentar infección por Kp-BLEE (no/sí).

Tabla 13. Estimación del odds-ratio de la infección por Kp-BLEE.

Factor de riesgo	Odds-ratio	IC95%	p-valor
Estancia en UCIN (días)	1,028	1,008-1,049	0,006

La variable que se asocia de forma independiente a la infección por Kp-BLEE es la duración de la estancia en UCIN, con un riesgo que aumenta 1.028 veces por cada día de estancia (Tabla 13).

6. Sensibilidad antibiótica

Para el análisis de la sensibilidad antibiótica se ha seleccionado un aislamiento por paciente, con un total 84 aislamientos (en tres muestras epidemiológicas no se realizó estudio de sensibilidad por panel comercial, únicamente se realizó cribado de BLEE mediante disco placa). Los aislamientos estudiados presentaron los siguientes porcentajes de sensibilidad (Tabla 14):

Tabla 14. Sensibilidad antibiótica.

Antibiótico	% sensibilidad
Amoxicilina-clavulánico	33
Piperacilina-tazobactam	77
Imipenem	100
Meropenem	100
Ertapenem	100
Amikacina	100
Gentamicina	0
Tobramicina	0
Ciprofloxacino	33
Trimetoprim-sulfametoxazol	84.5

7. Tipado molecular

Tras la optimización de la técnica de PFGE, se obtienen 36 patrones óptimos para su análisis informático. El estudio de los patrones permite su clasificación de acuerdo a su homología ($\geq 80\%$) en 4 patrones genéticos que se denominan con letras de la A a la D Figura. A su vez, dentro de cada patrón se pueden definir subtipos entre aislados con $>90\%$ de similitud, a cada uno se le asigna un valor numérico y se consideran que son la misma cepa (Figura 8).

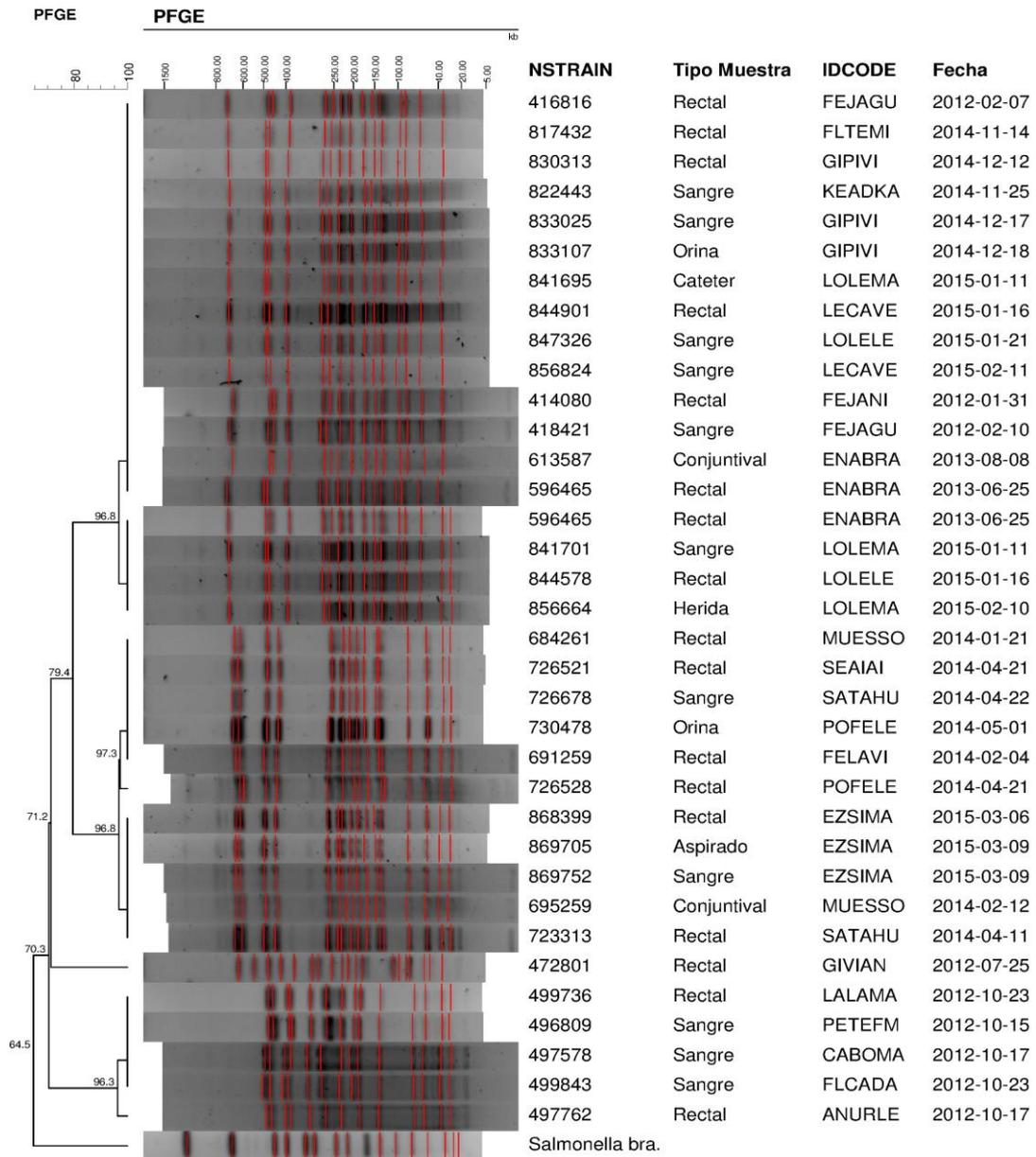


Figura 8. Dendrograma general (patrón A, B, C y D) con porcentajes de homología.

De los 36 aislados estudiados de Kp-BLEE, 18 están incluidos en el cluster denominado A, que corresponde al 50% del total de analizados. Entre ellos hay un 96,8% de homología (Figura 9).

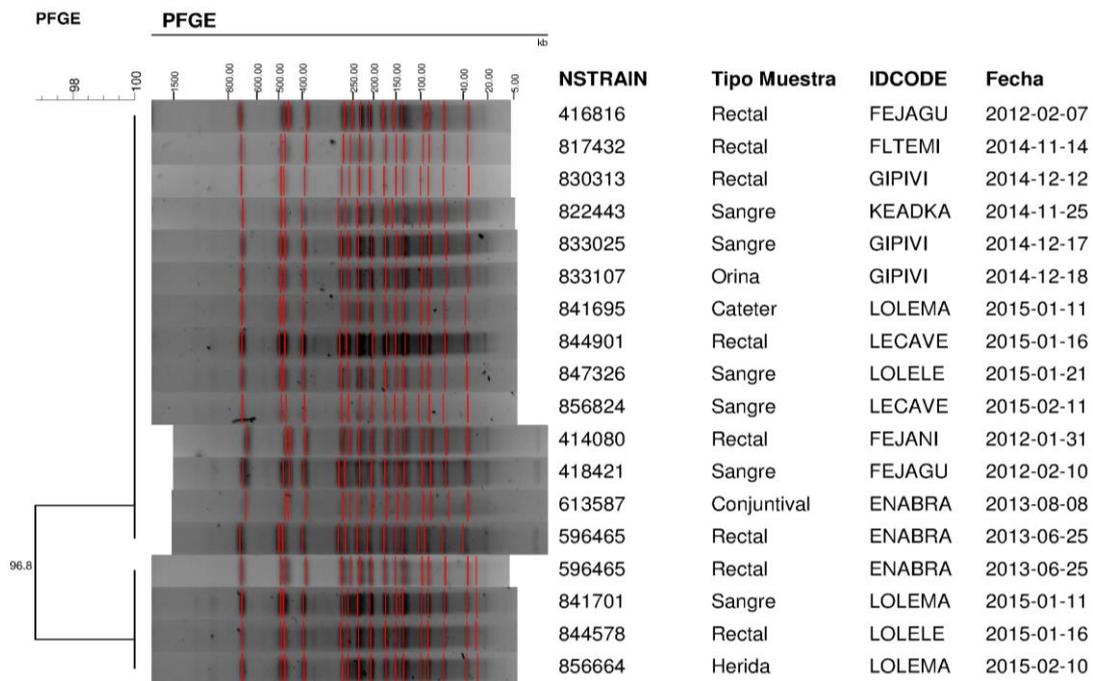


Figura 9. Dendrograma cluster A: 96.8% similitud.

En el cluster B se incluyen 11 aislados, 30% del total, con homología del 96.8% (Figura 10).

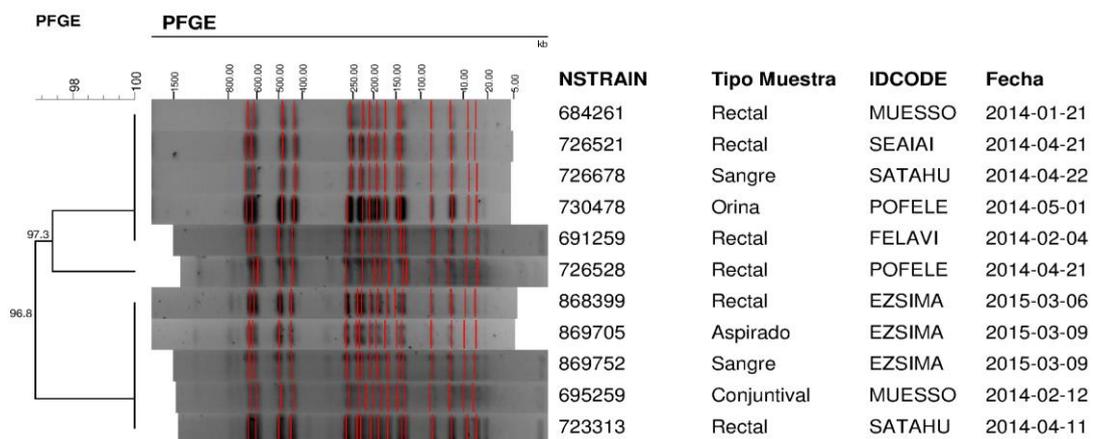


Figura 10. Dendrograma cluster B: 96.8% similitud.

El cluster C incluye 5 aislados, que corresponde con el 14% del total. Entre ellos hay una homología del 96.3%. Cuatro de los aislados son idénticos entre sí (Figura 11).

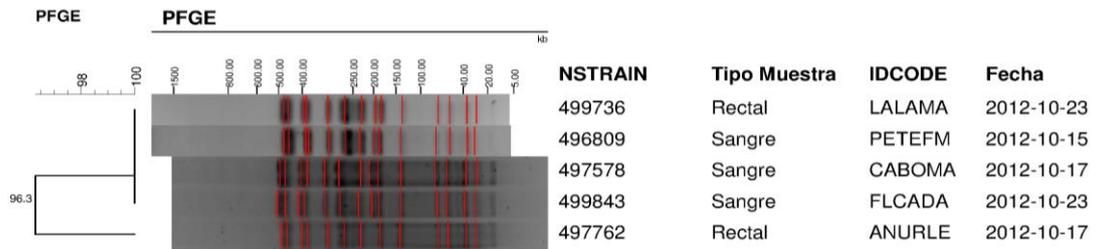


Figura 11. Dendrograma cluster C: 96.3% similitud.

Por último hay un aislado no relacionado con ninguno de los cluster anteriores que se denomina D, este corresponde con un 3% (Figura 8).

La distribución de los patrones de Kp-BLEE a lo largo del periodo de estudio es la siguiente (Figura 12):

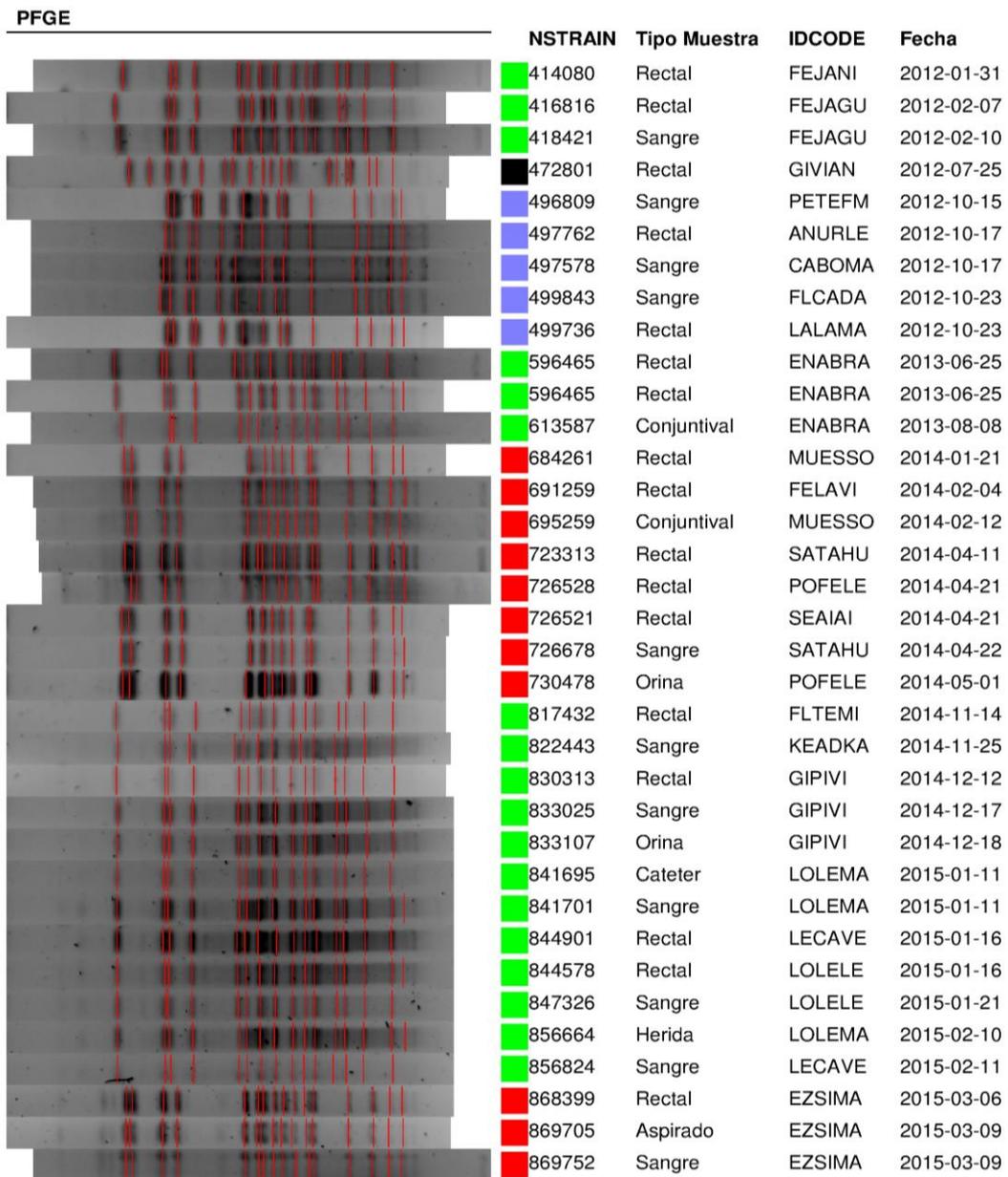


Figura 12. Distribución de los patrones por fecha (A-verde, B-rojo, C-morado y D-negro)

A principios del año 2012, se detecta el primer caso de cluster A (verde) en la UCIN. Se aísla en diferentes pacientes, en este caso en dos hermanos gemelos, siendo causa de colonización e infección. A mediados del año 2012, nos encontramos el patrón D (negro) con solo un aislamiento de muestra epidemiológica, pendiente de confirmar que no se vuelve a encontrar al genotipar el total de aislados en el periodo de estudio. En octubre de 2012, se detecta en la unidad el cluster C (morado), se aísla en diferentes pacientes en muestras epidemiológicas y clínicas. La diseminación de la

cepa se consigue controlar y existe un periodo libre de Kp-BLEE en la UCIN. A mediados del año 2013, reaparece el cluster A (verde), se aísla en muestras epidemiológicas y clínicas de una misma paciente (conjuntival y sangre). En enero de 2014, se introduce en la unidad en cluster B (rojo), se aísla en muestras epidemiológicas y clínicas de diferentes pacientes, además se mantiene en el tiempo, detectándose en mayo de 2014 y posteriormente en marzo de 2015 se aísla en muestras epidemiológicas y clínicas en un mismo paciente. En el mes de noviembre, aparece de nuevo el cluster A (verde) en diferentes pacientes hasta el mes de febrero de 2015.

Por último, cabe destacar que los diferentes aislamientos de Kp-BLEE clínicos y epidemiológicos de un mismo paciente están incluidos en el mismo cluster. En algunos casos la homología es del 100%, pero en todos es siempre >90% por lo que se puede considerar la misma cepa (Figura 13).

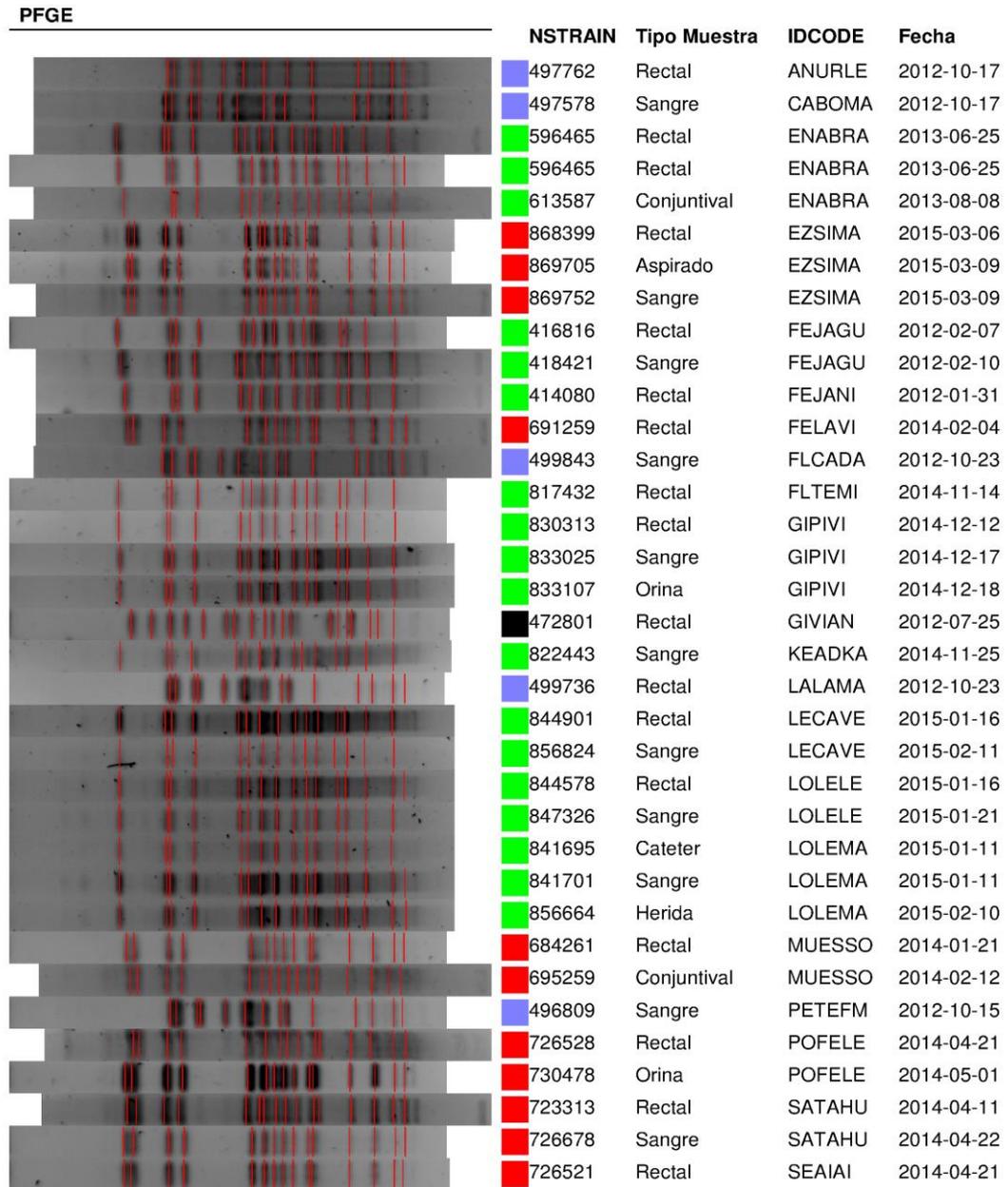


Figura 13. Distribución de los patrones por pacientes.

Además, se envían 11 aislados seleccionados de los cluster establecidos al CNM para estudio comparativo entre PFGE y REP-PCR con los siguientes resultados:

Tabla 15. Comparación patrones PFGE con resultados REP-PCR CNM y mecanismo de resistencia.

Aislado	REP-PCR CNM	Tipo BLEE CNM	PFGE HUMS
416015 450499 596465 822443 841701	Relacionados entre sí, no con el resto	CTX-M-15	Patrón A
684261 695259 868399	Relacionados entre sí, no con el resto	Grupo SHV	Patrón B
496809 499843	Relacionados entre sí, no con el resto	CTX-M-15	Patrón C
472801	No relacionado con el resto	CTX-M-15	Patrón D

DISCUSIÓN

1. Importancia *K. pneumoniae* BLEE en la UCIN: colonización e infección

En nuestro estudio se aísla Kp-BLEE en 87 pacientes distribuidos a lo largo del periodo de estudio, de los cuales el 79% solo estaban colonizados y el 21% presentó algún tipo de infección. Resultados similares obtienen otros autores que relacionan Kp-BLEE con la aparición de brotes en la UCIN por su alta capacidad de diseminación y de producir infecciones. Estos brotes también se caracterizan por una alta tasa de ataque, con muchos pacientes colonizados y casos de infección invasiva^{14,15,42-44}.

La proporción de pacientes colonizados por Kp-BLEE con cribado rectal de nuestro estudio es del 16%, es inferior a otros estudios como el 39% de la revisión de Stapleton et al.¹⁵, aunque este dato es difícil de comparar ya que la mayoría se centran en un brote concreto y los datos son muy variables^{18,27}.

La infección por Kp-BLEE es de origen nosocomial, afectó a 18 pacientes, este dato corresponde a una incidencia del 2,4% respecto al total de pacientes ingresados. La infección más frecuente es la bacteriemia, en nuestro estudio se dio en 13 pacientes, con una incidencia del 1,7%, cifra similar a otros estudios¹⁸. También se describen casos de ITU, conjuntivitis, neumonía e infección de herida. Estos resultados se correlacionan con lo descrito en la literatura ya que son las infecciones más habituales producidas por *K. pneumoniae*^{16,22}.

La colonización por enterobacterias MDR es un factor de riesgo en el desarrollo de infecciones sistémicas⁴⁵. El 10% de los pacientes colonizados de nuestro estudio desarrolló bacteriemia, inferior al 18% del estudio de Anderson et al.⁴⁶.

2. Utilidad del frotis rectal en la predicción de la infección y como medida de control de brotes

La formación de un equipo multidisciplinar junto con la implantación de medidas para la prevención de la infección es fundamental en el control de la diseminación de

bacterias multirresistentes^{11,28,30}. En nuestro caso, en enero de 2012 se establece el cribado rectal semanal a todos los pacientes ingresados en la unidad y se extreman las precauciones de contacto con los pacientes colonizados con el fin de controlar la aparición de brotes. Además, en mayo de 2015 se inician reuniones semanales entre Microbiología, Medicina Preventiva, Farmacia y el personal de la UCIN con el fin de revisar los procedimientos y los casos más relevantes de la semana.

En caso de brote se recomienda extremar las medidas de contacto y la búsqueda de posibles reservorios ambientales y en el personal sanitario^{15,30,44}. La búsqueda del origen del brote es interesante aunque lo habitual es que no sea posible encontrarlo, y con frecuencia se detecta el caso índice desconociéndose si corresponde a la fuente de la infección o si existe algún otro tipo de reservorio^{15,44}. En algunos casos se describe que el origen del caso índice es la adquisición de la flora intestinal de la madre en el momento del nacimiento, lo que sugiere que sería interesante realizar cribado rectal a las madres con el fin de predecir el posible caso índice^{6,7,26}.

Al analizar nuestros datos, nos encontramos que en el periodo de estudio se realiza frotis rectal al 69% de los pacientes ingresados en la UCIN, esto puede deberse a las dificultades iniciales en la implantación de las medidas. Al inicio hay periodos de no cumplimiento, y posteriormente a lo largo del periodo se dan intervalos de 7 a 9 días sin realización de cribado rectal por ser festivo. A pesar de ello se observa que el 84,7% de los casos sin cribado rectal son pacientes con ingreso inferior a 7 días; debido a que se establece una frecuencia semanal muchos de los pacientes con ingresos inferiores a 7 días no tienen resultado. Cabe destacar que la proporción de pacientes sin cribado rectal con >7 días de ingreso disminuye del 22% de 2012 al 6,7% de 2015, esto apoya la idea de la dificultad inicial en la implantación de las medidas y la mejora progresiva en su cumplimiento. Otros estudios excluyen directamente a los pacientes con ingresos inferiores a 7 días tras demostrar la escasa relevancia los resultados por el poco número de colonizados¹¹, en nuestro estudio el 25% de los pacientes se coloniza entre los 2 y 7 días por lo que se decide no excluirlos. En la literatura se observa una gran variación en la realización de los cribados, desde unidades con un alto

cumplimiento a otras con grandes dificultades para establecerlo de manera rutinaria^{11,15}.

En el 75% de los casos de bacteriemia fue posible predecir la infección con el frotis rectal. Este resultado, junto a las conclusiones de otros autores^{10,11}, apoya la teoría de la utilidad del cribado rectal en la predicción de la bacteriemia, ya que esta ocurre generalmente por translocación intestinal tras una colonización intestinal previa, debido a la inmadurez de las barreras mucosas de los neonatos y a la capacidad de adhesión de Kp-BLEE mediante fimbrias a la pared intestinal^{12,22}. En los otros tres casos de bacteriemia, no se disponía de resultado de muestra epidemiológica por lo que no se puede establecer si existía una colonización previa al cuadro de sepsis.

En el resto de infecciones detectadas también fue posible la predicción mediante el cribado rectal. Como excepción nos encontramos dos casos de conjuntivitis en los que el resultado de la colonización fue dos días posterior, esto puede deberse a que los controles epidemiológicos se realizan un día a la semana, posiblemente en estos dos casos si se hubiese realizado el frotis rectal en paralelo a la muestra conjuntival ambos hubiesen sido positivos.

La información que aporta el resultado del cultivo epidemiológico facilita la implantación del tratamiento antibiótico correcto precozmente¹². En la UCIN del HUMS, en caso de colonización previa por Kp-BLEE o situación de brote, se inicia antibioterapia con meropenem, que es el tratamiento de elección^{22,23,29}. Diferentes estudios evalúan que el inicio rápido del tratamiento antibiótico correcto, favorece la evolución del paciente y como consecuencia disminuye del coste sanitario^{40,47}.

3. Factores de riesgo relacionados con la infección por *K. pneumoniae* BLEE

En relación a los factores de riesgo, existe mucha variabilidad entre los estudios publicados, por lo que es complicado determinar cuáles son los pacientes con un mayor riesgo de infección por Kp-BLEE. Los factores que se relacionan más frecuentemente son: baja edad gestacional, bajo peso al nacimiento, VM prolongada,

larga estancia en UCIN, los procesos invasivos y el tratamiento antibiótico previo. Por tanto, nuestros resultados concuerdan con lo descrito en la literatura²⁶.

Al analizar cada una de las variables identificadas:

- **Sexo:** La proporción de hombres en los pacientes con infección por Kp-BLEE es superior que la de mujeres. La variable sexo no se relaciona como factor de riesgo en la infección por Kp-BLEE en los estudios consultados^{38,48}.
- **Tipo de parto:** En los pacientes con infección por Kp-BLEE la proporción de pacientes nacidos por cesárea es mayor (61,1% vs 37,7%). Aunque en nuestro estudio no se relacione como factor de riesgo, algunos autores sugieren que podría existir algún tipo de relación, ya que los niños que nacen mediante parto vaginal adquieren la flora intestinal de la madre en el momento del parto y ésta puede ser protectora en la posterior colonización por bacterias MDR^{10,49}.
- **Edad gestacional:** Al igual que en otros estudios¹⁷, los pacientes con infección por Kp-BLEE tienen una media de edad gestacional inferior ($p=0,002$) a aquellos que sólo están colonizados (media 27,89 vs 30,27). Los pacientes más prematuros tienen más riesgo de adquirir infecciones por bacterias MDR por presentar una mayor inmunosupresión, las barreras son más frágiles y requieren más procesos invasivos³.
- **Peso al nacimiento:** Los pacientes con infección por Kp-BLEE presentan una media de peso al nacimiento inferior ($p=0,001$) a aquellos sólo colonizados (media 1002,50 vs 1371,62). El bajo peso al nacimiento se relaciona con la infección por Kp-BLEE, ya que generalmente son pacientes que nacen muy prematuros y presentan las características descritas en el apartado anterior¹⁷.
- **Tiempo de colonización:** Habitualmente la colonización se produce en la primera semana de ingreso⁵⁰, en nuestro caso la media del tiempo de colonización de los pacientes con infección es de 13 días y solo los colonizados de 17 días. La colonización previa es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la infección por Kp-BLEE⁴⁵.

- **Días de estancia en UCIN:** Los pacientes con infección por Kp-BLEE presentan una media de estancia en la UCIN mayor que aquellos únicamente colonizados (media 55,39 vs 34,77). El riesgo de infección por Kp-BLEE aumenta 1.028 veces por cada día de estancia. Estos resultados coinciden con estudios previos en los que se ha descrito como factor independiente^{15,26,38}.
- **Duración del catéter epicutáneo:** Los pacientes con infección por Kp-BLEE presentan una media superior que los pacientes sólo colonizados (media 37,78 vs 25,03 días). Los procesos invasivos, como es el catéter epicutáneo, aumentan el riesgo de padecer infecciones por bacterias MDR²⁶.
- **Ventilación mecánica:** La proporción de pacientes con infección por Kp-BLEE que requieren VM es superior a los sólo colonizados (66,7% vs 42%). Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, el resultado no se aleja del límite de significación ($p=0,062$), sí que lo son cuando se analiza de forma cuantitativa en horas. La media de los pacientes con infección por Kp-BLEE es superior a los pacientes sólo colonizados (media 258,11 vs 128,50). La VM es un factor de riesgo importante en el desarrollo de infecciones por bacterias MDR²⁶.
- **Nutrición parenteral:** A diferencia de otros autores¹⁷, en nuestro estudio no se observan diferencias entre los pacientes sólo colonizados y aquellos con infección (89,9% vs 88,9%). Destacar que diferentes estudios establecen la lactancia materna como factor protector frente a la colonización por bacterias MDR^{39,51}.
- **Tratamiento antibiótico previo:** En nuestra población de estudio no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento antibiótico previo. Existen publicaciones en las que relacionan el uso de cefalosporinas de tercera generación^{17,26}, en nuestro hospital no es habitual su uso con el fin evitar la selección de los aislados productores de BLEE. En los pacientes que se usó una cefalosporina de tercera generación, ninguno presentó infección por Kp-BLEE, mientras que el estado de colonización es desconocido. Sería interesante desglosar los antibióticos recibidos previamente

al aislamiento de Kp-BLEE con el fin de detectar si existe relación entre alguno de ellos y la infección por Kp-BLEE en la unidad. Por ejemplo, ante la sospecha de infección vertical, los pacientes reciben tratamiento con ampicilina y gentamicina, sería interesante estudiar si podría favorecerse la selección, ya que todos los aislamientos son resistentes a ambos antibióticos.

Las infecciones por bacterias multirresistentes se relacionan con elevadas tasas de morbi-mortalidad¹⁷. En nuestro estudio fallecen dos pacientes, ambos con bacteriemia por Kp-BLEE secundaria a cuadro de enterocolitis necrotizante. En la literatura se describe que la presencia de *Klebsiella* en heces de los pacientes de UCIN con ventilación a presión favorece la aparición de enteritis necrotizante⁵².

4. Sensibilidad antibiótica y mecanismo de resistencia

Los aislados de Kp-BLEE analizados presentan resistencia a la mayoría de los antibióticos betalactámicos, incluyendo las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y monobactam como se describe en la literatura²¹. En nuestro estudio no se describen resistencias a los carbapenems. La resistencia a los carbapenems es poco frecuente en las UCIN, pero existen algunos países con alta prevalencia de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas, como es el caso de Italia, que describen algún brote en la UCIN⁵³.

La presencia de BLEE, al ser una resistencia plasmídica, se relaciona con alta resistencia a fluoroquinolonas, en nuestro caso la resistencia a quinolonas fue del 67% y a aminoglicósidos del 100% para gentamicina y tobramicina, mientras que amikacina presentó un 100% de sensibilidad, como en otros estudios publicados²³.

Aunque las BLEE son un problema global, enzimas y genotipos específicos suelen estar asociados a regiones geográficas, hospitales y unidades concretas, por tanto es importante conocer los patrones propios de resistencias²³.

El tipo de BLEE detectada en nuestro estudio es mayoritariamente CTX-M-15 en tres de los patrones genéticos circulantes mientras que el cuarto patrón se corresponde con BLEE del grupo SHV. En la revisión de brotes en la UCIN de Stapleton

et al de 2015, se detecta mayoritariamente BLEE del grupo SHV seguida de la CTX-M-15 en *K. pneumoniae*¹⁵

5. Tipado molecular

El tipado molecular de los aislados de Kp-BLEE nos permite conocer los patrones genéticos de las cepas circulantes en nuestro periodo de estudio y así poder establecer relaciones epidemiológicas entre las cepas^{14,32}. Hay que ser cautos con los resultados obtenidos, ya que es necesario el tipado de todos los aislamientos del periodo de estudio para poder sacar conclusiones respecto a la epidemiología. Debido a lo laboriosa y costosa que es la técnica no ha sido posible tipar más que los aislados seleccionados.

Con los resultados obtenidos se evidencia la aparición de diferentes clusters o agrupaciones de cepas a lo largo del periodo de estudio. Se han detectado tres patrones genéticos diferentes que agrupan al 97% de los aislados estudiados. La escasa variabilidad genética observada sugiere una diseminación clonal a lo largo del periodo de estudio. Sin embargo, otros estudios describen un mayor número de patrones genéticos entre las cepas estudiadas, sugiriendo una diseminación plasmídica de la BLEE^{11,39}.

El estudio molecular sugiere una diseminación horizontal de tres de los patrones entre los pacientes ingresados en la unidad y como consecuencia la aparición de brotes. Al igual que en otros estudios, esto se evidencia con el aislamiento del mismo patrón genético en diferentes pacientes que han coincidido en el tiempo en la UCIN^{11,27,54-56}. En nuestro hospital, no es la primera vez que se describen brotes por *Klebsiella* spp en la UCIN, ya en el año 2011 se describe uno producido por una cepa MDR de *K. oxytoca*⁵⁷.

En nuestro estudio hay dos cluster que persisten en el tiempo. Esto podría tratarse de clones muy extendidos, cluster endémicos, lo que sugiere que exista algún reservorio ambiental o en el personal sanitario; pero es necesario realizar más estudios para obtener conclusiones más certeras. Se denomina cluster endémico aquel que persiste en el tiempo, tiene gran capacidad de diseminación, están relacionados

genéticamente pero no temporalmente³². Existen clones muy extendidos, de los cuales derivan una gran cantidad de aislados; esto también podría explicar la reaparición de cluster³².

En nuestro estudio, al igual que en otros, se observa una diseminación horizontal de Kp-BLEE entre los pacientes ingresados en la unidad. Esto sugiere que los pacientes colonizados son un reservorio importante de bacterias MDR⁴⁶. Por tanto es muy importante su detección precoz con fin de controlar su diseminación^{14,22}.

También se confirma el aislamiento del mismo patrón genético en muestras epidemiológicas y clínicas de un mismo paciente, este resultado apoya la teoría de la translocación intestinal en los casos de bacteriemia y el riesgo de infección en el manejo tan dificultoso de los pacientes debido a los procesos invasivos a los que están sometidos.^{1,12} Además también se confirma la utilidad del frotis rectal en la predicción de la infección y como consecuencia el inicio del tratamiento antibiótico correcto precozmente, la mejor evolución del paciente y una disminución en el coste sanitario^{40,47}.

CONCLUSIONES

1. Kp-BLEE presenta una importante repercusión clínica y epidemiológica en la UCIN del HUMS, con una tasa de colonización del 16% y de infección del 2,4%.
2. La bacteriemia es la principal infección producida por Kp-BLEE. Habitualmente tiene lugar una colonización previa al episodio de sepsis.
3. El frotis rectal es muy útil en la predicción de la infección por Kp-BLEE y permite la instauración rápida del tratamiento antibiótico correcto.
4. Los factores de riesgo que se relacionan con la infección por Kp-BLEE son la baja edad gestacional, el bajo peso al nacimiento, la larga estancia en la UCIN y los procesos invasivos, en concreto, una larga duración del catéter epicutáneo y la ventilación mecánica.
5. El factor de riesgo que se relaciona de forma independiente con la infección por Kp-BLEE es la duración de la estancia en la UCIN. Cada día de estancia aumenta el riesgo de padecer infección por Kp-BLEE 1.028 veces.
6. El tipado molecular de los aislados de Kp-BLEE es fundamental para conocer los patrones genéticos circulantes y establecer las relaciones epidemiológicas entre los diferentes aislamientos.
7. Se detectan tres patrones genéticos mayoritarios que sugieren la diseminación horizontal de Kp-BLEE entre los pacientes ingresados en la UCIN.

PERSPECTIVAS

Posteriormente a la realización de este trabajo, pretendemos continuar con la recogida de datos para ampliar el estudio a todo el año 2015 y seguir prospectivamente para contar con más información, para seguir analizando las características de estos aislamientos epidemiológicos y clínicos de Kp-BLEE en la UCIN del HUMS.

El tipado molecular del total de aislados nos permitirá establecer relaciones epidemiológicas entre los aislados y la evolución en el tiempo.

Con este estudio se pretende concienciar al personal sanitario de la Unidad y al grupo de trabajo de la importancia de cumplir medidas preventivas e higiénicas en el manejo de los pacientes con el fin de disminuir la aparición de brotes y su posterior diseminación, y como consecuencia la reducción de complicaciones asociadas.

De esta forma mediante las reuniones semanales con la Unidad, Medicina Preventiva y Farmacia se pueden presentar los datos obtenidos y establecer protocolos de actuación para las diferentes situaciones.

Mediante la presentación en congresos y su publicación en revistas científicas la comunidad científica podrá tener acceso a los resultados obtenidos, ampliando así el conocimiento en este tema y animando a realizar más estudios que sustenten estos resultados.

REFERENCIAS

1. Martínez-Aguilar G, Alpuche-Aranda CM, Anaya C, et al. Outbreak of Nosocomial Sepsis and Pneumonia in a Newborn Intensive Care Unit by Multiresistant Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: High Impact on Mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001;22(11):725-728. doi:10.1086/501855.
2. Lawn JE. Estimating the causes of 4 million neonatal deaths in the year 2000. *Int J Epidemiol*. 2006;35(3):706-718. doi:10.1093/ije/dyl043.
3. Polin R, Denson S, Brady M, et al. Epidemiology and Diagnosis of Health Care-Associated Infections in the NICU. *Pediatrics*. 2012;129(4):e1104-e1109. doi:10.1542/peds.2012-0147.
4. Polin RA. Management of Neonates With Suspected or Proven Early-Onset Bacterial Sepsis. *Pediatrics*. 2012;129(5):1006-1015. doi:10.1542/peds.2012-0541.
5. Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, et al. Early Onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group B *Streptococcal* and *E. coli* Disease Continues. *Pediatrics*. 2011;127(5):817-826. doi:10.1542/peds.2010-2217.
6. Rettedal S, Löhr IH, Bernhoff E, Natås OB, Sundsfjord A, Øymar K. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among pregnant women in Norway: prevalence and maternal–neonatal transmission. *J Perinatol*. 2015;35(11):907-912. doi:10.1038/jp.2015.82.
7. Chereau F, Herindrainy P, Garin B, et al. Colonization of Extended-Spectrum- β -Lactamase- and NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* among Pregnant Women in the Community in a Low-Income Country: a Potential Reservoir for Transmission of Multiresistant *Enterobacteriaceae* to Neonates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3652-3655. doi:10.1128/AAC.00029-15.

8. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002;110(2 Pt 1):285-291. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165580>.
9. Waters D, Jawad I, Ahmad A, et al. Aetiology of community-acquired neonatal sepsis in low and middle income countries. *J Glob Health*. 2011;1(2):154-170. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23198116>.
10. Denkel LA, Schwab F, Kola A, et al. The mother as most important risk factor for colonization of very low birth weight (VLBW) infants with extended-spectrum - lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL-E). *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(8):2230-2237. doi:10.1093/jac/dku097.
11. Benenson S, Levin PD, Block C, et al. Continuous Surveillance to Reduce Extended-Spectrum β -Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Colonization in the Neonatal Intensive Care Unit. *Neonatology*. 2013;103(2):155-160. doi:10.1159/000343150.
12. Carl M a., Ndao IM, Springman a. C, et al. Sepsis From the Gut: The Enteric Habitat of Bacteria That Cause Late-Onset Neonatal Bloodstream Infections. *Clin Infect Dis*. 2014;58(9):1211-1218. doi:10.1093/cid/ciu084.
13. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767057>.
14. Casolari C, Pecorari M, Fabio G, et al. A simultaneous outbreak of *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2005;61(4):312-320. doi:10.1016/j.jhin.2005.03.005.
15. Stapleton PJ, Murphy M, McCallion N, Brennan M, Cunney R, Drew RJ. Outbreaks of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in neonatal intensive care units: a systematic review. *Arch Dis Child - Fetal Neonatal Ed*. 2016;101(1):72-78. doi:10.1136/archdischild-2015-308707.

16. Pfaller MA, Richter SS, Funke G, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. Vol 11th ed. American Society of Microbiology; 2015. doi:10.1128/9781555817381.
17. Abdel-Hady H, Hawas S, El-Daker M, El-Kady R. Extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in neonatal intensive care unit. *J Perinatol*. 2008;28(10):685-690. doi:10.1038/jp.2008.73.
18. Velasco C, Rodríguez-Baño J, García L, et al. Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum β -lactamase. *J Hosp Infect*. 2009;73(2):157-163. doi:10.1016/j.jhin.2009.06.013.
19. Selden R. Nosocomial *Klebsiella* Infections: Intestinal Colonization as a Reservoir. *Ann Intern Med*. 1971;74(5):657. doi:10.7326/0003-4819-74-5-657.
20. Di Martino P, Livrelli V, Sirot D, Joly B, Darfeuille-Michaud A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun*. 1996;64(6):2266-2273. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675336>.
21. Cercenado E, Cantón R. Procedimientos en Microbiología Clínica. *SeimcOrg*. 2011;40. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>.
22. Gupta A, Ampofo K, Rubenstein D, Saiman L. Extended Spectrum β Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Infections: a Review of the Literature. *J Perinatol*. 2003;23(6):439-443. doi:10.1038/sj.jp.7210973.
23. Malloy AMW, Campos JM. Extended-spectrum Beta-lactamases. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(12):1092-1093. doi:10.1097/INF.0b013e31823c0e9d.
24. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-331. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6109327>.

25. 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):1211-1233.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574506>.
26. Lukac PJ, Bonomo RA, Logan LK. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Children: Old Foe, Emerging Threat. *Clin Infect Dis.* 2015;60:1389-1397. doi:10.1093/cid/civ020.
27. Bagattini M. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(5):979-982. doi:10.1093/jac/dkl077.
28. Cantey JB, Sreeramoju P, Jaleel M, et al. Prompt Control of an Outbreak Caused by Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit. *J Pediatr.* 2013;163(3):672-679.e3. doi:10.1016/j.jpeds.2013.03.001.
29. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, et al. Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(5):337.e1-e337.e21. doi:10.1016/j.eimc.2014.11.009.
30. Haller S, Eller C, Hermes J, et al. What caused the outbreak of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. *BMJ Open.* 2015;5(5):e007397-e007397. doi:10.1136/bmjopen-2014-007397.
31. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2014).
<http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>.

32. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33(9):2233-2239. doi:0095-1137/.
33. 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):20-25. doi:10.1016/S0213-005X(13)70110-1.
34. Perera J, Tormo A, Garcia J. *Ingeniería Genética. Volumen I: Preparación, Análisis, Manipulación Y Clonaje de DNA.*; 2010.
35. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157 : H7 , *Escherichia coli* non - O157 (STEC), *Salmonella* serotypes , *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2013;157(April):1-13.
<http://www.pulsenetinternational.org/protocols/>.
36. Machado E, Coque TM, Canton R, Sousa JC, Peixe L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(2):296-302. doi:10.1093/jac/dkn179.
37. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 1.0 December 2013. http://www.eucast.org/resistance_mechanisms/.
38. Rettedal S, Löhr IH, Natås O, Sundsfjord A, Øymar K. Risk factors for acquisition of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during an outbreak in a neonatal intensive care unit in Norway. *Scand J Infect Dis*. 2013;45(1):54-58. doi:10.3109/00365548.2012.713116.
39. Cassettari VC, da Silveira IR, Dropa M, et al. Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. *J Hosp Infect*. 2009;71(4):340-347. doi:10.1016/j.jhin.2008.11.019.

40. Stone PW, Gupta A, Loughrey M, et al. Attributable Costs and Length of Stay of an Extended-Spectrum Beta-Lactamase–Producing *Klebsiella Pneumoniae* Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003;24(8):601-606. doi:10.1086/502253.
41. Han H, Zhou H, Li H, et al. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(7):2720-2731. doi:10.3390/ijerph10072720.
42. Arena F, Giani T, Becucci E, et al. Large Oligoclonal Outbreak Due to *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST26 Producing the FOX-7 AmpC β -Lactamase in a Neonatal Intensive Care Unit. doi:10.1128/JCM.01982-13.
43. Sumer S, Turk Dagi H, Findik D, et al. Two outbreaks of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. *Pediatr Int.* 2014;56(2):222-226. doi:10.1111/ped.12234.
44. Tamma PD, Savard P, Pál T, Sonnevend Á, Perl TM, Milstone AM. An Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2012;33(06):631-634. doi:10.1086/665715.
45. Singh N, Patel KM, Léger M-M, et al. Risk of resistant infections with *Enterobacteriaceae* in hospitalized neonates. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21(11):1029-1033. doi:10.1097/01.inf.0000036086.87120.ec.
46. Anderson B, Nicholas S, Sprague B, Campos J, Short B, Singh N. Molecular and Descriptive Epidemiology of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* in Hospitalized Infants. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(3):250-255. doi:10.1086/527513.
47. Mahieu LM, Buitenweg N, Beutels P, De Dooy JJ. Additional hospital stay and charges due to hospital-acquired infections in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* 2001;47(3):223-229. doi:10.1053/jhin.2000.0852.

48. Linkin DR, Fishman NO, Patel JB, Merrill JD, Lautenbach E. Risk Factors for Extended-Spectrum Beta-Lactamase–Producing *Enterobacteriaceae* in a Neonatal Intensive Care Unit . *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(9):781-783. doi:10.1086/502477.
49. Kothari C, Gaiind R, Singh L, et al. Community acquisition of β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in neonatal gut. *BMC Microbiol*. 2013;13(1):136. doi:10.1186/1471-2180-13-136.
50. Dedeić-Ljubović A, Hukić M. Occurrence of colonization and infection with multidrug-resistant organisms in a neonatal intensive care unit. *Med Glas (Zenica)*. 2012;9(2):304-310. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22926368>.
51. Mammina C, Di Carlo P, Cipolla D, et al. Surveillance of multidrug-resistant gram-negative bacilli in a neonatal intensive care unit: prominent role of cross transmission. *Am J Infect Control*. 2007;35(4):222-230. doi:10.1016/j.ajic.2006.04.210.
52. Sim K, Shaw AG, Randell P, et al. Dysbiosis Anticipating Necrotizing Enterocolitis in Very Premature Infants. *Clin Infect Dis*. 2015;60(3):389-397. doi:10.1093/cid/ciu822.
53. Giuffrè M, Bonura C, Geraci DM, et al. Successful control of an outbreak of colonization by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* sequence type 258 in a neonatal intensive care unit, Italy. *J Hosp Infect*. 2013;85(3):233-236. doi:10.1016/j.jhin.2013.08.004.
54. Pessoa-Silva C., Meurer Moreira B, Câmara Almeida V, et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. *J Hosp Infect*. 2003;53(3):198-206. doi:10.1053/jhin.2002.1373.
55. Gray J, Arvelo W, McCracken J, et al. An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit in Guatemala. *Am J Infect Control*. 2012;40(6):516-520. doi:10.1016/j.ajic.2012.02.031.

56. Kristóf K, Szabó D, Marsh JW, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26(8):563-570. doi:10.1007/s10096-007-0338-9.

57. Ruiz E, Rezusta A, Sáenz Y, et al. New genetic environments of aac(6')-Ib-cr gene in a multiresistant *Klebsiella oxytoca* strain causing an outbreak in a pediatric intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(2):236-238. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.09.004.