



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**Estudio clínico y epidemiológico de un brote
nosocomial producido por *Klebsiella oxytoca*
productora de IMP-8**

AUTOR

Salvador Vergara López

DIRECTORES

Jesús Rodríguez Baño

Profesor titular
Departamento de Medicina
Universidad de Sevilla

Álvaro Pascual Hernández

Catedrático de Microbiología
Universidad de Sevilla



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

Los Doctores Jesús Rodríguez Baño, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla, y Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAMOS:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título: “**Estudio clínico y epidemiológico de un brote nosocomial producido por *Klebsiella oxytoca* productora de IMP-8**”, ha sido realizada por D. Salvador Vergara López bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 18 de Septiembre de 2015.

Jesús Rodríguez Baño

Álvaro Pascual Hernández

Agradecimientos

Esta tesis doctoral es el final de una larga trayectoria y el resultado del trabajo de muchas personas importantes para mí.

En primer lugar quisiera agradecer profundamente a mis directores de tesis, Jesús Rodríguez Baño y Álvaro Pascual Hernández, la oportunidad de poder trabajar y aprender con ellos. Ha sido una experiencia única que me ha enriquecido profesionalmente más que cualquier otra que haya tenido en el pasado. Todas y cada de las conversaciones y comentarios que he compartido con ellos han sido de gran valor. Y en lo personal, me he sentido siempre cómodo, escuchado y respetado.

Hay dos personas a las que también quiero expresar mi sincero agradecimiento. Una de ellas es María del Carmen Domínguez Jiménez. Sin duda, a ella debemos todos que el brote nosocomial en el que se basa esta tesis pudiese ser erradicado. A su perseverancia, profesionalidad y capacidad de trabajo. Además, es una buena amiga que siempre ha estado dispuesta a enseñarme, escucharme, animarme, discutirme y hacer lo que hiciera falta para que mejorara. Muchas gracias.

La otra persona es María Carmen Conejo Gonzalo. Además de su contribución durante todo el trabajo de investigación, ha revisado la tesis de forma desinteresada y ha aportado de forma excepcional al resultado final. Gracias.

Justo es acordarse de donde están nuestros principios. Y los míos están en el grupo de investigación de Hepatitis víricas y SIDA, liderado por Juan Antonio Pineda Vergara. Gran parte de lo que soy hoy se lo debo a él y a personas como José Ángel García García y José Antonio Mira Escarti.

A Juan Corzo Delgado y Jesús Gómez Mateos les debo la pasión por las Enfermedades Infecciosas.

Pero nada eres sin tu familia. Y yo, sin duda, soy un buen ejemplo. A mi padre, siempre atento en la sombra, sin hacer mucho ruido. A mi madre, a la que cada vez admiro más, capaz de hacer lo que hiciera falta para impulsarme e inmune a la enfermedad y al desaliento.

Para el final dejo lo más importante. Mis dos niños, Carmen y Fernando, que son mi luz. Y mi otra mitad, Fadia. Sin ella nada es posible y mucho menos terminar este trabajo. Me ha apoyado, animado y ha ido siempre por delante, allanado el camino para que yo pudiese avanzar y llegar a esta y todas las metas.

INDICE DE ABREVIATURAS y SIGLAS

BAR = Bajante de aguas residuales de la unidad de cuidados intensivos.

BLEE = β -lactamasa de espectro extendido.

CMI = Concentración mínima inhibitoria.

CVC = Catéter venoso central.

DE = Desviación estándar.

EA = Estudio ambiental.

EP= Estudio del personal sanitario.

g = Gramo.

h = Hora.

KPC = *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa.

KOX_{IMP-8} = *Klebsiella oxytoca* productora de carbapenemasa IMP-8.

L = Lavabo de la unidad de cuidados intensivos.

MBL = Metallo- β -lactamasa.

mg = Miligramo.

ml = Mililitro.

mm = Milímetro.

L = Litro.

NAVM = Neumonía asociada a ventilación mecánica.

NDM = Nueva Delhi MBL.

PBP = Proteínas fijadoras de penicilinas (*penicillin-binding proteins*).

PFGE = Electroforesis en gel de campo pulsante (*Pulsed-field gel electrophoresis*).

PPCL = Protocolo para la prevención y control de *Legionella*.

RIQ = Rango intercuartílico.

rpm = Revoluciones por minuto.

spp = Especies.

UCI = Unidad de cuidados intensivos.

INDICE DEL CONTENIDO

Índice de abreviaturas y siglas.....	5
Índice del contenido.....	8
1. Tesis como compendio de artículos previamente publicados.....	13
2. Introducción general.....	15
2.1 Epidemiología de <i>Klebsiella</i> spp.....	17
2.2 Cuadros clínicos.....	18
2.2.1 Neumonías comunitarias.....	19
2.2.2 Abscesos hepáticos.....	19
2.2.3 Bacteriemias comunitarias.....	20
2.2.4 Variabilidad geográfica de las infecciones comunitarias por <i>Klebsiella</i> spp.....	21
2.2.5 Infecciones nosocomiales.....	22
2.3 Factores de patogenicidad.....	24
2.3.1 Antígeno capsular.....	24
2.3.2 Fimbrias.....	24
2.3.3 Resistencia al sistema del complemento.....	25
2.3.4 Sideróforos.....	25
2.3.5 Resistencia a antimicrobianos.....	26
2.3.5.1 Antimicrobianos β -lactámicos.....	27
2.3.5.2 β -lactamasas.....	29
2.3.5.2.1 Carbapenemasas.....	32
2.4 Aspectos no aclarados.....	36
2.4.1 Brotes nosocomiales.....	36

2.4.2	Tratamiento.....	38
3.	Artículos publicados.....	39
3.1	Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- β -lactamase-producing <i>Klebsiella oxytoca</i>	42
3.2	Lessons from an outbreak of metallo- β -lactamase-producing <i>Klebsiella oxytoca</i> in an intensive care unit: the importance of time at risk and combination therapy.....	52
3.3	Prolonged treatment with large doses of fosfomicin plus vancomycin and amikacin in a case of bacteraemia due to methicillin-resistant <i>Staphylococcus epidermidis</i> and IMP-8 metallo- β -lactamase-producing <i>Klebsiella oxytoca</i>	62
4.	Resumen de los artículos publicados.....	66
4.1	Objetivos de la investigación.....	67
4.2	Material y Métodos.....	68
4.2.1	Lugar de realización del estudio.....	68
4.2.2	Circuito de agua en la UCI.....	68
4.2.3	Descripción del Brote.....	69
4.2.4	Pacientes.....	69
4.2.5	Diseño de los estudios realizados.....	69
4.2.6	Definiciones y variables.....	71
4.2.7	Investigación de pacientes, ambiente y profesionales sanitarios y medidas de control.....	72
4.2.8	Terapia antimicrobiana.....	74
4.2.9	Estudios microbiológicos.....	75

4.2.10	Análisis estadístico.....	78
4.3	Resultados.....	80
4.3.1	Descripción general del brote.....	80
4.3.2	Aislamientos de <i>K. oxytoca</i> previos al brote.....	81
4.3.3	Descripción del brote y las medidas de control.....	81
4.3.3.1	Oleada 1.....	81
4.3.3.2	Oleada 2.....	84
4.3.3.3	Oleada 3.....	86
4.3.3.4	Oleada 4.....	88
4.3.4	Aislamientos de <i>K. oxytoca</i> durante el brote.....	89
4.3.5	El último caso del brote.....	89
4.3.6	Probabilidad de infección y/o colonización por KOX _{IMP-8} y presión de colonización.....	92
4.3.7	Estudio de casos y controles para la identificación de factores de riesgo de colonización/infección por KOX _{IMP-8}	93
4.3.8	Infecciones causas por KOX _{IMP-8}	94
4.3.9	Consumo de antibioterapia durante el brote.....	95
4.4	Discusión.....	96
4.4.1	Aspectos generales.....	96
4.4.2	MBL tipo IMP.....	96
4.4.3	Del reservorio humano al ambiental.....	98
4.4.4	Investigación ambiental.....	99
4.4.5	Importancia de lavabos y sistemas de desagüe de aguas residuales.....	101
4.4.6	El papel del PPCL.....	103

4.4.7	Factores de riesgo de infección y/o colonización por KOX _{IMP-8} ...	104
4.4.7.1	Tiempo en riesgo.....	105
4.4.7.2	Presión de colonización.....	106
4.4.7.3	Papel de la antibioterapia.....	107
4.4.8	Tratamiento de las infecciones por KOX _{IMP-8}	108
5.	Conclusiones.....	112
6.	Bibliografía.....	115
7.	Tablas.....	139
7.1	Tabla 1. Tipos de infección producidos por <i>Klebsiella</i> spp.....	140
7.2	Tabla 2. Antimicrobianos β-lactámicos.....	141
7.3	Tabla 3. Clasificación de β-lactamasas.....	142
7.4	Tabla 4. Resumen de estudios ambientales y medidas adoptadas.....	143
7.5	Tabla 5. Características principales de los pacientes infectados y/o colonizados por KOX _{IMP-8}	144
7.6	Tabla 6. Datos clínicos y analíticos del último caso del brote durante los 28 días de tratamiento antimicrobiano para la infección por KOX _{IMP-8}	146
7.7	Tabla 7. Comparación de las características de los casos y controles.....	147
7.8	Tabla 8. Análisis de regresión de Cox de los factores predictores de tiempo hasta infección y/o colonización por KOX _{IMP-8}	149
7.9	Tabla 9. Características clínicas, terapéuticas y pronósticas de los pacientes infectados por KOX _{IMP-8}	150
8.	Figuras.....	151

8.1	Figura 1. Representación esquemática de los principales factores de patogenicidad de <i>Klebsiella</i> spp.....	152
8.2	Figura 2. Diseminación de MBL tipo IMP en <i>Klebsiella</i> spp. hasta el comienzo del brote (2009).....	153
8.3	Figura 3. Plano de la UCI del Hospital de la Merced de Osuna.....	154
8.4	Figura 4. Curva sinóptica de los pacientes infectados y/o colonizados por KOX _{IMP-8} y medidas de control realizadas.....	155
8.5	Figura 5. Diagrama de flujo de los pacientes estudiados en el proyecto y estudios realizados.....	156
8.6	Figura 6. Eliminación del lavabo 6 y sustitución del sistema de desagüe del lavabo 7.....	157
8.7	Figura 7. Aislamiento del bajante 5 y derivación de las tuberías de desagüe de los lavabos 5 y 7 hacia el bajante 4.....	158
8.8	Figura 8. Probabilidad acumulada de infección y/o colonización por KOX _{IMP-8} durante las dos primeras oleadas del brote.....	159
8.9	Figura 9. Probabilidad acumulada de infección y/o colonización por KOX _{IMP-8} según el nivel de presión de colonización.....	160
8.10	Figura 10. Consumo de antimicrobianos antes, durante y después del brote nosocomial por KOX _{IMP-8}	161
8.11	Figura 11. Diseminación de MBL tipo IMP en <i>Klebsiella</i> spp. hasta 2015.....	162
8.12	Figura 12. Representación de los lavabos como reservorios permanentes.....	163
8.12.1	12a. Grifo Cerrado.....	163
8.12.2	12b. Grifo abierto.....	164

**1. TESIS COMO COMPENDIO DE ARTÍCULOS
PREVIAMENTE PUBLICADOS**

Esta tesis, de acuerdo con el informe correspondiente y la autorización de los directores de la misma y del órgano responsable del Programa de Doctorado, se presenta como un compendio de tres artículos. Las referencias completas a los artículos que componen el cuerpo de la tesis son las siguientes:

1.1 Vergara-López S, Domínguez MC, Conejo MC, Pascual Á, Rodríguez-Baño J. Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:E490-498. FACTOR IMPACTO: 5,197.

1.2 Vergara-López S, Domínguez MC, Conejo MC, Pascual Á, Rodríguez-Baño J. Lessons from an outbreak of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* in an intensive care unit: the importance of time at risk and combination therapy. J Hosp Infect. 2015; 89:123-131. FACTOR IMPACTO: 2,544.

1.3 Vergara-López S, Domínguez MC, Conejo MC, Pascual Á, Rodríguez-Baño J. Prolonged treatment with large doses of fosfomicin plus vancomycin and amikacin in a case of bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and IMP-8 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. J Antimicrob Chemother. 2015; 70:313-315. FACTOR IMPACTO: 5,313

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, el género *Klebsiella* incluye las especies *K. pneumoniae* (subespecies *pneumoniae*, *ozaenae* y *rhinoscleromatis*), *K. granulomatis*, *K. singaporensis*, *K. variicola* y *K. oxytoca* (1). Son bacilos gramnegativos inmóviles, anaerobios facultativos, que se caracterizan por una apariencia grande en la tinción de Gram y formar grandes colonias de aspecto mucoso.

Desde el punto de vista médico su importancia radica en el papel que tienen, fundamentalmente *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, como patógenos humanos. Clásicamente se asoció *K. pneumoniae* a la neumonía de Friedländer, relacionada con el alcoholismo y con hallazgos radiológicos característicos (2, 3). Pero es por su comportamiento como patógeno oportunista por lo que este género se ha convertido en uno de los protagonistas indiscutibles dentro de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (4, 5). El progresivo aumento de las enfermedades crónicas, la inmunodepresión y los procedimientos agresivos, la capacidad de este género de bacterias para producir una amplia variedad de infecciones, adaptarse al ambiente nosocomial, adquirir determinantes de resistencia frente a distintos antimicrobianos y diseminarse explican esta situación y son el punto de partida que justifica esta tesis doctoral: avanzar en el conocimiento de algunos aspectos epidemiológicos y clínicos relacionados con *Klebsiella* spp. Para ello se realiza una puesta al día de los aspectos más relevantes de este género, describiendo algunos aspectos no aclarados y cómo a través de un brote nosocomial se abordaron dichas áreas de incertidumbre, dando lugar a las tres publicaciones que constituyen el cuerpo de esta tesis doctoral.

2.1 Epidemiología de *Klebsiella* spp

Las bacterias del género *Klebsiella* son muy ubicuas en la naturaleza. Se encuentran fácilmente tanto en superficies secas (6) como húmedas (7), vegetales (8), carne (9) e incluso agua potable (10). En humanos, *Klebsiella* spp. forma parte de la flora normal del tracto gastrointestinal (11) y puede colonizar frecuentemente el aparato respiratorio superior (12) y ocasionalmente la piel, donde sin embargo no puede considerarse un miembro de la flora saprófita (13).

Por otro lado, este género suele ser un componente habitual del ambiente hospitalario, donde la tasa de pacientes colonizados se multiplica, en porcentajes de hasta el 77% en heces (14-16), de forma directamente proporcional al tiempo de estancia y sobre todo al uso previo de antimicrobianos (15). El principal reservorio hospitalario es el tracto gastrointestinal de los pacientes colonizados (17), desde donde se disemina con facilidad, siendo especialmente significativa su capacidad para producir brotes nosocomiales (18, 19). De estos, son de especial importancia los producidos por cepas resistentes a los antimicrobianos habituales. Ya en la década de los setenta se describieron brotes producidos por cepas con determinantes de resistencia frente a aminoglucósidos (20, 21). A partir de 1982, comenzaron a describirse brotes por *K. pneumoniae* y, en menor medida, *K. oxytoca* resistentes a antimicrobianos β -lactámicos incluyendo cefalosporinas, mediante la producción de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (22-24) que han llegado a diseminarse mundialmente a lo largo de las décadas siguientes (25). A esta situación se ha unido en los últimos años la diseminación de cepas productoras de β -lactamasas con actividad frente a antimicrobianos

carbapenémicos (carbapenemasas) que han convertido a los brotes nosocomiales por *Klebsiella* spp. multirresistente a antimicrobianos en una emergencia sanitaria internacional (26). Un aspecto especialmente relevante es el de los clones denominados “de alto riesgo” que han experimentado una rápida diseminación mundial en pocos años. El mejor ejemplo es el clon ST258 de *K. pneumoniae* productora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) que actualmente se considera endémico en Estados Unidos, Israel, Grecia, Italia, Polonia y Colombia. Otros ejemplos de clones de alto riesgo relacionados con el ST258 son el ST11 en China y Brasil, el ST15 en Italia, Polonia y Colombia o el ST340 en Brasil y Grecia (27).

2.2 Cuadros Clínicos

Klebsiella spp. es capaz de producir multitud de cuadros clínicos diferentes tanto de origen comunitario como nosocomial (5) (Tabla 1). Algunos de estos cuadros merecen una atención especial, ya sea por su importancia clínica o características diferenciales.

2.2.1 Neumonías comunitarias

Actualmente se considera que *Klebsiella* spp. produce entre el 1 y el 5% de las neumonías adquiridas en la comunidad (5), si bien es cierto que son más frecuentes en determinados países como Taiwan o Sudáfrica (28). El cuadro se relaciona fundamentalmente con dos claros factores de riesgo: alcoholismo y diabetes (3, 29). Aunque puede ser inespecífica, en su presentación clásica la infección es unilateral en 2/3 de las ocasiones y afecta mayoritariamente al segmento posterior del lóbulo superior derecho, con abombamiento de cisura y frecuente evolución hacia absceso pulmonar y/o empiema (3, 30). Desde un punto de vista clínico suele ser una enfermedad grave, frecuentemente bacteriémica y asociada a mal pronóstico (31).

2.2.2 Abscesos hepáticos

En las últimas dos décadas, *Klebsiella* spp. se ha descrito como causante frecuente de abscesos hepáticos en Estados Unidos (32), Europa (33) y Asia (34), especialmente en Taiwan (35, 36). Estos cuadros, a diferencia de lo que suele ocurrir en los producidos por *Escherichia coli* u otras bacterias, son primarios, es decir, no secundarios a focos en otras localizaciones. Por el contrario, estos abscesos hepáticos primarios suelen ser causa de diseminación a otros órganos en un porcentaje de hasta el 45% de los casos (35, 37, 38). Los ojos (33, 37, 38), meninges (35, 38), sistema nervioso central (35, 37) y pulmones (33, 35, 37) son las localizaciones metastásicas más frecuentes. Este cuadro constituye un

síndrome en sí mismo que se ha considerado como una enfermedad emergente en los últimos años.

El cuadro es más frecuente en hombres de mediana edad con diabetes mellitus, que se considera el principal factor de riesgo (37). La forma de presentación y alteraciones analíticas son inespecíficas. Más específica es la radiología, con nivel hidroaéreo hepático o gas en vena porta en radiografía simple de abdomen e infiltrado alveolar pulmonar junto con derrame pleural en radiología simple de tórax. En las imágenes de TAC, los abscesos suelen ser unilobares, multiloculados y con presencia de gas (34). Este tipo de absceso tiene mejor pronóstico que los producidos por otros microorganismos tanto en términos de mortalidad como de riesgo de recidiva (35, 39).

2.2.3 Bacteriemias comunitarias

En 1985 se publicó una larga serie española de bacteriemias por *Klebsiella* spp. donde se establecía que aproximadamente el 6,6% de todas las bacteriemias eran producidas por este género, con una incidencia de 2,3 casos/1000 hospitalizaciones (40). Los principales focos de infección fueron: urinario, respiratorio y biliar. Entonces la mortalidad era del 25% y el principal factor de riesgo era la diabetes mellitus (41).

Actualmente la bacteriemia por *Klebsiella* spp. es de origen comunitario en el 36% de los casos fuera del sudeste asiático y hasta más de la mitad en esa área geográfica, donde la infección invasora por *Klebsiella* spp. es

significativamente más prevalente (42). El factor de riesgo principal continúa siendo la diabetes mellitus. Los focos infecciosos subyacentes son los clásicos, con la excepción del absceso hepático (43) y la neumonía en Sudáfrica (28). La mortalidad se sitúa en torno al 10%.

Otro aspecto a tener en cuenta es la presencia de bacterias multirresistentes en la comunidad. En este sentido, Lee et al. publicaron una serie de bacteriemias comunitarias por *K. pneumoniae* productoras de BLEE en la que observaron un aumento de la prevalencia de cepas productoras de estas β -lactamasas desde el 6,6% en 2004 hasta el 15% en 2008 (43).

2.2.4 Variabilidad geográfica de las infecciones comunitarias por *Klebsiella* spp

Como se ha puesto de manifiesto, es evidente que existen diferencias geográficas en la incidencia de las infecciones comunitarias por *Klebsiella* spp., siendo significativamente superior en el sudeste asiático –especialmente en Taiwan- y Sudáfrica. Estas diferencias no han podido ser definitivamente explicadas por las desigualdades en las tasas de diabetes mellitus o alcoholismo, por la menor accesibilidad a los cuidados sanitarios o por el más bajo nivel socioeconómico (44). Lo que sí se ha demostrado, es que existen diferencias en relación a la virulencia del microorganismo en las distintas zonas. Yu et al. realizaron un estudio sobre 455 episodios de bacteriemia por *K. pneumoniae* en 7 países distintos (45), comprobando que los serotipos K1 y K2 eran significativamente más frecuentes en Taiwan y Sudáfrica, así como en los casos

de neumonía y absceso hepático bacteriémico. Además, la distribución del fenotipo mucóide de las cepas seguía el mismo patrón de frecuencia en los mismos sitios y patologías, fundamentalmente en pacientes más jóvenes y sin patología subyacente. El fenotipo mucóide se ha asociado estrechamente con la presencia del gen *rmpA* (*regulator of mucoid phenotype A*), un gen regulador plasmídico implicado en la síntesis del polisacárido extracapsular. La otra característica presente en prácticamente todas las cepas *rmpA* positivas fue la producción del sideróforo aerobactina. Se ha demostrado que existe una relación genética entre las cepas con estas características, que posteriormente ha resultado en un clon hipervirulento conocido como ST23 (46, 47) que está diseminándose en los últimos años fuera de sudeste asiático y Sudáfrica (48).

2.2.5 Infecciones nosocomiales

Klebsiella spp. fue el cuarto microorganismo aislado con mayor frecuencia en el estudio español de prevalencia de infecciones nosocomiales EPINE 2014, con un porcentaje global del 7,9% (6,6% *K. pneumoniae* y 1,3% *K. oxytoca*) (49). Las infecciones del tracto urinario son las más frecuentes, en las que *Klebsiella* spp. constituye el quinto agente infeccioso más prevalente (50). Otras infecciones significativas son la neumonía nosocomial, la bacteriemia o la infección de herida quirúrgica, junto con otras menos frecuentes (Tabla 1).

Las infecciones nosocomiales por *Klebsiella* spp. se diferencian de las producidas en la comunidad fundamentalmente en tres aspectos:

1) Las cepas que las producen no presentan la variabilidad geográfica observada en las cepas comunitarias (45).

2) Los factores de riesgo de los enfermos son diferentes. Mientras que la diabetes mellitus es más prevalente en los enfermos con infecciones comunitarias, la pluripatología -fundamentalmente la existencia de una neoplasia-, la instrumentalización y los procedimientos agresivos, lo son en los enfermos hospitalizados. Además, la gravedad de la infección nosocomial es mayor. Todo ello explica que la mortalidad sea también significativamente mayor en la infección nosocomial (42).

3) La frecuencia de cepas multirresistentes. Además del aumento progresivo de las cepas productoras de BLEE, *Klebsiella* spp. lidera ampliamente la clasificación de enterobacterias con sensibilidad disminuida a carbapenémicos, constituyendo actualmente el 41% de los aislamientos de este grupo de enterobacterias en España (51).

2.3 Factores de patogenicidad

Una de las razones que explica el papel principal de *Klebsiella* spp. como patógeno es la posesión de numerosos y variados factores de patogenicidad que se muestran resumidamente en la Figura 1.

2.3.1 Antígeno capsular (K)

El antígeno capsular está formado por la prominente cápsula de polisacáridos, una acumulación de haces gruesos de estructuras fibrilares que protege a la bacteria de la fagocitosis (52) y de los factores séricos bactericidas (53). Además, constituye una barrera natural para muchos antimicrobianos. Existen 77 serotipos distintos, de los que K1, K2, y en menor medida K4 y K5 han mostrado ser los más virulentos (44).

2.3.2 Fimbrias

Dado que un proceso crucial en la fisiopatología de infección por *Klebsiella* spp. es la adhesión a la mucosa del huésped, las fimbrias constituyen otro factor de patogenicidad importante. Estas proyecciones no flagelares de la superficie de la bacteria son la base de la reacción que permite clasificar a las bacterias en sensibles o resistentes a manosa dependiendo de si este elemento es capaz o no de inhibir la reacción de hemaglutinación (54). La fimbria más importante es la tipo

1, que ha demostrado ser un componente importante en la patogénesis de las pielonefritis (55) y de las neumonías asociadas a ventilación mecánica (56).

2.3.3 Resistencia al Sistema del Complemento

Las causas de la resistencia a la actividad bactericida del suero mediada por el Sistema del Complemento no están completamente dilucidadas. En *Klebsiella* spp., se piensa que la cápsula de polisacáridos protege de la activación del complemento mediante la exposición de estructuras no susceptibles de activarlo. Más aún, en algunos tipos capsulares de *Klebsiella* spp., las cadenas laterales de lipopolisacárido pueden estar expuestas al exterior. Sin embargo, aunque estas cadenas tienen la capacidad de activar el complemento, éste se activa en las zonas más distales de las cadenas, haciendo que el complejo lítico C5b-C9 se forme lejos de la membrana bacteriana. De esta forma se evita su acción sobre la misma (57).

2.3.4 Sideróforos

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento bacteriano que, sin embargo, tiene una disponibilidad muy baja en el tejido huésped debido a su captación intracelular a cargo de proteínas como la ferritina, la hemoglobina o la hemosiderina. Por esta razón, la consecución de hierro libre por parte de la bacteria es un factor de patogenicidad clave. Para conseguirlo, las bacterias secretan proteínas con altísima afinidad por el hierro llamadas sideróforos (58). En el caso de *Klebsiella* spp., los sideróforos más importantes son la

enterobactina y la aerobactina. La primera es sintetizada prácticamente por todas las cepas y su fuente principal de hierro es la transferrina, a la que supera en afinidad por el hierro férrico (59). La aerobactina capta hierro directamente de las células (60) y su importancia radica, más que en su papel directo en la patogenicidad de *Klebsiella* spp., en su asociación con los serotipos virulentos K1 y K2 y el fenotipo mucóide a través del gen plasmídico *rmpA* (44).

2.3.5 Resistencia a antimicrobianos

Dentro de los factores de patogenicidad, la resistencia a antimicrobianos es probablemente el más importante en las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria. De entrada, la estructura de doble membrana de la pared bacteriana característica de las bacterias gramnegativas constituye un sistema de defensa debido a la barrera que supone a la entrada de moléculas grandes (como daptomicina o glucopéptidos) o hidrofóbicas (como los β -lactámicos). Los β -lactámicos y otros antimicrobianos atraviesan la membrana externa a través de porinas y se encuentran con otros mecanismos defensivos como son las β -lactamasas periplasmáticas o las bombas de expulsión activa (61). El conjunto de estas defensas explica por qué las bacterias gramnegativas son inherentemente más resistentes a algunas familias de antimicrobianos que las grampositivas. En este sentido, tras los primeros antimicrobianos efectivos frente a gramnegativos (sulfonamidas, tetraciclinas, primera generación de aminoglucósidos y cloranfenicol), aparecidos entre los años 30 y 50 del siglo XX, los β -lactámicos, junto a las fluorquinolonas, han constituido la piedra angular del tratamiento de las

infecciones producidas por bacterias gramnegativas en general y *Klebsiella* spp. en particular (61).

2.3.5.1 Antimicrobianos β -lactámicos

Los β -lactámicos, representados en la Tabla 2 (62), se caracterizan por poseer como núcleo químico un anillo 6-aminopenicilánico o *penam*, formado a su vez por un anillo tiazolidínico enlazado a un anillo β -lactámico. Este último es esencial dado que, por un lado es clave en la actividad antimicrobiana de la molécula, y por otro es el sustrato de los principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos β -lactámicos (63).

La forma de actuación básica de estos antimicrobianos consiste en su unión a las proteínas fijadoras de penicilinas (*PBP*), básicamente enzimas transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas involucradas en la fase final de la formación de la pared bacteriana y la reorganización de la misma durante el crecimiento y la división celular. La unión del antimicrobiano provoca la inactivación irreversible de las *PBP* y secundariamente la muerte celular por dos mecanismos fundamentales:

- 1) La pared celular defectuosamente formada da lugar a una entrada masiva de agua por la alta presión osmótica interna y el estallido del microorganismo.

2) La pérdida de la inhibición de enzimas endógenas que hidrolizan mureína (autolisinas) conlleva un metabolismo desequilibrado y la lisis bacteriana (64).

Desgraciadamente, de forma lineal a la aparición de nuevos antimicrobianos han ido apareciendo determinantes de resistencia a los mismos. En el caso de los β -lactámicos, se han descrito varios mecanismos posibles de resistencia en las bacterias gramnegativas [adaptado de (64)]:

1) Modificación de la diana:

i. Modificación de la *PBP* existente.

2) Disminución de la concentración de antimicrobianos β -lactámicos dentro de la célula:

i. Disminución de la permeabilidad (pérdida de porinas).

ii. Expulsión activa (bombas de expulsión).

3) Inactivación enzimática de los antimicrobianos β -lactámicos.

Este es el mecanismo de resistencia más común e importante frente a estos antimicrobianos en bacterias gramnegativas. Estas enzimas se denominan β -lactamasas.

2.3.5.2 β -lactamasas

Las β -lactamasas se clasifican tradicionalmente según dos criterios diferentes:

1) Funcional. Descrita inicialmente por Bush en 1989 (65) y revisada por Bush, Jacoby y Medeiros posteriormente (66), esta clasificación está basada en la capacidad de las distintas β -lactamasas para hidrolizar determinados grupos de antimicrobianos y/o su sensibilidad a la acción de los inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam). La información se detalla en la Tabla 3.

2) Estructural. Acorde a su secuencia proteica, Ambler clasificó a las β -lactamasas en 4 clases principales: A, B, C y D (Tabla 3) (67). Las pertenecientes a las clases A, C y D precisan serina en su sitio activo, mientras que las pertenecientes al grupo B, conocidas como metalo- β -lactamasas (MBL), necesitan zinc como cofactor para realizar su actividad catalítica.

Históricamente, conforme han ido surgiendo antimicrobianos β -lactámicos de mayor espectro han aparecido β -lactamasas con capacidad de hidrolizar a una mayor variedad de ellos. Existen por tanto β -lactamasas de distintos espectros de acción, que van desde el reducido (penicilinasas) y el amplio (capaces de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación), hasta las

BLEE (con capacidad para hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como aztreonam), β -lactamasas tipo AmpC (hidrolizan cefalosporinas de tercera generación) y β -lactamasas con capacidad de inactivar carbapenémicos (Tabla 2 y 3) (68).

En el caso de *Klebsiella* spp., se distinguen β -lactamasas de producción intrínseca y de adquisición extrínseca. Este género muestra una resistencia intrínseca a las penicilinas naturales, aminopenicilinas y carboxipenicilinas, pero no a su asociación con inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam) ni a cefalosporinas. Esta resistencia se debe a la producción, prácticamente universal y más o menos importante, de una β -lactamasa cromosómica de clase A de tipo SHV, LEN o OKP (Tabla 3) (69). Además, específicamente *K. oxytoca* posee otra β -lactamasa de clase A, -denominada OXY-, con mayor espectro de actividad, que si es producida en suficiente cantidad puede conferir resistencia a cefalosporinas de tercera generación y aztreonam (70).

La resistencia adquirida a β -lactámicos se debe fundamentalmente a la producción de BLEE y los genes que las codifican suelen estar incluidos en plásmidos que contienen generalmente determinantes de resistencia a otros antimicrobianos, como sulfamidas o aminoglucósidos. Este hecho, junto con la coexistencia frecuente de resistencia a quinolonas, convierten muy frecuentemente a las cepas de *Klebsiella* spp. productoras de BLEE en cepas multirresistentes (68). Las BLEE derivan fundamentalmente de β -lactamasas de clase A de amplio espectro, -fundamentalmente TEM-1, TEM-2 y SHV-1-. A partir

de mutaciones puntuales de estas enzimas aparecieron las BLEE nominadas a partir de TEM-3 o SHV-2 (Tabla 3) (71). Típicamente estas enzimas son sensibles a los inhibidores de β -lactamasas y no son activas frente a cefamicinas o antimicrobianos carbapenémicos (68). Otras BLEE no derivadas de las TEM y SHV de amplio espectro son las de tipo OXA y las CTX-M. Las tipo OXA son raras en *Klebsiella* spp. (71). Las CTX-M se han convertido en las BLEE más frecuentes en *E. coli* y más recientemente también en *Klebsiella* spp., tanto en el ámbito nosocomial como en el comunitario (72).

Otras β -lactamasas que puede adquirir *Klebsiella* spp. pertenecen a la clase C de Ambler (AmpC). Aunque las AmpC se asemejan a las BLEE en el hecho de que son capaces de hidrolizar cefalosporinas de amplio espectro, se diferencian de aquellas en su actividad frente a las cefamicinas (las AmpC hidrolizan estos antimicrobianos mientras que las BLEE no), en que no hidrolizan eficientemente las cefalosporinas de cuarta generación como cefepima, y a su insensibilidad a la acción de ácido clavulánico y otros inhibidores de β -lactamasas (68). Estas enzimas son de codificación cromosómica e inducible en algunas especies de enterobacterias como *Enterobacter* spp., y pueden sobreproducirse al ser expuestas a β -lactámicos (73) o, como ocurre en *Klebsiella* spp., pueden ser adquiridas a través de plásmidos (74).

No obstante, el principal problema en la actualidad es la resistencia a carbapenémicos. En enterobacterias, esta resistencia puede estar mediada por la asociación de la pérdida de porinas con la hiperproducción de β -lactamasas con actividad débil sobre los carbapenémicos, como las AmpC (75) o las BLEE. Sin

embargo, el déficit de porinas puede acarrear un coste biológico significativo a la bacteria y no suele ser transferible, por lo que estos mecanismos no representan un problema de salud pública tan grave como la producción en *Klebsiella* spp. de carbapenemasas, β -lactamasas con actividad frente carbapenémicos-, debido a su continua evolución y alta velocidad de diseminación intra e interhospitalaria, así como a las dificultades que representan su control y tratamiento (26).

2.3.5.2.1 Carbapenemasas

La primera descripción de una carbapenemasa dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se realizó en 1993 a partir de una cepa de *E. cloacae* productora de la enzima NmcA (76). Desde entonces se han descrito una larga variedad de estas enzimas pertenecientes a las clases A, B y D de Ambler (Tabla 3).

Las carbapenemasas de clase A descritas pueden ser de codificación cromosómica (como por ejemplo, NmcA, Sme o SFC-1) o plasmídica (como KPC). Estas últimas son las más importantes de este grupo (77). Se caracterizan por una hidrólisis eficiente de todos los carbapenémicos y ser inhibidas parcialmente por ácido clavulánico. La diseminación de estas enzimas ha sido prácticamente global desde 1996 en que se describió por primera vez (27, 78).

Las de clase D están representadas fundamentalmente por la enzima OXA-48. Desde su primera descripción en Turquía en 2003 (79) se ha extendido por el sur y este de Europa (zona mediterránea) y África (79, 80). En España está

teniendo especial relevancia, siendo actualmente *K. pneumoniae* productora de OXA-48 la enterobacteria resistente a carbapenémicos más frecuentemente aislada (51).

El otro gran grupo de carbapenemasas son las MBL. Se caracterizan por degradar todos los antimicrobianos β -lactámicos excepto el aztreonam y por no ser susceptibles a la inhibición por los inhibidores de β -lactamasas con uso terapéutico, aunque sí al ácido etildiaminotetraacético (26). Existen muchos tipos diferentes de MBL, aunque los más importantes son los siguientes:

1. Tipo VIM. Denominadas de esta forma por haber sido descritas por primera vez en Verona en 1997 (81). Se han descrito varias decenas de variantes fundamentalmente en *Pseudomonas aeruginosa* pero también en *Klebsiella* spp. (82). Su diseminación en enterobacterias no se ha asociado a clones concretos, estando actualmente presente en numerosos países de Europa, Asia y América, tanto en forma de casos esporádicos como en brotes nosocomiales (26, 83).

2. Tipo NDM. La primera descripción de esta enzima se realizó en 2009, en un paciente sueco que había sido hospitalizado en un hospital de Nueva Delhi (84). Desde entonces está desarrollando una espectacular diseminación mundial, estando actualmente presente en todos los continentes, especialmente en India y Pakistán, que son consideradas como el reservorio primario de bacterias productoras de NDM. Su diseminación está muy ligada a los viajes internacionales y a la atención médica en estos

pacientes en el sur y sudeste asiáticos (85). No obstante, la diseminación intra y entre países de casos no relacionados con Asia ha sido sobradamente demostrada (86).

3. Tipo IMP. Este tipo de MBL fue la primera que se describió asociada a plásmidos. Fue en Japón en 1988 en una cepa de *P. aeruginosa* (87). Es una MBL que predominó inicialmente en bacilos gramnegativos no fermentadores y *Serratia marcescens* (88) y progresivamente se ha ido describiendo, cada vez con más frecuencia, en enterobacterias y principalmente en *Klebsiella* spp. (77, 89). Los genes codificadores de las más de 40 variantes identificadas (<http://www.mbled.uni-stuttgart.de/>) se encuentran generalmente en *cassettes* genéticos dentro de integrones de clase 1 junto con otros determinantes de resistencia (82), confiriendo de esta forma la habitual multirresistencia de estas cepas. Estos integrones forman parte de transposones o plásmidos conjugativos que explican su transmisión horizontal.

La evolución de las MBL tipo IMP en *Klebsiella* spp. hasta el inicio del brote que se aborda en este proyecto (2009) se representa en la Figura 2. En 1998, Nordmann publicó una revisión sobre resistencia en enterobacterias en la que se describía IMP-1 en *Klebsiella* spp. limitada a Japón (90), refiriéndose a los primeros casos descritos en 1996 tanto en *K. pneumoniae* como en *K. oxytoca* (91). No obstante, en 1996 también fue aislada en una cepa de *K. pneumoniae* en Singapur (92). En 1998 se realizó la primera descripción de la variante IMP-8 en una cepa de *K. pneumoniae* en Taiwan (93) y un año más tarde se describió el

primer brote nosocomial por *K. pneumoniae* productora de IMP-8 en el mismo centro sanitario (94). Hasta 2003 no se describió el primer caso de *K. pneumoniae* productora de IMP, en este caso IMP-1, fuera de Asia, -en Brasil-, (95) y en 2004 el primer brote nosocomial en Australia, que involucró a varias especies de bacterias gramnegativas que compartían un mismo plásmido portador de *bla*_{IMP-4} (96). Más hacia occidente, en 2003 se aisló el primer caso de IMP-1 en una cepa de *K. pneumoniae* en Turquía (97) y en 2009 la primera cepa de *K. pneumoniae* productora de IMP-4 en Estados Unidos (98). Hasta esa fecha no se había descrito ningún caso en España.

2.4 Aspectos no aclarados

En este trabajo describimos un brote clonal producido por una cepa de *K. oxytoca* multirresistente caracterizada anteriormente como la primera de la familia *Enterobacteriaceae* productora de la carbapenemasa IMP-8 en España (99), que además era hiperproductora de OXY (denominaremos a esta cepa como KOX_{IMP-8}). En el contexto de este brote se realizó este proyecto de investigación con el objetivo de avanzar en el conocimiento de varios aspectos de los detallados anteriormente en esta introducción:

2.4.1 Brotes nosocomiales

Los brotes nosocomiales por *Klebsiella* spp. ocurren habitualmente en unidades de cuidados intensivos (UCI) (5), están asociados a una significativa mortalidad (100) y son generalmente de naturaleza clonal (101-104). No obstante, también se han descrito brotes causados por distintos clones de la misma especie o incluso por distintas especies que comparten el mismo plásmido epidémico (105, 106).

Existen una serie de medidas establecidas para enfrentarse a estos brotes (107). Desgraciadamente, éstas no bastan en muchas ocasiones para controlar adecuadamente el problema, de manera que los brotes se prolongan a lo largo del tiempo e incluso se diseminan desde unos dispositivos asistenciales a otros (104, 108). Uno de los problemas de la falta de efectividad de las medidas

es la necesidad de mayor información sobre aspectos de la epidemiología clínica de estos brotes. Concretamente, los factores de riesgo de colonización en el contexto de brotes en los que los individuos colonizados constituyen el principal reservorio de la bacteria (que es lo más frecuente), no están adecuadamente establecidos. Los más conocidos parecen ser las enfermedades de base, la gravedad de la enfermedad que el paciente esté sufriendo en ese momento o los procedimientos diagnósticos o terapéuticos agresivos (100, 109-114). No obstante, la frecuente falta de información específica dificulta la interpretación de los datos del brote, incluyendo la adecuada caracterización epidemiológica (situación de epidemia o endemia, reservorios, mecanismos de transmisión, etc.). Otros aspectos importantes no dilucidados son la importancia del tiempo en riesgo o la influencia de la presión de colonización (113). Y por supuesto, la importancia de la exposición previa a antimicrobianos también es un asunto pendiente de establecer adecuadamente (100, 111, 113, 115-118).

Por otro lado, la literatura médica no ha prestado excesiva atención a la potencial importancia de los reservorios ambientales dentro de la complejidad epidemiológica de estos brotes, probablemente debido a que se les ha considerado tradicionalmente mucho menos importantes en comparación con el reservorio humano constituido por los pacientes infectados y/o colonizados (103-105).

2.4.2 Tratamiento

Otra de las grandes necesidades es mejorar el conocimiento sobre el tratamiento óptimo de las infecciones producidas por bacterias resistentes a carbapenémicos (119).

Los datos recientes sugieren que la terapia combinada puede ser superior a la monoterapia (120). La razón principal es la evidencia experimental y clínica de que la monoterapia puede estar asociada a peores resultados clínicos (120, 121) o a no prevenir el desarrollo de resistencia durante el tratamiento (122). Sin embargo, el efecto de las distintas combinaciones sobre bacterias y carbapenemasas específicas no está dilucidado (123). Es por ello que cualquier dato en relación a terapia combinada, especialmente sobre cepas específicas, tiene un valor importante.

El papel específico de cada antimicrobiano tampoco es bien conocido. Los propios carbapenémicos son objeto de gran controversia debido a que un importante número de cepas de *Klebsiella* spp. productoras de carbapenemasas, especialmente MBL, presentan valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de carbapenémicos relativamente bajos, incluso a veces dentro del rango de lo sensible de acuerdo a los puntos de corte de sensibilidad actuales (124), lo que podría permitir su uso en el tratamiento. No obstante, los datos clínicos son contradictorios y limitados casi exclusivamente a cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC o VIM (89).

Otro grupo de antimicrobianos de eficacia controvertida son los aminoglucosidos, cuya importancia radica en que pueden permanecer activos frente a muchas cepas multirresistentes productoras de carbapenemasas (89). La principal fuente de controversia radica en su uso en infecciones distintas a las del tracto urinario, donde tradicionalmente se han considerado antimicrobianos inferiores a los β -lactámicos y quinolonas (125).

Por último, la fosfomicina es un antibiótico activo frente a muchas cepas multirresistentes cuyo principal inconveniente es el riesgo de que se desarrollen resistencias durante el tratamiento en monoterapia (126). La experiencia clínica con este antibiótico es muy limitada. Pese a ello, su potencial papel en terapia combinada con otros antimicrobianos es una opción muy prometedora que hay que dilucidar.

3. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*

S. Vergara-López¹, M. C. Domínguez², M. C. Conejo³, Á. Pascual^{3,4} and J. Rodríguez-Baño^{4,5}

1) Internal Medicine Service, Hospital La Merced, 2) Laboratory of Microbiology, Hospital La Merced, Osuna, Seville, 3) Department of Microbiology, University of Seville, 4) Infectious Diseases and Clinical Microbiology Unit, University Hospital Virgen Macarena and 5) Department of Medicine, University of Seville, Seville, Spain

Abstract

We describe the epidemiology of a protracted nosocomial clonal outbreak due to multidrug-resistant IMP-8 producing *Klebsiella oxytoca* (MDRKO) that was finally eradicated by removing an environmental reservoir. The outbreak occurred in the ICU of a Spanish hospital from March 2009 to November 2011 and evolved over four waves. Forty-two patients were affected. First basic (active surveillance, contact precautions and reinforcement of surface cleaning) and later additional control measures (nurse cohorting and establishment of a minimum patient/nurse ratio) were implemented. Screening of ICU staff was repeatedly negative. Initial environmental cultures, including dry surfaces, were also negative. The above measures temporarily controlled cross-transmission but failed to eradicate the epidemic MDRKO strain that reappeared two weeks after the last colonized patients in waves 2 and 3 had been discharged. Therefore, an occult environmental reservoir was suspected. Samples from the drainpipes and traps of a sink were positive; removal of the sink reduced the rate number but did not stop new cases that clustered in a cubicle whose horizontal drainage system was connected with the eliminated sink. The elimination of the horizontal drainage system finally eradicated the outbreak. In conclusion, damp environmental reservoirs (mainly sink drains, traps and the horizontal drainage system) could explain why standard cross-transmission control measures failed to control the outbreak; such reservoirs should be considered even when environmental cultures of surfaces are negative.

Keywords: Carbapenemase, environmental reservoir, IMP-8, *Klebsiella oxytoca*, outbreak

Original Submission: 22 December 2012; **Revised Submission:** 17 April 2013; **Accepted:** 27 May 2013

Editor: J.-M. Rolain

Article published online: 31 May 2013

Clin Microbiol Infect 2013; **19**: E490–E498

10.1111/1469-0691.12288

Corresponding author: J. Rodríguez-Baño, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Unit, Hospital Universitario Virgen Macarena, Avda Dr. Fedriani 3, Sevilla 41009, Spain
E-mail: jesusrb@us.es

Introduction

Outbreaks caused by multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella* spp. are a growing worldwide problem. Such outbreaks occur more frequently (but not exclusively) in intensive care units (ICUs) [1], have been associated with significant mortality [2] and are usually clonal [3–6], although different clones or species sharing epidemic plasmids have also been described [7,8]. Most importantly, the implementation of recommended infection

control measures [9] is often not enough to fully control the outbreaks, so that many evolve over long periods of time or even spread to other healthcare centre [6,10]. Specifically, the medical literature has not drawn enough attention to the potential importance of environmental reservoirs during complex outbreaks, because they have been considered less important than the reservoir formed by colonized patients [5,7].

We report a prolonged clonal outbreak of nosocomial infection due to a multidrug-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* (MDRKO), which was previously characterized as the first IMP-8-producing *Enterobacteriaceae* in Spain [11], with the aim of describing its epidemiological features and the control measures implemented; we emphasize our finding that identifying and isolating an environmental reservoir was key for the eradication of this outbreak.

Materials and Methods

We followed the recommendations of the ORION statement for reporting outbreaks [12].

Setting

The study was conducted in La Merced Hospital, a 240-bed community public centre in Osuna, Seville (Spain). The hospital has an eight-bed medical and surgical ICU (with three additional beds in an adjoining room to be occupied if necessary), which receives ~350 admissions annually. The structure of the ICU is shown in Fig. 1. The water supply and wastewater removal system comprised 11 sinks (labelled S1 to S11 in Fig. 1); each sink drained into a wastepipe (W), labelled according to the number of the sink, except for: S6 and S7, which shared the same drainpipe and, together with S5, drained into W5; S8 and S9, which drained into W7; and S10 and S11, which drained into W8.

Patients

The investigation included all 42 patients colonized or infected by the epidemic strain of MDRKO over the outbreak, which evolved over four waves (Fig. 2). The index case was detected in March 2009 and the last case in November 2011. Patients with MDRKO were considered to be infected if presenting with signs of active infection considered to have been caused by MDRKO, according to CDC criteria [13], and colonized otherwise.

Patients, environmental and healthcare staff studies, and actions taken

Before the onset of the outbreak, all patients with >1 month stay in the ICU underwent active screening by rectal and pharyngeal swabbing for colonization with multidrug-resistant Gram negative bacteria. As described below, an active screening protocol including weekly and discharge rectal and pharyngeal swabbing (or tracheal aspirate if under mechanical ventilation) was started when the outbreak was detected.

During the outbreak, six main environmental investigations were carried out (Fig. 2 and Table 1). The earlier ones focused on dry surfaces, while later investigations tended to concentrate on surfaces surrounding the patients and damp environments. The methodology used is described in detail below.

The control measures undertaken during the outbreak are described in the Results section (the environmental measures are summarised in Table 1). An additional routine intervention carried out once a year, the Prevention and Control of *Legionella* Infection Protocol (PCLIP), which was non-specifically implemented because of this outbreak, is described here because of its potential impact on the evolution of the outbreak. The PCLIP is applied once a year to treat water supply networks of all Spanish hospitals. In our centre, this is performed by hyperchlorination of the main water tank for 3 h with free residual chlorine (20–30 mg/L) and hyperchlorination of the terminal points (1–2 mg/L) for 2 h.

As regards healthcare workers, ICU staff were screened twice during the outbreak (Fig. 2): in wave 1, a pharyngeal swab was collected, and in wave 3, pharyngeal and rectal swabs were collected.

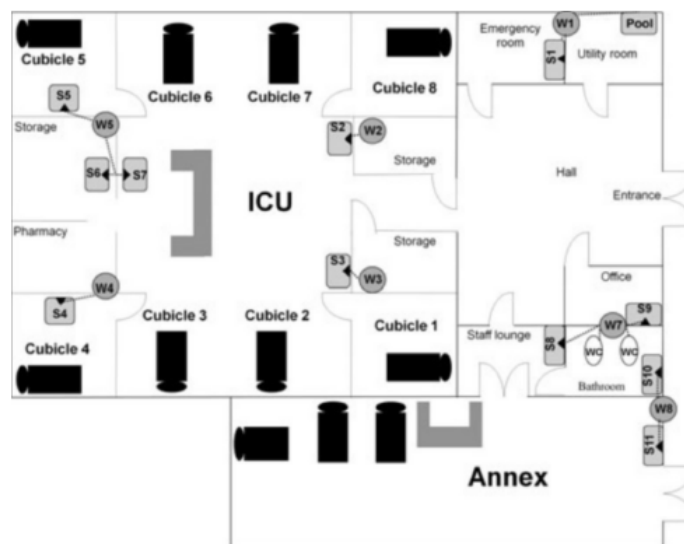


FIG. 1. Plan of the ICU. Grey square: sink. Grey circle: wastepipe. Discontinuous line: drainpipe. S: sink. W: wastepipe.

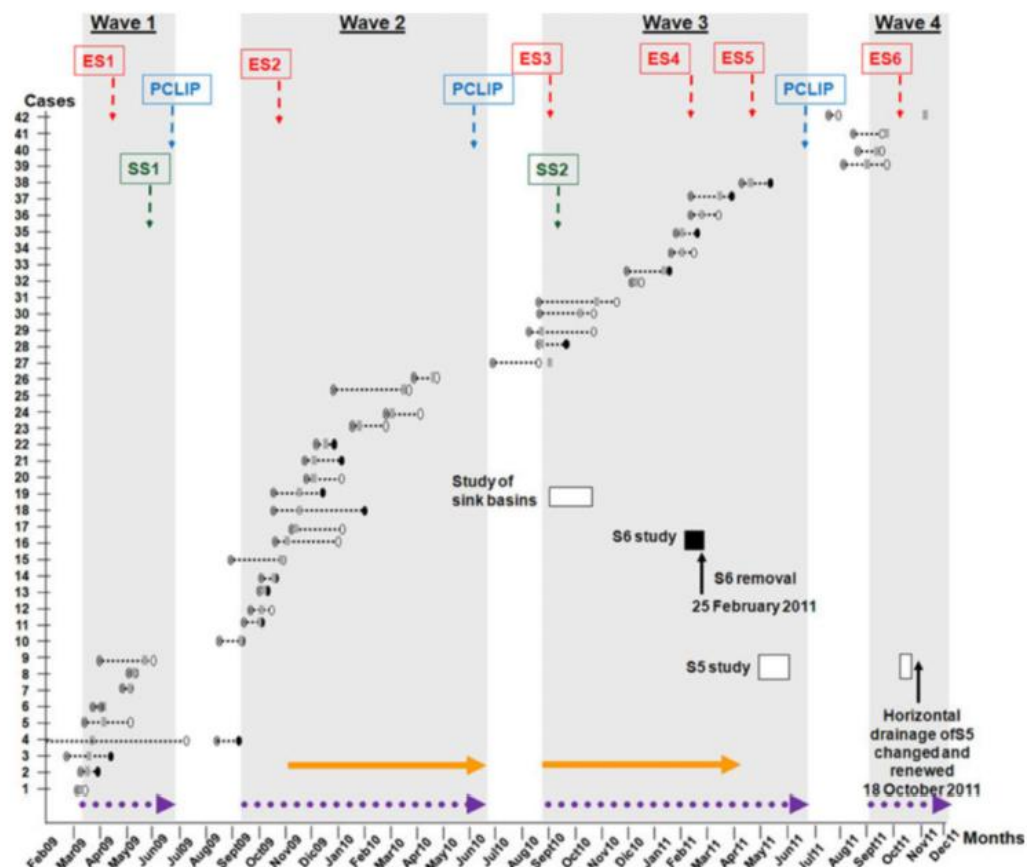


FIG. 2. Synoptic curve of patients colonized and/or infected due to multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* and control measures. ES (in red): environmental study. SS (in green): staff study. PCLIP (in blue): Prevention and Control of Legionella Infection Protocol. Discontinuous purple arrow: basic cross-transmission control measures. Continuous orange arrow: additional cross-transmission control measures. Circle with cross: admission date of patient. Open circle: discharge date of case. Black circle: date of death of case patient. Grey square: date of first isolation of MDRKO. Discontinuous line: ICU stay. Black square: positive environmental culture. White square: negative environmental culture.

Antimicrobial therapy consumption

With the purpose of investigating the consumption of the main group of antibiotics in the ICU, they were grouped as follows: third-generation cephalosporins (ceftriaxone, cefotaxime and ceftazidime); fourth-generation cephalosporins (cefepime); fosfomicin; piperacillin/tazobactam; carbapenems (imipenem); glycopeptides (vancomycin); aminoglycosides (amikacin, tobramycin and gentamicin); tigecycline; and fluoroquinolones (ciprofloxacin and levofloxacin). Consumption was measured using defined daily doses (DDD) [14] per 100 patient-days.

Microbiological studies

All MDRKO isolates (i. e. isolates showing resistance to carbapenems) obtained from clinical, surveillance and/or

environmental samples were studied. Screening samples were seeded onto MacConkey agar plates (Difco, Detroit, MI, USA) and chromID ESBL (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France). From September 2010, environmental samples were also cultured in thioglycolate broth (Difco). Identification and susceptibility testing was carried out first with an automated system (MicroScan[®]; Siemens Healthcare Diagnostics, West Sacramento, CA, USA). The characterization of the first nine outbreak isolates, obtained between March and August 2009, was previously reported [11]. In summary, the isolates showed intermediate susceptibility or resistance to all β -lactams tested (the MICs of imipenem, ertapenem and meropenem were 2 mg/L, 1–2 mg/L and 0.5–1 mg/L, respectively), and resistance to ciprofloxacin, trimethoprim-sulphamethoxazole and

TABLE 1. Summary of environmental studies and actions

Environmental study	Wave month/year	Areas investigated	Result	Actions
1	1 April/2009	Medical equipment, medical ventilators, oxygen and air vents in walls, faucets and fiberoptic bronchoscope.	Negative	None
2	2 November/2009	Enteral nutrition preparations, telephones, tables, computer keyboards, sink surfaces, monitors, portable medical ventilators, electrocardiographs and portable X-ray equipment.	Negative	None
3	3 September/2010	Environment surrounding a patient, including instrument cases, tables, chairs, monitors and all sink basins.	MBLKO isolated from a urinary catheter and a stethoscope around a case.	On 10 September 2010, all stethoscopes were investigated. None showed a positive culture.
4	3 February/2011	All sink drainpipes and traps	MBLKO isolated from S6 drainpipes and trap	On 25 February 2011, S6 and its drainage system were permanently removed. Drainage system of S7 was replaced.
5	3 April/2011	Several surfaces of cubicle 5, the storage area where S6 had been installed, all sink traps and main wastepipes	Negative	None
6	4 October/2011	S5 (water from faucets, basin, overflow and drainage grille, drainpipes and traps)	Negative	S5 and S7 drainpipes connected to W4. Installation of shut-off valves in the drainpipe of every sink to carry out biweekly chemical cleaning with Biguanid TM .

S5-6-7: sink numbers 5-6-7 in Figure 1. W4: wastepipe 4 in Figure 1.
^aAlthough the environmental study was negative, a secondary environmental focus was suspected and it was decided to implement these measures (see text).

tobramycin; only fosfomicin, colistin and amikacin were active. The isolates were closely related by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and were IMP-8 metallo- β -lactamase producers and chromosomal OXY β -lactamase hyperproducers [11]. *K. oxytoca* isolated after August 2009 was considered as belonging to the outbreak clone if it shared the same susceptibility profile; PFGE was also performed on selected isolates, including all environmental ones, for confirmation. Additionally, the susceptibility profiles of all *K. oxytoca* clinical isolates between February 2008 and February 2009 were retrospectively investigated.

Statistical analysis

Categorical variables are expressed as percentages and continuous variables as medians (interquartile range, IQR). We performed a chi-square test for trend for the incidence density of colonization/infection by the epidemic strain and for the percentage of cases detected by means of a rectal swab. The Kruskal-Wallis test was used to analyse the time between admission and acquisition of MDRKO, over the first three waves of the outbreak. Wave 4 was not included in the comparisons because of the low number of cases that occurred in this last wave. We also studied the trend in antimicrobial consumption before, during and after the outbreak. Epi info version 3.5.1 was used.

Results

Overall, 42 (6.4%) of the 660 patients admitted to the ICU during the outbreak period were colonized/infected by

MDRKO (Fig. 2); of these, 14 (33.3%) developed an infection (Table 2). The crude mortality of colonized/infected patients was 44%. The outbreak evolved in four waves (Fig. 2 and Table 2): from March to May 2009 (nine cases), from September 2009 to April 2010 (17 cases), from September 2010 to April 2011 (12 cases), and from September to November 2011 (four cases). The incidence density of colonization/infection due to MDRKO decreased during successive waves from 1.91 (wave 1) to 1.24 (wave 2) and 0.82 (wave 3) cases per 100 patient-days. The percentage of cases that were detected by means of a rectal swab increased from 55.5% in wave 1 to 88.2% in wave 2 and 83.3% in wave 3 ($p < 0.02$). The average time between admission and acquisition of MDRKO was 8 days (IQR, 6–37), 16 days (12–27) and 14 days (9–40) in waves 1, 2, and 3, respectively ($p < 0.22$).

K. oxytoca isolates before the onset of the outbreak

The bimonthly average number of *K. oxytoca* isolated in the whole hospital during 2008 was 2.08 cases, but during January–February 2009, just before the outbreak started, eight *K. oxytoca* strains were isolated from different patients. Of these, three were isolated from ICU patients; one of them, isolated from a patient who was admitted to the ICU from 10 December 2008 to 5 February 2009, was an ESBL-producer but was fully susceptible to carbapenems. These isolates were not available for further microbiological studies.

Antimicrobial consumption

As shown in Fig. 3, the use of fluoroquinolones, fosfomicin and aminoglycosides significantly increased after the onset of

TABLE 2. Main characteristics of the patients colonized and/or infected due to multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca*

Case number/wave	Cubicle	Sex/Age	Type of admission	Date sample (month/day/year)	Type of sample	Pattern of acquisition	Discharge status
1/1*	8	M/53	Medical	03/13/09	TA	Colonization	Alive
2/1*	7	M/66	Medical	03/16/09	TA	Infection (VAN)	Dead
3/1*	5	M/75	Medical	03/18/09	TA/RS	Colonization	Dead
4/1*	1	M/75	Surgical	03/24/09	RS	Colonization	Dead
5/1*	5	M/37	Medical	04/04/09	TA	Infection (VAN)	Dead
6/1*	3	M/42	Medical	04/05/09	TA	Colonization	Alive
7/1*	3	M/45	Medical	05/04/09	TA/RS	Colonization	Alive
8/1*	6	M/80	Medical	05/10/09	PS	Colonization	Alive
9/1*	6	M/62	Medical	05/20/09	RS	Colonization	Alive
10/2	7	M/79	Surgical	09/07/09	B	Infection (bacteraemia)	Dead
11/2	8	M/47	Medical	09/29/09	TA	Colonization	Dead
12/2	7	M/63	Medical	10/02/09	TA/RS	Infection (VAN)	Alive
13/2	4	M/83	Medical	10/08/09	RS	Colonization	Dead
14/2	5	F/78	Medical	10/15/09	TA/RS	Colonization	Dead
15/2	6	F/71	Medical	10/27/09	RS	Colonization	Alive
16/2	1	F/41	Medical	11/03/09	RS	Colonization	Alive
17/2	5	M/67	Medical	11/10/09	TA/RS	Infection (VAN)	Alive
18/2	4	M/77	Medical	11/17/09	TA/RS/U	Urine tract infection	Dead
19/2	8	F/79	Surgical	11/17/09	RS	Colonization	Dead
20/2	8	F/52	Medical	12/02/09	TA/RS/B	Infection (bacteraemia)	Alive
21/2	8	F/80	Medical	12/03/09	TA/RS/B	Infection (bacteraemia)	Dead
22/2	1	F/50	Medical	12/16/09	TA/RS/B	Infection (bacteraemia)	Dead
23/2	2	F/61	Medical	01/26/10	RS	Colonization	Alive
24/2	3	M/74	Surgical	03/03/10	RS	Colonization	Alive
25/2	5	F/82	Medical	03/16/10	RS	Colonization	Dead
26/2	6	F/66	Medical	04/20/10	RS	Colonization	Alive
27/3	4	F/80	Medical	09/01/10	AS	Colonization	Alive
28/3	4	F/76	Medical	08/23/10	TA	Infection (VAN)	Dead
29/3	6	M/58	Surgical	08/27/10	RS	Colonization	Alive
30/3	1	M/75	Medical	10/06/10	RS	Colonization	Alive
31/3	2	M/79	Medical	10/26/10	RS	Colonization	Alive
32/3	1	F/59	Medical	12/09/10	RS	Colonization	Dead
33/3	5	M/68	Medical	01/12/11	TA/RS	Infection (VAN)	Dead
34/3	1	M/47	Medical	02/01/11	RS	Colonization	Alive
35/3	2	F/62	Medical	02/01/11	TA/RS	Infection (VAN)	Dead
36/3	7	M/70	Medical	02/22/11	RS	Colonization	Alive
37/3	5	M/57	Medical	03/15/11	RS	Colonization	Dead
38/3	5	M/76	Medical	04/19/11	RS	Colonization	Alive
39/4	5	F/76	Medical	09/03/11	Ascites	Infection (peritonitis)	Alive
40/4	3	F/69	Medical	09/20/11	TA	Colonization	Alive
41/4	7	F/63	Medical	09/23/11	TA/RS	Colonization	Alive
42/4	NA	M/68	Surgical	11/04/11	B	Infection (bacteraemia)	Alive

M, man; F, female; TA, tracheal aspirate; RS, rectal swab; PS, pharyngeal swab; B, blood culture; U, urine culture; AS, axilla swab; VAN, ventilator-associated pneumonia; NA, not applicable.
 *Previously published data [11].

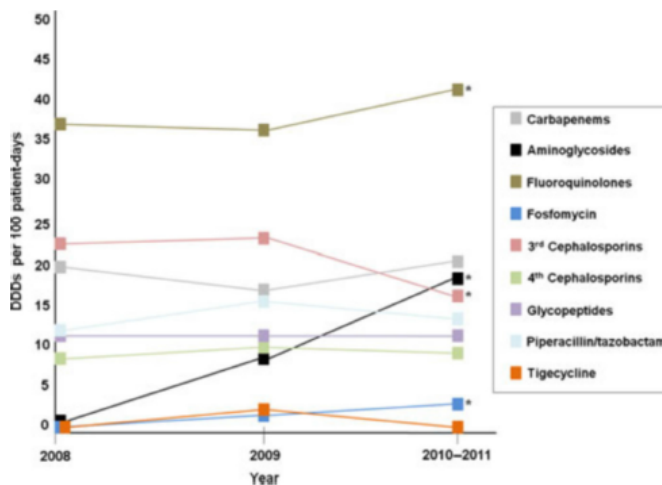


FIG. 3. Consumption of antimicrobial before, during and after the outbreak in the intensive care unit, Hospital La Merced, Osuna, Seville, Spain. DDD: defined daily dose. * $p < 0.05$. Aminoglycosides: amikacin, tobramycin and gentamycin. Carbapenems: imipenem. Fluoroquinolones: ciprofloxacin and levofloxacin. Third-generation cephalosporins: ceftriaxone, cefotaxime and ceftazidime. Fourth-generation cephalosporins: ceftepime. Glycopeptides: vancomycin.

the outbreak (the latter two were used to treat some patients infected with MDRKO). In contrast, the use of third-generation cephalosporins decreased. During the outbreak there was a non-significant reduction in the consumption of carbapenems and a non-significant increase in the consumption of piperacillin-tazobactam and tigecycline.

Description of the outbreak and control measures

Wave 1. On 19 March 2009, two MDRKO strains were isolated from the clinical samples of two patients admitted to adjacent ICU cubicles (7 and 8). Immediately, an infection control task force was formed. The basic control measures undertaken, which were repeated during later waves (Fig. 2), included: (i) active screening of all patients admitted to the ICU; (ii) contact precautions in individual cubicles for colonized/infected patients; (iii) reinforcement of standard cross-transmission control measures; (iv) periodic educational sessions; and (v) implementation of twice daily thorough cleaning. All surfaces except medical devices were cleaned with bleach (1:10 dilution of 5.25% sodium hypochlorite). Medical devices were cleaned with Biguanid[®] (first generation quaternary ammonium) at 1.6%. These disinfectants were tested *in vitro* at the used concentrations and showed inhibition of MDRKO growth (data not shown). The first nine isolates were submitted to a reference laboratory (Hospital Universitario Virgen Macarena, Seville) and the clonal nature of the outbreak was shown [11]. All screening samples taken from staff (SS1) and the environment (ES1) were negative (Fig. 2). The PCLIP was carried out in the hospital on 5 June. In July 2009, the last MDRKO-colonized patient still remaining in the ICU in this wave was transferred to another hospital; as no new cases had been detected by then, the outbreak was thought to have been eradicated.

Wave 2. In late August 2009, the last affected patient of wave 1 was readmitted to the ICU. Although contact precautions were implemented from admission, MDRKO was isolated from the blood culture of another patient in early September, and cross-transmission from the previous patients was suspected. All basic measures were immediately reactivated; however, new cases emerged. In November 2009, expert external advisors from the Hospital Universitario Virgen Macarena recommended 'additional measures' that were implemented, including: nurse cohorting; establishment of minimum nurse/patient and auxiliary/patient ratios of 1:2 and 1:2.5, respectively; review of the clean/dirty circuit; and reviewing the use of broad spectrum antibiotics. A second environmental study (ES2) was performed, with negative results. In April 2010, the last case in this wave was detected. The ICU and the adjoining room were left empty, walls were

painted, medications removed and fomites (medication vials, gloves and containers) eliminated. On 4 June 2010, the annual PCLIP was carried out in the hospital. The outbreak was again considered to be over.

Wave 3. In late August 2010, after 4 months with no cases, MDRKO was again isolated from the clinical sample of a patient who had been admitted for only 4 days. It was noticed that a patient, who was then in the Internal Medicine ward, had previously spent a lengthy period in the ICU; this patient was screened and detected as colonized, and thus was considered the probable index case for the third wave. All basic and additional measures were again implemented. ICU staff were screened again (SS2) and all cultures were negative. During the third environmental study (ES3), a urinary catheter removed from a colonized patient and a stethoscope used with that patient yielded MDRKO. Because in February 2011 the outbreak was still out of control, a fourth environmental study (ES4), which included sinks drainpipes and traps, was carried out. Only samples from S6 were positive, showing countless colonies of MDRKO that were cultured from every pipe, trap and drainage grille sample taken; samples from the faucet or overflow grille were negative. Samples from the pipe connecting S6 and S7 were also positive. On 25 February 2011, S6 and its drain system were permanently removed and the drain system of S7 was replaced. However, another two patients admitted to adjacent cubicle 5 acquired MDRKO in March and April 2011 (18 and 53 days after the environmental intervention). A fifth environmental study (ES5) was carried out, including surfaces in cubicle 5, the adjacent storage area where S6 used to be and all the sink traps and main wastepipes of the unit (Table 1). The 18 samples taken were negative. No new cases emerged in the following months. On 17 June 2011, the annual PCLIP was performed and the outbreak was once again considered eradicated.

Wave 4. On 3 September 2011, MDRKO was again isolated from the clinical sample of a patient admitted to cubicle 5. All patients admitted were screened again; two further colonized cases were detected. A sixth environmental study (ES6) was undertaken, involving 11 samples taken from S5 (faucets, surfaces, overflow hole, drainage grilles, drainpipes and trap); all were negative for MDRKO. In spite of that and because of the high suspicion of a hidden reservoir, in October 2011 the infection-control task force decided to isolate W5, which S5 and S7 still drained into. Thus, the complete horizontal drainage system of S5 and S7 was replaced and connected up to W4. Shut-off valves were also installed to each sink drainage system. Since then, a disinfection of the drainage system is performed twice a week using Biguanid[®] at 1.6% for 30 min

(through closing the valves), followed by opening the valves and running hot water (70°C) for 5 min. On 4 November 2011, MDRKO was isolated from blood cultures in a patient admitted to the surgical ward. This patient and the index case for wave 4 who was discharged from the ICU on 25 September 2011, shared healthcare staff in the surgical ward; therefore it was assumed that he had acquired MDRKO during his stay in the surgical ward. Three and 6 months after the end of the outbreak, unannounced transversal screening studies of both patients and the environment were carried out, and were negative. Screening of patients with a >1 month ICU stay was resumed. No new strains of *K. oxytoca* have been detected in the hospital, as of April 2013.

Concerning the isolates not included in the earlier report [11], their susceptibility profiles were identical to the previous ones. *bla*_{IMP-8} was detected by PCR in all 17 isolates from wave 2, and they all showed an identical PFGE profile to the epidemic strain from the first wave. Selected isolates from waves 3 and 4 and all the environmental samples were studied for the presence of *bla*_{IMP-8} and molecular relatedness by PFGE profile. Every strain studied carried *bla*_{IMP-8} and they showed the same PFGE profile as previous isolates.

Discussion

We described one of the most prolonged nosocomial outbreaks due to carbapenemase-producing *Klebsiella* spp., which was eradicated, that to our knowledge has been described to date [1,3–8,15–18]. Since the outbreak was due to a clonal strain in a small unit that rarely admits patients from other centres, it represented an excellent model for evaluating the complex evolving nature of its epidemiology. Our results show that control measures aimed at preventing cross-transmission were partially effective but were unable to definitively eradicate the outbreak strain; this, together with the epidemiological data, strongly suggests the key role of an environmental reservoir, at least during the later waves of the outbreak.

The outbreak strain was previously characterized as the first IMP-8-producing *Enterobacteriaceae* in Spain [11]. We do not know how the carbapenemase gene entered the hospital. Because the number of non-MDR *K. oxytoca* isolates dramatically increased just before the outbreak, it may be hypothesized that the epidemic clone was spreading before acquiring the IMP-8 gene, which probably increased the chances of spreading in the context of high antibiotic use; unfortunately, *K. oxytoca* strains isolated before the outbreak were not available for typing. This hypothesis follows the theory that spread of 'susceptible' (or not MDR) clones may sometimes be

the first stage of outbreaks caused by MDR bacteria if such clones eventually acquire MDR genes [19]. We also hypothesize that the gene codifying for the IMP-8 was introduced into the ICU by a colonized patient.

Colonized patients are the most important reservoir and patient-to-patient cross-transmission is considered to be the main mechanism of spread in outbreaks of nosocomial infection caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* [9]. However, it is recognized that standard infection control measures are frequently not enough to eradicate outbreaks [4,6,20]. In our case, basic control measures failed and additional measures including nurse cohorting (which was effective in other similar outbreaks [4,6]) had to be implemented. Nevertheless, the epidemic strain was not eradicated and the last waves occurred long after the last colonized patients from previous waves had been discharged. This previously observed phenomenon [3,20] may raise the suspicion of an unrecognized human or environmental reservoir that enabled the outbreak strain to survive in spite of the preventive measures to stop cross-transmission. Nevertheless, staff and patient surveillance studies did not identify any human long-term carrier.

Identifying potential environmental reservoirs has often been neglected, so that few authors to date have reported environmental studies when describing earlier outbreaks [1,3,4,6]. There are no standardized recommendations about when, where and how environmental sampling should be performed. Many of the environmental studies reported have in fact usually been carried out on dry surfaces [6]. MDR-resistant *Klebsiella pneumoniae* has been recovered from beds and various medical devices [1,6] and even from contaminated roll boards [16]. *K. oxytoca* has also been recovered from ventilator surface cultures [21]. We also found the MDRKO outbreak strain on medical instruments in the vicinity of an affected patient. However, all isolates taken from dry surfaces could merely reflect breaks in standard control measures. A stable reservoir could also be established in a moist environment where suitable conditions might favour the formation of microbial biofilms [20–24]. We found an environmental reservoir of this kind in the trap and pipes of S6 during wave 3 (Figs 1 and 2). Because of the results of environmental cultures and the association of the cases during that wave with cubicle 5, we think that a change in the epidemiology of the outbreak occurred, evolving from a predominantly patient-related reservoir during the first wave (although we cannot discard water drain system involvement) to an environmental one.

Importantly, contaminated sinks and drainage systems are becoming more frequently identified as relevant reservoirs of MDR Gram-negative bacteria, including *Acinetobacter baumannii*

[23], *Pseudomonas aeruginosa* [24] and recently also ESBL-producing *K. oxytoca* [20]. Contaminated water (i.e. used for staff hand washing, hygiene of patients or washing devices) is drained through the sinks; biofilm-forming bacteria may form stable reservoirs in the waste pipes and even in the semi-horizontal drain pipes if they are not inclined enough or are partially blocked. Water splashing from the faucets creates an aerosol effect from the sink's drain, which may later contaminate the basin and surrounding surfaces [23,24]. In our outbreak, removing the S6 and S7 drainage system failed to completely eradicate the outbreak strain; even though we had eliminated the S6 reservoir, S5 remained connected to the S6 pipe and to W5 (Fig. 1), and new cases occurred in cubicle 5. It was only when the horizontal drainage system to S5 was removed and S5 and S7 were connected to W4 that the outbreak was finally brought under control. We think that S5 was also a reservoir that could not be detected.

Finally, an unintended action may have played an important role in the epidemiology of the outbreak. In the first three waves, the emergence of new cases was stopped, coinciding with the application of the PCLIP, only to reemerge a few months later (Fig. 2). This would suggest that the PCLIP may have had a significant but not decisive impact on the contaminated drainage systems, perhaps because it was unable to completely eradicate the bacterial biofilms. Chemical disinfection of the drainage system has been previously reported to have had little impact on the bacterial burden in attempts to solve similar problems [20,24].

In conclusion, the epidemiology of outbreaks due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* may be complex and evolving; even when the main reservoirs are formed by colonized patients, and cross-transmission is the principal means of their spread, alternative reservoirs should be suspected if strictly applied traditional control measures are not efficacious. In these circumstances, a wet environmental reservoir (mainly the drain, trap and horizontal drainage system of a sink) should be considered. Finally, initiatives standardizing environmental investigations in healthcare settings should be encouraged.

Acknowledgements

We thank the staff from the Preventive Medicine, Laboratory, Pharmacy, Maintenance and Cleaning services as well as the Direction Team and the entire UCI staff of La Merced Hospital, for their efforts and contribution in tackling the outbreak.

The results of this paper have been presented as a poster communication to the regional XIV congress of SAEI (Anda-

lusian Society of Infectious Diseases), 13th–15th December 2012, Seville (Spain).

Transparency Declaration

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III – co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015). The funders had no role in the design, analysis or writing of the manuscript, or the decision to publish.

Á. Pascual has been a consultant for Merck and Pfizer, has served as speaker for Astra-Zeneca, Merck and Pfizer and has received research support from Merck and Pfizer. J. Rodríguez-Baño has been a consultant for Merck, Pfizer and Roche, has served as a speaker for Merck, Pfizer, Astra-Zeneca and Astellas, and has received research support from Merck and Novartis. All other authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Souli M, Gabani I, Antoniadou A et al. An outbreak of infection due to beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 364–373.
2. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 1099–1106.
3. Steinmann J, Kaase M, Gatermann S et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill* 2011; 16: 19944.
4. Kassis-Chikhani N, Salba F, Carbonne A et al. Extended measures for controlling an outbreak of VIM-1 producing imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a liver transplant centre in France, 2003–2004. *Euro Surveill* 2010; 15: 19713.
5. Tokatlidou D, Tsvitanidou M, Poumaras S et al. Outbreak caused by a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clone carrying blaVIM-12 in a university hospital. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1005–1008.
6. Borer A, Eskira S, Nativ R et al. A multifaceted intervention strategy for eradication of a hospital-wide outbreak caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Southern Israel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32: 1158–1165.
7. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis* 2007; 45: 1171–1178.
8. Gabani P, Ambretti S, Berlinger A et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March–30 September 2010. *Euro Surveill* 2011; 16: 19800.
9. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing

- Enterobacteriaceae* in acute care facilities. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009; 58: 256–260.
10. Bratu S, Landman D, Haag R et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1430–1435.
 11. Conejo MC, Domínguez MC, López-Cerero L, Serrano L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying blaIMP-8, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1071–1073.
 12. Stone SP, Cooper BS, Kibbler CC et al. The ORION statement: guidelines for transparent reporting of outbreak reports and intervention studies of nosocomial infection. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 833–840.
 13. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36: 309–332.
 14. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. *Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2013*. Oslo, Norway: WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, 2012.
 15. Kochar S, Sheard T, Shama R et al. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30: 447–452.
 16. van't Veen A, van der Zee A, Nelson J, Speelberg B, Kluytmans JA, Buiting AG. Outbreak of infection with a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain associated with contaminated roll boards in operating rooms. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4961–4967.
 17. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1028–1033.
 18. Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *J Hosp Infect* 2009; 74: 344–349.
 19. Martínez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemics, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 647–679.
 20. Lowe C, Willey B, O'Shaughnessy A et al. Outbreak of Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1242–1247.
 21. Schulz-Stübner S, Kniehl E. Transmission of extended-spectrum β -lactamase *Klebsiella oxytoca* via the breathing circuit of a transport ventilator: root cause analysis and infection control recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011; 32: 828–829.
 22. Khan AS, Dancer SJ, Humphreys H. Priorities in the prevention and control of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in hospitals. *J Hosp Infect* 2012; 82: 85–93.
 23. La Forgia C, Franke J, Hacek DM, Thomson RB Jr, Robicsek A, Peterson LR. Management of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit using novel environmental disinfection: a 38-month report. *Am J Infect Control* 2010; 38: 259–263.
 24. Hota S, Hirji Z, Stockton K et al. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30: 25–33.



Lessons from an outbreak of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* in an intensive care unit: the importance of time at risk and combination therapy

S. Vergara-López^{a,*}, M.C. Domínguez^b, M.C. Conejo^c, Á. Pascual^{c,d}, J. Rodríguez-Baño^{d,e}

^a Internal Medicine Service, Hospital La Merced, Osuna, Seville, Spain

^b Laboratory of Microbiology, Hospital La Merced, Osuna, Seville, Spain

^c Department of Microbiology, University of Seville, Seville, Spain

^d Infectious Diseases and Clinical Microbiology Unit, University Hospital Virgen Macarena, Seville, Spain

^e Department of Medicine, University of Seville, Seville, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2013

Accepted 30 December 2013

Available online 15 January 2014

2014

Keywords:

Carbapenem-resistant

Enterobacteriaceae

Klebsiella oxytoca

Outbreak

Time at risk



CrossMark

SUMMARY

Background: Outbreaks of nosocomial infection due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE), mostly *Klebsiella* spp., have become a worldwide phenomenon.

Aim: To investigate the risk factors for the acquisition of clonal multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* (MDRKO) producing the metallo- β -lactamase IMP-8 and hyper-producing chromosomal OXY-2 β -lactamase during a well-characterized outbreak, and to describe the clinical features of infections due to MDRKO.

Methods: A four-wave outbreak due to MDRKO occurred in the intensive care unit of a Spanish hospital between 2009 and 2011. The risk factors for acquisition of MDRKO during waves 1 and 2 (in which colonized patients served as the main reservoir for the epidemic strain) were analysed using a case-control study by Cox regression and logistic regression analysis. Clinical data and treatments of patients infected with MDRKO were also analysed.

Findings: For the study of risk factors, 26 cases and 45 controls were studied. None of the variables studied in the Cox regression analysis showed an association with MDRKO acquisition; time at risk was the only associated variable by logistic regression analysis. Colonization pressure was not associated with earlier acquisition. Overall, 14 patients were infected with MDRKO; ventilator-associated pneumonia (seven patients) was the most frequent type of infection. Monotherapy tended to be associated with higher mortality than combination therapy [60% (3/5) vs 16.6% (1/6); $P = 0.07$].

Conclusions: Time at risk was the most significant risk determinant for the acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in this epidemiological context and should be included in any study of risk factors for the acquisition of multidrug-resistant

* Corresponding author. Address: Internal Medicine Service, Hospital La Merced, Avenida de Andalucía 2, Osuna, Sevilla 41640, Spain. Tel.: +34 95 592 34 44; fax: +34 95 592 65 52.

E-mail address: vergara_lopez@hotmail.com (S. Vergara-López).

bacteria. Combination therapy may be superior to monotherapy for the treatment of CRE infections.

© 2014 The Healthcare Infection Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Outbreaks of nosocomial infection due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE), mainly due to *Klebsiella* spp., have become a serious emerging problem worldwide.¹ Recently, we described one of these nosocomial outbreaks due to the first strain of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* (MDRKO) in Spain to produce the metallo- β -lactamase IMP-8 and hyperproduce the chromosomal OXY-2 β -lactamase.^{2,3} Metallo- β -lactamases belong to class B β -lactamases of Ambler molecular classification and to group 3 according to functional Bush classification.^{4,5} They are characterized by requiring zinc to inactivate all β -lactams except aztreonam, and by non-susceptibility to therapeutic β -lactamase inhibitors. As usual, *bla*_{IMP-8} was carried on a plasmid together with other genes of resistance to fluoroquinolones and aminoglycosides. Also, the hyperproduction of the chromosomal class A OXY β -lactamase, able to inactivate cephalosporins and monobactams, resulted in the multidrug-resistant profile of the strain.⁶

To help decide what measures should be taken to control such outbreaks, more information about their clinical epidemiology is needed. Specifically, knowledge of the risk factors associated with CRE acquisition during outbreaks, when colonized patients are the main reservoir, has not been fully elucidated. The most frequently described factors include underlying diseases, poor functional status, severity of illness and invasive procedures.^{7–13} However, the lack of background information frequently jeopardizes the proper interpretation of the data, including an appropriate epidemiological characterization (outbreak or endemic setting, reservoirs), the role of time at risk, or the influence of colonization pressure.¹² The importance of previous exposure to antibiotics is also controversial.^{8,10,12,14–17}

Another unresolved subject concerns the optimal treatment for infections caused by CRE.¹⁸ Recent data suggest that combination therapy is superior to monotherapy although data about the utility of carbapenems, aminoglycosides and fosfomicin remain scarce.^{19,20}

We investigated the risk factors for the acquisition of MDRKO. We also described the clinical features, treatment and prognosis of patients who suffered infections due to the outbreak strain.

Methods

Setting

This study was conducted in the intensive care unit (ICU) of La Merced Hospital, a 240-bed community public hospital in Osuna, Seville, Spain. From March 2009 to November 2011, a four-wave nosocomial outbreak occurred, caused by an MDRKO strain; the outbreak was finally eradicated.^{3,21}

Study design and patients

First, a case-control study was conducted during the first two waves of the outbreak (March 2009 to June 2010). Despite intensive investigation, no environmental source was found during these two waves and healthcare workers were not found to be colonized.²¹ Colonized/infected patients were therefore considered to be the main reservoir, with cross-transmission as the principal means of spread. The last two waves were not included in this study because they were linked to an environmental reservoir.²¹

A case was defined as a patient admitted to the ICU and detected as colonized or infected with MDRKO during the study period. For each case, two control patients were randomly chosen from among those admitted to the ICU ± 3 days of the corresponding case admission date; only patients admitted to the ICU for at least 48 h and who had undergone active surveillance were eligible as controls.

Second, a prospective cohort study of all patients considered to be infected by MDRKO at any time during the entire outbreak (that is, the four waves from March 2009 to November 2011) was performed. Patients were followed for 30 days.

Definitions and variables

Patients with MDRKO were considered to be infected on the basis of clinical and microbiological data, following Centers for Disease Control and Prevention (CDC) criteria.²²

The following data were collected from all patients: sex, age, ward of origin, cubicle of admission in ICU, comorbidities and severity of illness according to the McCabe score and the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) classification system, invasive procedures, time at risk, colonization pressure, antimicrobial therapy before and after colonization/infection, and mortality.^{23,24} Time at risk was considered as the number of days from ICU admission to colonization/infection for case patients, and to discharge/death for controls. Daily colonization pressure was defined as percentage of colonized/infected patients per day by MDRKO. It was calculated as follows: (daily number of colonized/infected patients $\times 100$) / (total number of admitted patients); exposure to this variable was measured as the median of daily colonization pressure from admission to acquisition of MDRKO in cases, or to discharge/death in controls. Median colonization pressure was taken as the threshold for classifying patients into those subjected to low or high colonization pressure.

Exposure to any antimicrobial during the previous three months was considered. Empirical (e.g. before the susceptibility of the isolate was reported) and targeted therapies of patients with infections were collected. Antimicrobial regimens were considered appropriate if at least one agent active *in vitro* against MDRKO was administered and inappropriate otherwise.

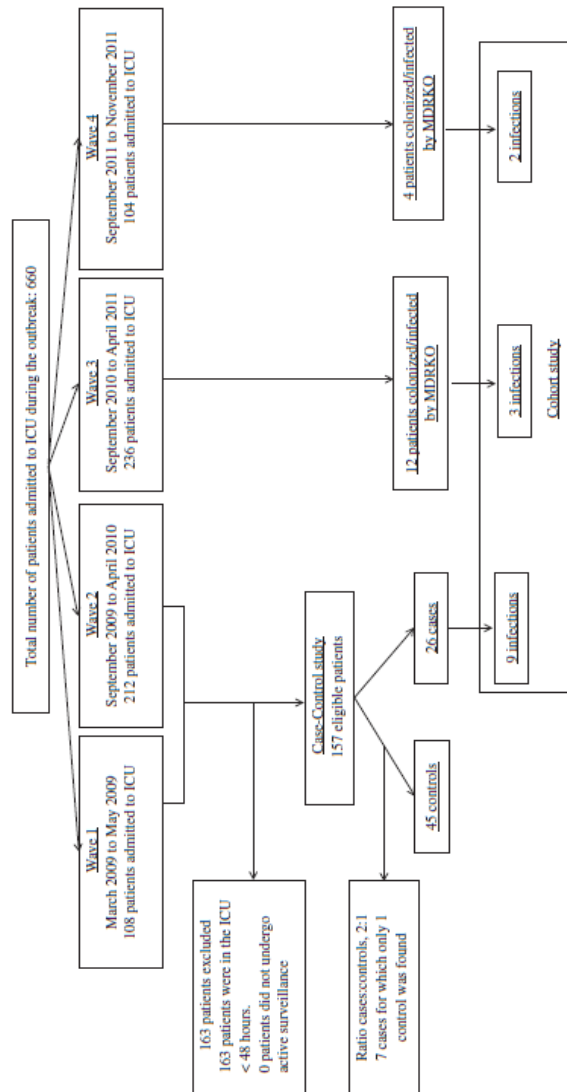


Figure 1. Flow chart of patients studied. ICU, intensive care unit; MDRKO, multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca*.

Microbiological studies

Throughout the outbreak, by an active screening protocol, rectal and pharyngeal swabs an active screening protocol, by rectal and pharyngeal swabs (or tracheal aspirate, if under mechanical ventilation) were performed on all admitted patients.²¹ A detailed description of microbiological procedures and characterization of the epidemic strain have been reported previously.³ In summary, all isolates of MDRKO were clonally related. According to CLSI guidelines, the isolates were susceptible only to fosfomicin [minimum inhibitory concentration (MIC): ≤ 16 mg/L], colistin (MIC: ≤ 2 mg/L), and amikacin (MIC: ≤ 8 mg/L). The MICs of imipenem, ertapenem and meropenem were 2, 1–2 and 0.5–1 mg/L, respectively.³ In accordance with the interim standard definitions for Enterobacteriaceae-acquired resistance, and given that MDRKO was susceptible only to three different families of those antimicrobials to which *K. oxytoca* is usually susceptible, it was considered as a multidrug-resistant strain.²

Statistical analysis

Categorical variables are presented as numbers (percentages). Continuous variables are expressed as the median [interquartile range (IQR)]. The cumulative risk of acquiring MDRKO, according to length of ICU stay, was studied using Kaplan–Meier curves. Colonization/infection rates, according to levels of colonization pressure, were compared by means of the log-rank test. To study the factors associated with the acquisition of MDRKO, univariate comparisons of cases and controls were performed using the χ^2 -test or Fisher's exact test, if required, for categorical variables, and Student's *t*-test or Mann–Whitney *U*-test, as appropriate, for continuous variables. To control for confounding factors and to investigate the importance of time at risk, two types of analysis were performed. First, adjusted hazard ratios (AHR) were calculated with a multivariate Cox regression analysis, using time until acquisition of MDRKO as the dependent variable; second, logistic regression analyses were performed, using colonization/infection due to MDRKO as the dependent variable, and including time at risk as one of the explanatory variables. Exposure to any antimicrobial rather than to specific drugs was included in the multivariate analyses. The most accurate model according to the Hosmer–Lemeshow test was finally selected. The statistical analysis was carried out using the SPSS 14 statistical software package (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

A flow chart of patients included in the study is shown in Figure 1. MDRKO was isolated from 42 patients during the entire outbreak; 26 of these were admitted during waves 1 and 2 and became the case patients in the case–control study; 14 were considered to be infected by MDRKO, and were included in the cohort of infected patients.

Cumulative probability of MDRKO acquisition and colonization pressure

The overall median time till acquisition of MDRKO in waves 1 and 2 was 16 days (IQR: 12–32). The cumulative probability of colonization/infection due to MDRKO increased from 18% ($\pm 6\%$)

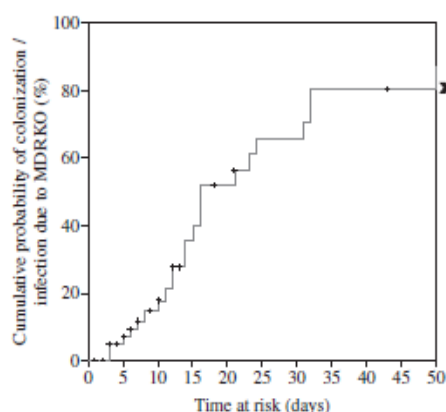


Figure 2. Cumulative rate of colonization/infection due to multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* (MDRKO) for intensive care unit (ICU) patients during the first and second waves of the outbreak. Black arrow: the last two patients affected were colonized after 85 and 230 days in the ICU.

at day 10 in the ICU, to 56% ($\pm 9\%$) at day 20, 71% ($\pm 8\%$) at day 30 and 87% ($\pm 7\%$) at day 50 (Figure 2). Median colonization pressure was 23.9% (IQR: 13.9–33). The times until colonization/infection due to MDRKO were similar for case patients subjected to high or low levels of colonization pressure ($P = 0.57$, log-rank test) (Figure 3).

Case–control study

Twenty-six cases along with 45 controls were studied; there were seven cases for which only one control could be found.

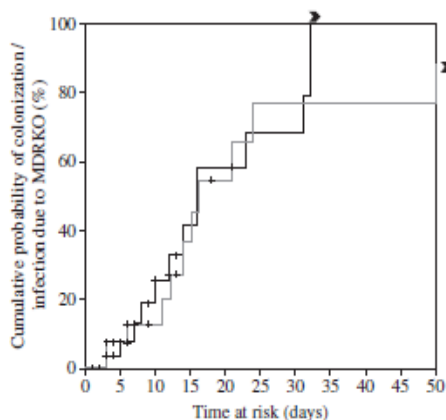


Figure 3. Cumulative rate of colonization/infection due to multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* (MDRKO) for intensive care unit (ICU) patients, according to levels of colonization pressure. Black arrow: the last two patients affected were colonized after 85 and 230 days in the ICU. Black line: high level of colonization pressure. Grey line: low level of colonization pressure.

Table 1
Factors associated with colonization and/or infection by multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* (epidemiological and clinical parameters)

Variable	Cases (N = 27)	Controls (N = 45)	P univariate	Adjusted OR (95% CI)	P multivariate
Male gender	16 (62)	28 (62)	0.95	–	–
Age in years	66.7 (52.3–79.1)	71.6 (59.5–79)	0.71	–	–
Ward of origin ^a			0.77	–	–
Medical	8 (30.4)	12 (29.5)			
Surgical	6 (21.7)	12 (29.5)			
Emergency	12 (47.8)	17 (40.9)			
Comorbidity					
Cancer	2 (7.7)	17 (37.8)	0.006	–	NS
Chronic heart failure	5 (19.2)	13 (28.9)	0.37	–	–
Diabetes mellitus	6 (23.1)	12 (26.7)	0.74	–	–
COPD	6 (23.1)	10 (22.2)	0.93	–	–
Chronic renal disease	2 (7.7)	4 (8.9)	0.9	–	–
Liver insufficiency	4 (15.4)	5 (11.1)	0.72	–	–
McCabe: rapidly fatal underlying disease ^b	2 (0–4)	2 (1–3.5)	0.41	–	–
Invasive procedures					
Central intravenous catheter	26 (100)	42 (93.3)	0.3	–	–
Tracheal intubation	25 (96.6)	27 (60)	0.001	–	NS
Tracheotomy	16 (62)	2 (4.4)	<0.001	–	NS
Nasogastric tube	22 (84.6)	31 (68.7)	0.1	–	NS
Parenteral nutrition	1 (3.8)	8 (17.8)	0.14	–	NS
Enteral nutrition	4 (15.4)	9 (20)	0.76	–	–
Urinary catheter	24 (92.3)	37 (82.2)	0.31	–	–
Colonization pressure	25 (17–43)	24 (12–31)	0.18	–	NS
APACHE index ^c	24.5 (18.5–35)	27 (22–31)	0.86	–	–
Time in ICU (days)	34 (15.5–51.7)	5 (2–8.5)	<0.001	1.13 (1.03–1.25)	0.012
Box 1 stay (days) ^d	38 (22–51)	5 (3.5–6)	0.004	–	NS
Box 2 stay (days) ^d	17 (13–37)	6 (2–8)	0.067	–	NS
Box 3 stay (days) ^e	9 (5–9)	3.5 (2–5.3)	0.095	–	NS
Box 4 stay (days) ^f	28 (10.5–91)	3 (3–11)	0.114	–	NS
Box 5 stay (days) ^g	38 (22–83)	7 (4–29)	0.056	–	NS
Box 6 stay (days) ^h	15 (4.5–31)	8 (6–10)	0.34	–	–
Box 7 stay (days) ^h	11.5 (10–13)	6.5 (4–11.8)	0.27	–	–
Box 8 stay (days) ⁱ	19 (5–33)	5 (3–8)	0.038	–	NS
Use of antimicrobial therapy					
Any type of antibiotic	24 (92.3)	25 (55.6)	0.001	–	NS
Aminopenicillins	7 (26.9)	8 (17.8)	0.36	–	–
Fourth-generation cephalosporins	4 (15.4)	2 (4.4)	0.18	–	–
Third-generation cephalosporins	17 (65.3)	12 (26.7)	0.006	–	NS
Fluoroquinolones	14 (53.8)	14 (31.1)	0.68	–	–
Carbapenems	6 (23.1)	9 (20)	0.76	–	–
Piperacillin/tazobactam	12 (46.2)	10 (22.2)	0.036	–	NS
Tigecycline	1 (3.8)	2 (4.4)	0.9	–	–
Glycopeptides	7 (26.9)	6 (13.3)	0.21	–	–
Mortality	13 (50)	20 (44.4)	0.65	–	–

OR, odds ratio; CI, confidence interval; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; APACHE, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II index; ICU, intensive care unit; NS, not significant.

Categorical variables are expressed as number of cases (percentage), and continuous variables as medians (interquartile range).

^a Sixty-seven patients.

^b Fifty-four patients.

^c Sixty-two patients.

^d Eleven patients stayed in cubicles 1 or 2.

^e Nine patients in cubicle 3.

^f Four patients in cubicle 4.

^g Ten patients in cubicle 5 or 7.

^h Twelve patients in cubicle 6.

ⁱ Fourteen patients in cubicle 8.

The univariate comparison of cases and controls is shown in Table I. Statistically significant differences were found for tracheal intubation, tracheotomy, admission to cubicles 1 and 8, exposure to any antimicrobial, exposure to third-generation cephalosporins, exposure to piperacillin/tazobactam (more frequent among cases), and a history of cancer (more frequent among controls). Also, time at risk was longer among cases [34 (15.5–51.7) days for cases; 5 (2–8.5) days for controls; $P < 0.001$]. In the multivariate Cox regression model, none of the variables included was shown to be an independent risk factor for MDRKO acquisition (Table II). Concordantly, only time at risk was associated with an increased risk of MDRKO acquisition when analysed by logistic regression (Table I) [adjusted odds ratio (OR): 1.13; 95% confidence interval (CI): 1.03–1.25; $P = 0.012$].

Clinical features of infections caused by MDRKO

Details of clinical features, treatment and prognosis are described in Table III. Fourteen patients were infected with MDRKO over the complete outbreak: ventilator-associated pneumonia (VAP) in seven patients, primary bloodstream infection (P-BSI) in four, and a catheter-related bloodstream infection (CRBSI), urinary tract infection (UTI) and secondary peritonitis (SP) in one patient each. Crude mortality was 50% (seven patients). Empirical therapy was inappropriate in 12 (85.7%) cases, and six of these died. According to type of infection, three out of seven patients with VAP and three out of four patients with P-BSI died. With respect to targeted therapy, of the 11 patients who were alive when susceptibility tests became available, five were treated with monotherapy (one with tigecycline and four with amikacin), and six with combination therapy (all with amikacin, combined with tigecycline in four cases, imipenem in one, and fosfomycin in one). The mortality rates of patients who received monotherapy and

combination therapy were 60% (3/5) and 16.6% (1/6), respectively (relative risk: 3.6; 95% CI: 0.5–24.7; $P = 0.07$).

Discussion

Our results show that time at risk was the only independent risk factor for the acquisition of the outbreak strain during the waves in which patients were the main reservoir and spread was thought to be due mainly to cross-transmission.²¹ We also found a trend towards higher mortality in patients treated with monotherapy.

Risk factors for the acquisition of multidrug-resistant pathogens vary according to the specific reservoirs and mechanisms of transmission of the organism. In outbreaks with a common environmental source, exposure to that source is the main risk factor, whereas in situations in which colonized patients are the main reservoir, variables that increase the likelihood of cross-transmission would be the most important risk factors. In our case, colonized patients were the main reservoir over the two first waves of the outbreak. Because of this, basic measures implemented to control the outbreak included – besides the active screening protocol – contact precautions for the cases, reinforcement of cross-transmission control and cleaning protocols and educational sessions about hand washing. Additional measures, such as nurse cohorting of the colonized/infected patients and an optimization of the health personnel/patient ratio should also be implemented. However, although cross-transmission was properly controlled, the combination of all these measures was insufficient to eradicate the outbreak. In the third wave, an environmental reservoir was found in some sink drains, traps and the horizontal drainage system of the ICU. Removal of the environmental reservoir resulted in the eradication of the outbreak. Hence, our outbreak had an initial stage, in which colonized patients and cross-transmission were the epidemiological key issues, and a later stage in which a common environmental source allowed the perpetuation of the outbreak.²¹ This is why we considered only the two first waves to perform the study of risk factors for CRE acquisition. Unfortunately, our case is unusual since environmental reservoirs are rarely ruled out in a proper manner. It is therefore necessary to be cautious when interpreting the risk factors found in insufficiently characterized outbreaks.

Curiously, none of the most frequently described risk factors for CRE acquisition, such as underlying diseases, invasive procedures or severity of illness, were associated with the acquisition of MDRKO in our study when time at risk was taken into account.^{7–13} These findings support the idea that, in outbreaks where colonized patients are the main reservoir, the opportunities for cross-transmission accumulate over time.¹⁴ This may be more evident in ICU outbreaks, where exposure to typical risk factors for multidrug-resistant organisms (such as severity of illness, invasive procedures and antibiotics) is more homogeneous and frequent than in outbreaks affecting conventional wards.^{5,7,9,11–13,15,17,25} These factors lead us to two main conclusions: first, that controlling for time at risk should always be taken into account when studying the risk factors for acquisition of multidrug-resistant bacteria, in order to interpret appropriately the importance of disease severity and invasive procedures (which are probably surrogates for transmission opportunities); and second, that the management of an ICU outbreak due to CRE in similar epidemiological situations should include the discharge of patients as soon as it is safe to do so.¹⁴

Table II

Cox regression analysis of factors predicting time until colonization/infection due to multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca*

Variable	AHR	95% CI	P-value
Cubicle 1			
No			
Yes	0.88	0.33–2.3	0.79
Cubicle 8			
No			
Yes	0.89	0.39–2.3	0.81
Cancer			
No			
Yes	0.96	0.21–4.3	0.96
Tracheal intubation			
No			
Yes	1.24	0.35–10.5	0.84
Tracheotomy			
No			
Yes	0.97	0.35–2.7	0.96
Use of antimicrobial therapy			
No			
Yes	3.66	0.78–17.1	0.1

AHR, adjusted hazards ratio.

Table III
Clinical features, therapy and prognosis of patients with infections due to multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca*

Case no.	Type of infection	Empiric therapy	Appropriate	Target therapy (MIC, mg/dL)	Creatinine ^a (mg/dL)	Doses (mg/q h) q 12h: every 12 hours	Appropriate	Outcome ^b
1	VAP	Piperacillin/tazobactam	No	Tigecycline (4) + amikacin (8)	0.49	50/12 350/12	Yes	Survived
2	VAP	None	No	Tigecycline (4)	—	50/12	No	Survived
3	P-BSI	None	No	—	—	—	No	Dead
4	VAP	Cefepime + vancomycin	No	Tigecycline (4) + amikacin (8)	1.1	50/12 500/12	Yes	Survived
5	VAP	Ceftriaxone + vancomycin	No	Tigecycline (4) + amikacin (8)	0.93	50/12 250/12	Yes	Survived
6	UTI	None	No	Tigecycline (4) + amikacin (8)	0.49	50/12 750/12	Yes	Dead
7	P-BSI	Ciprofloxacin + piperacillin/tazobactam	No	Amikacin (8)	0.63	750/12	Yes	Dead
8	P-BSI	Levofloxacin + amikacin	Yes	Amikacin (8)	0.46	750/12	Yes	Survived
9	P-BSI	Amikacin + vancomycin	Yes	Amikacin (8)	0.27	600/12	Yes	Dead
10	VAP	Amoxicillin/clavulanic acid	No	Amikacin (8)	0.54	750/12	Yes	Dead
11	VAP	Levofloxacin + piperacillin/tazobactam	No	—	—	—	No	Dead
12	VAP	Levofloxacin + imipenem	No	—	—	—	No	Dead
13	SP	Piperacillin/tazobactam	No	Imipenem (2) + amikacin (8)	0.36	500/8 600/12	Yes	Survived
14	CRBSI	None	No	Fosfomycin (16) + amikacin (8)	1.14	4000/6 750/12	Yes	Survived

MIC, minimum inhibitory concentration; VAP, ventilator-associated pneumonia; P-BSI, primary bloodstream infection; CRBSI, catheter-related bloodstream infection; UTI, urinary tract infection; SP, secondary peritonitis.

^a These data have been partially published.²¹

^b Creatinine value on starting targeted therapy.

^c Outcome within 30 days of diagnosis of infection due to multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca*.

Although colonization pressure is a well-established risk factor for the acquisition of antibiotic-resistant Gram-positive bacteria, it has not been found to be as clearly associated in the case of Gram-negative strains.^{12,26,27} In our case-control study design, we controlled for the potential impact of colonization pressure by matching to select control patients on the basis of admission date. However, we were unable to demonstrate that case patients subjected to higher levels of colonization pressure were at higher risk of early acquisition of MDRKO, as we would have expected. This would support our conclusion that time at risk was a greater determinant than colonization pressure for the acquisition of the multidrug-resistant strain, which may indirectly reflect that early detection and isolation effectively, but temporarily, limited transmission.

With regard to the impact of exposure to antimicrobials, β -lactams in general, carbapenems, penicillins active against *Pseudomonas aeruginosa*, β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations, and fluoroquinolones have been associated with an increased risk of CRE acquisition.^{3,7,9,13,15,17,25,28} This heterogeneity reflects the fact that a CRE strain may be selected by almost any broad-spectrum antibiotic.³ Like others, we failed to find an independent relationship between prior use of antimicrobial therapy and acquisition of CRE.^{10,12} This could be due to lack of statistical power; however, it could also be interpreted that previous antibiotic exposure may not be

essential in the outbreak setting for ICU patients, but just a facilitating factor.²⁹ All this would help to explain why the implementation of a restriction policy for carbapenems has been of such doubtful utility on its own; a more comprehensive approach, aimed at reducing exposure to all broad-spectrum antibiotics, is probably needed.³⁰

The optimum treatment of infections due to CRE is not well established, which is why data from even a small number of carefully evaluated patients may be of interest.¹⁸ As stated, our outbreak strain was resistant to all first-line antibiotics. It is probably because only second-line drugs (such as colistin, aminoglycosides, tigecycline or fosfomycin) are fully active against CRE that combination therapy has appeared to be superior to monotherapy in recent studies.^{19,20} Until now, tigecycline and colistin have been the most active *in vitro* antibiotics against CRE; aminoglycosides may also show an acceptable rate of *in vitro* activity for some CRE clones, although clinical experience with these drugs is scarce.³¹ In our patients, amikacin monotherapy was used in four cases, three of whom died. Aminoglycoside monotherapy was efficacious for treating anecdotal bloodstream infections due to CRE, although recent data showed increased mortality among patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *K. pneumoniae*.^{20,32} This could be explained, at least partially, by the pharmacokinetic properties of aminoglycosides, for which a targeted

plasma concentration is difficult to achieve with the usual doses in infections other than urinary tract – and even more so, as in our series, if a loading dose and once-daily dosing is not used.³³ More importantly, the use of carbapenems has been found to be a good alternative for treating infections due to VIM-producing *K. pneumoniae*, which has been related to heterogeneous carbapenem resistance levels; accordingly, strains with MICs of imipenem ≤ 4 mg/L could be successfully treated with imipenem in a combination regimen.³⁴ One patient in our series was treated and cured with imipenem (the MIC was 2 mg/L) and amikacin. Finally, fosfomicin plus amikacin was effective for treating the last case of CRBSI. Successful treatment of CRE infections with fosfomicin has already been reported; this might be supported by the fact that the risk of resistance development during fosfomicin treatment may be attenuated by the concomitant use of an aminoglycoside.^{35–37}

Our study has several limitations. First, it is possible that some control patients may have been misclassified, since colonization may not have been detected. However, at least two samples per patient were taken and processed using a validated method. Similarly, we cannot completely rule out the concomitant existence of a hidden environmental reservoir during waves 1 and 2, although colonized patients and cross-transmission were clearly the main means of spread. Finally, the study was underpowered to detect some risk factors and the impact of different treatments on the outcomes of patients with infection. The results are only applicable to similar epidemiological situations.

In conclusion, in an ICU outbreak caused by CRE where colonized patients are the main reservoir, time at risk should always be considered in any study of risk factors for the acquisition of CRE; the data provided may be useful for future analyses of therapy for infections due to CRE.

Acknowledgements

We would like to thank the staff from preventive medicine, pharmacy, laboratory, maintenance, and cleaning services, as well as the management team and the entire UCI staff of La Merced Hospital, for their efforts and contribution in tackling the outbreak.

Conflict of interest statement

A. Pascual has been a consultant for Merck and Pfizer, has served as speaker for Astra-Zeneca, Merck, and Pfizer, and has received research support from Merck and Pfizer. J. Rodríguez-Baño has been a consultant for Merck, Pfizer, and Roche, has served as speaker for Merck, Pfizer, Astra-Zeneca and Astellas, and has received research support from Merck and Novartis.

Funding sources

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' ERDF, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), Fondo de Investigación Sanitaria (grants 070190, 10/02021, and 10/01955), and Junta de Andalucía (grants 0063/2006, 0048/2008, and CTS-5259). The funders had no role in the design, analysis, writing of the manuscript, or the decision to publish.

References

- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791–1798.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–281.
- Conejo MC, Domínguez MC, López-Cerero L, Serrano L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying blaIMP-8, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:1071–1073.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980;289:321–331.
- Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:223–232.
- Arakawa Y, Ohta M, Kido N, et al. Chromosomal beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:63–70.
- Chitnis AS, Caruthers PS, Rao AK, et al. Outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a long-term acute care hospital: sustained reductions in transmission through active surveillance and targeted interventions. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33:984–992.
- Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:1099–1106.
- Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1028–1033.
- Mouloudi E, Protonotariou E, Zagorianou A, et al. Bloodstream infections caused by metallo- β -lactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:1250–1256.
- Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnessvredt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:1180–1185.
- Debby BD, Ganor O, Yasmin M, et al. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1811–1817.
- Wu D, Cai J, Liu J. Risk factors for the acquisition of nosocomial infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *South Med J* 2011;104:106–110.
- Paterson DL. Looking for risk factors for the acquisition of antibiotic resistance: a 21st-century approach. *Clin Infect Dis* 2002;34:1564–1567.
- Marchaim D, Chopra T, Bhargava A, et al. Recent exposure to antimicrobials and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the role of antimicrobial stewardship. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33:817–830.
- Ben-David D, Kordevani R, Keller N, et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:54–60.
- Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:1124–1130.
- Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing

- carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol* 2011;6:653–666.
19. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2108–2113.
 20. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012;55:943–950.
 21. Vergara-López S, Domínguez MC, Conejo MC, Pascual A, Rodríguez-Baño J. Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:490–498.
 22. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988;16:128–140.
 23. McCabe WR, Jackson GG. Gram-negative bacteremia. I. Etiology and ecology. *Archs Intern Med* 1962;110:847–864.
 24. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818–829.
 25. Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, Oren I, Kassis I, Finkelstein R. Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:666–671.
 26. Bonten MJ, Slaughter S, Ambergen AW, et al. The role of “colonization pressure” in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. *Archs Intern Med* 1998;158:1127–1132.
 27. Merrer J, Santoli F, Appere de Vecchi C, Tran B, De Jonghe B, Outin H. “Colonization pressure” and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:718–723.
 28. Kritsotakis EI, Tsioutis C, Roumelaki M, Christidou A, Gikas A. Antibiotic use and the risk of carbapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in hospitalized patients: results of a double case–control study. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1383–1391.
 29. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis* 2002;8:347–354.
 30. Borer A, Eskira S, Nativ R, et al. A multifaceted intervention strategy for eradication of a hospital-wide outbreak caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Southern Israel. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2011;32:1158–1165.
 31. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:570–573.
 32. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1798–1803.
 33. Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros MN, Ammani C, Falagas ME. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. *Drugs* 2011;71:2277–2294.
 34. Daikos GL, Petrakos P, Psichogiou M, et al. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo-beta-lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:1868–1873.
 35. Michalopoulos A, Virtzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomicin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect* 2010;16:184–186.
 36. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomicin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2850–2858.
 37. Souli M, Galani I, Boukovalas S, et al. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomicin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2395–2397.

Funding

This study was carried out as part of our routine work.

Transparency declarations

M. J. R. has received speaking honoraria from Cubist, Forest, Novartis and Sunovion, consulting fees from Durata, Cubist, Forest, Cepheid and Theravance, and research grant support from Cubist, Forest and Cerexa Pharmaceuticals. G. S. has received speaking honoraria from Cubist, Forest and Novartis Pharmaceuticals, consulting fees from Cubist and Forest Pharmaceuticals, and research grant support from Forest Pharmaceuticals. K. E. B.: none to declare.

References

- 1 Dhand A, Bayer AS, Pogliano J et al. Use of anti-staphylococcal β -lactams to increase daptomycin activity in eradicating persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of enhanced daptomycin binding. *Clin Infect Dis* 2011; **53**: 158–63.
- 2 Sakoulas G, Okumura CY, Thienphrapa W et al. Nafcillin enhances innate immune-mediated killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Mol Med (Berl)* 2014; **92**: 139–49.
- 3 Sakoulas G, Moise PA, Casapao AM et al. Antimicrobial salvage therapy for persistent staphylococcal bacteremia using daptomycin plus ceftaroline. *Clin Ther* 2014; doi:10.1016/j.clinthera.2014.05.061.
- 4 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
- 5 Wootton M, Howe RA, Hillman R et al. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 399–403.
- 6 Werth BJ, Sakoulas G, Rose WE et al. Ceftaroline increases membrane binding and enhances activity of daptomycin against daptomycin-nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 66–73.
- 7 Berti AD, Wergin JE, Girdaukas GG et al. Altering the proclivity towards daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using combinations with other antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 5046–53.
- 8 Mishra NN, Yang SJ, Chen L et al. Emergence of daptomycin resistance in daptomycin-naïve rabbits with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection is associated with resistance to host defense cationic peptides and *mpfF* polymorphisms. *PLoS One* 2013; **8**: e71151.
- 9 Sakoulas G, Eliopoulos GM, Fowler VG Jr et al. Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin and platelet microbicidal protein correlates with defective autolysis and loss of accessory gene regulator (*agr*) function. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 2687–92.
- 10 Werth BJ, Vidallac C, Murray KP et al. Novel combinations of vancomycin plus ceftaroline or oxacillin against methicillin-resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2376–9.

J Antimicrob Chemother 2015

doi:10.1093/jac/dku341

Advance Access publication 1 September 2014

Prolonged treatment with large doses of fosfomycin plus vancomycin and amikacin in a case of bacteraemia due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and IMP-8 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*

Salvador Vergara-López^{1*}, M. Carmen Domínguez²,
M. Carmen Conejo³, Álvaro Pascual^{3,4} and
Jesús Rodríguez-Baño^{4,5}

¹Internal Medicine Service, Hospital de Valme, Seville, Spain;

²Laboratory of Microbiology, Hospital La Merced, Osuna, Seville,

Spain; ³Department of Microbiology, University of Seville, Seville,

Spain; ⁴Infectious Diseases and Clinical Microbiology Unit,

University Hospital Virgen Macarena, Seville, Spain; ⁵Department of

Medicine, University of Seville, Seville, Spain

*Corresponding author. Tel: +34-95-501-56-87; Fax: +34-95-501-57-87; E-mail: vergara_lopez@yahoo.com

Keywords: bacteraemia treatment, infectious endocarditis, adverse effects, carbapenem resistance, carbapenemases

Sir,

Fosfomycin is an old, but potent, antibiotic in the current global fight against antibiotic resistance, mainly for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae,¹ but also for Gram-positive bacteria, such as MRSA.² However, information about the effectiveness and safety of the drug in severe systemic infections is scarce. We present a case of systemic infection in which methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and carbapenem-resistant *Klebsiella oxytoca* were isolated.

A 68-year-old Caucasian man was admitted to La Merced Hospital (Osuna, Seville, Spain) for elective colectomy in July 2011. A written consent to publish this case was obtained. His medical history included arterial hypertension, dyslipidaemia, cerebrovascular disease (a frontal ischaemic stroke 2 years earlier) and benign prostatic hyperplasia. In 1998, he had undergone an abdominoperineal resection, radiotherapy and chemotherapy due to a rectal cancer. Since then, he had suffered radiation cystitis. In June 2011, he was diagnosed with cancer recurrence and a total colectomy was performed. Forty-eight hours later, an intra-abdominal infection forced the performance of a wide small bowel resection. As a result, the patient developed short bowel syndrome, for which he had to receive prolonged total parenteral nutrition. A three-way foley catheter had to be maintained because of a protracted haematuria. On day 114 of hospitalization, the patient developed fever with no evident source. Physical examination revealed conjunctival haemorrhages. Imipenem (1 g/8 h intravenously), vancomycin (1 g/12 h intravenously) and amikacin (1 g/24 h intravenously) were initiated. Methicillin-resistant *S. epidermidis*

Research letters

Table 1. Clinical and laboratory data of the case patient over the 28 days of treatment with full doses of fosfomicin

	Normal values	Day 116	Day 120	Day 124	Day 128	Day 132	Day 136	Day 140	Day 144
Fever (°C)	<37.7	39	36.1	36	37.5	36	36.4	36.7	36.5
Haemoglobin (g/dL)	11.8–15.7	6.5	8.9	8.2	NA	8	8.9	NA	10.4
White-cell count (per mm ³)	3800–11 500	9770	8220	10330	NA	7660	7450	NA	8650
Urea (mg/dL)	15–50	48	58	20	NA	29	26	NA	53
Creatinine (mg/dL)	0.6–1.2	0.86	1.14	0.43	NA	0.48	0.46	NA	0.47
Sodium (mmol/L)	133–145	136	134	140	NA	140	139	NA	137
Potassium (mmol/L)	3.3–5.1	4.24	1.83	2.7	NA	3.95	4.01	NA	4.92
C-reactive protein (mg/L)	<5	124	145	114	NA	78	14	NA	7
Albumin (g/dL)	2.6–4.1	1.9	1.9	NA	NA	2.4	NA	NA	3.6

NA, not available.

Values outside of the normal range are shown in bold.

and carbapenem-resistant *K. oxytoca* were isolated from all three sets of blood cultures. The central catheter was removed, but it could not be cultured and none of the implicated microorganisms was isolated from urine. Since the *K. oxytoca* were only susceptible to fosfomicin (MIC \leq 16 mg/L), colistin (MIC \leq 0.5 mg/L) and amikacin (MIC \leq 2 mg/L), imipenem was switched to fosfomicin (4 g/6 h intravenously). *S. epidermidis* was susceptible to vancomycin (MIC 1 mg/L) and fosfomicin (MIC \leq 8 mg/L). A transthoracic echocardiogram revealed signs of possible infectious endocarditis, which was subsequently confirmed by the visualization of a 10 mm vegetation on the coronary sinus of the aortic valve through a transoesophageal echocardiogram. The patient became afebrile after 72 h of treatment, but on day 126 (day 12 of treatment) he developed a fever again. A blood culture was negative and the markers of infection were improving, so a non-infectious cause of fever was suspected and a non-steroidal anti-inflammatory drug was added to the treatment. He remained afebrile subsequently. A total of 28 days of treatment were completed. No heart complications were noted. The most significant event was a self-limited hypokalaemia (Table 1). Post-treatment blood cultures were negative and a control transoesophageal echocardiogram showed a complete disappearance of the vegetation.

Although our patient had a definite endocarditis according to the modified Duke criteria, the microbiological aetiology of the endocarditis was less obvious, since it might be caused by one or both microorganisms causing the bacteraemia. Because endocarditis due to *Klebsiella* spp. is rare and a 50% failure rate of medical treatment has been reported if valve replacement is not performed, we assumed *S. epidermidis* to be the microorganism likely responsible for the endocarditis. This microorganism is the most common culprit in native valve endocarditis due to CoNS,³ whose established treatment in cases of methicillin resistance is a 4–6 week course of vancomycin.⁴ Fosfomicin has been shown to be as effective as vancomycin in experimental conditions, although clinical experience is scarce.⁵ Amikacin could also have been as active against *S. epidermidis* as tobramycin and gentamicin, which had proven activity. However, a specific amikacin-susceptibility analysis was not performed.

Current recommended treatment of infections due to metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella* spp. is a combination of at least two antibiotics, in which aminoglycosides have an important role.⁶ We used amikacin as primary antimicrobial and fosfomicin as adjunctive therapy. The latter is active *in vitro* against a

substantial proportion of isolates and has shown synergistic antimicrobial action with other antibiotics. However, its potential to select resistant mutants⁷ explains why fosfomicin is currently considered as a second-line antibiotic for treating infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.⁸ Whatever the case, the addition of fosfomicin to amikacin, in addition to its antimicrobial activity, may have provided a protective effect against vancomycin- and aminoglycoside-related nephrotoxicity.⁹ To our knowledge, this is the first report on the use of full doses of fosfomicin during 4 weeks of treatment, with clinical usefulness and optimal tolerance.

There are some concerns regarding the use of large doses of intravenous fosfomicin, mostly due to the high content of sodium of the disodium pharmaceutical formulation. However, the rate of fosfomicin-related fluid-overload problems has been reported to be only 6%.¹⁰ Our patient's only remarkable adverse effect was a self-limited hypokalaemia, which is the most frequently described fosfomicin-related adverse event.¹⁰

In conclusion, our case showed that the prolonged use of high doses of fosfomicin in combination with other antibiotics could be useful for severe systemic infections due to multidrug-resistant bacteria, with an apparently excellent safety profile. The promising clinical application that our data suggest should be confirmed in future prospective studies.

Funding

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, co-financed by European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe', ERDF, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), Fondo de Investigación Sanitaria (grants 070190, 10/02021 and 10/01955) and Junta de Andalucía (grants 0063/2006, 0048/2008 and CTS-5259). The funders had no role in the design, analysis, writing of the manuscript or the decision to publish.

Transparency declarations

A. P. has been a consultant for Merck and Pfizer, has served as a speaker for AstraZeneca, Merck and Pfizer, and has received research support from Merck and Pfizer. J. R.-B. has been a consultant for Merck, Pfizer and Roche, has served as speaker for Merck, Pfizer, AstraZeneca and Astellas, and has received research support from Merck and Novartis. All other authors: none to declare.

References

- 1 van Duin D, Kaye KS, Neuner EA et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **75**: 115–20.
- 2 Miró JM, Entenza JM, Del Río A et al. High-dose daptomycin plus fosfomicin is safe and effective in treating methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4511–5.
- 3 Chu VH, Cabell CH, Abrutyn E et al. Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: report of 99 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 1527–30.
- 4 Habib G, Hoen B, Tornos P et al. Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2009; **30**: 2369–413.
- 5 Aguado JM. Native valve endocarditis caused by *Staphylococcus epidermidis*. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1989; **7**: 210–6.
- 6 Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M et al. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; **10**: 1393–404.
- 7 Marchese A, Gualco L, Debbia EA et al. In vitro activity of fosfomicin against Gram-negative urinary pathogens and the biological cost of fosfomicin resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2003; **22**: 53–9.
- 8 Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P et al. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 654–63.
- 9 Yanagida C, Ito K, Komiya I et al. Protective effect of fosfomicin on gentamicin-induced lipid peroxidation of rat renal tissue. *Chem Biol Interact* 2004; **148**: 139–47.
- 10 Florent A, Chichmanian RM, Cua E et al. Adverse events associated with intravenous fosfomicin. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **37**: 82–3.

J Antimicrob Chemother 2015

doi:10.1093/jac/dku334

Advance Access publication 11 September 2014

Intrahepatic antiviral quantification in a patient undergoing orthotopic cadaveric liver transplantation

Kaitlyn J. Moorehead¹, James R. Burton Jr², Gregory T. Everson², Jia-Hua Zheng¹, Becky Jo Kerr¹, Lane R. Bushman¹, Meng Wang¹, Cynthia Ju¹, Trevor Nydam³ and Jennifer J. Kiser^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Sciences, University of Colorado Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Aurora, CO, USA; ²Division of Gastroenterology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO, USA; ³Division of Transplant Surgery, University of Colorado School of Medicine, Aurora, CO, USA

*Corresponding author. Tel: +1-303-724-6131; Fax: +1-303-724-6135; E-mail: jennifer.kiser@ucdenver.edu

Keywords: nucleosides, pharmacokinetics, intrahepatic, tenofovir diphosphate, liver sampling

Sir,

Patients with end-stage liver disease (ESLD) have lower rates of sustained virological response to hepatitis C virus (HCV) treatment compared with those without significant hepatic impairment.¹ There may be pathophysiological alterations associated with ESLD, which may alter drug penetration or drug activation in the liver.² Comparing the concentrations of antiviral drugs in liver versus blood may inform drug selection in ESLD. The objective of this work was to quantify antiviral drugs in liver tissue and the active, phosphorylated forms of nucleos(t)ide analogues (NAs) in hepatocytes obtained from a fresh liver explant and to compare these values with drug concentrations in paired plasma and PBMCs.

A 50-year-old male with HIV/HCV coinfection on the liver transplant list was transferred to our hospital with acute kidney injury (serum creatinine 4.11 mg/dL) with a Model for ESLD score of 40. In the year prior to hospitalization, the patient's antiretroviral regimen included 300 mg of tenofovir disoproxil fumarate once daily plus 200 mg of emtricitabine once daily, 800 mg of darunavir once daily, 100 mg of ritonavir once daily and 400 mg of raltegravir twice daily. The patient had an HIV-1 RNA of <20 copies/mL and a CD4 count of 420 cells/mm³. On day 1, tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine was discontinued. On day 2, lamivudine was initiated and dose adjusted based on renal function. Darunavir was discontinued and replaced with atazanavir on day 3. Raltegravir and ritonavir doses remained unchanged.

The patient provided written informed consent for quantification of antiviral drugs in blood, PBMCs and hepatic tissue from his explant liver and publication of study findings. Six days following transfer to our hospital, the patient underwent orthotopic cadaveric liver transplantation. In the operating room, whole blood was obtained for quantification of antiviral drugs in plasma and PBMCs. Forty-five minutes later, the cirrhotic liver was removed. An 18-gauge needle biopsy was used to extract tissue cores from the liver explant for isolation of hepatocytes and quantification of phosphorylated nucleotides. Small liver tissue samples were also collected from scalpel cuts of the explant for quantification of parent drugs.

Liver tissue samples were weighed and homogenized with an electro-homogenizer and frozen at –80°C until quantification of parent drugs. Hepatocytes were isolated from core biopsies for quantification of phosphorylated metabolites. Briefly, the core biopsy samples were soaked in warm perfusion medium. Digestion medium was added and samples were shaken. Dissociated cell aggregates were filtered through a 100 µm cell strainer and rinsed with wash medium. Samples were centrifuged, the supernatant discarded and the pellet re-suspended in wash medium and counted. The isolated hepatocytes were lysed with 70:30 methanol/water then stored at –80°C until intracellular drug level analysis.

Tenofovir diphosphate, emtricitabine triphosphate and lamivudine triphosphate were quantified in PBMCs and isolated hepatocytes using a validated liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method.³ Tenofovir, emtricitabine, raltegravir, atazanavir and ritonavir were measured in plasma and liver tissue homogenate using validated LC/MS or HPLC/UV methods.^{4–6}

4. RESUMEN DE LOS ARTICULOS PUBLICADOS

4.1 Objetivos de la Investigación

- Describir la evolución epidemiológica de un brote clonal de *K. oxytoca* productora de MBL IMP-8 e hiperproductora de OXY:

- Curva epidémica.
- Medidas de control y su impacto sobre la evolución del brote.
- Estudios ambientales.
- Estudio del personal sanitario.
- Consumo de antimicrobianos.

- Describir los aspectos clínicos y pronósticos de los pacientes con infección y/o colonización por *K. oxytoca* productora de MBL IMP-8 e hiperproductora de OXY dentro de un brote clonal.

- Investigar los factores asociados con la infección y/o colonización por *K. oxytoca* productora de MBL IMP-8 e hiperproductora de OXY dentro de un brote clonal.

- Describir el tratamiento de las infecciones por *K. oxytoca* productora de MBL IMP-8 e hiperproductora de OXY dentro de un brote clonal.

4.2 Material y Métodos

4.2.1 Lugar de realización del estudio:

El estudio fue realizado en la UCI del Hospital de La Merced, situado en Osuna (Sevilla). Se trata de un hospital comarcal de 240 camas, cuya UCI tiene ocho camas: cuatro boxes con capacidad de aislamiento gracias a que disponen de una puerta de cristal, numerados como 1, 4, 5 y 8, y cuatro camas separadas por cortinas (más tres posibles adicionales situadas en una habitación anexa a la propia unidad). Esta UCI recibe unos 350 ingresos anuales y su estructura se muestra en la Figura 3.

4.2.2 Circuito de agua en la UCI

El aporte del agua potable y la retirada de las aguas residuales en la UCI se realizaban a través de 11 lavabos (L) situados como se indica en la Figura 3 (L1 a L11). Cada lavabo desaguaba a un bajante de aguas residuales (BAR) numerado igual que los lavabos, salvo el L6 y L7 que desaguaban a través de la misma tubería de desagüe al BAR5, al igual que el L5; el L8 y el L9 desaguaban en el BAR7 y el L10 y L11 que lo hacían en el BAR8.

4.2.3 Descripción del brote

El primer caso del brote fue detectado en marzo de 2009 y el último en noviembre de 2011. El brote se desarrolló en 4 oleadas (Figura 4): oleada 1 (marzo/2009 – mayo/2009); oleada 2 (septiembre/2009 – abril/2010); oleada 3 (septiembre/2010 – abril/2011) y oleada 4 (septiembre/2011 – noviembre/2011).

4.2.4 Pacientes

La investigación incluyó todos los pacientes ingresados en la UCI durante el período del brote y particularmente los pacientes infectados y/o colonizados por KOX_{IMP-8} durante el brote (Figura 5).

4.2.5 Diseño de los estudios realizados

Para el cumplimiento de los objetivos del proyecto se realizaron 3 estudios:

- 1) Un estudio epidemiológico descriptivo del brote y las medidas de control llevadas a cabo, siguiendo las recomendaciones ORION (127).

- 2) Un estudio de casos y controles en los períodos que ocuparon las oleadas 1 y 2 (marzo/2009 – abril/2010) para estudiar los factores de riesgo de adquisición de KOX_{IMP-8}. En este período se consideró que los pacientes

infectados y/o colonizados eran el principal reservorio del brote y la transmisión cruzada el principal mecanismo de transmisión. Las últimas dos oleadas no fueron incluidas dado que en ese período se consideró el reservorio ambiental como el principal reservorio del brote.

Para este estudio se definió como caso a todo paciente ingresado en la UCI que hubiese sido diagnosticado de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} durante el período anteriormente especificado. Por cada caso se seleccionaron dos controles escogidos de forma aleatoria de entre aquellos pacientes que hubiesen sido ingresados en la UCI en los 3 días anteriores o posteriores a la fecha de ingreso del caso correspondiente. Solamente los pacientes ingresados durante al menos 48 horas y que hubiesen sido sometidos a cultivos de vigilancia activa (cribado) para la detección de colonización por KOX_{IMP-8} pudieron ser seleccionados como controles.

3) Un estudio prospectivo de cohorte para la descripción clínica y del pronóstico de los casos de infección, incluyéndose en el mismo a todos los pacientes que sufrieron una infección por KOX_{IMP-8} durante todo el brote, es decir, desde marzo/2009 hasta noviembre/2011. Los pacientes fueron seguidos durante 30 días desde la fecha de diagnóstico de la infección.

4.2.6 Definiciones y variables

Se consideraron pacientes infectados aquellos que presentaban signos de infección activa causada por KOX_{IMP-8}, según los criterios clínicos y microbiológicos de los *Centers for Diseases Control and Prevention* (128), y colonizados el resto.

Los siguientes datos fueron recogidos de todos los pacientes: sexo, fecha de nacimiento, servicio de origen, cama donde ingresó en la UCI, comorbilidades y su gravedad según el índice de McCabe (129), gravedad al ingreso en la UCI según el índice APACHE II (130), exposición a procedimientos invasivos (catéteres vasculares, sonda urinaria, ventilación mecánica, cirugía), tiempo en riesgo, presión de colonización, terapia antimicrobiana antes y después de la infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} y mortalidad.

El tiempo en riesgo fue considerado como el número de días desde el ingreso en la UCI hasta la fecha de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} en los casos, y hasta la fecha del alta de la UCI o muerte para los controles.

La presión de colonización se definió como el porcentaje de pacientes infectados y/o colonizados por KOX_{IMP-8} en cada momento. Se calculó como sigue: (número de pacientes infectados y/o colonizados por KOX_{IMP-8} x 100) / (total de pacientes ingresados en la UCI). La exposición a esta variable se midió como la mediana de las presiones de colonización diarias desde el ingreso en la UCI

hasta la fecha de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} en los casos, y hasta la fecha del alta de la UCI o muerte para los controles. La mediana de presiones de colonización se tomó como punto de corte para clasificar a los pacientes en aquellos sometidos a alta o baja presión de colonización.

4.2.7 Investigación de pacientes, ambiente y profesionales sanitarios y medidas de control

Antes del comienzo del brote, la única medida de control de la transmisión de microorganismos multirresistentes en la UCI consistía en la realización de un cribado mediante cultivo de frotis rectal y faríngeo a los pacientes con un ingreso superior a un mes para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *P. aeruginosa* multirresistente y *Acinetobacter baumannii* multirresistente. Durante ese período, además se realizaba aislamiento de contacto de aquellos pacientes que mostraban infección y/o colonización por dichos microorganismos.

Una vez iniciado el brote, se instauró un protocolo de vigilancia activa consistente en un cribado semanal y al alta de todos los pacientes, mediante cultivo de frotis rectal y faríngeo (o aspirado traqueal en los pacientes con ventilación mecánica), para la detección de KOX_{IMP-8}.

Además, durante el brote se realizaron 6 investigaciones ambientales principales (Figura 4, Tabla 4). Las primeras se realizaron sobre superficies

secas, y posteriormente se centraron en ambientes húmedos. La metodología usada para la realización de los estudios ambientales se describe más adelante.

Las medidas de control llevadas a cabo durante el brote se describen en la sección Resultados, además de las medidas ambientales expuestas en la Tabla 4.

Una intervención rutinaria que se realizaba en la UCI anualmente era el Protocolo para la prevención y control de *Legionella* (PPCL). La justificación para incluir la descripción de este protocolo -que no fue implantando a causa del brote, sino que ya se realizaba rutinariamente de manera previa- en esta sección se basa en su potencial impacto sobre la evolución del brote. El PPCL en el Hospital de La Merced consistía en la hipercloración del tanque principal de suministro de agua durante 3 horas mediante cloro libre de residuos hasta concentraciones entre 20 y 30 mg/L. Posteriormente se hipercloraban los puntos terminales de la red de suministro de agua (1-2 mg/L) durante 2 horas.

Durante el brote se realizaron 2 estudios de cribado de colonización por KOX_{IMP-8} a todos los profesionales sanitarios que trabajaban en la UCI (Figura 4). En la primera oleada se tomó una muestra de frotis faríngeo y en la tercera una muestra de frotis faríngeo y otro rectal.

4.2.8 Terapia antimicrobiana

Para valorar la exposición a terapia antimicrobiana como factor de riesgo se consideraron todos los antimicrobianos recibidos por los pacientes desde 3 meses antes de la fecha de ingreso en la UCI. Los antimicrobianos fueron agrupados como sigue:

- Fluorquinolonas: ciprofloxacino, levofloxacino.
- Cefalosporinas de tercera generación: ceftriaxona, cefotaxima y ceftazidima.
- Cefalosporinas de cuarta generación: cefepima.
- Fosfomicina.
- Piperacilina/tazobactam.
- Carbapenémicos: imipenem (único carbapenémico utilizado en el Hospital de La Merced durante el brote).
- Glucopéptidos: vancomicina.
- Aminoglucósidos: ampicacina, tobramicina y gentamicina.
- Tigeciclina.

En los enfermos con infección por KOX_{IMP-8} se tuvieron en cuenta tanto los tratamientos antimicrobianos empíricos (aquellos administrados antes de conocer la sensibilidad del aislamiento microbiológico) como los dirigidos. Los regímenes de tratamiento antimicrobiano se consideraron como apropiados siempre que al menos uno de los antimicrobianos que componían el régimen fuese activo *in vitro*

frente a KOX_{IMP-8} . Si ninguno de los antimicrobianos era activo, el tratamiento se consideró como inapropiado.

El consumo de antimicrobianos se midió mediante el cálculo de las dosis diarias definidas (DDD) / 100 pacientes-día (131).

4.2.9 Estudios microbiológicos

Las muestras clínicas se tomaron siguiendo el procedimiento habitual según el foco infeccioso. La toma de muestras de cribado tanto de los pacientes como del personal sanitario se ha descrito en el apartado anterior. En relación a la toma de muestras ambientales, el procedimiento se modificó a lo largo del brote. Como se muestra en la Tabla 4, durante las primeras oleadas se utilizó una torunda impregnada en suero salino estéril para la toma de muestras de superficies secas. Más adelante, se añadió al procedimiento la inmersión de la torunda en caldo de tioglicolato (Difco, Detroit, MI, EEUU). Para estudiar sustancias líquidas, como nutrición enteral, se tomaba 1 ml de la sustancia, que se añadía a 9 ml de tioglicolato.

El estudio de las tuberías se llevó a cabo mediante la realización de un pequeño orificio a través del que se introducía una torunda impregnada en suero salino que se frotaba por la superficie interior. La torunda era introducida posteriormente en caldo de tioglicolato. Para el estudio de los sifones de los lavabos, se desenroscaban cuidadosamente y el agua que se vertía durante el desenroscado se recogía en un tubo Falcon de 50 ml (BD Biosciences; Bedford,

MA, EEUU). Una vez desenroscado completamente el sifón, también se tomaba una muestra del agua que permanecía en el fondo mediante una torunda impregnada en suero salino que posteriormente se sumergía en tioglicolato. En los casos en los que no se podía desenroscar el sifón, se aspiraba de éste una muestra de agua mediante una jeringa de 50 ml. Estas muestras se centrifugaban a 2500 rpm durante 15 minutos y el sedimento resultante se sembraba posteriormente.

Las muestras fueron sembradas en placas de agar McConkey (Difco, Detroit, MI, EEUU) y en un medio cromogénico selectivo para detectar cepas productoras de BLEE, ChromID ESBL (BioMérieux, Marcy L'Etoile, Francia). Además, como se ha descrito previamente, desde septiembre de 2010 también se cultivaron en caldo tioglicolato las muestras ambientales.

Se estudiaron todos los aislamientos de *K. oxytoca* con CMI elevada de imipenem obtenidos de muestras clínicas, de cribado de pacientes o estudios ambientales. La identificación de los microorganismos y el estudio de sensibilidad antimicrobiana fueron realizados inicialmente usando un sistema automatizado (MicroScan®; Siemens Healthcare Diagnostics, West Sacramento, CA, EEUU). Las cepas mostraron sensibilidad intermedia o resistencia a todos los antimicrobianos β -lactámicos (las CMI de imipenem, ertapenem y meropenem fueron de 2 mg/L, 1-2 mg/L y 0,5-1 mg/L respectivamente), así como resistencia a fluorquinolonas, trimetoprim-sulfametoxazol y tobramicina. Según los puntos de corte del *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)*, sólo fosfomicina (CMI \leq 16 mg/L), colistina (CMI \leq 2 mg/L), y amicacina (CMI \leq 8 mg/L) mostraron ser

completamente activos frente a las cepas de KOX_{IMP-8} del brote. Con estos datos y aplicando la clasificación actual de la resistencia en las bacterias, dado que KOX_{IMP-8} era sensible sólo a 3 familias diferentes de aquellos antimicrobianos habitualmente activos frente a *K. oxytoca*, KOX_{IMP-8} hubo de ser considerada como multirresistente. (132).

La caracterización completa de los nueve primeros aislamientos del brote (los ocurridos en la oleada 1) se realizó en el Hospital Universitario Virgen Macarena, y fue comunicada con anterioridad (99). En resumen, los aislamientos de KOX_{IMP-8}, que mostraron pertenecer al mismo clon en el estudio mediante electroforesis en gel de campo pulsante (*PFGE*), eran productores de la MBL IMP-8. El gen codificante de esta MBL se encontraba en un plásmido epidémico que además portaba otros determinantes de resistencia a fluorquinolonas y aminoglucosidos. Además, los aislados hiperproducían la β -lactamasa cromosómica OXY, con lo que mostraban resistencia a aztreonam, no hidrolizado por las MBLs.

Los aislamientos de *K. oxytoca* obtenidos a partir de la oleada 2 fueron considerados como pertenecientes a la cepa clonal del brote si presentaban el mismo perfil de sensibilidad que ésta. Además, se realizó *PFGE* a cepas seleccionadas provenientes tanto de muestras clínicas como ambientales de las oleadas 2, 3 y 4 para confirmar su pertenencia al clon epidémico.

Adicionalmente, se analizó retrospectivamente el perfil de sensibilidad antibiótica de todos los aislamientos de *K. oxytoca* obtenidos de muestras clínicas

entre febrero de 2008 y febrero de 2009 (el año anterior al comienzo del brote). La sensibilidad de esas cepas se había estudiado de manera rutinaria mediante el mismo sistema automatizado.

4.2.10 Análisis estadístico

Las variables categóricas se expresaron como porcentaje (%) y las numéricas como mediana [Rango intercuartílico (RIQ)].

Se utilizó el test de Chi-cuadrado para tendencias con el objetivo de estudiar la evolución de la densidad de incidencia de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} y del porcentaje de casos detectados mediante muestras de frotis rectales a lo largo de las distintas oleadas del brote. También se estudió la tendencia en el consumo de antimicrobianos antes, durante y después del brote.

Para comparar el tiempo de adquisición de KOX_{IMP-8} (tiempo entre la fecha de ingreso en la UCI y la de detección de KOX_{IMP-8}) durante las 3 primeras oleadas del brote se usó el test de Kruskal-Wallis. La cuarta oleada no se incluyó en este análisis debido al bajo número de casos que ocurrieron en la misma (Figura 5).

El riesgo acumulado de adquirir KOX_{IMP-8} según la duración de la estancia en la UCI se investigó mediante curvas de Kaplan-Meier y se expresó como probabilidad [Desviación estándar (DE)]. La influencia del nivel de presión de colonización (alto o bajo) fue estudiada mediante el test de long-rank.

Para estudiar los factores asociados con la adquisición de la cepa se realizó una comparación univariante de casos y controles. Las variables categóricas se compararon mediante el test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, cuando éste fue necesario. Las variables continuas se compararon mediante la prueba t de Student si cumplían criterios de normalidad o el test de U de Mann-Whitney en caso contrario.

Para estudiar la importancia del tiempo en riesgo y controlar los posibles factores de confusión se realizaron dos análisis diferentes. Por un lado se calculó el índice de riesgo en el tiempo ajustado (*hazard ratio* ajustada) mediante un análisis de regresión de Cox en el que el tiempo hasta la infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} se consideró como variable dependiente; los pacientes que no adquirieron KOX_{IMP-8} fueron censurados al alta de la UCI o fallecimiento. En este análisis, la exposición a cada antimicrobiano se analizó como variable dicotómica (sí/no). Por otro lado, se realizó un análisis multivariante de regresión logística, tomando la infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} como variable dependiente e incluyendo el tiempo en riesgo como una variable de exposición independiente. La exposición a los distintos antimicrobianos se estudió como variable dicotómica (sí/no) en forma de antimicrobianos individuales o en grupos. Finalmente se eligió el mejor modelo según el test de Hosmer-Lemeshow.

Para todo ello se utilizó el programa estadístico Epi info versión 3.5.1 y la 14ª versión del paquete estadístico SPSS (SPSS, Chicago, IL, EEUU).

4.3 Resultados

En primer lugar se expondrá la descripción epidemiológica del brote. Para el estudio clínico, la Figura 4 muestra los pacientes infectados y/o colonizados por la cepa de KOX_{IMP-8} a lo largo de todo el brote y por tanto incluidos en el estudio clínico del mismo. De un total de 42 pacientes, 26 enfermos infectados y/o colonizados durante las oleadas 1 y 2 formaron parte del estudio de casos y controles. Los 14 enfermos que desarrollaron infección se estudiaron dentro de la cohorte de enfermos infectados por KOX_{IMP-8} durante el brote en su conjunto (Figura 5).

4.3.1 Descripción general del brote

Durante los 31 meses que ocupó el brote, un total de 660 enfermos fueron ingresados en la UCI. Su distribución en las distintas oleadas se muestra en la Figura 5. Cuarenta y dos (6,4%) fueron colonizados y/o infectados por KOX_{IMP-8} en algún momento de su estancia (Figura 4, Tabla 5). De ellos, 14 presentaron una infección (33,3%). La mortalidad cruda de los pacientes infectados y/o colonizados por KOX_{IMP-8} fue del 44%.

La densidad de incidencia de adquisición de KOX_{IMP-8} (casos por 100 pacientes/día) fue de 1,91 en la oleada 1, 1,24 en la oleada 2 y 0,82 en la oleada 3. El porcentaje de casos detectados mediante cultivo de muestras de frotis rectal se incrementó desde el 55,5% en la oleada 1 hasta el 88,2% en la oleada 2 y el 83,3% en la oleada 3 ($p=0,02$). La mediana de tiempo desde el ingreso del

paciente hasta la detección de KOX_{IMP-8} fue de 8 (RIQ 6-37), 16 (RIQ 12-27) y 14 (RIQ 9-40) días en las oleadas 1, 2 y 3, respectivamente ($p=0,22$). La oleada 4 no se ha incluido en estas comparaciones debido a que sólo ocurrieron 4 casos durante ese período (Figura 5).

4.3.2 Aislamientos de *K. oxytoca* previos al brote

La frecuencia absoluta bimensual de aislamientos de *K. oxytoca* en muestras clínicas de todo el hospital había aumentado desde una media de 2,08 casos durante 2008 a ocho casos en los meses de enero y febrero de 2009, justo antes del comienzo del brote. De ellos, tres se produjeron en pacientes ingresados en la UCI, siendo una de las cepas productora de BLEE y resistente a quinolonas y trimetoprim-sulfametoxazol, pero completamente sensible a imipenem. De estos aislamientos no se pudieron realizar más estudios debido a que no habían sido preservados.

4.3.3 Descripción del brote y las medidas de control

4.3.3.1 Oleada 1

El 19 de marzo de 2009, el Servicio de Microbiología informó del aislamiento en dos muestras clínicas de dos enfermos ingresados en camas contiguas de la UCI (camas 7 y box 8, Figura 3) de *K. oxytoca* que presentaban un mismo fenotipo de resistencia, siendo resistentes a los carbapenémicos. El 20 de marzo se confirmaron estos resultados. En ese momento se declaró la

situación al Servicio de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía y se formó un grupo de trabajo constituido por miembros de la Dirección del hospital, Unidad de Medicina Interna, Microbiología, Farmacia, UCI y Medicina Preventiva.

Las primeras medidas de control (medidas básicas) se pusieron en marcha el 21 de marzo, continuándose en todas las demás oleadas del brote (Figura 4):

- Vigilancia activa mediante un cribado semanal y al alta de todos pacientes, en el que se tomaban muestras de frotis rectal y faríngeo (sustituido este último por un aspirado traqueal de los pacientes sometidos a ventilación mecánica).
- Aislamiento de contacto en boxes individuales de todos los pacientes colonizados y/o infectados por KOX_{IMP-8}.
- Refuerzo del protocolo de higiene de manos y otras medidas de control de transmisión cruzada.
- Sesiones educativas periódicas sobre higiene de manos, precauciones de contacto y desinfección.
- Cambio diario por parte de todo el personal sanitario de la UCI de uniforme y calzado sanitario.
- Puesta en marcha de un protocolo específico de limpieza y desinfección de superficies que consistió en dos limpiezas diarias de toda la unidad utilizando lejía a una concentración del 0,5%. Para la desinfección de superficies delicadas y aparatos electrónicos se utilizó una solución compuesta por agentes surfactantes y amonios cuaternarios a una concentración de 1,6-2% y 6%, respectivamente.

Como se ha mencionado, los primeros aislamientos de cada paciente fueron enviados al Hospital Universitario Virgen Macarena (Sevilla) para estudiar las bases genéticas del patrón de resistencia observado. En este estudio se confirmó la naturaleza clonal del brote y los mecanismos de resistencia a β -lactámicos de la cepa epidémica.

Nueve pacientes fueron afectados por KOX_{IMP-8} en esta oleada [previamente notificados (99)]. De ellos, dos (22,2%) desarrollaron una neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM). Cuatro pacientes (los dos infectados entre ellos) murieron, lo que supuso una mortalidad de 44,4% de los casos.

El 28 de marzo de 2009 se llevó a cabo el primer estudio ambiental (EA 1), en el que se realizó un cultivo de muestras tomadas de distintas superficies de la UCI. Todas las muestras fueron negativas (Tabla 4, Figura 4). De igual forma, el 1 de abril se tomó una muestra de frotis faríngeo a todo el personal de la UCI, en lo que constituyó el primer estudio del personal sanitario (EP 1). En el cultivo de ninguna de estas muestras creció KOX_{IMP-8} (Tabla 4, Figura 4).

El 5 de junio de 2009 se llevó a cabo en el hospital el PPCL mediante el procedimiento descrito de hipercloración del agua.

El último caso incidente de esta oleada fue detectado el 20 de mayo de 2009. Seis semanas después (2 de julio de 2009) el último paciente colonizado

que permanecía en la unidad fue trasladado a otro hospital. El brote se creyó erradicado.

4.3.3.2 Oleada 2

El 20 de agosto de 2009 regresó al Hospital de La Merced el último paciente de la oleada 1 y fue ingresado de nuevo en la UCI. De forma inmediata se tomaron medidas de aislamiento de contacto. Sin embargo, el 7 de septiembre de 2009 se aisló KOX_{IMP-8} a partir de un hemocultivo de otro enfermo ingresado en la cama 7. En ese momento se pusieron en marcha todas las medidas básicas de control (Figura 4). No obstante, nuevos casos fueron apareciendo de forma que en noviembre la situación estaba fuera de control. En ese momento se consultó con la Unidad de Gestión Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena y se acordó poner en marcha nuevas medidas adicionales de control:

- Establecimiento de cohortes de pacientes colonizados y no colonizados, con separación física de la UCI mediante el ingreso de los casos en el Anexo a la unidad (Figura 3).
- Optimización del cociente personal de enfermería/caso (2/1) y auxiliar de enfermería/caso (2,5/1).
- Disponibilidad de un celador exclusivo en la UCI.
- Creación de una subcomisión de utilización de antibioterapia que desaconsejó el uso de carbapenémicos, sin llevar a cabo una restricción de su uso como tal.

- Establecimiento de un circuito de limpieza limpio-sucio.

El EA 2 se llevó a cabo en noviembre de 2009 (múltiples muestras superficiales) con resultado negativo.

En abril de 2010, la UCI pudo permanecer vacía durante 10 días. En ese período se completó el circuito de limpieza limpio-sucio, se sustituyeron todos los fómites y se pintaron las paredes.

El 4 de junio de 2010, tras la aplicación del PPCL mediante una hipercloración del agua, se asumió de nuevo que el brote estaba controlado.

El último caso de esta oleada fue detectado el 20 de abril de 2010. Hubo un total de 17 enfermos afectados. Ocurrieron siete casos de infección: cuatro bacteriemias primarias, dos NAVM y una infección del tracto urinario. Nueve (52,9%) de los pacientes afectados fallecieron.

4.3.3.3 Oleada 3

Después de cuatro meses sin ningún caso, a finales de agosto de 2010, KOX_{IMP-8} fue aislada a partir de una muestra clínica (aspirado traqueal) de un paciente que llevaba sólo cuatro días ingresado en el box 5. A partir del conocimiento de este nuevo aislamiento se activó de nuevo el protocolo de control del brote y se pusieron en marcha las medidas de control (básicas y adicionales) de forma inmediata (Figura 4). Dada la escasa duración del ingreso del paciente en el que se aisló KOX_{IMP-8} , se decidió investigar mediante cultivos de cribado a otra enferma que había precedido a este primer caso de la nueva oleada y que había permanecido 50 días en el box 5. Esta enferma, ya fuera de la UCI y que no había coincidido con ningún paciente de la oleada 2, estaba colonizada y fue considerada como el caso índice de esta oleada.

A primeros de octubre de 2010 se llevó a cabo el EP 2 que consistió en la toma de una muestra de frotis rectal y faríngeo -llevados a cabo por un sólo miembro del personal de enfermería no relacionado con la UCI- a todo el personal sanitario. KOX_{IMP-8} no se aisló de ninguna muestra (Figura 4).

En esa misma fecha se llevó a cabo el EA 3 que incluyó muestras ambientales de los fómites y de las superficies alrededor de un caso. KOX_{IMP-8} fue aislada a partir de las muestras tomadas de la sonda vesical y el estetoscopio utilizados en ese paciente.

A finales de febrero de 2011 el brote seguía fuera de control, con 10 casos desde que se reactivara en septiembre de 2010. El equipo de control decidió entonces realizar un nuevo estudio ambiental (EA 4) incluyendo muestras de lugares húmedos y no accesibles a la limpieza habitual. Se estudiaron todas las tuberías, bajantes y sifones de los lavabos de la unidad. Todas las muestras fueron negativas salvo las tomadas del L6 (Figura 4, Tabla 4). Se aislaron innumerables colonias de KOX_{IMP-8} de todas las muestras del L6 salvo las procedentes del grifo y la rejilla del orificio de desagüe de rebosamiento (Figura 4). Las muestras de la tubería de conexión entre el L6 y L7 también fueron positivas. El 25 de febrero de 2011 tanto el L6 como todo su sistema de desagüe fueron eliminados. La tubería de conexión del L6 con el L7 fue sustituida. La situación antes y después de esta acción se muestra en la Figura 6.

A partir de ese momento sólo hubo dos nuevos pacientes afectados por KOX_{IMP-8} en esta oleada. Ambos aislamientos se produjeron en el box 5, 18 y 53 días después de la referida intervención ambiental. Dado que el segundo caso ingresó después de que todos los casos y pacientes no afectados hubiesen abandonado la UCI, se decidió repetir la investigación ambiental. El EA 5 incluyó de nuevo todas las tuberías, sifones y bajantes de la unidad, así como muestras superficiales del box 5 y del almacén en el que había estado el L6 (Tabla 4). Las 18 muestras tomadas fueron negativas. Desde ese momento no hubo nuevos casos y el 18 de junio, tras la aplicación del PPCL, el brote se dio una vez más por controlado y las medidas de control cesaron.

Hubo 12 casos en la oleada 3 incluyendo sólo tres infecciones (todas NAVM). La mortalidad cruda fue del 41,6%.

4.3.3.4 Oleada 4

La última oleada del brote comenzó el 3 de septiembre de 2011 con el aislamiento de KOX_{IMP-8} a partir de líquido ascítico de una paciente ingresada, otra vez, en el box 5. Tras la reactivación de las medidas de control se investigaron todos los pacientes de la unidad, encontrándose otros dos pacientes colonizados.

El 26 de septiembre, una vez que la paciente índice abandonó el box 5, se decidió no volver a ingresar pacientes en este box. De igual forma, una vez realizada la limpieza terminal de ese box, se realizó el EA 6: todas las superficies del box 5 y el L5 completo. De este lavado se tomaron 11 muestras (superficies, grifo, rejillas, tapón, tuberías y sifón). Todas las muestras (de superficies y del L5) fueron negativas. Sin embargo, el 5 de octubre se decidió aislar el BAR5 –al que todavía desaguaban las tuberías horizontales de desagüe del L5 y L7- y sustituir las tuberías horizontales de estos lavabos. Las nuevas tuberías fueron conectadas al BAR4 (Figura 7). Desde ese momento no ha habido nuevos aislamientos de KOX_{IMP-8} en la UCI.

4.3.4 Aislamientos de *K. oxytoca* durante el brote

Los aislamientos obtenidos a partir de la oleada 2 mostraron un patrón fenotípico de resistencia idéntico a los caracterizados en la primera oleada (99) y en todos se detectó el gen *bla*_{IMP-8}. Asimismo, mostraron pertenecer al mismo clon epidémico. A partir de entonces (oleadas 3 y 4) sólo se estudiaron algunas cepas de muestras clínicas seleccionadas al azar, así como todas las provenientes de muestras de estudio ambiental. Todas eran portadoras del gen *bla*_{IMP-8} y mostraron el mismo perfil al estudiarlas mediante *PFGE*.

4.3.5 El último caso del brote

El último caso del brote no se produjo en la UCI. Se trataba un paciente varón de 68 años que había ingresado el 12 de julio de 2011 para someterse a una cirugía programada de cáncer de colon. El paciente presentaba antecedentes de hipertensión arterial, dislipemia, enfermedad vascular cerebral –había sufrido un ictus isquémico frontal dos años antes- e hipertrofia benigna de próstata. En 1998 había sido sometido a una resección abdominoperineal a causa de un cáncer de recto por el que recibió además radioterapia y quimioterapia. Desde entonces sufría episodios recurrentes de hematuria a causa de una cistitis actínica. En junio de 2011 fue diagnosticado de una recidiva del cáncer. Por ese motivo se planteó realizar una colectomía total, que motivó el ingreso. Desgraciadamente, 48 horas después de la intervención sufrió una infección intraabdominal y tuvo que ser intervenido nuevamente, sometiéndose a una

resección amplia de intestino delgado en la que se conservó solamente un metro de intestino proximal y un asa no funcional distal abocada a piel por un extremo y libre a peritoneo por otro. A causa de dicha intervención permaneció en la UCI del 18 al 25 de julio (período entre las oleadas 3 y 4 en el que no estaban activas las medidas específicas de control) y desarrolló un síndrome de intestino corto.

Posteriormente fue trasladado a planta de cirugía donde permaneció seis meses (hasta el 24 de enero de 2012). Durante el ingreso en cirugía compartió personal sanitario con la paciente índice de la oleada 4 del brote (Figura 4), que permaneció ingresada en una habitación contigua desde que fue dada de alta de la UCI hasta su alta definitiva.

En relación a la evolución clínica, el paciente tuvo que ser sometido a nutrición parenteral total mediante catéter venoso central (CVC), sonda vesical, nutrición enteral por sonda nasogástrica primero y mediante gastrostomía percutánea endoscópica más adelante, así como drenaje peritoneal. Además tenía realizadas dos enterostomías, una funcional y la otra procedente del asa no funcional.

La evolución fue muy tórpida debido al desarrollo de múltiples complicaciones de carácter no infeccioso:

- Un cuadro de hematuria grave y muy prolongada que precisó transfusiones muy frecuentes (prácticamente diarias) desde agosto hasta noviembre de 2011. Tuvo varios episodios de insuficiencia renal obstructiva

secundaria a coágulos que obligaron a realizar varias cistoscopias. En una de ellas sufrió una perforación vesical con posterior fístula vesico-peritoneal por lo que comenzó a secretar orina a peritoneo recogida por la ostomía distal. Se tuvo que mantener con sonda vesical por todo ello.

- Múltiples episodios de insuficiencia renal aguda y trastornos hidroelectrolíticos a causa del síndrome de intestino corto, que se consiguieron controlar con el aporte de aproximadamente cinco litros diarios de fluidos.

- Un cuadro de desnutrición grave.

- Una hepatitis aguda grave secundaria a nutrición parenteral total.

Desde el punto de vista infeccioso también acontecieron múltiples complicaciones:

- Dos infecciones del tracto urinario asociadas a sondaje vesical (diagnosticadas clínicamente y sin confirmación microbiológica) por las que recibió tratamiento con quinolonas.

- Una infección de herida quirúrgica.

- Una peritonitis secundaria en la se aisló *Candida albicans* y por la que recibió ceftriaxona y fluconazol.

- Un cuadro de infección intravascular que dio lugar a la publicación número tres, y que consistió en lo siguiente: El 26 de octubre de 2011, en el contexto de un cuadro febril, se aisló *S. epidermidis* de la punta de un CVC con signos locales de infección en el punto de inserción. No se extrajeron hemocultivos. El 4 de noviembre el enfermo seguía febril y se sospechó la existencia de una bacteriemia relacionada con catéter, dado que existía fiebre sin

foco aparente y signos locales de infección del nuevo CVC, que fue retirado aunque no se procedió a cultivar. En ese momento el paciente mostraba hemorragias conjuntivales como signo exploratorio más significativo. Se comenzó tratamiento empírico con imipenem (1 g/8h), vancomicina (1 g/12h) y amicacina (1 g/24h). En los hemocultivos se aisló *S. epidermidis* resistente a meticilina y KOX_{IMP-8}, por lo que se sustituyó imipenem por fosfomicina (4 g/6h) por vía intravenosa, manteniéndose vancomicina y amicacina. Una ecocardiografía transesofágica realizada por sospecha de endocarditis confirmó la existencia de una verruga endocárdica de 10 mm en el seno coronario de la válvula aórtica, cuya función era normal. El paciente quedó afebril unas 72 horas después de comenzar el tratamiento, aunque unos días más tarde desarrolló de nuevo febrícula, que se consideró de origen no infeccioso dada la buena evolución clínica y analítica del enfermo (Tabla 6), y que cedió con antiinflamatorios no esteroideos. Finalmente completó 28 días de tratamiento antimicrobiano con excelente tolerancia al mismo, salvo un episodio autolimitado de hipopotasemia (Tabla 6), consiguiéndose además una resolución completa del cuadro, según se apreció en una ecocardiografía de control.

4.3.6 Probabilidad de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} y presión de colonización

La mediana de tiempo desde el ingreso hasta la infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} durante las oleadas 1 y 2 fue de 16 (RIQ 12-32) días. La probabilidad acumulada de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} se incrementó desde el 18%

(DE 6%) en el 10º día de ingreso, al 56% (DE 9%) en el 20º día, 71% (DE 8%) en el 30º día y hasta el 87% (DE 7%) en el día 50 (Figura 8).

La mediana del conjunto de medianas de presiones de colonización de cada paciente fue del 23,9% (RIQ 13,9-33%). El tiempo desde el ingreso hasta la infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} fue similar en los todos los pacientes, con independencia de que hubiesen estado sometidos a baja (<23,9%) o alta presión de colonización ($\geq 23,9\%$); $p=0,57$ en el test de log-rank (Figura 9).

4.3.7 Estudio de casos y controles para la identificación de factores de riesgo de colonización/infección por KOX_{IMP-8}

En este estudio se incluyeron 26 casos y 45 controles, dado que hubo siete casos para los que sólo fue posible encontrar un control.

La comparación univariante de casos y controles se muestra en la Tabla 7. La necesidad de ventilación mecánica (97% frente a 60%, $p=0,001$), traqueotomía (62% frente a 4%, $p<0,001$), días de ingreso en el box 1 [38 (RIQ 22-51) frente a 5 (RIQ 4-6) días, $p=0,004$] y en el box 8 [19 (RIQ 5-33) frente a 5 (RIQ 3-8) días, $p=0,038$], la exposición a algún antimicrobiano (92% frente a 56%, $p=0,001$), la exposición a cefalosporinas de tercera generación (65% frente a 27%, $p=0,006$), o a piperacilina/tazobactam (46% frente a 22%, $p=0,036$) y el tiempo en riesgo [34 (RIQ 16-52) frente a 5 (RIQ 2-9) días, $p<0,001$] fueron significativamente más frecuente en los casos. Por otro lado, el antecedente de cáncer fue más frecuente en los controles (8% frente a 38%, $p=0,006$).

En el análisis multivariante de regresión logística mostrado en la Tabla 7, solamente el tiempo en riesgo se asoció independientemente con un riesgo incrementado de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} [odds ratio ajustada: 1,13; intervalo de confianza (IC) al 95%: 1,03-1,26; $p=0,012$]

En el modelo de regresión de Cox, ninguna de las variables incluidas se comportó como un factor de riesgo independiente de tiempo hasta infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} durante el brote (Tabla 8).

4.3.8 Infecciones causadas por KOX_{IMP-8}

Los detalles clínicos, terapéuticos y pronósticos de los 14 casos de infección por KOX_{IMP-8} durante el brote se muestran en la Tabla 9. La infección más frecuente fue la NAVM (siete casos), seguida de bacteriemia primaria (cuatro casos), bacteriemia asociada a CVC (un caso), infección del tracto urinario (un caso) e infección de líquido ascítico (un caso). La mortalidad bruta fue del 50%.

El tratamiento empírico fue inapropiado en 12 (85,7%) casos, de los que seis (50%) murieron: tres de los siete casos de NAVM y tres de los cuatro de bacteriemia primaria.

En relación con el tratamiento dirigido, de los 11 pacientes no fallecidos en el momento de recibir los resultados microbiológicos, cinco fueron tratados con monoterapia (uno con tigeciclina y cuatro con amicacina) y seis con terapia

combinada (todos con ampicilina, combinada con tigeciclina en cuatro casos, imipenem en un caso y fosfomicina en el último caso). La mortalidad de los pacientes tratados con monoterapia fue del 60% (tres de cinco), mientras que fue del 16,6% (uno de seis) en los tratados con terapia combinada [riesgo relativo: 3,6; IC 95 %: 0,5-24,7; $p = 0,07$].

4.3.9 Consumo de antibioterapia durante el brote

Como se muestra en la Figura 10, el uso de fluorquinolonas, fosfomicina y aminoglucósidos aumentó de forma significativa al comienzo del brote (los dos últimos se usaron para tratar infecciones por KOX_{IMP-8}). En contraste con ello, el consumo de cefalosporinas de tercera generación sufrió un descenso. Por último, ocurrió también un descenso en el uso de carbapenémicos y un aumento en el de piperacilina/tazobactam y tigeciclina, si bien estos no fueron significativos.

4.4 Discusión

4.4.1 Aspectos generales

Este trabajo describe uno de los brotes nosocomiales por *Klebsiella* spp. productora de carbapenemasa más prolongados a nivel mundial, que pudo finalmente ser completamente erradicado (101-106, 110, 133-136). Y dado que se produjo por una cepa clonal y en una pequeña unidad con muy poco intercambio de pacientes con otras unidades, representa un modelo excelente para estudiar la complejidad de la epidemiología de estos brotes. Así, hemos podido caracterizar el brote de forma detallada, evaluar los motivos del fracaso de las medidas de control habituales, evaluar los factores de riesgo para la adquisición de la bacteria, estudiar las características clínicas de las infecciones y, aunque de manera limitada por el bajo número de casos, estudiar la respuesta a los tratamientos antimicrobianos.

4.4.2 MBL tipo IMP

La cepa causante del brote fue adecuadamente caracterizada como la primera enterobacteria productora de la MBL IMP-8 en España en el laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen Macarena (99). Como se mencionó en la Introducción, hasta entonces se habían descrito enterobacterias productoras de este tipo de MBL fundamentalmente en el sudeste asiático, Australia y casos esporádicos en Turquía y Brasil. Desde la conclusión del brote ha continuado la expansión mundial de este tipo de MBL, tal como se muestra en

la Figura 11. Así, en 2012 tuvo lugar un brote nosocomial por *K. pneumoniae* productora de IMP-4 en China (137). En España, en 2009 se describió una cepa de *K. pneumoniae* productora de IMP-22 (138) y en 2012 una nueva enzima (IMP-28) en una cepa de *K. oxytoca* (139). En 2013, la situación en Taiwan podía calificarse de endemia, toda vez que se describieron 37 casos de bacteriemia por enterobacterias productoras de IMP-8, nueve de ellas *K. pneumoniae* (140). Siguiendo con la enzima producida por la cepa responsable del brote descrito en esta tesis, en 2009 se describió *bla*_{IMP-8} en un nuevo integrón de clase 3 presente en una cepa de *K. pneumoniae* (141). Y finalmente, en la India se ha descrito la enzima IMP-26 en cepas tanto nosocomiales como comunitarias (142).

No conocemos como se introdujo esta carbapenemasa en nuestro centro. Sin embargo, dado que el número de aislamientos de *K. oxytoca* no multirresistente se incrementó de forma notable justo antes del comienzo del brote, planteamos como hipótesis que antes de la ocurrencia del brote se podría haber estado diseminando una cepa sin la carbapenemasa, que en algún momento adquirió el gen *bla*_{IMP-8}, quizás a partir de una bacteria no patógena. Desgraciadamente no es posible confirmar o descartar esta hipótesis, puesto que las cepas de *K. oxytoca* anteriores al comienzo del brote no pudieron ser estudiadas al no haber sido conservadas.

Nuestra hipótesis se basa en la teoría de que, si bien los brotes suelen comenzar con la introducción de un clon multirresistente con capacidad de diseminación en un entorno específico, en algunas ocasiones no es así, sino que la situación se inicia como un brote causado por un clon sensible (o al menos no

multirresistente) que consigue expandirse de forma exitosa por razones diversas (y que al no ser multirresistente puede pasar desapercibido), y que eventualmente adquiere horizontalmente el/los genes de multirresistencia a través de un plásmido, lo que podría favorecerse en el contexto de una elevada presión antibiótica (143). No obstante, la hipótesis de que la cepa epidémica ya portadora del gen *bla*_{IMP-8} fuese introducida en la UCI por un paciente colonizado previamente no es en absoluto descartable, aunque esto no explicaría el aumento de aislamientos de *K. oxytoca* ocurridos con anterioridad. Hemos de recordar que antes del comienzo del brote no existía vigilancia activa de los enfermos al ingreso en la UCI.

4.4.3 Del reservorio humano al ambiental

Nuestra hipótesis inicial sobre las bases epidemiológicas del brote, es decir, que los pacientes infectados y/o colonizados por la cepa responsable son el principal reservorio en los brotes nosocomiales por enterobacterias multirresistentes, siendo la transmisión cruzada entre pacientes el principal mecanismo de transmisión, es un hecho completamente establecido (107). Sin embargo, también es conocido que las medidas de control son a menudo insuficientes para erradicar los brotes causados por estas cepas (102, 104, 144). En nuestro caso, las medidas básicas fallaron y fue necesario poner en marcha medidas adicionales como el aislamiento físico o el establecimiento de cohortes de personal sanitario, que habían mostrado ser efectivas en otros brotes similares (102, 104). Desgraciadamente estas medidas adicionales tampoco lograron erradicar el brote y las últimas oleadas ocurrieron, además, después de largos

períodos sin casos en la unidad y sin enfermos que hubiesen coincidido en algún momento del ingreso con los casos. Este fenómeno, previamente observado (101, 144), puede sugerir la existencia de un reservorio no descubierto, bien humano (pacientes o trabajadores sanitarios) o ambiental, que permita la supervivencia de la cepa responsable del brote a pesar de las medidas de control puestas en marcha. Dado que los estudios realizados al personal sanitario no pudieron poner de manifiesto la existencia de un reservorio humano estable (portador sano), la hipótesis de la existencia de un reservorio ambiental fue cobrando progresivamente más fuerza.

4.4.4 Investigación ambiental

La búsqueda de potenciales reservorios ambientales ha sido frecuentemente obviada, por lo que sólo algunos autores han publicado estudios ambientales en las descripciones de brotes nosocomiales anteriores a éste (101, 102, 104, 133).

No existen recomendaciones estandarizadas sobre cuándo, dónde y cómo hay que realizar una investigación ambiental en un brote. En el caso de *Klebsiella* spp., la mayoría de los estudios ambientales publicados hasta la fecha han sido realizados sobre superficies secas (104). En este contexto, *K. pneumoniae* multirresistente ha sido recuperada de camas y aparatos médicos (104, 133) e incluso de teclados contaminados (135). *K. oxytoca* también ha sido recuperada de muestras procedentes del cultivo de aparatos de ventilación

mecánica (145). Así, nosotros aislamos la cepa responsable del brote en instrumentos médicos situados en la vecindad de un paciente afectado.

Sin embargo, todos estos aislamientos realizados a partir del estudio de superficies secas pueden ser el resultado de contaminaciones puntuales secundarias a rupturas ocasionales de las medidas de control de transmisión cruzada. La constitución de un reservorio estable podría ser más factible en lugares húmedos fuera de los circuitos de limpieza habituales, en los que existieran factores que favorecieran la creación de biopelículas donde la bacteria pudiera sobrevivir por largos periodos de tiempo (144-148). Nuestro estudio describe el hallazgo de un reservorio ambiental de este tipo en el sifón y las tuberías de desagüe del L6 durante la oleada 3 (Figuras 3 y 4 y Tabla 4). En función de este hallazgo y la progresiva asociación de casos en el box 5, planteamos que ocurrió un cambio en la epidemiología del brote por el que, desde un escenario donde el reservorio era predominantemente humano durante las primeras oleadas, –aunque no es posible descartar completamente la existencia de un reservorio ambiental también en estas oleadas, en las que sólo se estudiaron superficies secas-, evolucionó hacia otro en el que el reservorio ambiental descubierto era el responsable de la aparición de nuevos casos más esporádicos. Las evidencias de que este reservorio fue clave en las oleadas 3 y 4 son varias: aislamiento del microorganismo, acumulación de casos en camas relacionadas con el desagüe del L6 y erradicación del brote al eliminar el reservorio. Esta evolución y cambio en los determinantes del brote (reservorios y mecanismos de transmisión) posiblemente ocurre con más frecuencia de lo reconocido en brotes que no logran erradicarse sin el cierre y/o reforma completa

de unidades de hospitalización, y debería ser tenida en cuenta en estas situaciones.

4.4.5 Importancia de lavabos y sistemas de desagüe de aguas residuales

Los lavabos y sistemas de desagüe contaminados se están describiendo de forma cada vez más frecuente como reservorios relevantes de bacterias gramnegativas multirresistentes como *A. baumannii* (147), *P. aeruginosa* (148) y recientemente también *K. oxytoca* (144).

El agua usada para el lavado de los pacientes, el lavado de manos o de instrumentos médicos, contaminada por la bacteria en cuestión, es eliminada a través de los lavabos. De esta forma, las bacterias alcanzan el sifón y las tuberías de desagüe, donde pueden formar biopelículas y con ello reservorios estables en estos lugares. La formación de estos reservorios puede estar favorecida por el mal uso de los lavabos (como ocurre con el vertido de medicamentos o sueros; además, el vertido de agua potencialmente contaminada tras la higiene de pacientes o limpieza de instrumentos médicos debería realizarse en vertederos *ad hoc* y no en los lavabos que se usan luego para la higiene de manos) y por el mal estado o diseño de las tuberías de desagüe, con frecuentes tramos horizontales o incluso con pendiente negativa o tramos bloqueados, que dificultan o enlentecen el flujo y facilitan el estancamiento y la consiguiente formación de biopelículas (Figura 12a).

En este escenario, al abrir el grifo de un lavabo, fundamentalmente cuando el chorro vierte directamente en la rejilla de desagüe, se crean salpicaduras y aerosoles que hacen que las bacterias presentes en los reservorios del sistema de desagüe contaminen intermitentemente la vasija del lavabo y las superficies anexas (Figura 12b), que a su vez contaminarán las manos del personal, su ropa o los dispositivos sanitarios (147, 148). Generalmente, el inóculo de estas contaminaciones suele ser muy bajo por lo que el descubrimiento de estas contaminaciones es muy complicado. Además, una limpieza de superficies, aunque transitoriamente efectiva, no es capaz de controlar adecuadamente la reiteración de la contaminación de bajo grado que se continúa produciendo.

En nuestra experiencia, la eliminación del L6 y los sistemas de desagüe de los L6 y L7 no bastaron para erradicar el brote. Ocurría que incluso cuando el reservorio que se había descubierto en relación al L6 fue eliminado, el L5 permanecía conectado al mismo bajante que los L6 y L7 a través de su tubería de conexión con el BAR5 (Figura 6), lo que seguramente mantuvo el reservorio, y nuevos casos tuvieron lugar en dicho box. Sólo cuando el sistema de desagüe horizontal del L5, a pesar de no haber encontrado allí la bacteria, fue retirado y tanto el L5 como el L7 fueron conectados al BAR4, aislando el BAR5 (Figura 7), pudo erradicarse el brote. Este hecho apoya definitivamente la existencia de un reservorio en relación al L5 que no pudo ser puesto de manifiesto.

4.4.6 El papel del PPCL

El PPCL es una acción no específicamente realizada para este brote pero que, sin embargo, pudo jugar un papel importante en la epidemiología del mismo. En las tres primeras oleadas, el cese de aparición de casos nuevos coincidió con la aplicación del PPCL, reapareciendo posteriormente unos meses más tarde (Figura 4). Este hecho apoya la hipótesis de que el PPCL pudo tener un impacto importante aunque no definitivo sobre los reservorios ambientales localizados en los sistemas de desagües de aguas residuales, de forma que era capaz de disminuir significativamente los mismos pero incapaz de erradicar completamente las biopelículas. En este sentido, la descontaminación química de los sistemas de desagüe se ha descrito como una acción efectiva aunque limitada para la erradicación de este problema (144, 148). En esto se basó la última acción realizada en este brote una vez que cesó definitivamente la aparición de casos: la colocación de una válvula de cierre en las tuberías de desagüe de todos los lavabos para llevar a cabo una limpieza bisemanal con amonios cuaternarios (Tabla 4).

4.4.7 Factores de riesgo de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8}

Los factores de riesgo de adquisición de patógenos multirresistentes varían dependiendo del reservorio y mecanismos de transmisión del microorganismo. En los brotes producidos debido a una fuente de contaminación común, la exposición a esa fuente es el principal factor de riesgo. Por otro lado, en las situaciones en las que los pacientes infectados y/o colonizados son el principal reservorio, las variables que favorecen la transmisión cruzada son los factores de riesgo más importantes. En nuestro caso, esta fue la razón de que ciñéramos el análisis de los factores de riesgo a las dos primeras oleadas, las únicas en las que claramente pudimos asumir que el reservorio principal era probablemente humano y la principal vía de transmisión la de persona-persona a través del personal sanitario (transmisión cruzada). Una fortaleza de nuestro trabajo es que incluyó el estudio de reservorios ambientales desde el principio, lo que ha sido muy infrecuente obviado en el abordaje de los brotes similares que se han descrito hasta la fecha en la literatura. Es por tanto necesario ser muy cuidadosos en la interpretación de los factores de riesgo hallados a partir del estudio de brotes insuficientemente caracterizados.

4.4.7.1 Tiempo en riesgo

Curiosamente, ninguno de los factores de riesgo tradicionalmente descritos para la adquisición de enterobacterias resistentes a carbapenémicos, como las enfermedades subyacentes, los procedimientos agresivos o la gravedad de la enfermedad actual, se asociaron de forma independiente en nuestro estudio con la adquisición de KOX_{IMP-8} cuando se tomó en cuenta el tiempo en riesgo (109-114). Este hallazgo apoya la idea de que en los brotes en los que los pacientes infectados y/o colonizados son el principal reservorio, las oportunidades de transmisión se acumulan a lo largo del tiempo (115). Esto además puede ser más evidente todavía en los brotes producidos en UCI, donde la presencia de los factores de riesgo clásicos (gravedad de los pacientes, exposición a procedimientos invasivos) es más generalizada y homogénea que en los brotes desarrollados en unidades de hospitalización convencionales, y por tanto la acumulación de posibilidades de transmisión cruzada sobresale como el principal factor de riesgo (109, 110, 112-114, 116, 118, 149). Todos estos argumentos nos llevan a concluir principalmente dos cosas: la primera, que el tiempo en riesgo tiene que ser necesariamente controlado en cualquier estudio sobre factores de riesgo de adquisición de bacterias multirresistentes en un entorno concreto, para una correcta interpretación de variables como la gravedad de la enfermedad actual, los procedimientos agresivos (que pueden traducir simplemente una mayor acumulación de posibilidades de transmisión) o la exposición a antimicrobianos (también es más probable que se reciban antimicrobianos a mayor tiempo en riesgo); y la segunda, que el manejo de los brotes nosocomiales por bacterias

resistentes a carbapenémicos en similares situaciones epidemiológicas debe incluir la salida de los pacientes de la unidad afecta tan pronto como la situación clínica lo permita, para reducir los tiempos en riesgo de estos pacientes.

4.4.7.2 Presión de colonización

Aunque la presión de colonización (porcentaje de los pacientes ingresados en la unidad afecta que están colonizados o infectados por la bacteria causante del brote en un momento determinado) es un factor de riesgo bien establecido para la adquisición de bacterias grampositivas, en bacterias gramnegativas este hecho no está tan claramente demostrado (113, 150, 151). En nuestro estudio de casos y controles, el impacto de la presión de colonización se controló en el diseño al emparejar casos y controles según el día de ingreso en la UCI. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que los pacientes sometidos a una presión de colonización más elevada no adquirieron más precozmente KOX_{IMP-8} que aquellos sometidos a menor presión de colonización, tal como se hubiese esperado. Este hallazgo nos permite dar solidez a nuestra conclusión de que el tiempo en riesgo fue más determinante que la presión de colonización para la adquisición de la bacteria multirresistente en un contexto de cumplimiento razonablemente adecuado de las medidas estándar de control de transmisión (higiene de manos, precauciones de contacto y limpieza de superficies). Y esta afirmación refleja indirectamente que una detección y aislamiento precoz de los pacientes afectados puede efectivamente, aunque de forma temporal, limitar la transmisión de la cepa productora del brote.

4.4.7.3 Papel de la antibioterapia

Los β -lactámicos en general, incluyendo carbapenémicos, penicilinas activas frente a *P. aeruginosa* y combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, así como las fluorquinolonas, han sido asociados con un riesgo incrementado de adquirir una enterobacteria resistente a carbapenémicos (109, 110, 114, 116, 118, 149, 152). Sin embargo, nosotros, al igual que otros autores, no logramos demostrar una relación entre el uso previo de antibioterapia y la adquisición de KOX_{IMP-8} (111, 113). Este hecho podría explicarse por una falta de potencia estadística de nuestro estudio. Pero, por otro lado, también podría ocurrir que la presión antibiótica no sea esencial en brotes ocurridos en UCI debido a las características particulares de este escenario, en el que las posibilidades de transmisión cruzada son muy altas por el elevado uso de procedimientos agresivos y la alta frecuencia de contacto con los pacientes, limitándose a ser un factor facilitador indirecto mediante la eliminación de parte de la flora endógena en el paciente que recibe el antibiótico. Esto hace que el paciente adquiera flora exógena ante exposiciones menores, al reducir la competencia en el nicho ecológico y, a la vez, aumentar la capacidad de diseminación desde ese paciente al permitir un mayor grado de colonización en su flora por la cepa resistente (153). Ello nos ayudaría a explicar por qué la aplicación de una política de restricción del uso de carbapenémicos ha demostrado ser de muy dudosa utilidad por sí misma (104), dado que otros fármacos pueden actuar también como selectores de estas cepas, siendo más razonable una política de uso adecuado de antimicrobianos en general, que intente reducir la exposición innecesaria a los mismos. Esta es la

base de nuestra medida de no restringir el uso de carbapenémicos, preconizando en su lugar un uso responsable de la terapia antimicrobiana en general.

4.4.8 Tratamiento de las infecciones por KOX_{IMP-8}

Dado que el tratamiento de las infecciones producidas por enterobacterias resistentes a carbapenémicos no está adecuadamente establecido, cualquier dato sobre pacientes tratados y correctamente evaluados puede ser de interés (119).

Como describimos previamente, la cepa productora del brote descrito en este trabajo era resistente a todos los antimicrobianos de primera línea frente a *Klebsiella* spp. (fundamentalmente β -lactámicos y quinolonas). Aunque la terapia combinada no ha demostrado ser superior a la monoterapia con β -lactámicos y quinolonas en el caso de cepas sensibles a estos fármacos, el hecho de que solamente los antimicrobianos considerados de segunda línea (aminoglucosidos, tigeciclina, colistina o fosfomicina) sean los que con más frecuencia permanecen completamente activos frente a enterobacterias resistentes a carbapenémicos puede ser la razón de que la terapia combinada haya mostrado mejores resultados que la monoterapia en estudios observacionales retrospectivos (120, 121) y constituya actualmente el régimen mayoritariamente recomendado (154, 155), más aún en algunos subgrupos de pacientes, como aquellos con mayor pluripatología de base y mayor gravedad de la infección, –bacteriemias principalmente (156)-. Otra cuestión no menor es establecer el régimen de terapia combinada más óptimo, un aspecto no clarificado a pesar de haber sido

específicamente abordado en un meta-análisis reciente (157), debido a las limitaciones de los estudios realizados hasta la fecha.

Los aminoglucósidos han mostrado aceptables tasas de actividad frente a estas cepas, aunque la experiencia clínica con estos fármacos es más escasa que con tigeciclina o colistina (158). Un trabajo reciente mostró que el tratamiento con aminoglucósidos (en este caso, gentamicina, por ser la cepa sensible), normalmente en combinación con otros fármacos, se asoció con menor mortalidad que el uso de otros tratamientos en un brote causado por una cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC (159). Por otro lado, otros autores han descrito un aumento de mortalidad en pacientes con bacteriemia por *K. pneumoniae* productora de KPC tratados con aminoglucósidos en monoterapia frente a terapia combinada (121, 160). Nosotros usamos amicacina en monoterapia en cuatro de nuestros pacientes con infección por KOX_{IMP-8}, tres de los cuales fallecieron. Estos malos resultados pueden explicarse, al menos de forma parcial, por las propiedades farmacocinéticas de los aminoglucósidos, para los que es complicado conseguir una concentración plasmática adecuada en infecciones distintas a las del tracto urinario. Más aún cuando, como en nuestra serie, no se administra una dosis de carga y/o no se usan en administración única diaria (161). En cualquier caso, está claro que el papel de los aminoglucósidos en estas infecciones merece más estudios.

Otro aspecto importante en el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas es el papel de los propios carbapenémicos. El uso de éstos se ha descrito como una alternativa válida para

el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae* productora de MBL tipo VIM y KPC. Así, las cepas con CMI de imipenem ≤ 4 mg/L o de meropenem ≤ 8 mg/L podrían ser adecuadamente tratadas con estos fármacos usados dentro de una terapia combinada con otro fármaco activo de segunda línea (162), sobre todo si, en el caso de meropenem, se usa a dosis elevada (2 g/8h) y en perfusión prolongada de 3-4 horas, lo que aumenta la probabilidad de alcanzar el tiempo sobre la CMI predictor de eficacia (156). Esto sería así a pesar de que actualmente sólo se consideran sensibles las cepas con CMI ≤ 1 mg/L según el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* (163) y ≤ 2 mg/L según el *CLSI* (164) para ambos antimicrobianos. Un paciente de nuestra serie fue tratado exitosamente con imipenem, –con un aislado con CMI de este carbapenémico de 2 mg/L-, en combinación con ampicacina.

Finalmente, otro fármaco que se mostró aparentemente eficaz en combinación con ampicacina fue fosfomicina, cuando se usó para tratar al último paciente del brote. Este caso permitió valorar este fármaco en profundidad debido al tipo de microorganismo y al tipo de infección: intravascular secundaria a una bacteriemia relacionada con CVC, con probable endocarditis infecciosa. Se catalogó como probable debido a que, aunque se cumplieron claramente los criterios de Duke modificados de endocarditis infecciosa definitiva (165), no pudo establecerse definitivamente si ésta fue producida por *S. epidermidis*, KOX_{IMP-8} o ambos microorganismos. De cualquier forma, el caso constituyó la primera descripción de un tratamiento de cuatro semanas con fosfomicina intravenosa a dosis completas en combinación con vancomicina y ampicacina, con excelente tolerancia y respuesta clínica.

Fosfomicina es un antibiótico antiguo que permanece activo muy frecuentemente frente enterobacterias multirresistentes (166). Este hecho junto a su potencial actividad sinérgica en combinación con otros antimicrobianos, como aminoglucósidos, justifican que pueda tener un papel en el tratamiento infecciones por enterobacterias multirresistentes. En la parte negativa, su capacidad para seleccionar mutantes resistentes (126), hace que ese papel sea de segunda línea (167) y establece la necesidad de usarlo en combinación. Además, el uso de fosfomicina intravenosa conlleva la posibilidad de una sobrecarga de sodio debido a la gran cantidad que contiene la preparación para administración parenteral. Sin embargo, en la literatura sólo se ha descrito un 6% de efectos secundarios relacionados con sobrecarga de sodio (168) y nuestro paciente únicamente experimentó una hipopotasemia autolimitada, por otro lado el efecto indeseable más frecuentemente descrito (168).

5. CONCLUSIONES

1. La epidemiología de los brotes nosocomiales producidos por enterobacterias productoras de carbapenemasas puede ser enormemente compleja y cambiante en el tiempo, y su adecuada caracterización requiere una investigación epidemiológica completa.
2. Aunque el principal reservorio de estos brotes son los pacientes infectados y/o colonizados, y la transmisión cruzada el principal mecanismo de transmisión, debe sospecharse la posibilidad de que existan reservorios ambientales secundarios o alternativos siempre que las medidas básicas para controlar la transmisión cruzada se muestren ineficaces para erradicar el problema.
3. Los reservorios ambientales localizados en lugares húmedos fuera de los circuitos de limpieza habitual (fundamentalmente sifones y tuberías de desagüe horizontales de lavabos) deben ser detenidamente considerados e investigados en esas situaciones.
4. La erradicación de brotes complejos y prolongados causados por enterobacterias productoras de carbapenemasas es posible si se caracterizan adecuadamente los reservorios de estas bacterias.
5. Es necesario estandarizar los procedimientos microbiológicos (tipo de muestras y procesamiento) para los estudios ambientales, que son necesarios para la vigilancia y control de este tipo de brotes.
6. El tiempo en riesgo debe ser considerado siempre en cualquier estudio sobre factores de riesgo de adquisición del microorganismo en brotes epidémicos, y la actuación debe guiarse también por ello, intentando que los enfermos permanezcan el menor tiempo en la unidad afecta.

7. Respecto al tratamiento, los datos que aporta este trabajo son limitados pero apoyan la idea de que, mientras no existan mejores evidencias, parece razonable tratar las infecciones invasoras graves por enterobacterias productoras de carbapenemasas resistentes a los fármacos de primera línea con terapia combinada, incluyendo al menos dos antimicrobianos activos (o uno activo más imipenem, si la CMI es ≤ 4 mg/L, o meropenem, si la CMI es ≤ 8 mg/L, ambos a las dosis más altas aconsejadas).
8. Fosfomicina puede ser una alternativa válida en los regímenes de tratamiento combinado para infecciones graves por enterobacterias resistentes a carbapenémicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. TOBA Release 7.7, 2007.
2. Friedländer C. Über die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie. Arch Pathol Anat Physiol Klin Med 1882;87:319-24.
3. Felson B, Rosenberg LS, Hamburger MJ. Roentgen findings in acute Friedländer's pneumonia. Radiology. 1949; 53:559–565.
4. Bergogne-Bérézin E. Nosocomial pathogens: new pathogens, incidence, prevention. Presse Med. 1995; 24:89–97.
5. Bouza E, Cercenado E. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. Semin Respir Infect. 2002; 17:215-230.
6. Anderson RL, Mackel DC, Stoler BS, Mallison GF. Carpeting in hospitals: an epidemiological evaluation. J Clin Microbiol. 1982; 15:408-415.
7. Cooke EM, Pool R, Brayson JC, Edmondson AS, Munro ME, Shinebaum R. Further studies on the sources of *Klebsiella aerogenes* in hospital patients. J Hyg (Lond). 1979; 83:391-395.
8. Wright C, Kominos SD, Yee KB. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. Appl Environ Microbiol. 1976; 31:453-454.
9. Stiles ME, NG LK. Biochemical characteristics and identification of *Enterobacteriaceae* isolated from meats. Appl Environ Microbiol. 1981; 41:639-645.
10. Evans TM, LeChevallier MW, Waarvick CE, Seidler RJ. Coliform species recovered from untreated surface water and drinking water by the membrane filter, standard, and modified most-probable-number techniques. Appl Environ Microbiol. 1981; 41:657-663.

11. Arora DR, Chugh TD. Klebocin types of *Klebsiella pneumoniae* isolated from normal and diarrhoeal stool. *Indian J Med Res.* 1981; 73:856-859.
12. Kurrle E, Bhaduri S, Krieger D, Gaus W, Heimpel H, Pflieger H, et al. Risk factors for infections of the oropharynx and the respiratory tract in patients with acute leukemia. *J Infect Dis.* 1981; 144:128-136.
13. Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol.* 1975; 30:381-385.
14. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP. Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. *N Engl J Med.* 1969; 281:1137-1140.
15. Pollack M, Niemann RE, Reinhardt JA, Charache P, Jett MP, Hardy PH Jr. Factors influencing colonisation and antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. *Lancet.* 1972; 2:668–671.
16. Selden R, Lee S, Wang WL, Bennett JV, Eickhoff TC. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. *Ann Intern Med.* 1971; 74:657–664.
17. Montgomerie JZ. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. *Rev Infect Dis.* 1979; 1:736-753.
18. Doebbeling BN. Epidemics: identification and management. In R. P. Wenzel (ed.). *Prevention and control of nosocomial infections*, 2nd edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore; 1993. p. 177–206.
19. Stamm WE, Weinstein RA, Dixon RE. Comparison of endemic and epidemic nosocomial infections. In RE Dixon (ed.). *Nosocomial infections*. York e Medical Books, Atlanta, Ga; 1981. p. 9–13.

20. Christensen SC, Korner B. An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. Scand J Urol Nephrol. 1972; 6:232–238.
21. Noriega ER, Leibowitz RE, Richmond AS, Rubinstein E, Schaeffler S, Simberkoff MS, et al. Nosocomial infection caused by gentamicin-resistant, streptomycin-sensitive *Klebsiella*. J Infect Dis. 1975; 13:S45–S50.
22. Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase among hospitalized patients. Infection. 1993; 21:18-22.
23. Gür D, Pitt TL, Hall LMC, Akalin HE, Livermore DM. Diversity of *Klebsiellae* with extended-spectrum β -lactamases at a turkish university hospital. J Hosp Infect. 1992; 22:163–167.
24. Medeiros AA. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: extended-spectrum β -lactamases have arrived in North America. Ann Intern Med. 1993; 119:428-430.
25. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, et al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum β -lactamase production in nosocomial Infections. Ann Intern Med. 2004; 140:26-32.
26. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?. Clin Microbiol Rev. 2005; 18:306-325.
27. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Rev. 2015; 28:565-591.

28. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:160-166.
29. Marik PE. The clinical features of severe community-acquired pneumonia presenting as septic shock. Norasept II Study Investigators. *J Crit Care.* 2000; 15:85-90.
30. Moon WK, Im JG, Yeon KM, Han MC. Complications of *Klebsiella pneumoniae*: CT evaluation. *J Comput Assist Tomogr.* 1995; 19:176-181.
31. Jong GM, Hsiue TR, Chen CR, Chang HY, Chen CW. Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. *Chest.* 1995; 107:214-217.
32. Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS. Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. *Clin Infect Dis.* 2004; 39:1654-1659.
33. Sobirk SK, Struve C, Jacobsson S.G. Primary *Klebsiella pneumoniae* liver abscess with metastatic spread to lung and eye, a North-european case report of an emerging syndrome. *Open Microbiol J.* 2010; 4:5-7.
34. Li J, Fu Y, Wang JY, Tu CT, Shen XZ, Li L, et al. Early diagnosis and therapeutic choice of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess. *Frontiers of Medicine in China.* 2010; 4:308-316.
35. Wang JH, Liu Y, Lee SS, Yen MY, Chen YS, Wang JH, et al. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 1998; 26:1434-1438.
36. Tsai FC, Huang YT, Chang LY, Wang JT. Pyogenic liver abscess as endemic disease, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:1592-1600.

37. Lee NK, Kim S, Lee JW, Jeong YJ, Lee SH, Heo J, et al. CT differentiation of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* vs. non-*Klebsiella pneumoniae*. Br J Radiol. 2011; 84:518-525.
38. Basu S. *Klebsiella pneumoniae*: an emerging pathogen of pyogenic liver abscess. Oman Medical Journal. 2009; 24:131-133.
39. Yang CC, Yen CH, Ho MW, Wang JH. Comparison of pyogenic liver abscess caused by non-*Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae*. J Microbiol Immunol Infect. 2004; 37:176-184.
40. García de la Torre M, Romero-Vivas J, Martínez-Beltrán J, Guerrero A, Meseguer M, Bouza E. *Klebsiella* bacteremia: an analysis of 100 episodes. Rev Infect Dis. 1985; 7:143-150.
41. Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. J Hosp Infect. 1998; 38:119-132.
42. Wu HS, Wang FD, Tseng CP, Wu TH, Lin YT, Fung CP. Characteristics of healthcare-associated and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan. J Infect. 2012; 64:162-168.
43. Lee JA, Kang CI, Joo EJ, Ha YE, Kang SJ, Park SY, et al. Epidemiology and clinical features of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Microb Drug Resist. 2011; 17:267-273.
44. Thomson JE. Community-acquired pneumonia in northeastern Australia-a hospital based study of aboriginal and non-aboriginal patients. Aust N Z J Med 1997; 27:59-61.

45. Yu VL, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman KP, von Gottberg A, et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13:986-993.
46. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*. 2009; 4:e4982.
47. Chung DR, Lee HR, Lee SS, Kim SW, Chang HH, Jung SI, et al. Evidence for clonal dissemination of the serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strain causing invasive liver abscesses in Korea. *J Clin Microbiol*. 2008; 46:4061-4063.
48. Gundestrup S, Struve C, Stahlhut SG, Hansen DS. First case of liver abscess in Scandinavia due to the international hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clone ST23. *Open Microbiol J*. 2014; 8:22-24.
49. Estudio EPINE-EPPS 2014. Estudio de prevalencia de la infección nosocomial en España de 2014. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene.
50. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med*. 1991; 91:72-75.
51. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59:3406-3412.

52. Yokochi T, Inoue Y, Kato Y, Sugiyama T, Jiang GZ, Kawai M, et al. Strong adjuvant action of *Klebsiella* O3 lipopolysaccharide and its inhibition of systemic anaphylaxis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1995; 10:181-184.
53. Williams P, Lambert PA, Brown MR, Jones RJ. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J Gen Microbiol*. 1983; 129:2181-2191.
54. Ottow JCG. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. 1975. *Annu Rev Microbiol*; 29:79-108.
55. Matsumoto T, Mizunoe Y, Sakamoto N, Tanaka M, Kumazawa J. Increased renal scarring by bacteria with mannose-sensitive pili. *Urol Res*. 1990; 18:299-303.
56. Williams P, Tomas JM. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Med Microbiol*; 1990; 1:196-204.
57. Tomas JM, Camprubi S, Williams P. Surface exposure of the O-antigen in *Klebsiella pneumoniae* O1:K1 serotype strains. *Microb Pathog*. 1988; 5:141-147.
58. Griffiths E, Chart H, Stevenson P. High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence. In JA Roth (ed.). *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1988. p. 121-137.
59. Griffiths, E. The iron-uptake systems of pathogenic bacteria. In JJ Bullen and E. Griffiths (ed.), *Iron and infection*. New York, N.Y: John Wiley & Sons, Inc; 1987. p. 69-137.
60. Brock JH, Williams PH, Licéaga J, Wooldridge KG. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and

- enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infect Immun*. 1991; 59:3185-3190.
61. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*. 2012; 27:128-142.
62. Martínez-Martínez JA, López-Suñé Esther. Características de los antimicrobianos. *En Mensa J*, compilador. *Guía de terapéutica antimicrobiana*. Barcelona: Escofer Zamora S.L; 2013. p 3-49.
63. Prescott L.M, Harley JP, Klein DA. *Microbiología*. 4ª edición. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U; 1999.
64. Chambers HF. Penicillins. *In* Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed.). *Principles and practice of Infectious Diseases*. 5th Edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p 321-336.
65. Bush K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33:259–263.
66. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39:1211–1233.
67. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond*. 1980; 289:321-331.
68. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med*. 2006; 119:S62-S70.
69. Haeggman S, Löfdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:2400-2408.

70. Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Mori M, Ito H, Komatsu T, et al. Chromosomal β -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33:63-70.
71. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14:933-951.
72. Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111:5694-5699.
73. Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8:557-584.
74. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 533-537.
75. Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux G, Collatz E, Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35:1093-1098.
76. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:7693-7697.
77. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:1791-1798.
78. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-1 from a

- carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:1151-1161.
79. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:15-22.
80. Benouda A, Touzani O, Khairallah MT, Araj GF, Matar GM. First detection of oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Morocco. *Ann Trop Med Parasitol.* 2010; 104:327-330.
81. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43:1584-1590.
82. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014; 32:S4-S9.
83. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. *Trends Mol Med.* 2012; 18:263-272.
84. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:5046-5054.
85. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol.* 2013; 62:499-513.

86. Jain A, Hopkins KL, Turton J, Doumith M, Hill R, Loy R, et al. NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69:1777-1784.
87. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35:147-151.
88. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP} among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:824-829.
89. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25:682-707.
90. Nordmann P. Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis.* 1998; 27:S100-S106.
91. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, et al. PCR detection of metallo- β -lactamase gene (*bla*_{IMP}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum- β -lactams. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:2909-2913.
92. Koh TH, Babini GS, Woodford N, Sng LH, Hall LM, Livermore DM. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. *Lancet.* 1999; 353:2162.
93. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:2368-2371.

94. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. J Clin Microbiol. 2001; 39:4433-4439.
95. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. J Clin Microbiol. 2005; 43:516-519.
96. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP-4} among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. Clin Infect Dis. 2005; 41:1549-1556.
97. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. Clin Microbiol Infect. 2006; 12:695-696.
98. Limbago BM, Rasheed JK, Anderson KF, Zhu W, Kitchel B, Watz N, et al. IMP-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States. J Clin Microbiol. 2011; 49:4239-4245.
99. Conejo MC, Domínguez MC, López-Cerero L, Serrano L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying *bla*_{IMP-8}, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain. J Antimicrob Chemother. 2010; 65:1071-1073.
100. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29:1099-1106.
101. Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and

- VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. Euro Surveill. 2011; 16:19944.
102. Kassis-Chikhani N, Saliba F, Carbonne A, Neuville S, Decre D, Sengelin C, et al. Extended measures for controlling an outbreak of VIM-1 producing imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a liver transplant centre in France, 2003-2004. Euro Surveill. 2010; 15:19713.
103. Tokatlidou D, Tsivitanidou M, Pournaras S, Ikonomidis A, Tsakris A, Sofianou D. Outbreak caused by a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clone carrying *bla*_{VIM-12} in a university hospital. J Clin Microbiol. 2008; 46:1005-1008.
104. Borer A, Eskira S, Nativ R, Saidel-Odes L, Riesenber K, Livshiz-Riven I, et al. A multifaceted intervention strategy for eradication of a hospital-wide outbreak caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Southern Israel. Infect Control Hosp Epidemiol. 2011; 32:1158-1165.
105. Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo- β -lactamase in Spain: toward endemicity?. Clin Infect Dis 2007; 45:1171-1178.
106. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, Gelsomino F, Bielli A, Landini MP, et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March - 30 September 2010. Euro Surveill 2011; 16:19800.
107. Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. MMWR 2009; 58:256-260.

108. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med 2005; 165:1430-1435.
109. Chitnis AS, Caruthers PS, Rao AK, Lamb J, Lurvey R, Beau De Rochars V, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* at a long-term acute care hospital: sustained reductions in transmission through active surveillance and targeted interventions. Infect Control Hosp Epidemiol. 2012; 33:984-992.
110. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:1028-1033.
111. Mouloudi E, Protonotariou E, Zagorianou A, Iosifidis E, Karapanagiotou A, Giasnetsova T, et al. Bloodstream infections caused by metallo- β -lactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010; 31:1250-1256.
112. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol 2009; 30:1180-1185.
113. Debby BD, Ganor O, Yasmin M, David L, Nathan K, Ilana T, et al. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31:1811-1817.

114. Wu D, Cai J, Liu J. Risk factors for the acquisition of nosocomial infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. South Med J. 2011; 104:106-110.
115. Paterson DL. Looking for risk factors for the acquisition of antibiotic resistance: a 21st-century approach. Clin Infect Dis. 2002; 34:1564-1567.
116. Marchaim D, Chopra T, Bhargava A, Bogan C, Dhar S, Hayakawa K, et al. Recent exposure to antimicrobials and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the role of antimicrobial stewardship. Infect Control Hosp Epidemiol. 2012; 33:817-830.
117. Ben-David D, Kordevani R, Keller N, Tal I, Marzel A, Gal-Mor O, et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. Clin Microbiol Infect. 2012; 18:54-60.
118. Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, Vartzili S, Chelvatzoglou FC, Papaioannou V, et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. J Antimicrob Chemother. 2007; 60:1124-1130.
119. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. Future Microbiol. 2011; 6:653-666.
120. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E, et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56:2108-2113.
121. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella*

- pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. Clin Infect Dis. 2012; 55:943-950.
122. Lee J, Patel G, Huprikar S, Calfee DP, Jenkins SG. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. J Clin Microbiol. 2009; 47:1611-1612.
123. Samonis G, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Falagas ME. Synergy of fosfomicin with carbapenems, colistin, netilmicin, and tigecycline against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31:695-701.
124. Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, Nicolau DP. In vivo efficacy of human simulated regimens of carbapenems and comparator agents against NDM-1-producing *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58:1671-1677.
125. Vidal L, Gafter-Vili A, Borok S, Fraser A, Leibovici L, Paul M. Efficacy and safety of aminoglycoside monotherapy: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. J Antimicrob Agents. 2007; 60:247-257.
126. Falagas ME, Giannopoulou KP, Kokolakis GN, Rafailidis PI. Fosfomicin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. Clin Infect Dis. 2008; 46:1069-1077.
127. Stone SP, Cooper BS, Kibbler CC, Cookson BD, Roberts JA, Medley GF, et al. The ORION statement: guidelines for transparent reporting of outbreak reports and intervention studies of nosocomial infection. J Antimicrob Chemother 2007; 59:833-840.

128. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008; 36:309-332.
129. McCabe WR, Jackson GG. Gram-negative bacteremia. I. Etiology and ecology. *Arch Intern Med*. 1962; 110: 847-855.
130. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985; 13:818-829.
131. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2013. Oslo, 2012.
132. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18:268-281.
133. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T, et al. An outbreak of infection due to β -lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek university hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis*. 2010; 50:364-373.
134. Kochar S, Sheard T, Sharma R, Hui A, Tolentino E, Allen G, et al. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009; 30:447-452.
135. van't Veen A, van der Zee A, Nelson J, Speelberg B, Kluytmans JA, Buiting AG. Outbreak of infection with a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain associated with contaminated roll boards in operating rooms. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:4961-4967.

136. Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM, Kopuit P, Schlesinger Y, Broide E, et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *J Hosp Infect.* 2010; 74:344-349.
137. Yu F, Ying Q, Chen C, Li T, Ding B, Liu Y, et al. Outbreak of pulmonary infection caused by *Klebsiella pneumoniae* isolates harbouring *bla*_{IMP-4} and *bla*_{DHA-1} in a neonatal intensive care unit in China. *J Med Microbiol.* 2012; 61:984-989.
138. Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC β -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32:253-259.
139. Pérez-Llarena FJ, Fernández A, Zamorano L, Kerff F, Beceiro A, Aracil B, et al. Characterization of a novel IMP-28 metallo- β -lactamase from a Spanish *Klebsiella oxytoca* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:4540-4543.
140. Yan JJ, Lee NY, Chen HM, Wang MC, Ko WC, Tsai LH, et al. Bloodstream infections caused by IMP-8-producing *Enterobacteriaceae* isolates: the need for clinical laboratory detection of metallo- β -lactamases?. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32:345-352.
141. Papagiannitsis CC, Dolejska M, Izdebski R, Dobiasova H, Studentova V, Esteves FJ, et al. Characterization of pKP-M1144, a novel ColE1-like plasmid encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 β -lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59:5065-5068.

142. Sheng WH, Badal RE, Hsueh PR. Distribution of extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases, and carbapenemases among *Enterobacteriaceae* isolates causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: results of the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57:2981-2988.
143. Martínez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:647-679.
144. Lowe C, Willey B, O'Shaughnessy A, Lee W, Lum M, Pike K, et al. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:1242-1247.
145. Schulz-Stübner S, Kniehl E. Transmission of extended-spectrum β -lactamase *Klebsiella oxytoca* via the breathing circuit of a transport ventilator: root cause analysis and infection control recommendations. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011; 32:828–829.
146. Khan AS, Dancer SJ, Humphreys H. Priorities in the prevention and control of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in hospitals. *J Hosp Infect.* 2012; 82:85-93.
147. La Forgia C, Franke J, Hacek DM, Thomson RB Jr, Robicsek A, Peterson LR. Management of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit using novel environmental disinfection: a 38-month report. *Am J Infect Control.* 2010; 38:259-263.
148. Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaardt G, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection

- secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30:25-33.
149. Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, Oren I, Kassis I, Finkelstein R. Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30:666-671.
150. Bonten MJ, Slaughter S, Ambergen AW, Hayden MK, van Voorhis J, Nathan C, et al. The role of "colonization pressure" in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. *Arch Intern Med.* 1998; 158:1127-1132.
151. Merrer J, Santoli F, Appere de Vecchi C, Tran B, De Jonghe B, Outin H. "Colonization pressure" and risk of acquisition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a medical intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000; 21:718-723.
152. Kritsotakis EI, Tsioutis C, Roumbelaki M, Christidou A, Gikas A. Antibiotic use and the risk of carbapenem-resistant extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in hospitalized patients: results of a double case-control study. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66:1383-1391.
153. Lipsitch M, Samore MH. Antimicrobial use and antimicrobial resistance: a population perspective. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:347-354.
154. Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouvelekis LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10:1393-1404.
155. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouvelekis LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*

- bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:2322-2328.
156. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Cobos-Trigueros N, Fresco G, Navarro-San Francisco C, Gudiol C, et al; for the Study Group of Nosocomial Infections (GEIH) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). 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: 337.e1-337.e21.
157. Paul M, Carmeli Y, Durante-Mangoni E, Mouton JW, Tacconelli E, Theuretzbacher U, et al. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69:2305-2309.
158. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:570-573.
159. Gonzalez-Padilla M, Torre-Cisneros J, Rivera-Espinar F, Pontes-Moreno A, López-Cerero L, Pascual A, et al. Gentamicin therapy for sepsis due to carbapenem-resistant and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70:905-913.
160. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by

- KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 1798-1803.
161. Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros MN, Ammari C, Falagas ME. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. Drugs. 2011; 71:2277-2294.
162. Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M, Kosmidis C, Vryonis E, Skoutelis A, et al. Prospective observational study of the impact of VIM-1 metallo- β -lactamase on the outcome of patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53:1868-1873.
163. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. Available at: <http://www.eucast.org>.
164. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 24th Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
165. Li JS, Sexton DJ, Mick N, Nettles R, Fowler VG Jr, Ryan, et al. Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis. Clin Infect Dis. 2000; 30:633-638.
166. van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013; 75:115-120.
167. Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*:

- systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:654-663.
168. Florent A, Chichmanian RM, Cua E, Pulcini C. Adverse events associated with intravenous fosfomicin. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 37:82-83.
169. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11:589-603.
170. Pascual A. *Klebsiella* spp. Revisited: A key nosocomial pathogen and a reservoir of MDR genes. ICAAC 2013, Denver, CO.

7. TABLAS

Tabla 1. Tipos de infección producidos por *Klebsiella* spp.

Absceso hepático
Bacteriemias
Infección osteoarticular
Infección de piel y tejidos blandos
Absceso cerebral
Absceso renal
Meningitis
Endocarditis infecciosa
Endoftalmitis
Enterocolitis necrotizante
Colitis hemorrágica
Infección intraabdominal
Absceso esplénico
Prostatitis / absceso prostático
Infección tracto urinario
Empiema
Infección de herida quirúrgica
Neumonía de la comunidad
Neumonía nosocomial
Neumonía asociada a ventilación mecánica

Tabla 2. Antimicrobianos β -lactámicos.

Subfamilia	Generación	Actividad predominante	Antimicrobiano
Penicilinas naturales		Cocos grampositivos	Penicilina G Penicilina V
Penicilinas resistentes a penicilinasas		<i>Staphylococcus aureus</i> incluyendo productores de penicilinasas	Meticilina Oxacilina Cloxacilina
Aminopenicilinas		Cocos grampositivos y gramnegativos adquiridos en la comunidad	Ampicilina Amoxicilina Asociaciones con ácido clavulánico o sulbactam
Carboxi y ureidopenicilinas		<i>P. aeruginosa</i> y gramnegativos adquiridos en el hospital	Piperacilina / tazobactam
Cefalosporinas	Primera	Cocos grampositivos sensibles a penicilina ó meticilina	Cefalotina Cefazolina Cefalexina Cefadroxilo
	Segunda	<i>Bacteroides fragilis</i>	Cefoxitina* Cefminox*
		Estreptococos. Microorganismos gramnegativos: enterobacterias	Cefaclor Cefuroxima Cefonicida
	Tercera	Estreptococos. Microorganismos gramnegativos: enterobacterias	Cefpodoxima Cefditoren Cefixima Ceftibuteno Cefotaxima Ceftriaxona
		Enterobacterias y <i>P. aeruginosa</i>	Ceftazidima
Cuarta	Enterobacterias y <i>P. aeruginosa</i>	Cefepima	
Quinta	Enterobacterias y <i>S. aureus</i> resistente a meticilina	Ceftarolina	
Carbapenémicos		Sin actividad frente a <i>P. aeruginosa</i>	Ertapenem
		Con actividad frente a <i>P. aeruginosa</i>	Imipenem Meropenem Doripenem

*Cefamicinas.

Tabla 3. Clasificación de β -lactamasas.

Bush-Jacoby	Grupo estructural (subgrupo)	Sustrato/s distintivo	Inhibición por		Características	Enzimas representativas
			AC / TZB	EDTA		
1	C	Cefalosporina	N	N	Hidrólisis cefalosporinas >> penicilinas; hidroliza cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, p99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefalosporina	N	N	Hidrólisis de ceftazidima	GCI, CMY-37
2a	A	Penicilinas	S	N	Hidrólisis penicilinas >> cefalosporinas	PCI
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de espectro reducido	S	N	Hidrólisis penicilinas = cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos	S	N	Oxi-imino- β -lactámicos	TEM-3, SHV-2, CTX-M-14, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilinas	N	N	Resistencia a clavulánico, tazobactam y sulbactam	TEM-30, SHV-10
02ber	A	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos	N	N	Oxi-imino- β -lactámicos con resistencia a clavulánico, tazobactam y sulbactam	TEM-50
2c	A	Carboxipenicilinas	S	N	Hidrólisis de carboxipenicilinas	PSE-1, CARB-3, RTG-4
2ce	A	Carboxipenicilinas, cefepima	S	N	Hidrólisis de carboxipenicilinas, cefepima	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	V	N	Hidrólisis de cloxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de amplio espectro	V	N	Hidrólisis de cloxacilina, Oxi-imino- β -lactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenémicos	V	N	Hidrólisis de cloxacilina, carbapenémicos	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de amplio espectro	S	N	Hidrólisis cefalosporinas pero no aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenémicos	V	N	Hidrólisis carbapenémicos, Oxi-imino- β -lactámicos, cefamicinas	KPC, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Carbapenémicos	N	S	Hidrólisis carbapenémicos pero no aztreonam	IMP, VIM, CcrA, IND-1
	B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	B (B2)	Carbapenémicos	N	S	Hidrólisis preferente de carbapenémicos	CphA, Sfh-1
NI	desconocido					

AC: ácido clavulánico; TZB: tazobactam; NI: no incluido; EDTA: ácido etildiaminotetraacético. S: Sí. N: No. V: variable.

Tabla 4. Resumen de estudios ambientales y medidas adoptadas.

Estudio ambiental	Oleada mes/año	Áreas investigadas	Procedimiento	Resultado	acciones
1	1 Abril 2009	Equipos médicos, equipos de ventilación mecánica, salidas de oxígeno y aire en la pared, grifos y broncoscopio	Torunda impregnada con suero salino estéril	Negativo	Ninguna
2	2 Noviembre 2009	Preparaciones de nutrición enteral, teclados, superficies de lavabos, monitores, equipos de ventilación mecánica portátiles, de electrocardiografía y de rayos X portátiles	Torunda impregnada con suero salino estéril. Para líquidos, 1 ml de solución + 9 ml de tioglicolato	Negativo	Ninguna
3	3 Septiembre 2010	Ambiente alrededor de un caso incluyendo equipo médico, mesas, sillas, monitores y todas las vasijas de los lavabos	Torunda sumergida en caldo de tioglicolato	KOX _{IMP-8} aislada a partir de una sonda urinaria y un estetoscopio utilizado en el caso investigado.	El 10 de septiembre de 2010, todos los estetoscopios fueron investigados. Ninguno mostró un resultado positivo
4	3 Febrero 2011	Todos los lavabos y sistemas de desagüe de la unidad	Procedimiento de estudio de sifones y tuberías*	KOX _{IMP-8} aislada a partir del sifón y tuberías de desagüe del L6	El 25 de febrero de 2011, L6 y su sistema de desagüe fue eliminado definitivamente. El sistema de desagüe de L7 fue sustituido.
5	3 Abril 2011	Múltiples superficies del box 5, el almacén donde estaba situado L6 antes de ser eliminado y todos los lavabos y bajantes de la unidad.	Procedimiento de estudio de sifones y tuberías* Torunda sumergida en caldo de tioglicolato	Negativo	Ninguna
6	4 Octubre 2011	L5 (agua de los grifos, vasija, rejillas de rebosamiento y desagüe, tuberías de desagüe y sifón)	Procedimiento de estudio de sifones y tuberías* Torunda sumergida en caldo de tioglicolato	Negativo	Las tuberías de desagüe de L5 y L7 fueron conectadas a BAR4. Se instalaron válvulas en las tuberías de todos los lavabos.

L: lavado numerado en Figura 3; BAR: bajante de aguas residuales, numerado en Figura 3; ml: mililitro. Biguanid®: amonios cuaternarios.*ver descripción de dicho procedimiento en el apartado 4.2.9 Estudios microbiológicos.

Tabla 5. Características principales de los pacientes infectados y/o colonizados por KOX_{IMP-8}.

Caso/Oleada	Cama	Sexo/edad	Servicio origen	Fecha cultivo	Tipo de muestra	Patrón de adquisición	Situación final
1/1*	8	H/53	Médica	13/03/09	AT	Colonización	Curación
2/1*	7	H/66	Médica	16/03/09	AT	Infección (NAVVM)	Fallecimiento
3/1*	5	H/75	Médica	18/03/09	AT/ER	Colonización	Fallecimiento
4/1*	1	H/75	Quirúrgica	24/03/09	ER	Colonización	Fallecimiento
5/1*	5	H/37	Médica	04/04/09	AT	Infección (NAVVM)	Fallecimiento
6/1*	3	H/42	Médica	05/04/09	AT	Colonización	Curación
7/1*	3	H/45	Médica	05/04/09	AT/ER	Colonización	Curación
8/1*	6	H/80	Médica	10/05/09	EF	Colonización	Curación
9/1*	6	H/62	Médica	20/05/09	ER	Colonización	Curación
10/2	7	H/79	Quirúrgica	07/09/09	HC	Infección (Bacteriemia)	Fallecimiento
11/2	8	H/47	Médica	29/09/09	AT	Colonización	Fallecimiento
12/2	7	H/63	Médica	02/10/09	AT/ER	Infección (NAVVM)	Curación
13/2	4	H/83	Médica	08/10/09	ER	Colonización	Fallecimiento
14/2	5	M/78	Médica	15/10/09	AT/ER	Colonización	Fallecimiento
15/2	6	M/71	Médica	27/10/09	ER	Colonización	Curación
16/2	1	M/41	Médica	03/11/09	ER	Colonización	Curación
17/2	5	H/67	Médica	10/11/09	AT/ER	Infección (NAVVM)	Curación
18/2	4	H/77	Médica	17/11/09	AT/ER/U	ITU	Fallecimiento
19/2	8	M/79	Quirúrgica	17/11/09	ER	Colonización	Fallecimiento
20/2	8	M/52	Médica	02/12/09	AT/ER/HC	Infección (Bacteriemia)	Curación
21/2	8	M/80	Médica	03/12/09	AT/ER/HC	Infección (Bacteriemia)	Fallecimiento
22/2	1	M/50	Médica	16/12/09	AT/ER/HC	Infección (Bacteriemia)	Fallecimiento
23/2	2	M/61	Médica	26/01/10	ER	Colonización	Curación
24/2	3	H/74	Quirúrgica	03/03/10	ER	Colonización	Curación
25/2	5	M/82	Médica	16/03/10	ER	Colonización	Fallecimiento
26/2	6	M/66	Médica	20/04/10	ER	Colonización	Curación
27/3	4	M/80	Médica	01/09/10	EA	Colonización	Curación
28/3	4	M/76	Médica	23/08/10	AT	Infección (NAVVM)	Fallecimiento
29/3	6	H/58	Quirúrgica	27/08/10	ER	Colonización	Curación
30/3	1	H/75	Médica	06/10/10	ER	Colonización	Curación

31/3	2	H/79	Médica	26/10/10	ER	Colonización	Curación
32/3	1	M/59	Médica	09/12/10	ER	Colonización	Fallecimiento
33/3	5	H/68	Médica	12/01/11	AT/ER	Infección (NAVM)	Fallecimiento
34/3	1	H/47	Médica	01/02/11	ER	Colonización	Curación
35/3	2	M/62	Médica	01/02/11	AT/ER	Infección (NAVM)	Fallecimiento
36/3	7	H/70	Médica	22/02/11	ER	Colonización	Curación
37/3	5	H/57	Médica	15/03/11	ER	Colonización	Fallecimiento
38/3	5	H/76	Médica	19/04/11	ER	Colonización	Curación
39/4	5	M/76	Médica	03/09/11	Ascitis	Infección (Peritonitis)	Curación
40/4	3	F/69	Médica	20/09/11	AT	Colonización	Curación
41/4	7	F/63	Médica	23/09/11	AT/ER	Colonización	Curación
42/4	NA	H/68	Quirúrgica	04/11/11	HC	Infección (Bacteriemia)	Curación

*Datos previamente publicados (99); H: Hombre; M: Mujer; AT: Aspirado traqueal; ER: Exudado rectal; EF: Exudado faríngeo; HC: Hemocultivo; U: Urocultivo; EA: Exudado axilar; NAVM: Neumonía asociada a ventilación mecánica; ITU: infección del tracto urinario; NA: No aplicable.

Tabla 6. Datos clínicos y analíticos del último caso del brote durante los 28 días de tratamiento antimicrobiano para la infección por KOX_{IMP-8}.

	Valores normales	Día 116	Día 120	Día 124	Día 128	Día 132	Día 136	Día 140	Día 144
Fiebre (°C)	<37,7	39	36,1	36	37,5	36	36,4	36,7	36,5
Hemoglobina (g/dL)	11,8–15,7	6,5	8,9	8,2	ND	8	8,9	ND	10,4
Leucocitos (por mm ³)	3800–11500	9770	8220	10330	ND	7660	7450	ND	8650
Urea (mg/dL)	15–50	48	58	20	ND	29	26	ND	53
Creatinina (mg/dL)	0,6–1,2	0,86	1,14	0,43	ND	0,48	0,46	ND	0,47
Na (mmol/L)	133–145	136	134	140	ND	140	139	ND	137
K (mmol/L)	3,3–5,1	4,24	1,83	2,7	ND	3,95	4,01	ND	4,92
PCR (mg/L)	<5	124	145	114	ND	78	14	ND	7
Albúmina (g/L)	2,6–4,1	1,9	1,9	ND	ND	2,4	ND	ND	3,6

Na: sodio; K: potasio; PCR: proteína C reactiva; ND: dato no disponible. Los días están numerados desde la fecha de ingreso del paciente. Los valores fuera del rango de normalidad están resaltados **en negrita**.

Tabla 7. Comparación de las características de los casos y controles.

Variable	Casos (n=27)	Controles (n=45)	p univariante	OR ajustada (IC 95%)	p multivariante
Género masculino	16 (62)	28 (62)	0,95	-	-
Edad (años)	66,7 (52,3-79,1)	71,6 (59,5-79)	0,71	-	-
<u>Planta de ingreso†</u>			0,77	-	-
Médica	8 (30,4)	12 (29,5)			
Quirúrgica	6 (21,7)	12 (29,5)			
Urgencias	12 (47,8)	17 (40,9)			
<u>Comorbilidad</u>					
Cáncer	2 (7,7)	17 (37,8)	0,006	-	NS
Insuficiencia cardiaca	5 (19,2)	13 (28,9)	0,37	-	-
Diabetes mellitus	6 (23,1)	12 (26,7)	0,74	-	-
EPOC	6 (23,1)	10 (22,2)	0,93	-	-
ERC	2 (7,7)	4 (8,9)	0,9	-	-
Insuficiencia hepática	4 (15,4)	5 (11,1)	0,72	-	-
McCabe rápidamente fatal‡	2 (0-4)	2 (1-3,5)	0,41	-	-
<u>Procedimientos agresivos</u>					
Vía venosa central	26 (100)	42 (93,3)	0,3	-	-
Intubación orotraqueal	25 (96,6)	27 (60)	0,001	-	NS
Traqueotomía	16 (62)	2 (4,4)	<0,001	-	NS
Sonda nasogástrica	22 (84,6)	31 (68,7)	0,1	-	NS
Nutrición parenteral	1 (3,8)	8 (17,8)	0,14	-	NS
Nutrición enteral	4 (15,4)	9 (20)	0,76	-	-
Sonda vesical	24 (92,3)	37 (82,2)	0,31	-	-
Presión de colonización	25 (17-43)	24 (12-31)	0,18	-	NS
Índice APACHE§	24,5 (18,5-35)	27 (22-31)	0,86	-	-
Tiempo en ICU (días)	34 (15,5-51,7)	5 (2-8,5)	<0,001	1,13 (1,03-1,25)	0,012
Box 1 (días) ¶	38 (22-51)	5 (3,5-6)	0,004	-	NS
Cama 2 (días) ¶¶	17 (13-37)	6 (2-8)	0,067	-	NS
Cama 3 (días) ¶¶	9 (5-9)	3,5 (2-5,3)	0,095	-	NS
Box 4 (días) ††	28 (10,5-91)	3 (3-11)	0,114	-	NS
Box 5 (días) ††	38 (22-83)	7 (4-29)	0,056	-	NS
Cama 6 (días) §§	15 (4,5-31)	8 (6-10)	0,34	-	-
Cama 7 (días) ††	11,5 (10-13)	6,5 (4-11,8)	0,27	-	-
Box 8 (días) ¶¶	19 (5-33)	5 (3-8)	0,038	-	NS
<u>Uso de terapia antimicrobiana</u>					
Algún tipo de antimicrobianos	24 (92,3)	25 (55,6)	0,001	-	NS

Aminopenicilinas	7 (26,9)	8 (17,8)	0,36	-	-
Cefalosporinas de cuarta-generación	4 (15,4)	2 (4,4)	0,18	-	-
Cefalosporinas de tercera-generación	17 (65,3)	12 (26,7)	0,006	-	NS
Fluorquinolonas	14 (53,8)	14 (31,1)	0,68	-	-
Carbapenémicos	6 (23,1)	9 (20)	0,76	-	-
Piperacilina/tazobactam	12 (46,2)	10 (22,2)	0,036	-	NS
Tigeciclina	1 (3,8)	2 (4,4)	0,9	-	-
Glucopéptidos	7 (26,9)	6 (13,3)	0,21	-	-
Mortalidad	13 (50)	20 (44,4)	0,65	-	-

†67 pacientes; ‡54 pacientes; §62 pacientes; ¶11 pacientes ingresados en box 1 y cama 2; || 9 pacientes en cama 3; ††4 pacientes en box 4; ‡‡10 pacientes en box 5 y cama 7; §§12 pacientes en cama 6; ¶¶14 pacientes en box 8; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ERC, enfermedad renal crónica; APACHE: índice Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II; NS: no significativo.

Tabla 8. Análisis de regresión de Cox de los factores predictores de tiempo hasta infección y/o colonización por KOX_{IMP-8}.

Variable	HRA	IC 95%	p
Box 1			
No			
Sí	0,88	0,33-2,3	0,79
Box 8			
No			
Sí	0,89	0,39-2,3	0,81
Cáncer			
No			
Sí	0,96	0,21-4,3	0,96
Intubación orotraqueal			
No			
Sí	1,24	0,35-10,5	0,84
Traqueotomía			
No			
Sí	0,97	0,35-2,7	0,96
Uso de terapia antimicrobiana			
No			
Sí	3,66	0,78-17,1	0,1

HRA: Hazard ratio ajustada.

Tabla 9. Características clínicas, terapéuticas y pronósticas de los pacientes infectados por KOX_{IMP-8}.

Caso	Tipo	Terapia empírica	Apropiado	Terapia dirigida (CMI, mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Dosis (mg/h)	Apropiado	Pronóstico
1	NAVM	Piperacilina/ tazobactam	No	Tigeciclina (4) + amicacina (8)	0,49	50/12 350/12	Sí	Curación
2	NAVM	Ninguno	No	Tigeciclina (4)	-	50/12	No	Curación
3	BP	Ninguno	No	-	-	-	No	Fallecimiento
4	NAVM	Cefepima + vancomicina	No	Tigeciclina (4) + amicacina (8)	1,1	50/12 500/12	Sí	Curación
5	NAVM	Ceftriaxona + vancomicina	No	Tigeciclina (4) + amicacina (8)	0,93	50/12 250/12	Sí	Curación
6	ITU	Ninguno	No	Tigeciclina (4) + amicacina (8)	0,49	50/12 750/12	Sí	Fallecimiento
7	BP	Ciprofloxacino + Piperacilina/ tazobactam	No	Amicacina (8)	0,63	750/12	Sí	Fallecimiento
8	BP	Levofloxacino + amicacina	Sí	Amicacina (8)	0,46	750/12	Sí	Curación
9	BP	Amicacina + vancomicina	Sí	Amicacina (8)	0,27	600/12	Sí	Fallecimiento
10	NAVM	Amoxicilina/ácido clavulánico	No	Amicacina (8)	0,54	750/12	Sí	Fallecimiento
11	NAVM	Levofloxacino + Piperacilina/ tazobactam	No	-	-	-	No	Fallecimiento
12	NAVM	Levofloxacino + imipenem	No	-	-	-	No	Fallecimiento
13	P	Piperacilina/tazobactam	No	Imipenem (2) + amicacina (8)	0,36	500/8 600/12	Sí	Curación
14	BRC	Ninguno	No	Fosfomicina (16) + amicacina (8)	1,14	4000/6 750/12	Sí	Curación

NAVM: Neumonía asociada a ventilación mecánica; BP: Bacteriemia primaria; BRC: Bacteriemia relacionada con catéter; ITU: Infección del tracto urinario; P: peritonitis; Los valores de Creatinina son los medidos al comienzo de la terapia; El pronóstico está referido a 30 días tras el diagnóstico de infección por KOX_{IMP-8}.

8. FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los principales factores de patogenicidad de *Klebsiella* spp. [Adaptado de (169)].

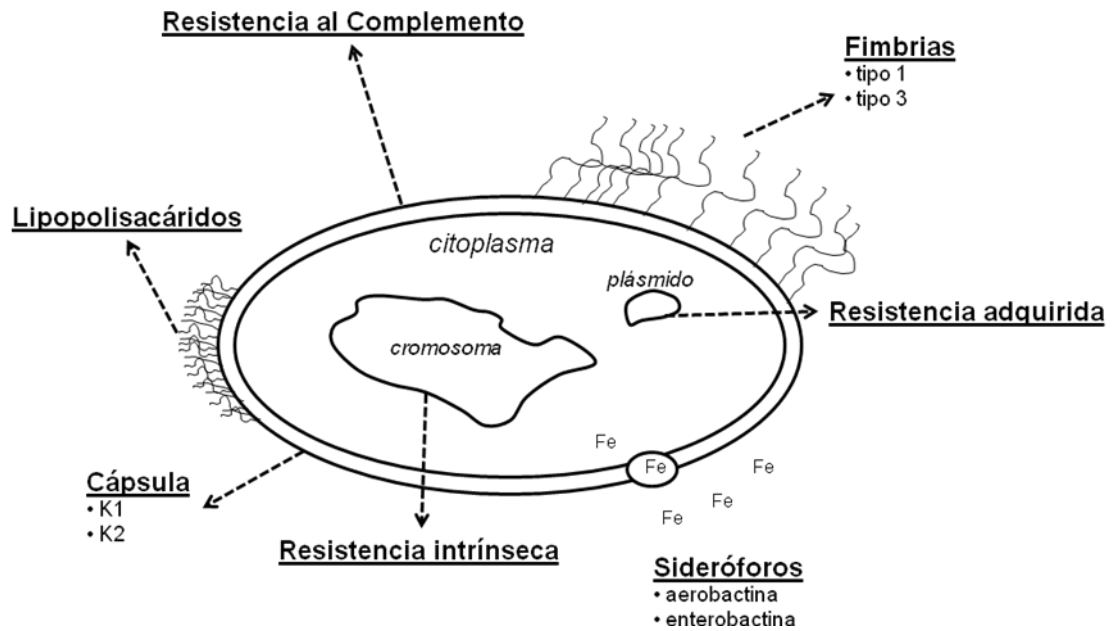
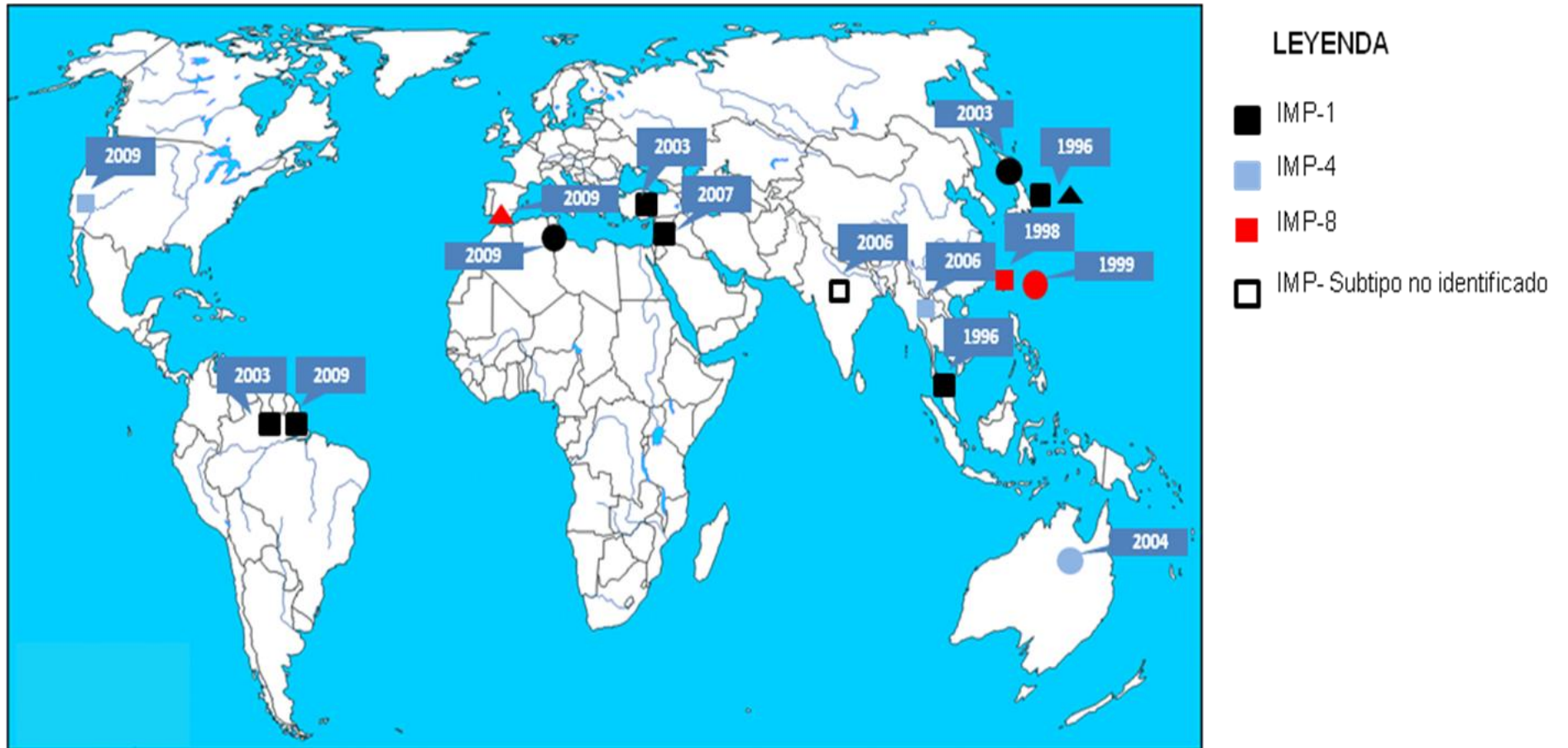
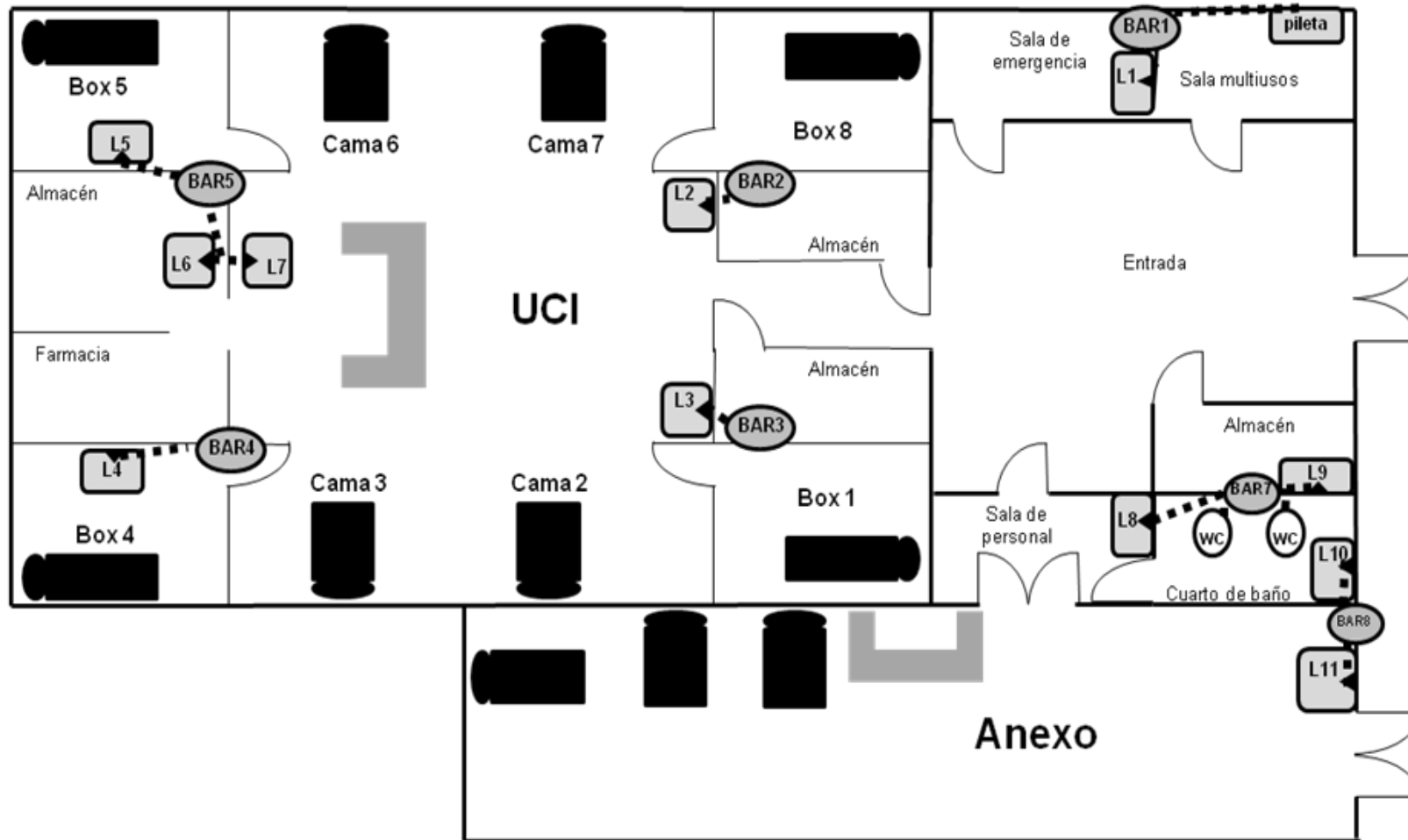


Figura 2. Diseminación de MBL tipo IMP en *Klebsiella* spp. hasta el comienzo del brote (2009).



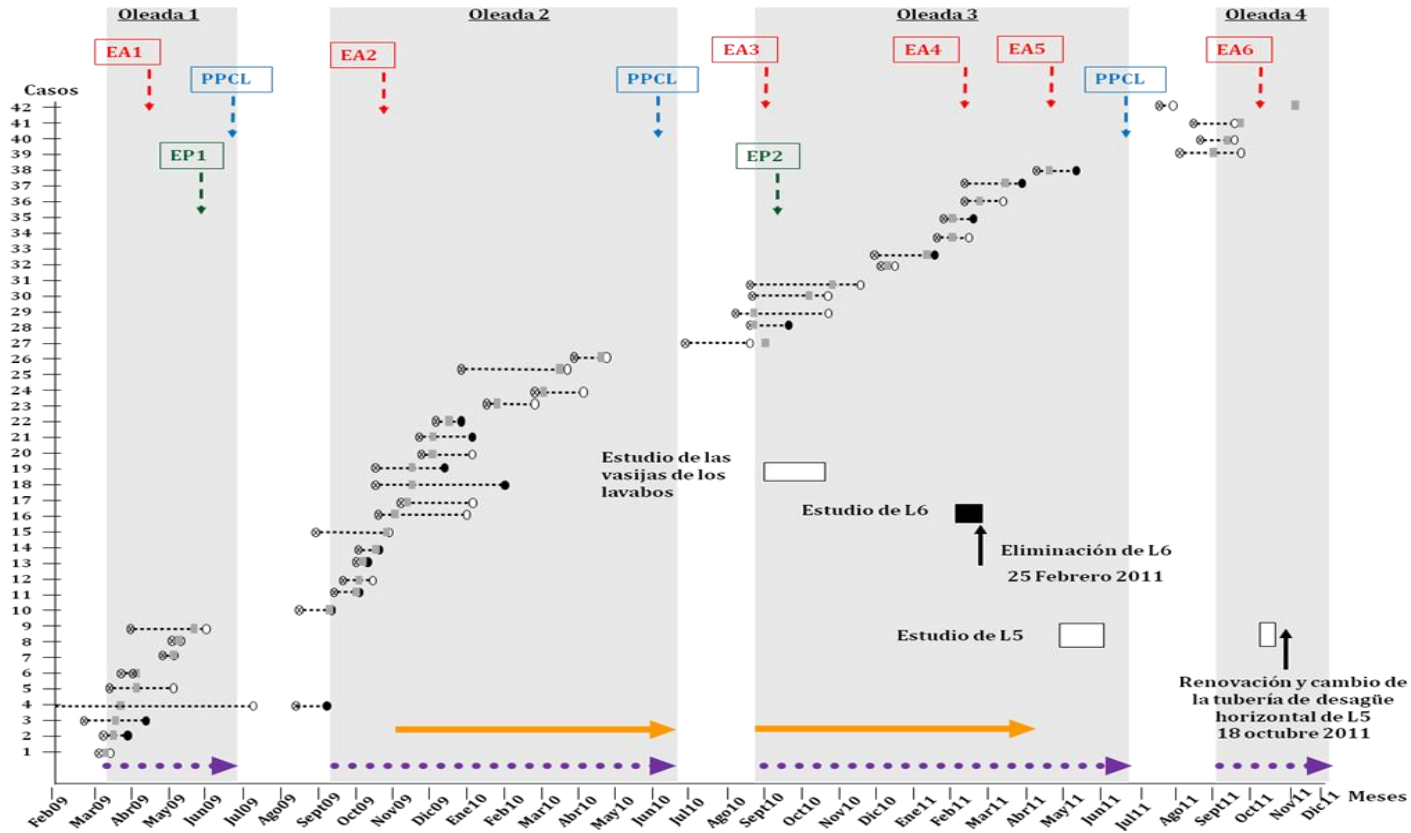
Cuadrado: caso esporádico de infección por *K. pneumoniae*; círculo: brote; triángulo: caso esporádico de infección por *K. oxytoca*. Los años representan la fecha de aislamiento del microorganismo.

Figura 3. Plano de la UCI del Hospital de la Merced de Osuna.



Símbolos: Cuadrado gris: lavabo (L); círculo gris: bajante aguas residuales (BAR); línea discontinua: tubería de desagüe entre L Y BAR.

Figura 4. Curva sinóptica de los pacientes infectados y/o colonizados por KOX_{IMP-8} y medidas de control realizadas.



Símbolos: EA (color rojo): estudio ambiental; EP (color verde): estudio del personal; PPCL (color azul): Protocolo para la Prevención y Control de *Legionella*; flecha discontinua (color púrpura): medidas de control básicas; flecha continua (color naranja): medidas de control adicionales; círculo aspado: fecha de ingreso del caso en la UCI; círculo blanco: fecha de alta del caso en la UCI; círculo negro: fecha de éxitus; cuadrado gris: fecha del primer aislamiento de KOX_{IMP-8} en el caso; línea discontinua: período de estancia en UCI del caso; cuadrado negro: EA positivo; cuadrado blanco: EA negativo.

Figura 5. Diagrama de flujo de los pacientes estudiados en el proyecto y estudios realizados.

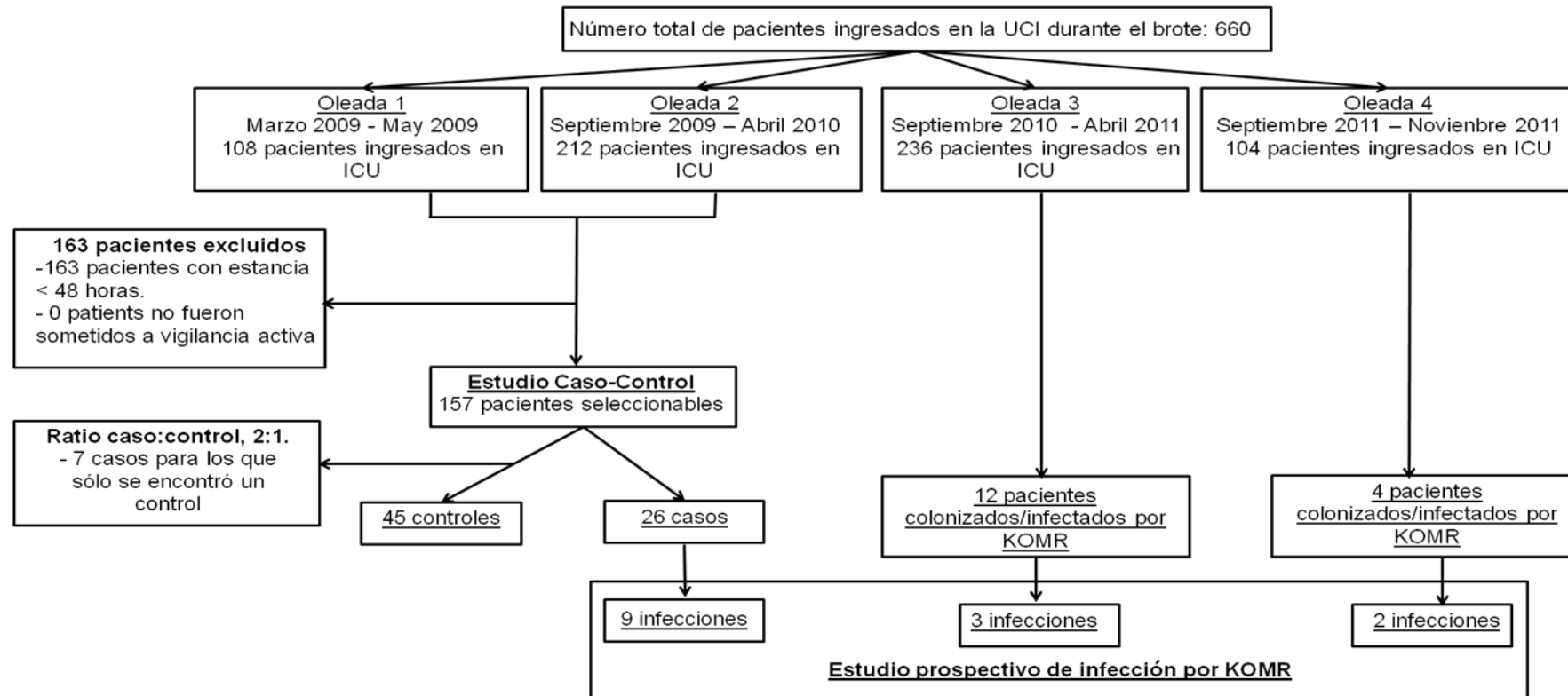
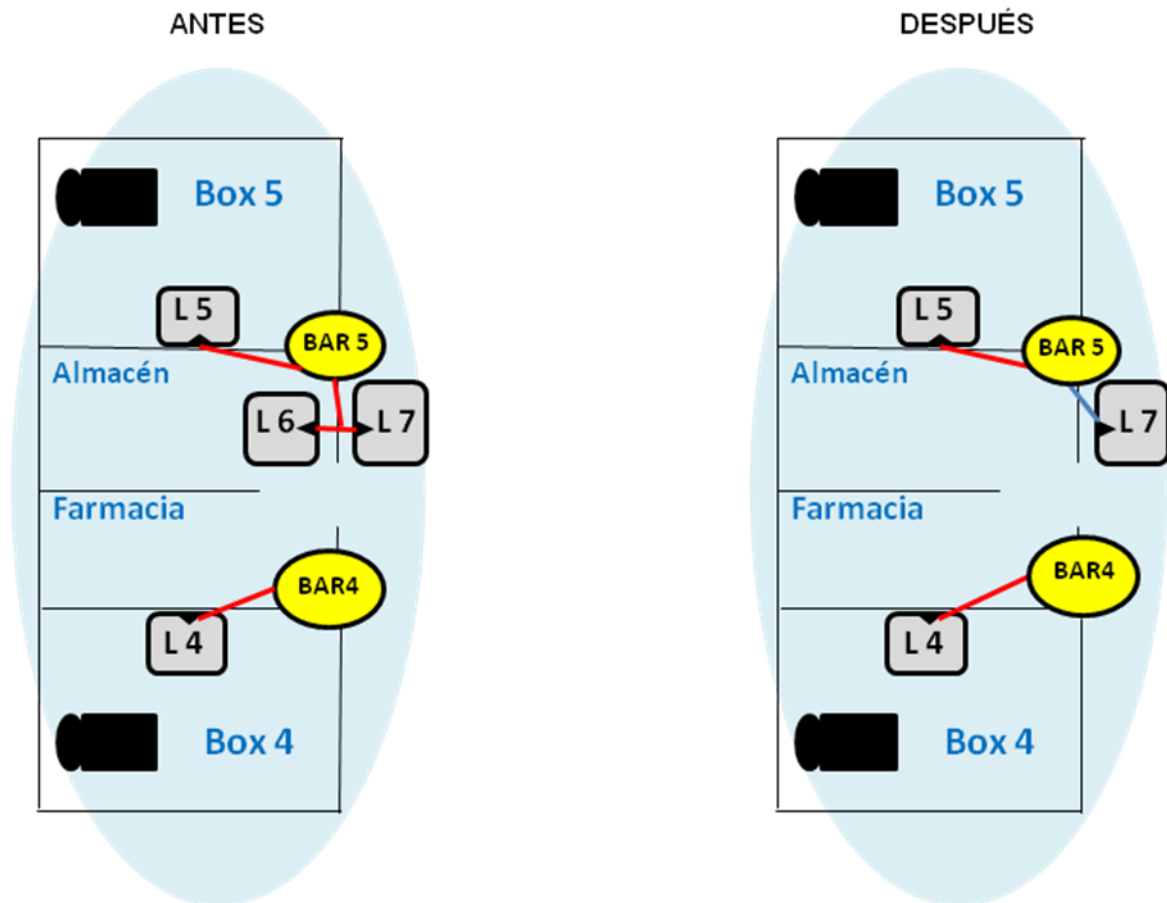
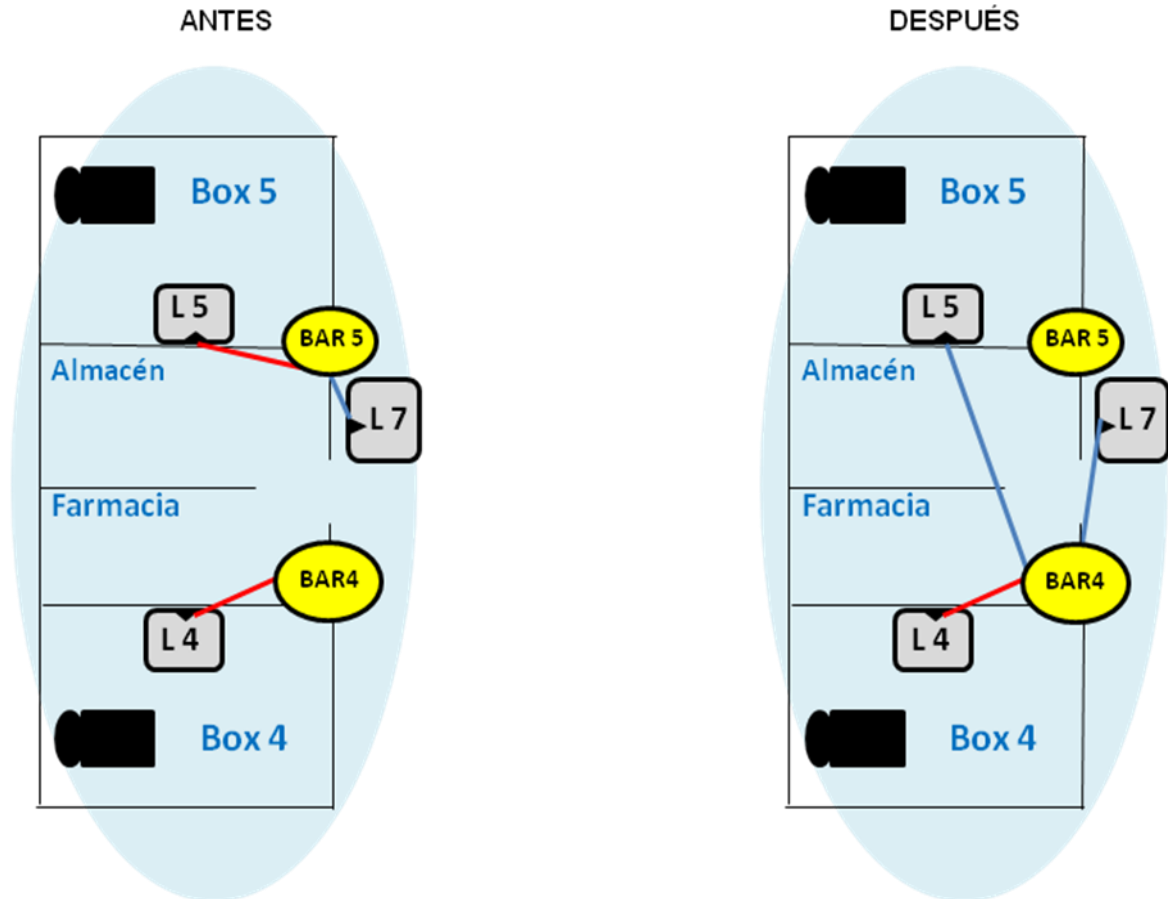


Figura 6. Eliminación del lavabo 6 y sustitución del sistema de desagüe del lavabo 7.



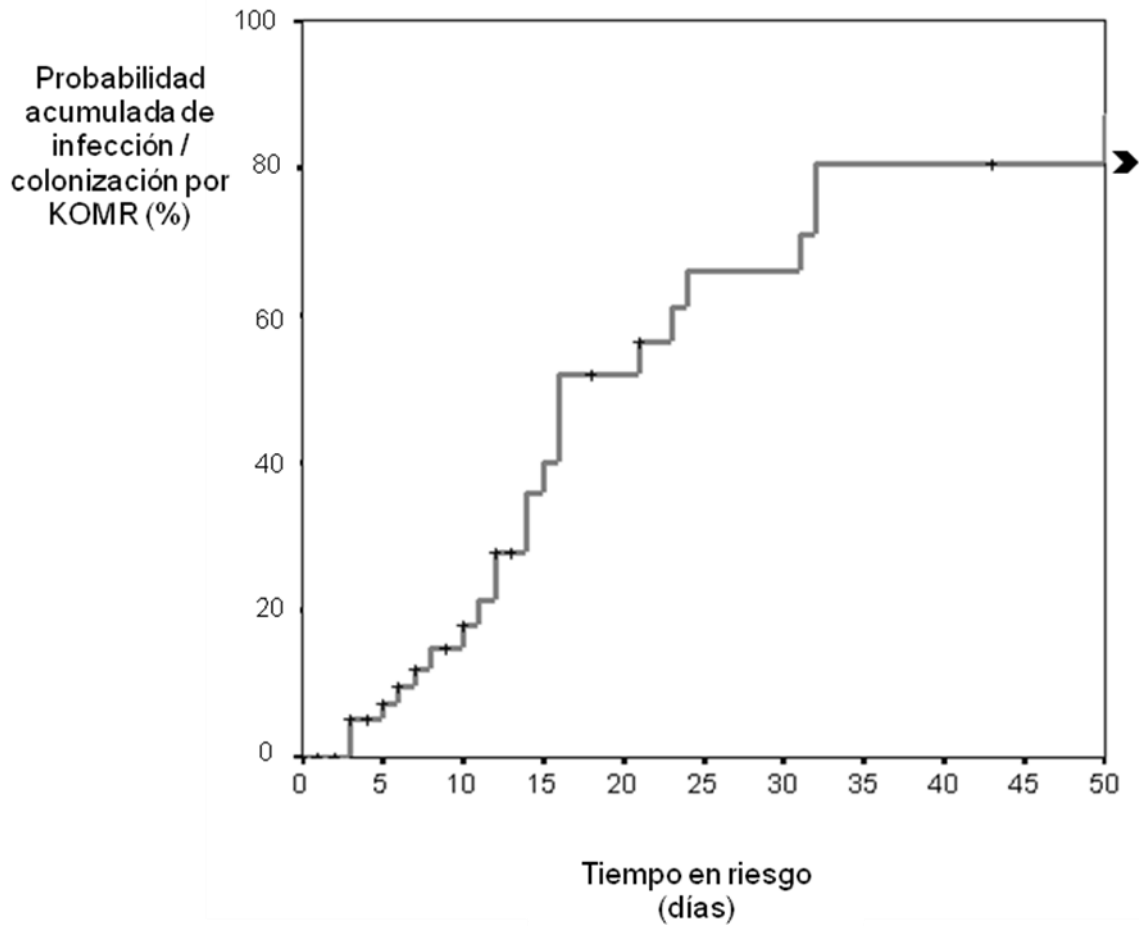
Símbolos: Cuadrado gris: lavabo (L); círculo amarillo: bajante aguas residuales (BAR); línea roja: tubería de desagüe antigua; línea azul: tubería de desagüe nueva.

Figura 7. Aislamiento del bajante 5 y derivación de las tuberías de desagüe de los lavabos 5 y 7 hacia el bajante 4.



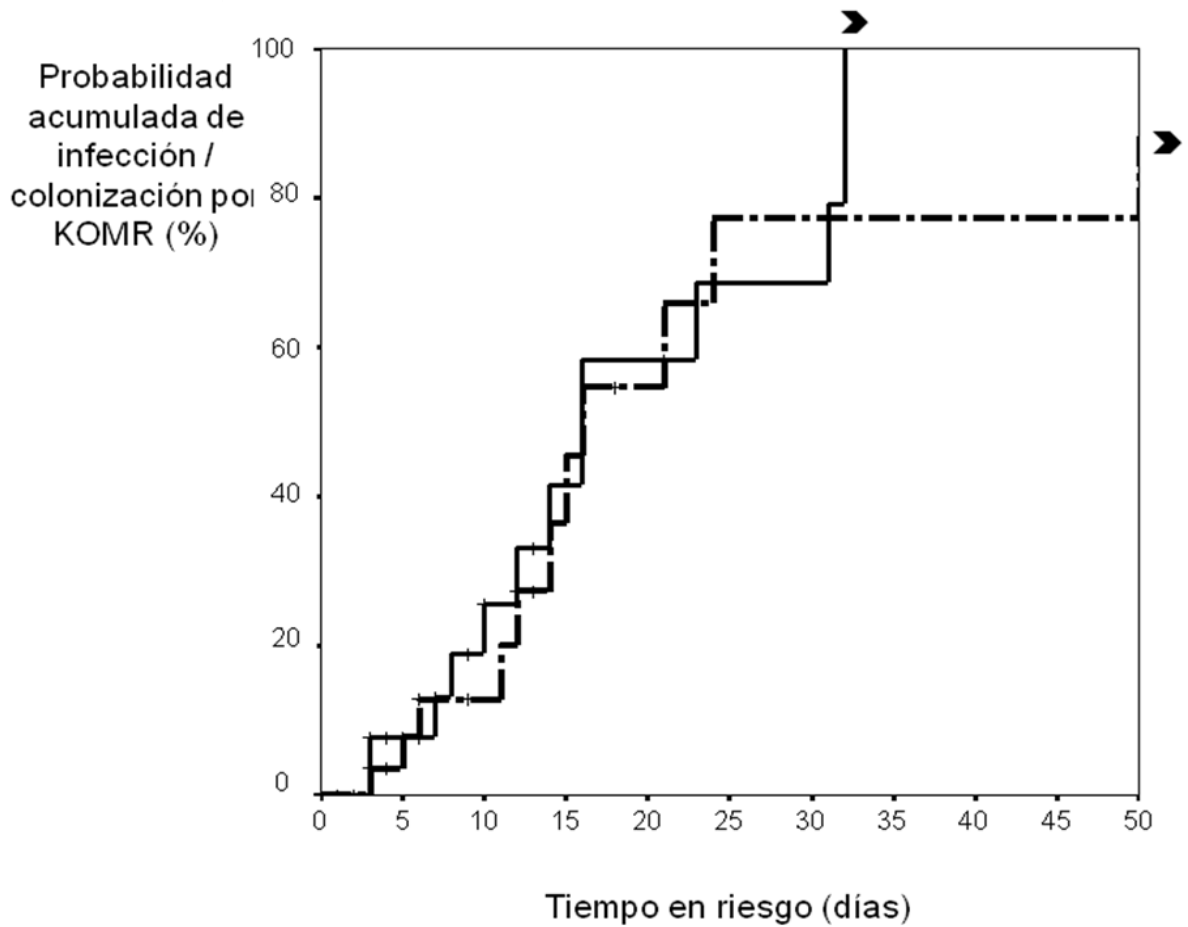
Símbolos: Cuadrado gris: lavabo (L); círculo amarillo: bajante aguas residuales (BAR); línea roja: tubería de desagüe antigua; línea azul: tubería de desagüe nueva.

Figura 8. Probabilidad acumulada de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} durante las dos primeras oleadas del brote.



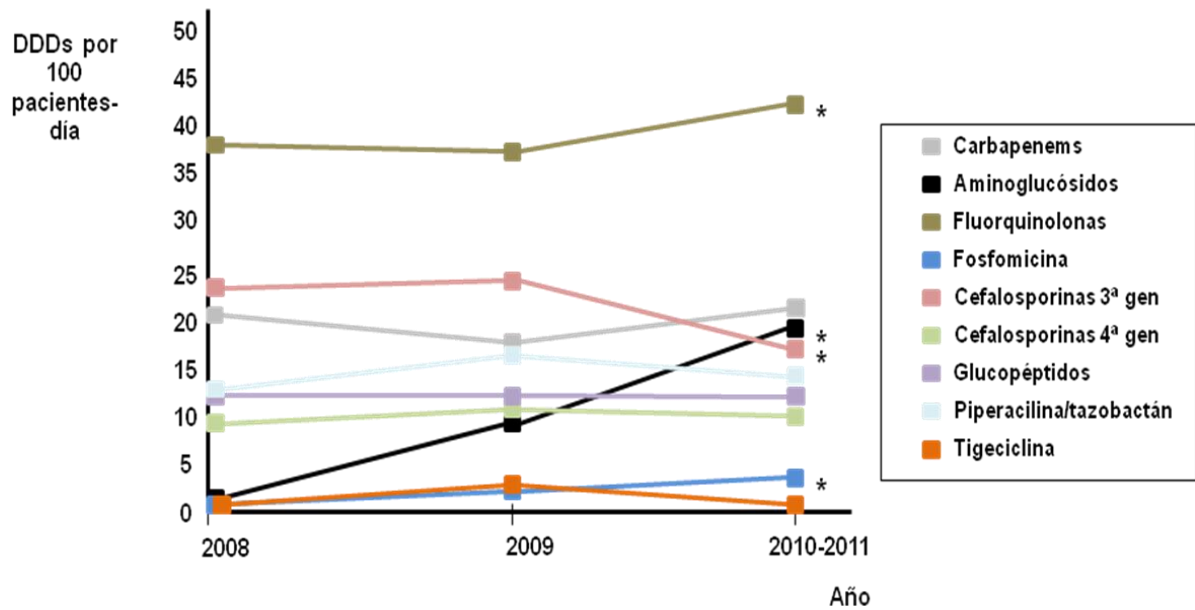
Fecha negra: los dos últimos pacientes fueron colonizados después de 85 y 230 días de ingreso en la UCI.

Figura 9. Probabilidad acumulada de infección y/o colonización por KOX_{IMP-8} según el nivel de presión de colonización.



Fecha negra: los dos últimos pacientes fueron colonizados después de 85 y 230 días de ingreso en la UCI; línea continua: alto nivel de presión de colonización; línea discontinua: bajo nivel de presión de colonización.

Figura 10. Consumo de antimicrobianos antes, durante y después del brote nosocomial por *KOX*_{IMP-8}.

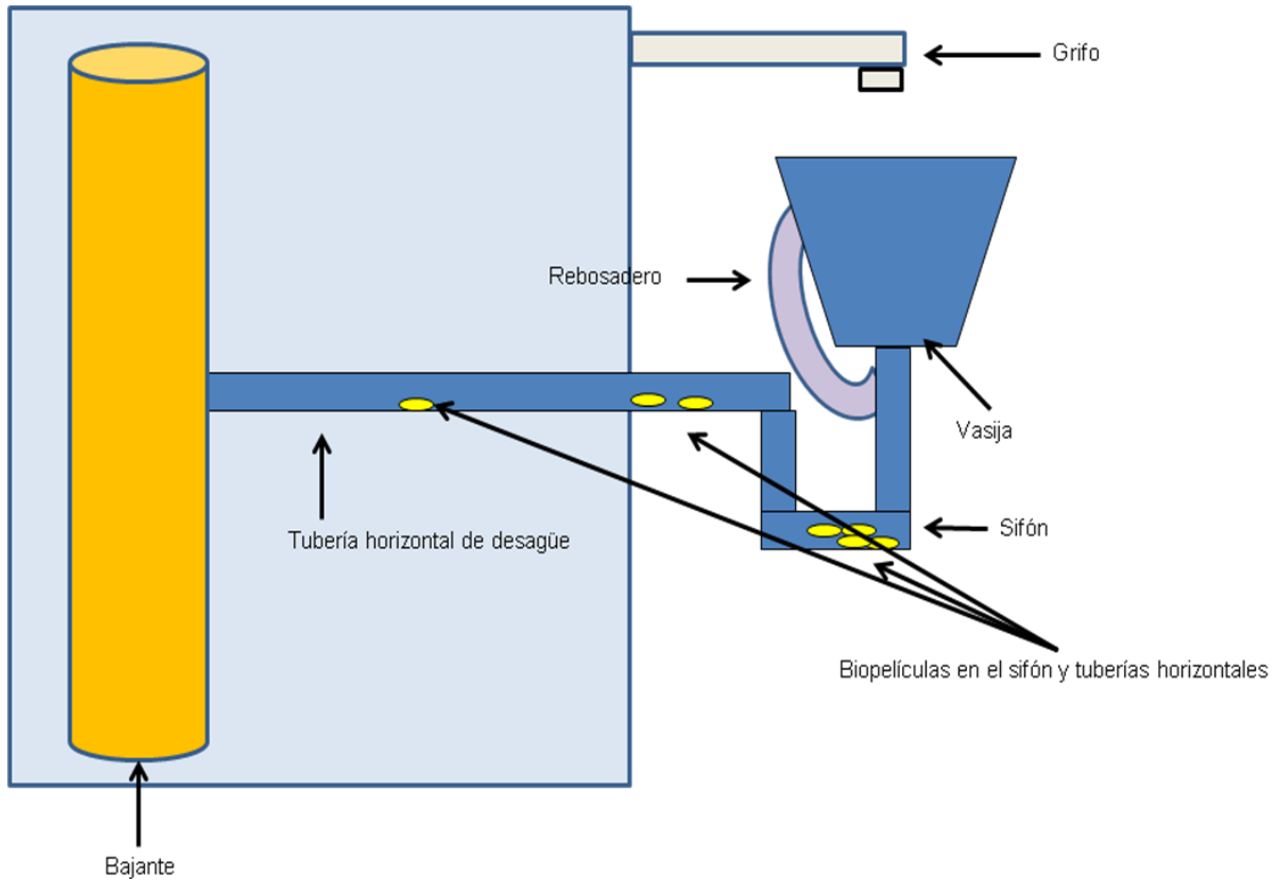


DDD: Dosis diaria definida; *p < 0,05; aminoglucósidos: amicacina, tobramicina, gentamicina; carbapenémicos: imipenem; fluorquinolonas: ciprofloxacino, levofloxacino; cefalosporinas 3ª gen: ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima; cefalosporinas 4ª gen: cefepima; glucopéptidos: vancomicina.

Figura 12. Representación de los lavabos como reservorios permanentes

[Adaptado de (170)].

12 a. Grifo Cerrado



12 b. Grifo abierto

