



11262  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

9

29

ANALISIS EPIDEMIOLOGICO, MICROBIOLOGICO  
Y MOLECULAR DE LA RESISTENCIA POR  
GRAMNEGATIVOS EN LAS INFECCIONES INTRA-  
HOSPITALARIAS EN UNA INSTITUCION DEL  
TERCER NIVEL DEL SISTEMA DE SALUD  
MEXICANO.

11262  
FACULTAD DE MEDICINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS  
P R E S E N T A :

MANUEL SIGFRIDO RANGEL FRAUSTO

Departamento de Infectología  
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

México, D. F.

1992



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
<b>4. JUSTIFICACION</b>	<b>11</b>
<b>5. HIPOTESIS</b>	<b>13</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
<b>7. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>15</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>23</b>
<b>9. DISCUSION</b>	<b>42</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>54</b>
<b>12. ANEXOS</b>	<b>65</b>

## RESUMEN

**Propósito.** Conocer la frecuencia de infecciones producidas por gramnegativos multirresistentes, los factores de riesgo involucrados, las características de los microorganismos, así como sus posibles mecanismos de resistencia y de transmisión dentro del hospital.

**Diseño.** Estudio prolectivo de casos y controles.

**Lugar.** Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", México, D.F.

**Pacientes.** Se incluyeron dos grupos: 80 individuos con infecciones intrahospitalarias por bacilos gramnegativos multirresistentes (casos) y 40 con infecciones por bacilos gramnegativos no multirresistentes (controles).

**Resultados.** La frecuencia de infecciones por gramnegativos fue de 7.5 por cada 100 egresos y constituyeron el 81% de las infecciones nosocomiales, las multirresistentes fueron dos veces más frecuentes que las no multirresistentes. Los factores de riesgo relacionados con la adquisición de una infección por bacilos gramnegativos multirresistente fueron: estancia intrahospitalaria mayor de 15 días, hospitalización en urgencias y/o terapia intensiva, administración de antibióticos y el empleo de éstos por más de dos semanas. La prescripción de esquemas combinados que incluyeron  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos y metronidazol o clindamicina fueron los que más se asociaron a este tipo de infecciones. Durante el estudio se observó un brote de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente en la unidad de cuidados intensivos asociado a colonización del agua de los nebulizadores de pacientes con los factores de riesgo mencionados. La frecuencia de resistencia a ampicilina en enterobacterias fue del 42% y para pseudomonas 64%; a  $\beta$ -lactámicos, en enterobacterias fue: piperacilina 68%, cefotaxima 57%, cefoperazona 45% y ceftazidima 40%; en pseudomonas: piperacilina 86%, cefotaxima 78%, cefoperazona 81% y ceftazidima 67%. La concentración inhibitoria mínima de  $\beta$ -lactámicos en pseudomonas, klebsiella y serratia disminuyó claramente en presencia de inhibidores de  $\beta$ -lactamasa lo que sugiere que esta especie es  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro, fenómeno no encontrado en citrobacter y enterobacter. Los aislamientos de klebsiella, serratia y pseudomonas mostraron un patrón similar de plásmidos (26 y 40 Kb), mismo que se encontró en todas las pseudomonas descritas en el brote de multirresistencia.

**Conclusiones.** Las infecciones por bacilos gramnegativos fueron altamente prevalentes en este estudio. Los pacientes internados en la unidad de cuidados intensivos y urgencias, así como aquellos que reciben de antibióticos, particularmente el empleo de triple esiqueta, por más de dos semanas, tienen mayor riesgo de adquirir infecciones nosocomiales por bacilos gramnegativos multirresistentes. El análisis de plásmidos permitió identificar a un microorganismo, como responsable de un brote en la unidad de terapia intensiva. Se identificó un patrón de resistencia semejante con un perfil de plásmidos (40 y 26 Kb) entre klebsiella, serratia y pseudomonas.

## ABSTRACT

**Purpose.** To know the frequency of nosocomial multiresistant gramnegative infections, the risk factors associated, their resistance profiles, and their mechanisms of resistance and dissemination in the hospital.

**Design.** Prolective case-control study.

**Patients.** Two groups of patients were included: inpatients with multiresistant nosocomial gramnegative infections (80 cases), and 40 inpatients with non-multiresistant gramnegative infections (controls).

**Results.** Nosocomial gramnegative infections were 7.5/100 inpatients, being 61% of the nosocomial infections, multiresistant gramnegative infections were two times more frequently than non-multiresistant ones. Hospital stay longer than 15 days, previous antibiotic use, time of antibiotic use, being in emergency room/ICU, were the risk factors associated with multiresistant nosocomial infections. Use of combined therapy ( $\beta$ -lactams + aminoglycosides + clydaniticin or metronidazole) were associated with a higher risk for a multiresistant nosocomial infection. During the study, an outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* was detected in ICU which was associated with the colonization of the nebulizator's water. Enterobacterias and pseudomonas were found resistant to amikacin in 42% and 64% respectively. The frequency of  $\beta$ -lactams resistance in enterobacterias was: piperacillin 68%, cefotaxime 57%, cefoperazone 45% and ceftazidime 40%. Pseudomonas was found resistant to piperacillin in 86%, cefotaxime 78%, cefoperazone 81%, and ceftazidime 67%. The combination with  $\beta$ -lactams and their inhibitors reduced the minimum inhibitory concentration needed, this suggests the possibility of the presence of a broad spectrum  $\beta$ -lactamase. A common plasmid was found in klebsiella, serratia and pseudomonas tested, this was found in the pseudomonas from the outbreak.

**Conclusions.** A high prevalence of gramnegative multiresistant nosocomial infection was observed. Emergency room and ICU were the hospital areas with the highest risk to acquired a multiresistant infection. Previous antibiotic use, particularly combined therapy was associated with multiresistant nosocomial infections. The plasmid profile allow us to identify the strain responsible of the outbreak.

## INTRODUCCION

En México, el escaso conocimiento sobre la resistencia antimicrobiana ha favorecido que el empleo de los antibióticos se rija de acuerdo a los patrones establecidos en países desarrollados; sin embargo, el comportamiento de la resistencia en dichos países aunque con tendencia al aumento, parece haberse estabilizado (1), no así en países como México y otros en desarrollo donde este fenómeno continua aumentando desproporcionadamente (2). Lo anterior es debido en parte, al uso indiscriminado de antibióticos y la amplia práctica de la automedicación, sin que hasta el momento se hayan establecido medidas de control por las autoridades de salud, permitiendo así, el surgimiento de microorganismos resistentes a una gran variedad de antimicrobianos, especialmente entre los bacilos gramnegativos y de éstos, entre las enterobacterias y pseudomonas (3,4).

Las infecciones adquiridas dentro del hospital son causas significativas de morbi-mortalidad, y se definen como infecciones que ocurren en pacientes después de 48-72 hrs. de su ingreso y que no se encontraban presentes o en período de incubación al momento de su admisión, o que se presentan una vez que el paciente ha sido egresado del hospital (5,6). Las infecciones nosocomiales se presentan en el 2 al 10% de los pacientes admitidos a hospitales generales; sin embargo, estas cifras pueden llegar a ser mayores en centros de tercer nivel (7,8), debido generalmente a la naturaleza de las enfermedades subyacentes que tienen los pacientes atendidos en esos centros. Estas infecciones se asocian con un 3% de mortalidad en algunos hospitales de Norteamérica (9) y son responsables de hasta 60 000 muertes anuales directa o indirectamente atribuidas a éstas. En México se ha calculado que las infecciones nosocomiales pueden ser responsables de 150,000 muertes al año convirtiéndose en la cuarta causa de mortalidad general (8). La importancia de las

infecciones nosocomiales radica además, en el aumento de la estancia hospitalaria y en el incremento del costo de la misma (10).

Las infecciones de vías urinarias, heridas, neumonías y bacteremias son las principales infecciones nosocomiales y son frecuentemente producidas por bacilos gramnegativos como: *Klebsiellae spp*, *Pseudomonas spp*, *Serratia spp*, *Enterobacter spp* y *Citrobacter spp*, microorganismos que, después de *Escherichia coli*, más se relacionan con estas infecciones (5,6,11,12), debido seguramente a que sus probres requerimientos nutricionales les permiten conservarse fácilmente en reservorios inanimados del ambiente hospitalario (11,13,14).

Las condiciones que favorecen una mayor morbi-mortalidad al adquirir este tipo de infecciones, son que los bacilos gramnegativos adquirieren resistencia con más frecuencia que los grampositivos (11,15), la segunda, es que los pacientes que adquieren este tipo de infecciones generalmente tienen enfermedades subyacentes más graves que aquellos que se infectan por microorganismos sensibles (16); sin embargo, la mortalidad elevada no es sólo favorecida por la falta de opciones terapéuticas, sino también, muy probablemente a que las bacterias multirresistentes sean más patógenas, aunque esto último no ha sido demostrado consistentemente (17). Finalmente, la elevada frecuencia con que se emplean esquemas de antibióticos seleccionados empíricamente para el manejo de infecciones graves, condiciona un mayor número de fallas terapéuticas, como efecto resultante de un aumento de la resistencia, los antibióticos utilizados para el tratamiento de estas infecciones son más tóxicos o más caros, y con más frecuencia su eficacia está menos demostrada (18).

La adquisición de una infección por bacilos gramnegativos multirresistentes tiene como antecedente frecuente el uso previo de antibióticos, debido a la selección

producida por el antimicrobiano a expensas de competidores susceptibles (18-22). Desafortunadamente estos fenómenos no se limitan a un sólo individuo (23), lo que sugiere la existencia de mecanismos que permiten la diseminación de estos microorganismos, tales como fomites (instrumental, material de curación), o las propias manos del personal de salud (23). Tal diseminación de microorganismos resistentes dentro del hospital constituye un grave problema, debido a su elevada morbimortalidad, así como al impacto económico producido por el tratamiento de complicaciones, el consumo de antibióticos y el tiempo de estancia hospitalaria (22).

La creciente emergencia de infecciones por microorganismos multirresistentes ha estimulado la formulación de recomendaciones sobre el uso de antimicrobianos (4,24,25), que junto con el conocimiento de los patrones epidemiológicos de resistencia (26) demandarían un uso más racional de los antibióticos (24,25); sin embargo, esto aún está limitado a pocos centros hospitalarios por lo que el consumo de antimicrobianos continúa siendo indiscriminado en la inmensa mayoría de los hospitales (27).

En la mayoría de las especies bacterianas, los mecanismos de resistencia son múltiples y representan la capacidad de los microorganismos de sobrevivir en ambientes hostiles, a través de la adquisición de determinantes genéticos, cuyo origen puede ser la mutación o la herencia (28-30). En el caso de las mutaciones, éstas son el resultado de alteraciones en la secuencia del ADN del cromosoma bacteriano, lo que se traduce en la síntesis de proteínas alteradas, pero todavía funcionales, estas proteínas tienen la capacidad de alterar importantemente la acción del antimicrobiano gracias a la modificación de los componentes de la pared celular, y membrana externa y modificación de la afinidad de los receptores para ciertos antibióticos que alteran el transporte del medicamento o su unión. Epidemiológicamente las mutaciones no contribuyen importantemente al desarrollo

de resistencia, siendo la razón doble: 1) Depende de determinantes cromosómicas que no participan en la transmisión de resistencia entre diferentes especies, y 2) Las bacterias mutantes tienen alteraciones metabólicas por lo que están en desventaja comparadas con sus congéneres no mutantes (29). Los agentes antimicrobianos no inducen propiamente la aparición de mutantes resistentes, las mutaciones aparecen espontáneamente como resultado del daño químico al ADN, y los antimicrobianos proveen "la presión", para la selección de las mutantes que obtuvieron mecanismos de resistencia y son capaces de sobrevivir.

El segundo mecanismo es la herencia, la cual depende de plásmidos (31), éstos han sido aislados de casi todas las especies bacterianas, son estables y pueden heredarse sin estar unidos al cromosoma, constituyen del 1 al 3% del genoma celular (33) y poseen diversas determinantes genéticas. Las bacterias comúnmente tienen dos o más plásmidos diferentes en coexistencia y codifican para diferentes propiedades: vías metabólicas, factores de virulencia, y resistencia a antibióticos, entre otros (28,29,31). Se les llama factores "R" a los que codifican la resistencia antimicrobiana, una proporción importante de ellos son conjugables o transferibles, es decir, son capaces de transferir copias de sí mismos de una bacteria a otra, muchos de ellos son capaces de codificar para la síntesis de proteínas tubulares y se cree que a través de ellos el ADN se transmite de una célula a otra (32,33). Los plásmidos no son esenciales para el metabolismo de la célula, su pérdida es permanente ya que la célula no puede regenerarlo, sino solo adquirirlo de otra bacteria.

Existen otras moléculas capaces de conferir resistencia: transposones y secuencias de inserción. Los primeros son segmentos de ADN que se encuentran frecuentemente en los plásmidos y/o en el cromosoma bacteriano y codifican para más de una de las importantes características especificadas por los plásmidos, tales como resistencia a antimicrobianos y producción de toxinas. Los segundos son más

pequeños y generalmente sólo codifican para la expresión de una característica (33,34).

El tratamiento de infecciones por bacilos gramnegativos incluye el uso de dos grupos de antibióticos principalmente: a)  $\beta$ -lactámicos, los cuales inhiben la síntesis de pared celular, gracias a su unión a las proteínas fijadoras de penicilinas, enzimas con actividad de trans y carboxipeptidasas, y que catalizan la síntesis del polímero de la pared celular, el peptidoglicano, el cual es indispensable para el mantenimiento de la estructura y rigidez de la pared celular. La unión de los  $\beta$ -lactámicos a estas proteínas previene la formación de enlaces peptídicos, produciendo una pared celular débil; y además activa otras enzimas: las autolisinas, responsables de la degradación de la pared celular, resultando en un imbalance entre síntesis y degradación de la misma, con destrucción de la bacteria (35,36). b) Aminoglicósidos, los cuales inhiben la síntesis de proteínas al unirse en uno o más sitios en los ribosomas, especialmente en la subunidad pequeña; para unirse a los ribosomas requieren ser transportados intracelularmente a través de un mecanismo activo cuya energética depende de un gradiente electromecánico de protones (37,38).

Las bacterias resistentes a  $\beta$ -lactámicos hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de penicilinas y cefalosporinas, gracias a la presencia de enzimas codificadas cromosómicamente, o por plásmidos (39). Aunque estas enzimas son cada vez más numerosas y por lo tanto de difícil clasificación pueden ser diferenciadas en cuatro tipos principalmente (ver tabla 1), que varían en la especificidad por sus substratos, inhibidores, características físicas, de inhibición, punto isoeléctrico, peso molecular, composición de aminoácidos, que aunque variable, éste último, generalmente es altamente constante en el sitio activo (40).

Tabla 1  
Clasificación  $\beta$ -Lactamasas

GRUPO	NOMBRE	SUBSTRATOS	AC	EDTA	CODIFICA
1	CEP-N	CEFALOSPORINA	NO	NO	CROMOSOMA
2a	PEN-Y	PENICILINAS	SI	NO	GRAM +
2b	BDS-Y	CEFALOSPORINA PENICILINAS	SI	NO	PLASMIDOS TEM-1, TEM-2
2b'	EBS-Y	CEFALOSPORINA PENICILINAS, CEFOTAXIMA.	SI	NO	PLASMIDOS TEM-3, TEM-5
2c	CAR-Y	PENICILINAS, CARBENICILINA	SI	NO	PLASMIDOS PSE-1, PSE-3
2d	CLX-Y	PENICILINAS, CLOXACILINA	SI	NO	PLASMIDOS OXA-1, PSE-2
2e	CEP-Y	CEFALOSPORINA	SI	NO	<i>Proteus vulgaris</i>
3	MET-N	VARIABLE	NO	SI	CROMOSOMA, <i>P. maltophilia</i>
4	PEN-N	PENICILINAS	NO	?	CROMOSOMA, <i>P. cepacia</i> .

CEP, cefalosporinas; PEN, penicilinas; BDS, amplio espectro; EBS, amplio espectro extenso; CAR, carbenicilina; CLX, cloxacilina; MET, metales; AC, ácido clavulánico; EDTA, etilendiaminotetracético.

Un punto importante en la evolución de resistencia a  $\beta$ -lactámicos lo constituye la aparición de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, medicamentos considerados en la actualidad de elección para el tratamiento de infecciones por enterobacterias y *Pseudomonas* spp; la aparición de resistencia a dichos antibióticos fue por la aparición de  $\beta$ -lactamasas del tipo cromosómico (40,41), clasificadas dentro del grupo 1 de  $\beta$ -lactamasas, (ver tabla 1) y se han descrito entre

gramnegativos principalmente en *E. cloacae*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *K. oxytoca*, y *P. aeruginosa* (42). Desde su descripción inicial hasta la actualidad se han descrito más de 50 tipos de  $\beta$ -lactamasas que pertenecen a este grupo (42-46).

En 1984 se observó la aparición primero en Francia, y posteriormente en otros países europeos y en sudamérica, de brotes de infecciones nosocomiales producidos por *K. pneumoniae* y posteriormente por otras enterobacterias resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos, excepto cefamicinas e imipenem. Esta nueva resistencia era dependiente de la producción de  $\beta$ -lactamasas codificadas por plásmidos con una alta actividad hidrolítica contra cefotaxima, designada como CTX-1. (47,50). Posteriormente otra  $\beta$ -lactamasas codificada también por plásmidos fue aislada en microorganismos provenientes de pacientes de una unidad de terapia intensiva (CAZ-1), la cual expresaba una mayor resistencia a ceftazidima que a cefotaxima (51,52). Estas nuevas  $\beta$ -lactamasas se han agrupado dentro del grupo 2b y 2b' (amplio espectro y amplio espectro extenso, Tabla 1). Ambas son capaces de hidrolizar ureidopenicilinas y penicilinas pero varían una de otra en sus puntos isoelectrónicos y en la afinidad por sus sustratos. Estas  $\beta$ -lactamasas a diferencia de las clase I son inhibidas por ácido clavulánico (53,54).

Existen tres tipos principales de resistencia a aminoglicósidos (55): 1. Alteración del sitio blanco dentro de la célula bacteriana, debido a un cambio en la afinidad de las proteínas de los ribosomas que se unen a los aminoglicósidos. 2. Interferencia con el transporte dentro de la célula por cambios en la permeabilidad de la membrana celular. Estos dos mecanismos son secundarios habitualmente a mutaciones que en ocasiones pueden adquirirse durante el tratamiento siendo responsables, como en el caso de la resistencia a amikacina por *P. aeruginosa* (56). 3. Modificación enzimática con subsecuente inactivación de los aminoglicósidos por tres mecanismos: acetilación de grupos amino por acetiltransferasas, fosforilación de

grupos hidroxilo por fosfotransferasas, y adenilación de grupos hidroxilos por adeniltransferasas. Todas estas enzimas tienen diferente afinidad y con frecuencia actúan sobre una gran variedad de sustratos, y están ampliamente distribuidas, tanto entre grampositivos como entre bacilos gramnegativos, lo que explica la frecuente resistencia múltiple y cruzada. Este último tipo de resistencia se ha encontrado con frecuencia variable: entre gramnegativos va desde un 37% (en *Pseudomonas*) hasta un 98% (en *Serratia*) (57). Las acetiltransferasas son las enzimas más frecuentemente involucradas en la resistencia entre gramnegativos a aminoglicósidos especialmente gentamicina y tobramicina y con menos frecuencia a amikacina. En algunos países en los que la amikacina ha aumentado su uso, la resistencia dependiente de la producción de una acetiltransferasa (*aacA*) descrita inicialmente como codificada en un gen cromosómico, se ha establecido actualmente su origen plasmídico (58); que en ocasiones expresa resistencia a gentamicina, y que el cual es del tipo no conjugativo (59).

La diseminación de la resistencia puede hacerse por cuatro mecanismos: Primero: clonal, donde una sola clona bacteriana puede volverse resistente por mutación o herencia de un solo plásmido que codifica la resistencia a uno o varios antimicrobianos. Segundo: por transferencia, en el que un microorganismo puede heredar un plásmido resistente que se ha diseminado en especies diferentes. Tercero: mixta, donde existe una combinación de los mecanismos anteriores. Cuarto: transposición, la que resulta de la distribución de un tipo fijo de determinantes de resistencia, por ejemplo,  $\beta$ -lactamasas, que pueden estar presentes en un elemento transportable como plásmidos, transposones o secuencias de inserción (28,29,33). Todos estos mecanismos solos o en combinación pueden contribuir a la diseminación de patrones de resistencia similares en una área del hospital, en varias áreas o incluso en diferentes hospitales de una misma ciudad o ciudades (60-64).

## JUSTIFICACION.

Los microorganismos más frecuentemente responsables de infecciones nosocomiales son miembros de la tribu *Klebsielleae* spp (*Klebsiella*, *Serratia*, y *Enterobacter*), *Citrobacter* spp y *Pseudomonas* spp los cuales en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ) ocasionan el 80% de las infecciones nosocomiales y su sensibilidad a  $\beta$ -lactámicos va del 25-75% (65). En otros centros hospitalarios la frecuencia de infecciones resistentes por gramnegativos es también muy elevada y en el caso del Hospital de Especialidades de CMN (IMSS) (66), se ha informado que la resistencia de *Pseudomonas* spp a cefalosporinas de tercera generación alcanza el 65% y a gentamicina hasta el 40%, en el INNSZ varía entre 40 y 50% respectivamente (65,66).

Ya que los microorganismos mencionados constituyen la causa más común de infecciones nosocomiales, y son las que se asocian con más frecuencia a resistencia a los antimicrobianos de uso común, se hace indispensable ampliar el conocimiento del comportamiento de dichos gérmenes a estos antibióticos, así como entender los mecanismos involucrados en la génesis de resistencia, identificar los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de infección o resistencia y modificar en la medida de lo posible la generación, diseminación y perpetuación de la misma.

Nuestro propósito a través de este trabajo fue determinar la prevalencia de la resistencia a aminoglicósidos y  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro, antimicrobianos de uso común en el tratamiento de infecciones por gérmenes gramnegativos, con mucho uno de nuestros más serios problemas, los factores de riesgo relacionados con la adquisición de infecciones por microorganismos multirresistentes para establecer acciones que nos permitan su control, el patrón de resistencia entre los bacilos gramnegativos mencionados con anterioridad, y dado que la resistencia depende de la presencia de plásmidos que codifican para la producción de enzimas tipo  $\beta$ -lactamasas y/o inactivadoras de aminoglicósidos los empleamos como marcadores epidemiológicos y/o como responsables de la resistencia (67).

### HIPOTESIS.

El uso de antimicrobianos en el hospital favorece la selección de microorganismos gramnegativos multirresistentes dependientes de la transmisión de uno o varios factores comunes responsables de la misma.

Consideramos que probablemente la resistencia a aminoglicósidos y  $\beta$ -lactámicos está condicionada por la presencia entre los gramnegativos de uno o varios plásmidos de tamaño relativamente grande (40 Kb aproximadamente).

## OBJETIVO GENERAL.

Determinar la frecuencia de resistencia en infecciones intrahospitalarias causadas por gramnegativos en una institución de tercer nivel del sistema de salud de México. Definir el impacto del empleo de antimicrobianos y la aparición de resistencia y en la morbi mortalidad. Identificar las áreas de hospitalización con mayor riesgo, los factores relacionados con su aparición, las especies de gramnegativos con mayor índice de resistencia, y en ellas determinar la frecuencia de resistencia mediada por plásmidos, tanto a  $\beta$ -lactámicos como aminoglicósidos, y establecer medidas potenciales para su control.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la frecuencia de infecciones intrahospitalarias causadas por gérmenes gramnegativos resistentes a aminoglicósidos (amikacina, gentamicina, tobramicina y netilmicina) y  $\beta$ -lactámicos (carbenicilina, piperacilina, cefotaxima, cefoperazona y ceftazidima) entre la tribu *Klebsiellae* (*Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Enterobacter* spp.), *Pseudomonas* spp., y *Citrobacter* spp.
2. Identificar las áreas de hospitalización con mayor índice de resistencia.
3. Establecer la relación entre uso previo de antibióticos y aparición de la misma.
4. Determinar la frecuencia de la resistencia mediada por plásmidos, estableciendo grupos de acuerdo a sus características.

## MATERIAL Y METODOS.

### Diseño del estudio.

Fue un ensayo prolectivo, transversal, observacional de grupos comparativos (casos y controles) entre pacientes con infecciones por bacilos gramnegativos multirresistentes y sensibles.

### Pacientes.

Se incluyeron todos los individuos en quienes se identificó una infección intrahospitalaria ocasionada por microorganismos pertenecientes a la tribu *Klebsiellae* (*Klebsiella*, *Serratia*, y *Enterobacter*), al género *Pseudomonas* spp. y al género *Citrobacter* spp. atendidos en el Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán de abril de 1989 a marzo de 1990. Se distribuyeron en dos grupos: casos y controles.

Características de los casos. Pacientes con infección intrahospitalaria por los bacilos gramnegativos ya mencionados, resistentes a por lo menos dos aminoglucósidos más uno o más  $\beta$ -lactámicos, exceptuando *Klebsiella* spp. en la que debía de ser resistente a un  $\beta$ -lactámico distinto a carbenicilina por considerarse normalmente resistente a ésta.

Características de los controles. Pacientes con infección intrahospitalaria por bacilos gramnegativos de las mismas especies que las mencionadas para los casos, que fueran sensibles a todos los antibióticos del estudio, o bien, resistentes a no más de uno de ellos.

Criterios de inclusión. 1. Se incluyeron todos aquellos pacientes con infecciones por alguno de los bacilos gramnegativos ya mencionados. 2. Se incluyeron sólo aquellos con cultivos positivos tomados de acuerdo a normas establecidas en el manual de procedimientos de Microbiología Clínica (68,69) y que correspondieran a infecciones documentadas.

Criterios de exclusión. 1. Se excluyeron los pacientes con muestras que contenían más de dos gérmenes en los que por cuenta de colonias no se encontró uno predominante. 2. Se excluyeron aquellos casos de infección que se reconocieron como resistentes inicialmente (Kirby-Bauer) pero que con las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de confirmación (microdilución) se encontraron sensibles.

#### Definiciones de infecciones.

1. Infección. Los bacilos gramnegativos aislados de muestras clínicas e incluidos en el estudio se consideraron causantes de infección en las siguientes circunstancias:

a) Heridas: con evidencia de inflamación, secreción purulenta en el que el bacilo gramnegativo fuera el germen único o predominante

b) Neumonía: Pacientes con sospecha clínica de neumonía con dos de los siguientes criterios: fiebre, leucocitosis  $>10\ 000$ , tos con expectoración purulenta, síndrome de condensación pulmonar o insuficiencia respiratoria, y radiografía de tórax con imagen sugestiva de neumonía, y en quien además se tuvo confirmación microbiológica en alguna de las siguientes muestras: expectoración con más de 25 leucocitos y menos de 10 células epiteliales por campo al examen microscópico (10X) (70). Punción transtraqueal con el aislamiento del bacilo gramnegativo. La muestra obtenida por broncoscopia o sonda endotraqueal se consideró infectante si la cuenta mayor de  $10\ 000$  UFC/mL o predominancia el bacilo gramnegativo como predominante. Biopsia con aislamiento puro o predominante del bacilo

gramnegativo.

c) Hemocultivo: aislamiento del bacilo gramnegativo en una o más muestras (71).

d) Orina: cuenta igual o mayor de  $10^5$  UFC/mL si el aislamiento era de muestra obtenida de chorro medio en paciente sintomático. Con cuenta de 100 UFC/mL o más si la muestra era obtenida por punción de sonda de Foley (68), y presencia del germen cuando la muestra se hubiese obtenido por punción suprapúbica.

e) Otros líquidos normalmente estériles: cefaloraquídeo, pleural, articular. Se consideraron cuando el microorganismo fuera único o predominante (68).

2. Colonización. Aislamientos de bacilos gramnegativos del estudio que no reunieran los criterios antes mencionados y por lo tanto no fueron incluidos en el estudio.

3. Infección nosocomial. Cuando la infección se hubiera hecho aparente después de 48-72 horas de hospitalización y que no se encontrara presente o en período de incubación al momento del ingreso (72-73).

#### Tamaño de la muestra.

El tamaño se calculó en base al factor más importante considerado en nuestra hipótesis (uso previo de antibióticos), con una magnitud del riesgo a detectar (R) de 4 y una exposición al factor de riesgo de 50%. Con un error alfa unimarginal de 0.05 y un error beta unimarginal de 0.20. Por lo que resultaron necesarios 40 casos y 40 controles (74,75).

### **Estudio de Casos y Controles.**

Con el objeto de investigar los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de infecciones por microorganismos resistentes, se efectuó un registro de las siguientes variables recolectados en un formato especial (ver anexo I):

a) Demográficas. Nombre, edad, sexo, registro, fecha de ingreso, area, y tiempo de hospitalización.

b) Clínicas. Diagnósticos de ingreso; procedimientos invasivos (endoscopias); intervenciones quirúrgicas en el presente internamiento o en las últimas cuatro semanas antes de su ingreso; presencia de catéteres, empleo de nutrición parenteral; sitio de infección documentado; sitio de aislamiento; uso previo de antibióticos hasta en las cuatro semanas previas al desarrollo de la infección resistente, tiempo y dosis recibidas; germen identificado; patrón de sensibilidad y tratamiento actual, fármacos y dosis.

c) Evolución. Se analizó la mortalidad cruda en ambos grupos.

### **Identificación de los microorganismos.**

La identificación de las enterobacterias se hizo por un micrométodo comercial API 20E (Analytab Products, Plainview, N.Y.), de uso habitual en el laboratorio de Microbiología Clínica, y en el caso de *Pseudomonas* spp se efectuaron pruebas de oxidación y fermentación de glucosa, crecimiento en Müller-Hinton a 42°C, pruebas para descarboxilasas: lisina, ornitina y arginina, y reducción de nitratos a nitritos (76) (Ver anexo II).

### **Sensibilidad antimicrobiana.**

La sensibilidad antimicrobiana se hizo inicialmente por: a) Difusión en agar de Müller-Hinton suplementado (Ca<sup>++</sup> 25 mg/L, y Mg<sup>++</sup> 12.5 mg/L) utilizando discos impregnados con soluciones de los siguientes antibióticos: amikacina, gentamicina, netilmicina, tobramicina, piperacilina, carbenicilina, cefotaxima, ceftriaxona,

ceftazidima y cefoperazona, utilizando una suspensión bacteriana semejante a la turbidez del estándar 0.5 de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), siguiendo las recomendaciones de el "National Comitee Clinical Laboratories Standards" (NCCLS) (77) (ver anexo III). b) Toda resistencia se corroboró midiendo la concentración inhibitoria mínima (CIM) por microdilución empleando sales puras de los antimicrobianos del estudio (cuatro aminoglucósidos: amikacina, gentamicina, netilmicina y tobramicina; y cinco  $\beta$ -lactámicos: carbenicilina, piperacilina, cefotaxima, cefoperazona y ceftazidima), siguiendo los estándares de la NCCLS (78) (Ver anexo IV). Se utilizó un inóculo de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL y se incubó a  $35^\circ\text{C}$  por 18 h. Cada ensayo de susceptibilidad incluyó *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 como controles (ver apéndice IV). c) La resistencia a  $\beta$ -lactámicos mediada por  $\beta$ -lactamasas se probó en una submuestra de microorganismos multiresistentes, utilizando el disco de nitrocefín (79) (ver anexo V). d) En las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas se realizaron estudios de sinergismo con carbenicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima y cefoperazona más ácido clavulánico (1:2) mediante la técnica de microdilución (80) (ver anexo VI).

Los microorganismos se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  en agar nutritiva más antibiótico, en el caso de las cepas resistentes, o sin él en las sensibles. Además se guardaron en papel por quintuplicado en una solución de citrato de sodio al 5% más glicerol, en una proporción 6/4, es decir, al 40% de glicerol con el antibiótico correspondiente.

#### **Análisis de plásmidos.**

Las muestras almacenadas se recuperaron, resemebrándolos en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) con o sin antibiótico de acuerdo al tipo de resistencia.

Posteriormente se realizó extracción de ADN plasmídico de acuerdo a el método de extracción alcalina de BirnBoim y Doly (81) modificada con fenol (82) (ver anexo VII).

El ADN plasmídico extraído se depositó en un gel de agarosa al 1% y se corrió en una cámara horizontal de electroforesis submarina a 105 V durante una hora, posteriormente el gel se tiñó con bromuro de etidio, se observó bajo luz ultravioleta, y se fotografió con una cámara polaroid con una abertura de 11 y un tiempo de exposición de 40 segundos.

Los plásmidos se clasificaron de acuerdo a su peso molecular, empleando como control de peso fago lambda (50kb) completo y cortado con HindIII que produce ocho cortes en el mismo de 23.1, 9.4, 6.6, 4.4, 2.3, 2.0, 0.56, y 0.12 Kb.

SISTEMA DE CAPTACION DE LA INFORMACION. Se revisaron los resultados diarios de sensibilidad antimicrobiana en el laboratorio de Microbiología Clínica, y se corroboró posteriormente si era o no nosocomial, su procedencia, área de hospitalización, enfermedades subyacentes, factores predisponentes, etc, de acuerdo a la hoja de recolección de datos ya comentada (ver anexo I).

En la siguiente figura se muestra la ruta crítica que se siguió durante el estudio.



seleccionaron 10 cepas de *Pseudomonas* spp., 10 de *Klebsiella* spp., y 10 de *Serratia* spp. Se utilizaron también cuando fue necesario prueba exacta de Fisher, razón de momios, y en el caso del análisis de los factores de riesgo de los casos y controles mediante análisis de regresión logística simple y múltiple, considerándose significativo un nivel alfa menor a 0.05.

## RESULTADOS.

## Población.

Durante el período de estudio, se registraron 2980 egresos y 365 infecciones intrahospitalarias, con una tasa de 12.2 por 100 egresos, de los cuales 135 fueron infecciones por los bacilos gramnegativos del estudio (Tabla 2).

Tabla 2  
Infecciones Nosocomiales de Marzo 1990 a Abril 1991  
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

	n	Tasa*
Egresos durante el período	2980	
Infecciones nosocomiales	365	12.2
Infecciones por gramnegativos totales	222	7.5
Infecciones por gramnegativos+	135	4.5

\* Eventos/100 egresos      + Bacilos gramnegativos del estudio

De las 135 infecciones, 15 fueron excluidas, por falta de recuperación del germen (5), duda respecto a la toma de la muestra (8) y dos debido a que tenían un aislamiento previo del mismo microorganismo aislado en el INNSZ en otro hospital. Se incluyeron 120 infecciones nosocomiales por bacilos gramnegativos. La proporción de infecciones por bacilos gramnegativos (del estudio) del total de infecciones nosocomiales fue del 33%, dos tercios de las cuales fueron multirresistentes (tabla 3).

**Tabla 3**  
**Infecciones por Gramnegativos Multirresistentes en el INNSZ**

	n	Tasa (%)
Infecciones gramnegativos totales/Inf. nosocomiales	222/365	61
Infecciones por gramnegativos*/Inf. nosocomiales	120/365	33
Infecciones multirresistentes/Inf. nosocomiales	80/365	22
Infecciones multirresistentes/Inf. por gramnegativos*	80/120	66

\* Bacilos gramnegativos incluidos.

#### Estudio de casos y controles.

Se incluyeron 60 casos y 40 controles pareados únicamente por fecha de diagnóstico de la infección  $\pm$  2 semanas, debido a que la proporción de infecciones multirresistentes fue mayor que la de sensibles se incluyeron dos casos por cada control. No se observaron diferencias en ambos grupos en cuanto a edad y sexo. La enfermedad subyacente fue similar en ambos grupos a excepción de los tumores sólidos que fueron más frecuentes en los casos que en los controles (tabla 4).

**Tabla 4**  
**Características Generales de los Sujetos Incluidos al Estudio**

Características	Casos (n=80)	Controles (n=40)	p
Edad (años)	45.4 $\pm$ 11	42 $\pm$ 12	
Sexo (Masculino/Femenino)	37/43	16/24	0.32
Diabetes Mellitus	21	7	0.2
Tumores sólidos	16	2	0.02
Cirrosis Hepática	6	4	0.44
Enfermedades de la Colágena	9	4	0.52
Insuficiencia Renal	3	4	0.16
Neoplasias Hematológicas	6	7	0.12

No hubo diferencias entre casos y controles en relación al sitio de aislamiento del microorganismo (tabla 5).

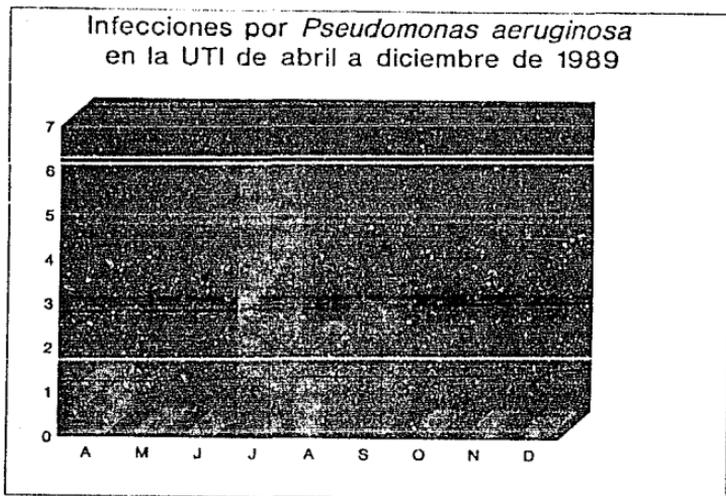
La mortalidad fue mayor en los casos que en los controles (16 vs 3,  $p=0.06$ , RR 1.3, IC<sub>95%</sub>:1.04-1.7) y aunque no fue estadísticamente significativa, todos los casos que fallecieron tuvieron infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

Tabla 5  
Sitio de Aislamiento de Bacilos Gramnegativos

Sitio de aislamiento	Casos	Controles	p*
Infecciones de vías urinarias	28 (35%)	17 (42%)	0.27
Bacteremias	17 (21%)	13 (32%)	0.13
Infecciones de herida quirúrgica	24 (30%)	7 (18%)	0.10
Neumonías	11 (14%)	6 (18%)	0.52

#### Descripción de un brote por *P. aeruginosa* en la UTI.

Durante los meses de julio y agosto se observó un aumento en los aislamientos de *P. aeruginosa* procedente de la unidad de cuidados intensivos, en el período preepidémico (abril a junio) con una tasa del 3.7% y 27 egresos. Durante el período epidémico (julio a septiembre) hubo 42 egresos y una tasa del 22%, durante el mes de julio la epidemia alcanzó su punto máximo y el 100% de los egresos (5) presentó una infección por *P. aeruginosa*. Durante el período postepidémico (septiembre, octubre y noviembre) hubieron 57 egresos y ninguna infección por *P. aeruginosa* (figura 2).



#### Origen y sensibilidad antimicrobiana de la *P. aeruginosa* aislada en la UTI.

*P. aeruginosa* que se aisló de los casos de infección en la UTI presentó un patrón de multiresistencia uniforme que se muestra en la tabla 6, que comparado con un aislamiento del periodo preepidémico, mostró un perfil de resistencia distinto. El análisis de plásmidos confirmó que se trató de microorganismo común como se muestra en la figura 3. Debido a que los primeros casos fueron neumonía y traqueítis se buscó una fuente común, por lo que se cultivó el agua de la cascada de los ventiladores de donde se aisló el mismo microorganismo. Se tomaron cultivos de conectores y de las mangueras con hisopos húmedos, de los cuales no se recuperó el microorganismo.

Tabla 6  
Sensibilidad de Aislamientos de Terapia Intensiva Meses Abril-Septiembre

Mes	Número	A	G	N	T	C	P	Cx	Cf	Cz
abril	1	S	R	S	S	R	R	S	S	S
junio	1	R	R	R	R	R	R	R	R	R
julio	5	R	R	R	R	R	R	R	R	R
agosto	2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
septiembre	3	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Figura 3. Electroforesis ADN plasmídico de *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente carriles 2, 3, 4, 5, 7 y 8 en el carril 6 se muestra la pseudomona del aislamiento previo al brote.

### Descripción del caso índice.

El caso índice ocurrió en un paciente masculino de 58 años de edad, quien ingresó a la UTI por inestabilidad postoperatoria de cirugía abdominal por probable absceso pancreático el 28 de junio. Se encontraba en su vigésimo séptimo día de internamiento cuando ameritó la cirugía. En el décimo primer día postoperatorio presentó empeoramiento del problema respiratorio y fiebre. Se tomó una radiografía de tórax que mostró un nuevo infiltrado parahiliar derecho, el cultivo tomado a través de la cánula mostró como microorganismo único: *Pseudomonas aeruginosa*. El paciente había recibido previamente ampicilina, amikacina y metronidazol por 10 días, por absceso intraabdominal, encontrándose afebril al momento de desarrollar el nuevo cuadro infeccioso.

### Descripción de los casos de infección por *P. aeruginosa* multirresistente.

Los episodios de infección por *P. aeruginosa* multirresistente que ocurrieron durante el período epidémico fueron: neumonía (2), traqueítis (3), infección de vías urinarias (4), de herida quirúrgica (1) y bacteremia primaria (1). En la siguiente figura 2 se observan los casos de este brote por *Pseudomonas aeruginosa*, donde se observa como los casos se concentraron principalmente en julio.

### Análisis de Factores de riesgo.

El análisis univariado de los factores de riesgo relacionados con la adquisición de una infección multirresistente mostró que la hospitalización en urgencias o en terapia intensiva, la estancia prolongada (mayor de 15 días), el antecedente de procedimientos quirúrgicos, el uso de antibióticos y el tiempo de uso de antibióticos (más de dos semanas) se relacionaron con un riesgo mayor para adquirir una infección multirresistente, no así el uso de catéteres urinarios o endovenosos, o la nutrición parenteral (tabla 7).

**Tabla 7**  
**Análisis Univariado Factores de Riesgo**

Factores de riesgo	RM*	IC <sub>95%</sub>	p
Estancia Terapia y/o Urgencias	6.09	2.4-16	<.001
Estancia > 15 días	10.3	3.8-29	<.001
Procedimientos quirúrgicos	2.4	0.9-6	.04
Catéteres vesicales	1.4	0.5-3	.5
Catéteres intravenosos	3.76	0.3-33	.3
Nutrición parenteral	1.66	0.5-5	.4
Uso de antibióticos	6.53	2.6-16.7	<.001
Tiempo de uso de antibióticos	1.33	1-1.7	.01

\* Razón de momios.

En el análisis multivariado utilizando un modelo de regresión múltiple se encontraron como factores de riesgo significativos: la estancia en terapia intensiva o urgencias, la estancia prolongada, el uso previo de antibióticos y la administración de antibióticos por más de dos semanas (tabla 8).

**Tabla 8**  
**Análisis Multivariado de Factores de Riesgo**

Factores de riesgo	RM	IC <sub>95%</sub>	p
Estancia en Urgencias y/o Terapia	1.5	1.01-3.1	.04
Uso de antibióticos	2.2	1.15-4.2	.01
Estancia > 15 días	2.2	1.16-4.2	.01

En cuanto al número de antibióticos utilizados, la administración de más de un antibiótico se relacionó más frecuentemente con una infección multirresistente (casos), en cambio, el uso de un "sólo" antibiótico fue un factor "protector" para el desarrollo de una infección multirresistente ( $p < .01$ , RR.66, IC<sub>95%</sub> 0.45-0.96) (tabla 9).

Tabla 9  
Número de Antibiótico Utilizados en Casos y Controles

Número de antibióticos	Casos	Controles	RR	IC <sub>95%</sub>	p
Un antibiótico	11	7	0.6	0.45-0.96	<.01
Dos antibióticos	18	3	1.0	0.83-1.28	1.14
Tres antibióticos	29	1	1.3	1.07-1.604	0.01

RR = Riesgo relativo (Exacta de Fisher)

En cuanto al tipo de antibiótico, en los casos el uso de triple esquema fue más frecuente al igual que el de ceftriaxona sola o combinada con otros antibióticos. La administración de norfloxacin y cotrimoxazol fue mucho más frecuente en los controles y generalmente no más de 15 días (Tabla 10). Mientras que la combinación de  $\beta$ -lactámicos más aminoglicósidos o más aminoglicósidos y clindamicina y/o metronidazol fué mucho más frecuente entre los casos.

Tabla 10  
 Tipo de Antibióticos Recibidos en Casos y Controles

Tipo de antibiótico	Casos	Controles	RR	IC <sub>95%</sub>	p
Ampicilina + Amikacina + Clindamicina o Metronidazol	28	1	1.3	1.0-1.6	.01
Cefalotina + Amikacina	8	2	0.9	.68-1.3	.51
Ceftriaxona + Amikacina	10	1	1.1	.88-1.4	.67
Cefalotina	2	1			
Cotrimoxazol	2	2			
Norfloxacin	2	3			
Ampicilina	2	1			
Ceftriaxona	3	0			

#### Análisis de microorganismos.

Las infecciones por *Klebsiella* spp fueron las más comunes, seguidas por *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Serratia* spp. (tabla 11). La especie más común entre pseudomonas fue *P. aeruginosa* (89%) y en klebsiella, *K. pneumoniae* (62%).

**Tabla 11**  
Frecuencias de Gramnegativos del Estudio Causantes de Infección.

Microorganismo	n	Frecuencia(%)
<i>Klebsiella</i> spp	45	39
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	
<i>Klebsiella ozenae</i>	15	
<i>Pseudomonas</i> spp	37	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	
<i>Pseudomonas putida</i>	2	
<i>Enterobacter</i> spp	18	15
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	
<i>Citrobacter freundii</i>	10	12
<i>Serratia</i> spp	10	12
<i>Serratia marcescens</i>	7	
<i>Serratia liquefaciens</i>	3	

En cuanto a los bacilos gramnegativos aislados tampoco se observó diferencias entre casos y controles, aunque en el caso de *Pseudomonas* spp, éstas fueron ligeramente más comunes en los casos que en los controles (Ver tabla 12).

**Tabla 12**  
Frecuencia de Bacilos Gramnegativos Encontrados en Casos y Controles

Microorganismo	Casos	Controles	p*
<i>Klebsiella</i> spp	28 (35%)	17 (42%)	0.27
<i>Pseudomonas</i> spp	29 (36%)	8 (20%)	0.052+
<i>Enterobacter</i> spp	10 (12%)	8 (20%)	0.21
<i>Serratia</i> spp	7 (8%)	3 (8%)	0.37
<i>Citrobacter</i> spp	6 (7%)	4 (10%)	0.44

\* Exacta de Fisher + RR= 1.13, IC<sub>95%</sub> = 1.0-1.62

**Sensibilidad antimicrobiana.**

La sensibilidad por difusión en agar practicada como escrutinio para determinar susceptibilidad se muestra en las tablas de la 13 y 14. La mayor parte de los microorganismos que se encontraron resistentes lo fueron a más de un  $\beta$ -lactámico y a más de un aminoglicósido. La frecuencia de resistencia de enterobacterias a amikacina fue de 42%, y para pseudomonas de 64%, para gentamicina fue de 53 y 72% respectivamente, para el resto de los aminoglicósidos fue similar. La elevada frecuencia de resistencia al resto de los aminoglicósidos es notoria a pesar de que la amikacina es el aminoglicósido que en el INNSZ se emplea en forma exclusiva desde 1981.

**Tabla 13**  
**Sensibilidad por Difusión en Agar a Aminoglicósidos\***

Microorganismo	Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente
Enterobacterias	Amikacina	45	3	35
	Gentamicina	35	4	44
	Netilmicina	36	2	45
	Tobramicina	35	2	46
<i>Pseudomonas</i> spp.	Amikacina	13		24
	Gentamicina	9	1	27
	Netilmicina	10	1	26
	Tobramicina	10		27

\* Número de microorganismos encontrados resistentes por este método.

En el caso de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos la frecuencia de resistencia fue mayor en pseudomonas que en enterobacterias, en las primeras la resistencia a piperacilina se encontró en 86%, a cefotaxima 78%, cefoperazona 81% y ceftazidima 67%. En enterobacterias la resistencia a piperacilina fue del 68%, cefotaxima 57%, cefoperazona 45 y ceftazidima 40%.

Tabla 14  
Sensibilidad por Difusión en Agar a  $\beta$ -Lactámicos\*

Microorganismo	Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente
Enterobacterias	Carbencilina+	18		20
	Piperacilina	23	3	57
	Cefotaxima	35		48
	Cefoperazona	45		38
	Ceftazidima	49		34
<i>Pseudomonas</i> spp.	Carbenicilina	4		33
	Piperacilina	5		32
	Cefotaxima	8		29
	Cefoperazona	6	1	30
	Ceftazidima	12		25

\* Número de microorganismos encontrados por este método  
+ Excepto *Klebsiella* spp.

El análisis de sensibilidad por microdilución se hizo por duplicado, el control de calidad se hizo con 10 aislamientos de *Pseudomonas* spp, 10 de *Klebsiella* spp y 10 de *Serratia* spp practicándose análisis de correlación intracalse para dichas pruebas y fué de 0.81-0.98 ( $\pm$  una dilución) para los nueve antibióticos probados (ver tabla 15).

**Tabla 15**  
**Correlación Interensayo Sensibilidad por Microdilución**

Antibióticos	Coefficiente de Correlación Intraclase
Amikacina	0.81
Gentamicina	0.92
Netilmicina	0.92
Tobramicina	0.88
Carbenicilina	0.98
Piperacilina	0.98
Cefotaxima	0.95
Cefoperazona	0.88
Ceftazidima	0.85

La concentración mínima inhibitoria para el 50 y 90% de las cepas se muestra en la tabla 16, nótese el alto nivel de resistencia encontrado para pseudomona.

**Tabla 16**  
**Concentración Mínima Inhibitoria de *Pseudomonas aeruginosa***  
**en Casos y Controles**

Antibiótico	Casos			Controles		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Intervalo	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Intervalo
Amikacina	128	256	8->256	2	4	0.5-32
Gentamicina	64	128	4-256	2	4	0.25-16
Netilmicina	64	128	4-128	2	6	0.5-16
Tobramicina	64	128	2-128	1	4	0.25-16
Carbenicilina	1024	1024	256->1024	128	512	32 ->1024
Piperacilina	64	128	32-256	8	32	4-256
Cefotaxima	64	128	4-256	2	8	0.5-16
Cefoperazona	64	128	2-256	2	8	1-16
Ceftazidima	16	64	1-128	2	4	0.5-4

La resistencia fue menor en el resto de las enterobacterias (tabla 17). Llama la atención el alto nivel de resistencia encontrado para amikacina y para el resto de los aminoglicósidos, así como para cefoperazona y piperacilina antibióticos cuyo uso es excepcional en el INNSZ tanto para enterobacterias como para pseudomonas.

Tabla 17  
Concentración Mínima Inhibitoria para Enterobacterias en Casos y Controles

Antibiótico	Casos			Controles		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Intervalo	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Intervalo
Amikacina	32	128	8-256	2	4	0.5-32
Gentamicina	32	64	8-128	1	4	0.5-16
Netilmicina	64	128	8-128	4	8	0.5-32
Tobramicina	64	128	4-256	2	4	0.2- 8
Carbenicilina	1024	1024	1024-1024	16	256	8- 1024
Piperacilina	64	128	32-128	4	16	4- 64
Cefotaxima	64	128	4-128	2	4	0.5- 8
Cefoperazona	64	128	2-128	1	4	0.2-16
Ceftazidima	32	64	2- 64	0.5	2	0.2- 8

Las pruebas de sensibilidad por microdilución al añadirles un inhibidor de beta lactamasas mostró una importante disminución en la media geométrica de la concentración mínima inhibitoria a carbenicilina, piperacilina, cefotaxima y menor en cefoperazona y ceftazidima, particularmente entre *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas spp.*, a diferencia de *Enterobacter spp.* y *Citrobacter spp.* donde la disminución fue menor. (tablas 18 y 19).

**Tabla 18**  
**Media Geométrica de CIM<sub>50</sub> a β-lactámicos e Inhibidores de β-lactamasas**  
**Más β-lactámicos en un grupo de Bacilos Gramnegativos Multirresistentes**

Microorganismo	CB	CB+CL	PIP	PIP+CL	CTX	CTX+CL
<i>Klebsiella</i> (10)	1258	38	125	32	35	2.97
<i>Pseudomonas</i> (10)	977	85	114	32	53	12.33
<i>Enterobacter</i> (7)	234	76	76	17	112	3.17
<i>Citrobacter</i> (5)	1258	83	125	26	46	3.99
<i>Serratia</i> (5)	1000	16	421	8	45	3.36

CB = carbenicilina, PIP = piperacilina, CL = Clavulanato, CTX = cefotaxima

Todos estos microorganismos era resistentes a todos los antibióticos, sin embargo, como puede observarse en la tabla 19 todos fueron sensibles a Imipenem.

**Tabla 19**  
**Media Geométrica de CIM<sub>50</sub> a β-lactámicos e Inhibidores de β-lactamasas**  
**Más β-lactámicos en un grupo de Bacilos Gramnegativos Multirresistentes**

Microorganismo	CFP	CFP+CL	CAZ	CAZ+CL	AZT	IMP
<i>Klebsiella</i> (10)	35	14	35	12	35	1.2
<i>Pseudomonas</i> (10)	100	25	43	29	27	1.44
<i>Enterobacter</i> (7)	38	11	76	17	11.7	1.2
<i>Citrobacter</i> (5)	38	16	125	26	31	1.9
<i>Serratia</i> (5)	251	23	19	8	8	1.2

CFP = cefoperazona, CAZ = ceftazidima, CL = Clavulanato,  
 AZT = aztreonam, IMP = Imipenem

El aislamiento de un microorganismo resistente en el laboratorio fue notificado inmediatamente al comité de vigilancia de infecciones nosocomiales quienes a su vez comunicaron a las enfermeras del sector donde se encontraba el paciente iniciándose las medidas de aislamiento dependiendo del sitio de la infección: aislamiento respiratorio, si se trataba de una neumonía; piel y heridas, en caso de una infección de herida quirúrgica, etc.

#### Análisis de plásmidos.

El análisis de plásmidos mostró un patrón semejante en los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* (12), *Klebsiella pneumoniae* (10), y *Serratia marcescens* (5) multiresistentes (carriles 1, 2, 3, 4 y 5 de la figura 4) diferente en los provenientes de aislamientos sensibles (carriles 6-10), donde se observa claramente la ausencia de los plásmidos que corresponden a 26 y 40 Kb. *Citrobacter* spp (5) y *Enterobacter* spp (10) no tuvieron un patrón plasmídico semejante al ya descrito y como se observa en la figura 5, fue claramente diferente. En esta figura en el carril 1 se observa el marcador de peso molecular, en el carril 2 enterobacter, carril 3 klebsiella sensible, carril 4 citrobacter y en los carriles 5, 6, 7 y 8 pseudomonas multiresistente. El tamaño de los plásmidos encontrados en pseudomonas se muestra en la siguiente figura (fig. 6), aquí se utilizó lambda digerido (carril 1) y sin digerir (carril 4) como marcadores de peso molecular y en los carriles 2 y 3 los prototipos de microorganismos resistentes y sensibles respectivamente. Los microorganismos multiresistentes compartieron dos plásmidos, de 26 y 40 Kb respectivamente (figura 6).

**Figura 4. Comparación de los patrones plasmídicos entre microorganismos resistentes y sensibles (ver texto).**

**Figura 5. Se muestran los aislamientos de citrobacter y enterobacter que mostraron un patrón plasmídico diferente.**

**Figura 6. Se muestran los controles de peso molecular carriles 1 y 4 (Lambda digerido con HindIII y Lambda sin digerir, respectivamente) y el prototipo de los plásmidos proveniente de aislamientos resistentes (carril 2), y sensibles (carril 3).**

## DISCUSION

La emergencia de infecciones nosocomiales multirresistentes es un evento cada vez más frecuente, que ha sido informado en diversas partes del mundo (83,84). Durante el periodo de estudio en el INNSZ, la frecuencia de infecciones multirresistentes duplicó a la de las infecciones nosocomiales sensibles, razón por la cual se incluyeron el doble de casos que de controles, lo cual fue más frecuente en terapia intensiva y urgencias. Los brotes de infecciones por microorganismos multirresistentes en las unidades de terapia intensiva de México y en otros países como Estados Unidos y Europa, se han asociado con una elevada mortalidad (85-88). La alta resistencia a cefalosporinas de tercera generación y a uno o más aminoglicosidos encontrada por nosotros entre los casos es alarmante, y se asoció con una mortalidad cruda mayor, aunque no fue estadísticamente significativa.

Durante el periodo de estudio el 61% de las infecciones nosocomiales fueron producidas por bacilos gramnegativos y una tercera parte por los microorganismos incluidos.

Los factores de riesgo asociados con la adquisición de infecciones multirresistentes después del análisis multivariado fueron: estancia por más de 15 días, la administración de antibióticos y su empleo por más de dos semanas, la hospitalización en urgencias y/o terapia intensiva.

Se sabe bien que la estancia prolongada en el hospital aumenta el riesgo de adquirir (91-94) una infección nosocomial, aunque con frecuencia esta susceptibilidad se relaciona con la gravedad de la enfermedad subyacente (89,90). El factor de riesgo más importantemente asociado con la adquisición de una infección por bacilos gramnegativos multirresistentes encontrado por nosotros, fue la estancia hospitalaria

mayor de dos semanas. Aunque no se analizó la gravedad de la infección más pacientes con tumores sólidos se observaron entre los casos que entre los controles, en quienes previamente se ha informado de un riesgo mayor para adquirir una infección nosocomial (95).

La administración previa de antibióticos se ha considerado como uno de los factores de riesgo más importantes (21,97), en este estudio, efectivamente se asoció con un riesgo mayor de infección nosocomial por bacilos gramnegativos multirresistentes; sin embargo, éste fue mayor cuando además se consideraba el tipo y número de antibióticos administrados, vgr. cefalosporinas de tercera generación (92) o combinaciones de antibióticos:  $\beta$ -lactámicos más aminoglicósidos y metronidazol o clindamicina, esquemas reconocidos previamente como capaces de seleccionar bacilos gramnegativos multirresistentes, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus* spp. y *Candida* spp. resistentes. (98-100). La mayor parte de estos esquemas incluyeron amikacina, antibiótico que se ha asociado con una menor selección de microorganismos resistentes, con estabilización de esta resistencia en la mayor parte de los hospitales donde se ha empleado de manera exclusiva como en el INNSZ; sin embargo, la resistencia que se observó en nuestros casos fue muy elevada. El uso de un antibiótico, especialmente cotrimoxazol o norfloxacin, fue un factor protector para adquirir una infección multirresistente, probablemente debido al tiempo breve de administración (7 días en promedio), por lo que la posibilidad de selección de microorganismos multirresistentes fue menor. La duración de la terapia antimicrobiana, en el análisis univariado se asoció a un riesgo mayor de infección nosocomial multirresistente; sin embargo, después del análisis multivariado no fue corroborado.

La estancia en urgencias y/o terapia intensiva fue un factor de riesgo debido probablemente a: 1. Los pacientes que se encuentran en estas áreas generalmente

están más graves y por lo tanto más susceptibles de adquirir una infección y 2. Con frecuencia son multiinvasidos con procedimientos diagnósticos y/o terapéuticos, suelen tener más de un catéter o están intubados. Estas características son las responsables de que los pacientes hospitalizados en estas áreas tengan una mayor morbi-mortalidad al infectarse por bacilos gramnegativos multirresistentes, por lo que el uso racional tanto de procedimientos como de antibióticos debe ser una de las prioridades de estos servicios clínicos (87-90).

*Pseudomonas* spp. fue más frecuentemente causa de infecciones multirresistentes, evento que se explica por facilidad con que puede adquirir o generar alta resistencia y por la facilidad con la que puede sobrevivir en el ambiente hospitalario inanimado por tiempo prolongado, debido a sus bajos requerimientos nutricionales y a su gran resistencia a un ambiente adverso (temperatura, pH, antisépticos y desinfectantes) (97,101,102). Se sabe que los pacientes con infecciones por *pseudomonas* tienen además una mayor mortalidad asociada (96), lo cual fue corroborado en este estudio, ya que todos los pacientes que fallecieron tenían una infección por *pseudomonas* multirresistente.

Durante los meses de julio, agosto y septiembre de 1989, la frecuencia de aislamientos de *P. aeruginosa* de terapia intensiva fue mayor que en los meses previos y posteriores. Todos las *pseudomonas* aisladas en este periodo tuvieron el mismo perfil de multirresistencia y que por el análisis de plásmidos se encontró que se trataba de un mismo microorganismo. Este brote se originó por la contaminación de las mangueras de los ventiladores, debido a la dificultad en la esterilización de las mangueras de los ventiladores y a que por falta de repuestos se reutilizaban después de un proceso incompleto de desinfección alta con glutaraldehído. Este problema ha ocurrido principalmente en unidades de cuidados intensivos neonatales debido a que se combinan varios factores que favorecen su aparición como son: un

número excesivo de pacientes, que permiten el relajamiento de las medidas habituales de seguridad para su manejo y enfermos cuyos padecimientos de base los hacen más susceptibles (103). En este brote la clara relación entre una correcta esterilización del equipo y la desaparición del mismo explicó su mecanismo, aunque no podemos descartar la presencia de otros vectores: material de curación, las manos del personal, etc., ya que no sólo se observaron infecciones de tracto respiratorio bajo sino también se observaron infecciones de vías urinarias y un episodio de bacteremia primaria. En esta epidemia el análisis de plásmidos demostró ser una herramienta útil que permitió identificar un sola cepa de *P. aeruginosa* como responsable de la misma, ya que los aislamientos fuera del brote mostraron un patrón de sensibilidad distinto y tenían también un perfil plasmídico diferente. Con ello, se pudo definir el tiempo de aparición y desaparición del microorganismo responsable.

La elevada frecuencia de resistencia especialmente entre pseudomonas contrasta con los estudios realizados previamente en el INNSZ (65) donde en 1984 la resistencia a amikacina era apenas del 18% y 6 años después aumentó hasta el 64%, y en el caso de otras enterobacterias en el mismo año fue del 0% mientras que en 1990 fue del 42%; para el resto de aminoglicósidos la tasa de resistencia ha permanecido más o menos constante a pesar de que ya no se utilizan. La resistencia a  $\beta$ -lactámicos también ha aumentado importante, ya que en 1984 la resistencia a piperacilina en enterobacterias y pseudomonas fue del 12.5 y 42% respectivamente, y en este estudio la encontramos en el 68 y en el 86% respectivamente, con un incremento similar para el resto de los  $\beta$ -lactámicos. Este fenómeno puede explicarse por el empleo de antibióticos de amplio espectro por tiempo prolongado y un aumento en el número y en la sobrevivencia de los pacientes con diversos grados de inmunosupresión (neoplasias, trasplantes de órganos, enfermedades de la colágena, etc.) en comparación con épocas anteriores. La resistencia cruzada entre  $\beta$ -lactámicos y aminoglicósidos sugiere un factor común que podría corresponder al plásmido

observado en la *P. aeruginosa* de terapia intensiva.

La adición de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas produjo una drástica disminución de las CIMs de cefotaxima, cefoperazona, carbenicilina y piperacilina, especialmente en *Klebsiella* spp., *Serratia* spp. y en *Pseudomonas* spp., a diferencia de *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp. donde la disminución fue menor. Este hallazgo sugiere en principio dos mecanismos distintos de resistencia, el primero la presencia de  $\beta$ -lactamasas codificadas por plásmidos en *klebsiella*, *serratia* y *pseudomonas* y el otro,  $\beta$ -lactamasas (cefalosporinasas) del grupo Clase 1, mediadas cromosómicamente en *enterobacter* y *citrobacter*. La resistencia a las cefalosporinas de tercera generación que responde a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas y que no cruza con imipenem es una característica de la actividad de  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro, codificadas por plásmidos, y que se han encontrado en bacilos gramnegativos causantes de infecciones en unidades de terapia intensiva en Francia, España, Bélgica, Estados Unidos y Chile (47-52,104), donde se han asociado con una alta mortalidad. El primer bacilo gramnegativo que se informó como portador de este tipo de plásmido fue *Klebsiella* spp. y, posteriormente se ha encontrado en otros bacilos gramnegativos. El tratamiento de las infecciones por estos microorganismos ha requerido de combinaciones de antibióticos que incluyen carbapenems y aminoglicósidos, cuando no se ha encontrado resistencia cruzada, como ocurre en la mayoría de las enterobacterias; o con ciprofloxacina, en el caso de *pseudomonas* que puede ser resistente a carbapenems (105).

La gran mayoría de los aislamientos mostraron una elevada resistencia también a aminoglicósidos, especialmente amikacina y tobramicina y ligeramente menor a gentamicina, ésto sugiere la actividad de una enzima de amplio espectro del como la acetiltransferasa AAC 6', probablemente ésta sea codificada por plásmidos, que se han seleccionado en este hospital por el uso exclusivo de amikacina durante

10 años. Posiblemente la expresión fenotípica (producción de la enzima) ocurre de manera variable y podría además, coexistir con otro tipo de información genética extracromosómica, como la producción de  $\beta$ -lactamasas. La disminución en la permeabilidad parece una explicación poco probable, debido a que la resistencia a la amikacina no se asocia, en esos casos, con una resistencia elevada a los  $\beta$ -lactámicos (106).

La presencia de material extracromosómico común en los microorganismos responsables de brotes de infecciones multirresistentes en el hospital tiene muchos antecedentes, siendo particularmente importantes los informes de epidemias de infecciones nosocomiales multirresistentes por *S. marcescens* en Nashville, Tenn. (107); por *S. marcescens*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *K. oxytoca* y *Proteus rettgeri* en Seattle, Wa (108); por *K. pneumoniae* en Richmond, Va. (109); por mencionar algunos. Muchos de estos brotes se han originado en las unidades de terapia intensiva y/o urgencias, y con frecuencia en áreas de quemados o unidades de cuidados intensivos neonatales, donde el número excesivo de pacientes fomenta la relajación de las medidas de control dentro de esas áreas favoreciendo la diseminación de microorganismos altamente resistentes. Los plásmidos que se encuentran en los microorganismos aislados en estas zonas del hospital son muy polimórficos y varían en sus propiedades y pesos moleculares, ver tabla 20. Sus pesos moleculares varían desde 45 000 hasta 105 000 daltones y la resistencia que codifican les permite a los microorganismos sobrevivir en presencia de aminoglicósidos,  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas y sulfametoxazol. En los dos primeros brotes (Nashville y Seattle), se logró demostrar transmisión a otros gramnegativos.

Tabla 20  
Características de los plásmidos identificados  
en brotes por microorganismos multirresistentes

Origen	Enterobacteria	Peso*	Antibióticos+
Nashville	<i>K pneumoniae</i>	105 000	GM,TM,SM,TC,KM CB,SU,TE,AP
Seattle	<i>S marcescens</i>	45 000	GM,TM,KM,AP,CB CF,SM,SU.
Virginia	<i>K pneumoniae</i>	71 000	GM,KM,CF,AP,CB

\* megadaltons.

+ gentamicina (GM), tobramicina (TM), kanamicina (KM), estreptomycin (SM), ampicilina (AP), carbenicilina (CB), cefalotina (CF), cloranfenicol (CM), tetraciclina (TC), sulfonamida (SU).

Los plásmidos que codifican para la producción de  $\beta$  lactamasas que se han aislado de *K. pneumoniae* y de otros bacilos gramnegativos varían desde menos de 50 Kb hasta más de 150 Kb, algunos expresan además resistencia para aminoglicósidos, sulfas o tetraciclinas (51,106,107,110,111). *Pseudomonas*, *klebsiella* y *serratia* en este estudio tenían varios plásmidos, el menor de ellos de 26 Kb aproximadamente fue el más constante en nuestros aislamientos. El peligro de la presencia de plásmidos con información para la producción de enzimas para una gran variedad de antibióticos depende también de su posible transmisibilidad, replicación y expresión en clones diferentes del mismo organismo o bien en especies, y géneros diferentes dentro del hospital e inclusive la posibilidad de diseminación a otras instituciones a través del intercambio de pacientes y de personal.

Este fenómeno de multirresistencia no se ha confinado al hospital sino también se han encontrado bacilos gramnegativos multirresistentes especialmente coliformes en las aguas de algunos rios en HongKong (112), donde además la frecuencia de multirresistencia era mayor en afluentes provenientes de poblaciones urbanas que de suburbanas sugiriendo un mayor consumo de antibióticos en las primeras. Así como también, en muestras provenientes de la comunidad, hecho corroborado por otros investigadores en el INNSZ (113) y aunque pseudomonas no fue de los bacilos gramnegativos más comunes, si fue uno de los más resistentes. A diferencia de lo que ocurre en el hospital, *P. stutzeri* fue la especie de pseudomonas más frecuente en la comunidad y la resistencia a gentamicina en pseudomonas fue del 17%.

Las infecciones nosocomiales son pues, uno de los retos más importantes a vencer hoy día. La eficacia de los programas de control de infecciones ha sido demostrada ampliamente (114,115), al prevenir cuando menos el 30% de las infecciones nosocomiales. En este estudio, el sistema de vigilancia permanente permitió, detectar un aumento del número de infecciones por bacilos gramnegativos multirresistentes en una área del hospital (unidad de cuidados intensivos), esclarecer su posible origen y mecanismos de transmisión. Un sistema de vigilancia como éste requiere del laboratorio de Microbiología Clínica, ya que es el responsable de la identificación y la determinación de la sensibilidad antimicrobiana de los organismos aislados de muestras clínicas, con lo que orienta al comité de control de infecciones y la comunidad médica respecto al uso racional de antibióticos, establecer políticas apropiadas para disminuir el riesgo de inducción de resistencia, lograr una disminución de los costos y de la toxicidad de los antimicrobianos que se emplean de el hospital. A estas dos disciplinas, se ha agregado en años recientes la biología molecular, la cual ha revolucionado el conocimiento tanto de la microbiología como de la epidemiología de las infecciones adquiridas en los hospitales, y ha surgido de

esta asociación una nueva disciplina: la epidemiología molecular, cuya aportación clave ha sido, entre otras, la demostración fehaciente de la identidad (caracterización de tipos y clonas) de un microorganismo, la definición de la transferencia de los factores de resistencia y la caracterización de los genes responsables de la misma (ii6,ii7,ii8). La conjunción de estas tres disciplinas, en este estudio, permitió conocer el comportamiento de las infecciones producidas por bacilos gramnegativos multirresistentes, los factores de riesgo relacionados con su adquisición y así como los posibles mecanismos de resistencia.

El análisis de plásmidos confirma la impresión de un mecanismo de resistencia común entre pseudomonas, klebsiella y serratia; distinto del de enterobacter y citrobacter, aunque esto requiere la demostración de que el ADN plasmídico del primer grupo codifica para las propiedades de resistencia observadas.

El patrón de plásmidos semejante entre las pseudomonas multirresistentes aisladas de terapia intensiva, y diferente del perfil obtenido de las pseudomonas aisladas previamente (sensibles a la mayoría de los antibióticos probados), fue una herramienta muy útil para establecer de manera precisa que el caso índice fue el que dió origen a la diseminación del organismo multirresistente durante las 10 semanas subsiguientes.

El control de infecciones producidas por microorganismos multirresistentes requiere intervención en dos niveles: 1. Uso de antibióticos. Utilizar de preferencia un sólo antibiótico con actividad bactericida contra el microorganismo causante de la infección; emplear combinaciones cuando se tratan infecciones por microorganismos potencialmente resistentes, y en caso de prescribir antibióticos empíricamente cambiar al antimicrobiano de elección en cuanto se disponga de la sensibilidad. 2. Precauciones de manejo. Lavado de manos antes y después de revisar

cada paciente; aislamiento de aquellos sujetos con infecciones multirresistentes; uso de guantes para el manejo de heridas y secreciones, y manejo adecuado de excretas y ropa de cama. La aplicación de estas recomendaciones es esencial para evitar la selección de microorganismos resistentes y su subsecuente diseminación.

En las últimas décadas la introducción de una gran variedad de nuevos antimicrobianos ha cambiado drásticamente el tratamiento de las enfermedades infecciosas; sin embargo, la aparición casi explosiva de nuevos compuestos favorece la administración indiscriminada de los mismos, misma que induce la aparición de microorganismos resistentes con gran rapidez. Esta carrera aparentemente interminable, conduce inexorablemente a la selección de microorganismos cada vez más resistentes y a la síntesis de compuestos cada vez más costosos. El empleo adecuado de antibióticos y el juicioso uso de laboratorio de microbiología son las estrategias que pueden detener esta carrera (119,120).

## CONCLUSIONES

1. La frecuencia de infecciones por bacilos gramnegativos fue de 7.5 por cada 100 ingresos, correspondió al 61% de las infecciones nosocomiales, y dos tercios de éstas fueron por bacilos gramnegativos multirresistentes.
2. Las áreas del hospital con mayor riesgo para adquirir infecciones por organismos multirresistentes fueron la unidad de cuidados intensivos y urgencias, lo cual se comprobó mediante el estudio de casos y controles y además porque durante el estudio se detectó un brote por *P. aeruginosa* multirresistente en la unidad de terapia intensiva.
3. Efectivamente el uso previo de antibióticos (RR 6.53, IC<sub>95%</sub> 2.6-16.67), particularmente el empleo de triple esquema (RR 1.3, IC<sub>95%</sub> 1.07-1.6) por más de dos semanas (RR 1.33, IC<sub>95%</sub> 1-1.7), se relacionaron con la adquisición de una infección nosocomial por bacilos gramnegativos multirresistentes.
4. El análisis de plásmidos permitió identificar epidemiológicamente a un microorganismo, en particular, como responsable de un brote en la unidad de terapia intensiva. Además, se identificó un perfil de plásmidos (50 y 30 Kb) común entre *klebsiella*, *serratia* y *pseudomonas*, que compartían un patrón de resistencia semejante. En contraste el patrón de plásmidos observado entre *enterobacter* y *citrobacter* fue distinto al igual que la susceptibilidad a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, ya que no se documentó una disminución importante en la concentración mínima inhibitoria a  $\beta$ -lactámicos que sí se observó en el primer grupo de organismos.

5. El control de infecciones nosocomiales demanda el conocimiento de los factores de riesgo relacionados con la adquisición de una infección multirresistente. En este estudio, la hospitalización por más de 15 días, la estancia en la unidad de cuidados intensivos y urgencias, el uso previo de antibióticos, el tiempo de uso previo de antibióticos, el antecedente de procedimientos quirúrgicos, y la presencia de tumores sólidos fueron factores de riesgo para adquirir una infección nosocomial por bacilos gramnegativos multirresistentes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Editorial. Microbial Resistance to  $\beta$ -lactam Antibiotics. *Mayo Clin Proc.* 1982;57:781-82.
2. Levy S, Burke L, Wallace T. Task Force Control of Infectious Diseases. *Rev Infect Dis.* 1987;9(suppl 3): S1-3.
3. Kupersztoch-Portnoy YM. Antibiotic Resistance of Gram-negative Bacteria in Mexico: Relationship to Drug Consumption in: *Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids.* Levy SB, Clowes RC, Koening EL (eds). New York City, USA. Plenum Press. 1981;529-37.
4. Guiscafré HG, García MP, Trejo JA, Gámez J, Martínez GM, Zúñiga VT, Muñoz O. Resistencia antimicrobiana de enterobacterias y pseudomonas. Recomendaciones terapéuticas. *Rev Med IMSS (Méx).* 1982;20:485-92.
5. Dixon RE. Symposium on nosocomial infections. *Am J Med.* 1981;70:379-85.
6. Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG: The nationwide nosocomial infection rate. A need for vital statistics. *Am J Epidemiol.* 1985;121:159-67.
7. Meers PD, Ayliffe GAJ, Emmerson AM, et al. Report of the national survey of infection in hospitals. *J Hosp Infect.* 1981;2(suppl 1):1-51.
8. Ponce de León S. The needs of developing countries and the resources required. *J Hosp Infect.* 1991; (suppl A):376-81.
9. Centers for Diseases Control. National Nosocomial Infections Study. *MMWR.* 1984;33:28-53.
10. Ponce de León RS, Romero OMC, Sandoval GMN, Ruiz-Palacios G. Eficacia de un programa de control de infecciones nosocomiales: una posibilidad real de mejorar la calidad de la atención médica. *Salud Pública Méx.* 1986;28:593-8.
11. Benette JV, Brachman PS. Nosocomial Infections.
12. Avila F, Ramírez GL, Alpuche AC, Arredondo GJL, Santos PJI. Infecciones nosocomiales en un hospital pediátrico. *Salud Pública Méx.* 1986;28:616-22.

13. Hurst V, Sutter VI. Survival of *Pseudomonas aeruginosa* infection in the hospital environment. *J Infect Dis.* 1966;116:151-54.
14. Center for Diseases Control. Contaminated povidone-iodine solution in Texas. *MMWR.* 1989;38:133-5.
15. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med.* 1991;91 (suppl 3B):72S-5
16. Holmberg SD, Solomon SL, Blake PA. Health and economic impact of antimicrobial resistance. *Rev Infect Dis.* 1987;9:1065-78.
17. Kapecko DJ, Formal SB. Plasmids and the virulence of enteric and other bacterial pathogens. *Ann Intern Med.* 1984;101:260-2.
18. Lambert. Clinical impact of drug resistance. *J Hosp Infect* 1988;11:135-41.
19. McGowan JE. Anticrobial resistance in hospitals and it's relation to antibiotic use. *Rev Infect Dis.* 1983;5:1033-48.
20. Van Der Waay D. Colonization Pattern of the digestive tract by potentially pathogenic microorganisms: Colonization controlling mechanisms and consequences for antibiotic treatment. *Infection.* 1983;11 (suppl 1):90-2.
21. McGowan JE. Is antimicrobial resistance in hospital microorganism related to antibiotic use?. *Bull NY Acad Med.* 1987;63:253-68.
22. Finland M. Emergence of antibiotic resistance in hospitals. *Rev Infect Dis.* 1979;1:4-21
23. Phillips I. Environmental factors contributing to antibiotic resistance. *Infect Control.* 1983;4:448-51.
24. Ruiz-Palacios G, Ponce de León S, Sifuentes J, et al. Control de la resistencia de bacilos gramnegativos a aminoglicósidos. *Rev Invest Clín (Méx)* 1986;38:1-8
25. Cross AS, Opal S, Kopecko DJ. Progressive increase in antibiotic resistance of gramnegative bacterial isolates, Walter Reed Hospital 1976-1980. Specific analysis of gentamicin, tobramycin and amikacin resistance. *Arch Intern Med.* 1983;143:2073-6.

26. Farmer JJ, Davis BR. Detection of *Serratia* outbreaks in Hospital. *Lancet* 1976;Aug 28:455-9.
27. Simon HJ, Folb PI, Rocha H. Policies, laws and regulations pertaining antibiotics: Report of task force 3. *Rev Infect Dis.* 1987;9(3):S261-9.
28. Lavy S. Microbial Resistance to Antibiotics. *Lancet* 1982;jul 10:83-86.
29. Davis J. Mechanisms of antibiotic resistance: Current concepts. Upjohn Co (ed). Kalamazoo, USA. 1980.
30. Jacoby G, Archer G. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *N Engl J Med.* 1991;324:601-12.
31. Watanabe I. The origin of "R" factors. *Ann NY Acad Sci.* 1987;82:126-31.
32. Davis J, Smith D. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Ann Rev Microbiol.* 1978;32:469-85.
33. Hardy I. Bacterial plasmids. American Society for Microbiology (ed). Geneva, Switzerland. 1986.
34. Cohen SN. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature* 1976;263:731-3.
35. Yocum RR, Waxman DW, Strominger JL. The mechanisms of action of penicillins. *J Biol Chem.* 1980;255:3977-9.
36. Georgopopadakou NH, Liu FY. Binding of  $\beta$ -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis* in relation to antibacterial activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1980;18:834-6
37. Bryan LE. Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in: *New Dimension in antimicrobial therapy.* Root RK and Sande MA eds Churchill Livingstone, New York. 1984:17-36
38. Hancock REW. Aminoglycoside uptake and mode of action: with special reference to streptomycin and gentamicin II. Effects of aminoglycosides on cells. *J Antimicrob Chemother.* 1981;8:429-32.

39. Medeiros AA.  $\beta$ -lactamases. Br Med Bull. 1984;40:18-27.
40. Bryan L, Godfrey AJ.  $\beta$ -lactam antibiotics: Mode of Action and Bacterial Resistance in: Antibiotics in Laboratory Medicine. Lorian V, ed. 3rd edition. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1991: 599-664.
41. Bush K. Recent Developments in  $\beta$ -lactamase Research and their implication for the future. Rev Infect Dis. 1988;10:681-90.
42. Sanders CC, Sanders WE. Clinical Importance of Inducible  $\beta$ -lactamases in Gram-Negative Bacteria. Eur J Clin Microbiol. 1987;6:435-7.
43. Sanders CC, Sanders WE. Microbial resistance to newer generation  $\beta$ -lactam antibiotics: Clinical and Laboratory implications. J Infect Dis. 1985;151:399-406.
44. Livermore DM. Clinical significance of  $\beta$ -lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. Eur J Clin Microbiol. 1987;6:439-45.
45. Vu H, Nikaido H. Role of  $\beta$ -lactam hydrolisis in the mechanism of resistance to  $\beta$ -lactamase constitutive *Enterobacter cloacae* strain to expanded-spectrum  $\beta$ -lactams. Antimicrob Agents Chemother. 1985;27:393-8.
46. Gates MI, Sanders CC, Goering RV, Sanders WE. Evidence of Multiple forms of type I chromosomal  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1986;30:453-7.
47. Shah PM, Stille W. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains more susceptible to cefoxitin than third generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother. 1983;11:597-8.
48. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of Plasmid-coded resistance to broad spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1985;28:302-7.
49. Brun-Buisson C, Legrand P, Phillipon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet. 1987; 2:302-6.

50. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Ferroux R, Chuzel R. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel  $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1987;20:323-34.
51. Férit A, Sirot D, Chazal C. Novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* more resistant to ceftazidime than to other broad spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32:626-30.
52. Gutmann L, Kitzis MD, Billot-Klein D, Gldstein F, Tran Van Nhieu G, Lu T, Carlet J, Collatz E, Williamson R. Plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (TEM-7) involved in resistance to ceftazidime and aztreonam. *Rev Infect Dis*. 1988;10:860-78.
53. Ben-Redjeb SB, Ben-Yaghlane HB, boujnah A, Phillippon A, Labia R. Synergy between clavulanic acid and newer  $\beta$ -lactams on nine clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium* resistant to third-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 1988;21:263-6.
54. Akova M, Yang Y, Livermore DM. Interactions of Tazobactam with inducibly and constitutively expressed Class-I  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 1990;25:199-208.
55. Bryan LE. Aminoglycoside resistance. In: *Antimicrobial Drug Resistance*. Bryan LE, ed. Orlando FL. Academic Press. 1984:241-77.
56. Maloney J, Rimland D, Stephens TP, Whitney A. Analysis of amikacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* developing in patients receiving amikacin. *Arch Intern Med*. 1989;149:630-4.
57. Naber KG, Grimm H, Rosenthal EJK, Shah PM, Wiedemann B. Resistance to aminoglycosides: the situation in the Federal Republic of Germany. *J Int Med Res*. 1990;18 (suppl 4): 6D-26.
58. Shaw KJ, Cramer CA, Rizzo M, Mierzwa R, Gewain K, Miller GH, Hare RS. Isolation, characterization, and DNA sequence analysis of an AAC(6)-II Gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:2052-62.
59. John J, McNeill WF. Characteristics of *Serratia marcescens* containing a plasmid coding for gentamicin resistance in nosocomial infections. *J Infect Dis* 1981;143:810-817.

60. Hopkins JD, Flores A, Pla MP, Lester S, O'Brien TF. Nosocomial Spread of an amikacin resistance gene on both a mobilized, nonconjugative plasmid and a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:1605-11.
61. Wiedemann Bernd. Mechanisms of antibiotic resistance and their dissemination of resistance genes in the hospital environment. *Infect Control* 1983;4:444-7.
62. Shaberg D, Alford RH, Anderson R, Farmer III JJ, Melly MA, Schaffner W. An outbreak of nosocomial infection due to multiply resistant *Serratia marcescens*: Evidence of interhospital spread. *J Infect Dis.* 1976;134:161-8.
63. Pedersen SS, Koch C, Hoiby N, Rosendal K. An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *J Antimicrob Chemother.* 1986;17:505-16.
64. Zaidi M, Sifuentes J, Bobadilla M, et al. Epidemic of *Serratia marcescens* bacteremia and meningitis in a neonatal unit in Mexico city. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1989;10:14-20
65. Giraud MC, Calva JJ, Huazano F, et al. Patrones de susceptibilidad a 19 antimicrobianos de gérmenes aislados en hemocultivos en un hospital de referencia de la ciudad de México. *Rev Inv Clin (Méx)* 1986;38:7-14.
66. *Bol Epidemiol HE CMN (IMSS)* 1987;3:1-3.
67. Shlaes DM, Currie-McCumber CA. Plasmid analysis in molecular epidemiology: a summary and future directions. *Rev Infect Dis* 1986;8:738-46.
68. Isenberg HD, Washington II JA, Doern GV, Amsterdam D. Specimen Collection and Handling. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann K, et al eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th edition. Washington: American Society for Microbiology. 1991:15-28.
69. Sifuentes J. *Manual de Laboratorio Microbiología Clínica*. Instituto Nacional de la Nutrición. México 1990.
70. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc.* 1975;50:339-46.
71. Aronson MD, Bor DH. Blood cultures. *Ann Intern Med.* 1987;106:246-53.

72. Ponce de León S, Manual para el Control de Infecciones Nosocomiales. Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". México, 1985.
73. Thoburn R, Fekety FR, Cluff LE. Infections acquired in the hospitalized patients. *Arch Intern Med.* 1968;121:1-10.
74. Schlesselman JJ: *Case control studies design, conduct, analysis.* New York City, Oxford University Press. 1982:145-70.
75. Annegers JF. University of Texas School of Public Health Epidemiology Package. Houston, Tx.
76. Geraldí GI. *Pseudomonas* and Related Genera. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann K, et al eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 5th edition. Washington. American Society for Microbiology. 1991:429-41.
77. Barry A, Thornsberry C. Susceptibility Tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann K, et al eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 5th edition. Washington. American Society for Microbiology. 1991:1117-25.
78. Sham D, Washington II JA. Antibacterial susceptibility tests. Dilution Methods. In: Balows A, Hausler WJ, Herrmann K, et al eds. *Manual of Clinical Microbiology.* 5th edition. Washington. American Society for Microbiology. 1991:1105-16.
79. O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH. Novel Method for detection of  $\beta$ -lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972;1:283-8.
80. Bryan LE, Godfrey A.  $\beta$ -lactam antibiotics: Mode of Action and Bacterial Resistance. In: Lorian V ed *Antibiotics in Laboratory Medicine.* 3rd ed. Baltimore, Maryland. Williams & Wilkins. 1991:599-64.
81. BirnBoim HC, Doly J. A rapide alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; *Nucleic Acids Res.* 1979;7:1513-23
82. Kado CI, Liu ST, Rapid procedure for detections and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981;145-1365-73

83. Brown EH, Spencer RC, Brown JMC. The emergence of bacterial resistance in hospitals—a need of continuous surveillance. *J Hosp Infect.* 1990;15:35-9.
84. O'Brien TF. Resistance of bacteria to antibacterial agents: Report of Task Force 2. *Rev Infect Dis* 1987;9(suppl 3):S244-60.
85. O'Brien TF, Acar JF, Medeiros AA, Norton RA, Goldstein F, Kent RL. International comparison of prevalence of resistance to antibiotics. *JAMA* 1978;239:1518-23.
86. Atkinson BA, Lorian V. Antimicrobial agent susceptibility patterns of bacteria in hospitals from 1971 to 1982. *J Clin Microbiol.* 1984;20:791-6.
87. Ponce de León RS, García ML, Volkow FP. Resultados iniciales de un programa de vigilancia de infecciones nosocomiales en los institutos nacionales de salud. *Salud Pública Méx.* 1986;28:583-92.
88. Peredo MA, Manjarrez MA, Rival LM, et al. Infecciones adquiridas por pacientes hospitalizados, etiología y formas clínicas. *Rev med IMSS (Méx).* 1981;19:605-9.
89. Wenzel RP, Thompson RL, Landry SM, et al. Hospital-acquired infections in intensive care units patients: An overview with emphasis in epidemics. *Infect Control.* 1983;4:371-5.
90. Wenzel RP, Osterman CA, Hunting KJ. Hospital-acquired infections II. Infections rates by service and common procedures in a university hospital. *Am J Epidemiol.* 1976;4:645-50.
91. Green JW, Wenzel PR. Postoperative wound infection: a controlled study of the increased duration of hospital stay and direct cost of hospitalization. *Ann Surg* 1977;185:264-8.
92. Haley RW, Schaberg DR, Crossley KB, et al. Extra charges and prolongation of stay attributable to nosocomial infections: a prospective interhospital comparison. *Am J Med* 1981;70:51-8.
93. Freeman J, McGowan JE. Day specific incidence of nosocomial infection estimated from a prevalence survey. *Am J Epidemiol* 1981;114:888-901.

94. Josephson A, Karanfil L, Alonso H, et al. Risk-specific nosocomial infection rates. *Am J Med.* 1991;91(suppl 3B):131S-7.
95. Armstrong D. Infections complications of Neoplastic disease. *Clin Bull.* 1976;6:135-41.
96. McManus AT, Mason AD, McManus WF, Pruitt BA Jr. Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a burn center. *Eur J Clin Microbiol.* 1985;4:219-23.
97. Corelli RL, Haas J, Guglielmo BJ. Prior Treatment with third-generation cephalosporins (TGC) is associated with subsequent isolation of TGC-resistant gram negative rods. Proceedings of the 31st. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago Ill. 1991:266
98. Locksley RM, Cohen M, Quin TC. Multiple antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction, transmission and evolution of nosocomial infection. *Ann Intern Med.* 1982;97:317-24.
99. Noskin GA, Till M, Patterson BK, Clarke JT, Warren J. High-level gentamicin resistance in *Enterococcus faecalis* bacteremia. *J Infect Dis.* 1991;164:1212-5.
100. Smits F, Prior A, Arblaster P. Incidence of *Candida* in hospitals in patients and the effects of antibiotic therapy. *Br Med J.* 1966;1:208-10.
101. Straton CW. *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control.* 1983;4:36-40.
102. Hammond SA, Morgan JR, Russell AD. Comparative susceptibility of hospital isolates of Gram-negative bacteria to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect.* 1987;9:255-64.
103. Centron García D, Ruiz Trevisan A, Botto L, Cervetto M, Sarubi MA, Zorzópolos J. An outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal unit: plasmid pattern analysis. *J Hosp Infect.* 1989;14:99-105.
104. Kitzis MD, Billot-Klein D, Goldstein FW, Williamson R, Tran Van Nhieu V, Carlet J, Acar JF, Gutmann L. Dissemination of the novel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase CTX-1, which confers resistance to broad spectrum cephalosporins, and its inhibition by  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32:9-14

105. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:147-51.
106. Verbist L, Incidence of multiresistant gram-negative bacterial isolates from intensive care units in Belgium. A surveillance study. *Scand J Infect Dis.* 1991;suppl 78:45-53.
107. Rubens CE, Farrar E, McGee ZA, Schaffner W. Evolution of a plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents during prolonged epidemic of nosocomial infections. *J Infect Dis* 1981;143:170-81
108. Tompkins LS, Plorde JJ, Falkow S. Molecular analysis of R factors from multi-resistant nosocomial isolates. *J Infect Dis* 1980;141:625-36.
109. Markowitz SM, Veazey JM, Macrina FL, Mayhall CG, Lamb VA. Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: implication to a conjugative R plasmid. *J Infect Dis.* 1980;142:106-12.
110. Jacoby G, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:164-9
111. Quinn JP, Miyashiro D, Sahn D, Flamm R, Bush K. Nobel plasmid-mediated  $\beta$ -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:1451-6.
112. French GL, Ling J, Chow KL, Mark KK. Occurrence of multiple antibiotic resistance and R-plasmids in gram-negative bacteria isolated from faecally contaminated fresh-water streams in Hong Kong. *Epim Inf.* 1987;98:285-99.
113. Cerón C, Sifuentes J, Calva J, Ontiveros C. Resistencia antimicrobiana de flora bacteriana entérica aisladas de muestras fecales de lactantes de San Pedro Martir, Tlalpan. Tesis de Licenciatura, Instituto Nacional de la Nutrición, "Salvador Zubirán". México 1992.
114. Haley R, Culver D, White JW, Morgan MW, Emori GT, Munn VP, Hooton TM. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in US hospitals. *Am J Epidemiol.* 1985;121:182-205.

115. Ponce de León S, Romero OC, Sandoval GM, Ruiz-Palacios GM. Eficacia de un programa de control de infecciones nosocomiales: una posibilidad real para mejorar la calidad de la atención médica. *Salud Pública Méx.* 1986;28:583-92.
116. Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infections: Examples of methodology and investigations of outbreaks. *Rev Infect Dis.* 1986;8:682-92.
117. Tenover F. Studies of antimicrobial resistance genes using DNA probes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29:721-5.
118. Eisenstein BI. New Molecular Techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *JID.* 1990;161:595-602.
119. Lifshitz G. ¿De veras necesitamos nuevos antibióticos?. *Rev Med IMSS (Méx)* 1987;25:229-31.
120. Gootz TD. Discovery and development of new antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:13-31.

**ANEXO I  
HOJA DE RECOLECCION DE DATOS**

Nombre \_\_\_\_\_ Registro \_\_\_\_\_  
 Servicio \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_  
 Fecha de ingreso \_\_\_\_\_ Día Recolección \_\_\_\_\_  
 Diagnósticos de ingreso:  
 A) \_\_\_\_\_ B) \_\_\_\_\_  
 C) \_\_\_\_\_ D) \_\_\_\_\_  
 E) Infeccioso \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Tiempo de estancia antes del aislamiento: \_\_\_\_\_

Intervenciones quirúrgicas y procedimientos invasivos:

A) \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_  
 B) \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_  
 C) \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Origen de la muestra: ( ) orina ( ) sangre ( ) expect ( ) herida  
 ( ) otras: \_\_\_\_\_

Definición: ( ) caso ( ) control

Administración previa de antimicrobianos ( ) SI ( ) NO

¿Cuáles?: \_\_\_\_\_ tiempo y dosis \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ tiempo y dosis \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ tiempo y dosis \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ tiempo y dosis \_\_\_\_\_

Motivo de uso previo \_\_\_\_\_

Germen aislado: ( ) Klebsiella ( ) Serratia  
 ( ) Pseudomonas ( ) Enterobacter  
 ( ) Citrobacter ( ) Otros

Sensibilidad: R = resistente S = sensible

( ) Amikacina ( ) Gentamicina ( ) Netilmicina ( ) Carbenicilina  
 ( ) Piperacilina ( ) Ceftriaxona ( ) Cefoperazona ( ) Ceftazidima

Otros: \_\_\_\_\_

Tratamiento actual: \_\_\_\_\_ dosis \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ dosis \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ dosis \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ dosis \_\_\_\_\_

Evolución clínica: ( ) curación ( ) mejoría ( ) falla

Bacteriológica: ( ) erradicación ( ) persistencia ( ) sobreinfección

Complicaciones: \_\_\_\_\_

**ANEXO II**  
**IDENTIFICACION DE *PSEUDOMONAS* spp.**

1. Crecimiento de la muestra en agar McConkey y sangre de carnero.
2. Incubación a 35°C por 18hrs
3. Tinción de Gram de las colonias.
4. Producción de oxidasas determinada en una colonia aislada en agar sangre de carnero (pigmentación violeta en papel secante).
5. Oxidación de glucosa demostrada por el método de Hugh-Leifson: se sembró una colonia en dos tubos con medio de cultivo y glucosa más colorante [aerobiosis y anaerobiosis (aceite)], se incubó a 37°C por 18 hrs. Con cambio de color (amarillo) en tubo sin aceite (metabolismo oxidativo).
6. Producción de pigmento en agar de Müeller-Hinton.
7. Crecimiento a 42°C.

**Identificación especies de *Pseudomonas* spp**

Característica	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>
Piocianina	+ 0 -	-	-
Pioverdina	+ 0 -	+	+ 0 -
Indofenol oxidasa	+	+	+
Movilidad	+	+	+
Arginina dehidrolasa	+	+	+
Hidrólisis gelatina	- 0 +	+	-
Crecimiento a 42°C	+	-	-

## ANEXO III

## SENSIBILIDAD POR DIFUSION EN AGAR

1. Se creció la cepa que se deseaba probar en agar McConkey a 35°C durante 18 hrs.
2. Se tomaron colonias individuales y se resuspendieron en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) hasta alcanzar la turbidez del 0.5 de McFarland.
3. Se mojó un hisopo en esta dilución y se sembró en forma masiva en una placa de agar Müller-Hinton.
4. Se colocaron los discos que contenían los antibióticos a probar.
5. Se incubaron a 35°C durante toda la noche (habitualmente 18 hrs.)
6. Se leyó el halo de inhibición producido por cada antibiótico de acuerdo a los estándares propuestos por la NCCLS (78).

ANTIBIOTICO	SENSIBLE (mm)		RESISTENTE (mm)	
	EC	PS	EC	PS
AMIKACINA	>17	>17	<14	<14
GENTAMICINA	>15	>15	<12	<12
NETILMICINA	>15	>15	<12	<12
TOBRAMICINA	>15	>15	<12	<12
CARBENICLININA	>23	>17	<19	<15
PIPERACILINA	>21	>18	<17	<14
CEFOTAXIMA	>23	>23	<14	<14
CEFOPERAZONA	>21	>21	<15	<15
CEFTAZIDIMA	>18	>18	<14	<14

EC = *Escherichia coli*PS = *Pseudomonas aeruginosa*

**ANEXO IV  
ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD POR MICRODILUCION.**

**Material.**

1. Placas de poliestireno estériles para ELISA con 96 pozos de 150  $\mu$ l de capacidad.
2. Pipeta multicanal
3. Puntas para pipeta 100  $\mu$ l
4. Viales para antibióticos estériles
5. Charolas de plástico estériles para vaciar reactivos
6. Pipetas Pasteur
7. Balanza analítica
8. Espejo para lectura

**Reactivos.**

1. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.1
2. Agua desionizada.
3. Caldo infusión cerebro-corazón (BII).
4. Caldo Müeller-Hinton, suplementado con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>.
5. Caldo Soya tripticaseína con glicerol al 20%.
6. Agar nutritivo.

**Preparación de soluciones.**

**Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).**

NaCl	16.0 g.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.4 g.
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	5.8 g.
KCl	0.4 g.
$\text{H}_2\text{O}$ desionizada	2.0 L.
Ajustar a pH 7.1	

Esterilizar en autoclave 15 minutos/15 Lb de presión.

**Caldo Müller-Hinton suplementado.**

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  8.36 g.

Se disolvió en 1 L. agua desionizada y se esterilizó en autoclave 15 min/15 Lb de presión

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.68 g.

Se disolvió en 1 L. agua desionizada y se esterilizó en autoclave 15 min/15 Lb de presión. Se preparó el caldo Müller-Hinton de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se esterilizó en autoclave 15 min/15 Lb de presión y se le añadieron 5 ml de la solución de  $\text{MgCl}_2$  y 10 ml de la de  $\text{CaCl}_2$ .

**Procedimiento.**

1. Se resembró la cepa obtenida en agar McConkey y se incubó a 35°C por 16-18 hrs., posteriormente se tomó una colonia y se disolvió en caldo BHI hasta ajustar al 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias).
2. De esta dilución se tomaron 10  $\mu\text{l}$  y se disolvieron en 10 ml de PBS.

3. Mientras tanto se colocaron 50  $\mu$ l del caldo Müeller-Hinton suplementado en cada uno de los pozos de las microplacas exceptuando el número uno.
4. Los antibióticos que se probaron fueron sales estériles puras y se calculó la cantidad necesaria de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{peso en g.}}{\text{potencia}} = \frac{\text{ml. de diluyente} \times \text{cantidad deseada en g.}}{\text{potencia}}$$

por ejemplo, para conocer la cantidad de amikacina =  $\frac{20 \times 512}{905} = 11.31$

la cantidad obtenida la dividimos entre 1000, para obtener los gramos que hay que pesar .011314 g., ésta es la cantidad que diluimos en 20 ml. Para el resto de antibióticos se pesaron:

- gentamicina = .00796 g.
- tobramicina = .00548 g.
- netilmicina = .00876 g.
- carbenicilina = .0493 g.
- pipracilina = .02552 g. (para 100 ml)
- ceftriaxona = .00512 g.
- cefoperazona = .010813 g.
- ceftazidima = .0060 g.

7. Una vez preparadas las diluciones se inocularon 50  $\mu$ l del antibiótico a todos los pozos excepto el último. De tal manera que, el pozo 1 sólo contenía antibiótico y el último sólo el microorganismo, utilizándose éste último como control de crecimiento.
8. De la misma manera se inoculó el microorganismo en todos los pozos.
9. Se incubaron a 35°C durante 16-18 hrs y se leyeron con ayuda del espejo.

10. En cada placa de ELISA se sembraron en las dos últimas dos líneas de pozos las cepas control de sensibilidad conocida, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 cuyos patrones de susceptibilidad a los diferentes antibióticos son:

Intervalos de Concentración Mínima Inhibitoria para los Antibióticos Probados de las Cepas Controles ( $\mu\text{g/mL}$ )

Bact	Amika	Genta	Netil	Tobra	Carbe	Pipe	Ceft	Cefo	Caz
PA	2-8	1-4	2-8	.5-2	16-24	2-8	2-8	2-8	2-8
EC	2-8	.5-4	.25-1	5-1	.25-1	4-16	1-4	.12-.5	.12-5

Bact= bacteria, PA = *Pseudomonas aeruginosa*, EC = *Escherichia coli*, Amika= amikacina, Genta= gentamicina, Netil= netilmicina, Tobra= tobramicina, Carbe= carbenicilina, Pipe= piperacilina, Ceft= ceftriaxona, Cefo= cefoperazona, Caz= ceftazidima.

11. Se consideró CMI aquella concentración existente en el último pozo donde no hubiese crecimiento bacteriano.

## ANEXO V

### PRODUCCION DE $\beta$ -LACTAMASAS

#### Método Nitrocefín.

**Principio.** La hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico de la cefalosporina cromogénica nitrocefín (3-(2,4 dinitrostril)(6R,7R)-7-(2-tienilacetamido)-cefem) produce un cambio de color de amarillo a rojo.

#### Procedimiento

1. Se utilizaron discos de nitrocefín que contienen 10 mg/ml, los cuales se colocaron sobre una placa de agar Müller-Hinton previamente inoculada con la cepa que se desara probar a una concentración final de 0.5 McFarland.
2. Se esperó de 10 a 30 minutos y se vigiló el cambio de color de amarillo a rojo.

## ANEXO VI SINERGISMO β LACTÁMICOS + CLAVULANATO

Con el mismo procedimiento utilizado para obtener la concentración mínima inhibitoria por microdilución en placa, se prepararon placas que contenían carbencilina + clavulanato, piperacilina + clavulanato, cefotaxima + clavulanato, cefoperazona + clavulanato y ceftazidima + clavulanato todas en una relación 1:2. Las cepas probadas para estos antibióticos fueron escogidas al azar entre las cepas multirresistentes y se probaron también para imipenem y aztreonam.

Se utilizaron los mismos controles de crecimiento y sensibilidad que en el ensayo de microdilución (ver anexo IV).

ANEXO VII  
PROCEDIMIENTO PARA EXTRACCION DE PLASMIDOS.

**Materiales**

**A. Amortiguador**

Solución de acetato 40 mM (pH 7.2)

Etilen diaminotetracético 2 mM

1. Ajustar pH 7.29 con solución glacial de ácido acético.
2. Aforar a 1000 ml.

**B. Solución para lisis.**

Dodecil sulfato de sodio al 3%

Tris 50 mM pH 12.2

1. Ajustar pH añadiendo NaOH 2N
2. Aforar a 1000 ml
3. Estabilizar por filtración

**C. Solución fenol-cloroformo (50/50) vol/vol.**

Fenol congelado y licuado 50-C: 50 mL

Cloroformo 50 mL

**D. Púrpura de Bromocresol en glicerol**

Púrpura de Bromocresol 0.25%

Glicerol 50%

Acetato 0.05 M (pH 7.9 )

### PROCEDIMIENTO

1. Después de la recuperación de una de las cepas en medio BHI (infusión cerebro-corazón) suplementado con antibiótico en el caso de microorganismos multirresistentes (amikacina 16 ug/mL, o cefotaxima 8 ug/ml).
2. Se sembró en una placa de agar McConkey para verificar se tratara de la cepa seleccionada.
3. Se cultivó nuevamente en 3 ml de caldo soya tripticase más el antibiótico apropiado a 35°C durante 18 horas.
4. Se colocó 1 mL de caldo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
5. Se centrifugó en una microcentrifuga Eppendorf por 5 minutos a 12000 RPM. Se decantó el sobrenadante y se repitió este procedimiento en tres ocasiones para concentrar la mayor cantidad de colonias bacterianas.
6. Se resuspendió en 100  $\mu$ L de solución A
7. Se añadieron 200  $\mu$ L de solución B, y se mezcló brevemente por agitación.
8. Se Incubó 60 min a 0 C.
9. Después se añadieron dos volúmenes de la solución C (600  $\mu$ L aproximadamente), se emulsificó la solución agitando suavemente y posteriormente se centrifugó 15 minutos en el a 12000 RPM.
10. Sin utilizar el precipitado de la interfase, se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf.
11. Se extrajo el ADN plasmídico con fenol saturado utilizando un volumen igual al sobrenadante (600  $\mu$ L).
12. Se mezcló durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 12000 RPM.
13. Se colocó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf y se le agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1).
14. Se mezcló perfectamente durante 5 minutos y se centrifusó 10 minutos a 12000 RPM.

15. Se colocó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf y se le agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
16. Se mezcló durante 5 minutos y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos.
17. Se colocó el sobrenadante en otro tubo Eppendorf y se precipitó con dos volúmenes y medio de alcohol etílico absoluto.
18. Se dejó precipitar por lo menos durante 2 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
19. Después se centrifugó 10 minutos a 12000 RPM y se tiró el sobrenadante.
20. Se dejó secar el exceso de alcohol y el precipitado se resuspendió nuevamente en  $30\ \mu\text{l}$  de tris-EDTA 1X.
21. Se tomaron  $5\ \mu\text{L}$  y se probaron en una electroforesis con Agarosa tipo II al 0.8%.
22. Se añadió azul de bromocresol con glicerol como indicador de corrimiento y en uno de los pozos fago lambda cortado con HindIII como indicador de peso molecular.

### ELECTROFORESIS SUBMARINA.

1. Se utilizo agarosa al 1%, para evitar subrecalentamiento y permitir observar plásmidos relativamente grandes.
2. Se utilizó amortiguador bajo en sal.  
40 mM Tris boratos  
2mM EDTA.  
Se ajustó el pH con ácido acético glacial.
3. La agarosa se disuolvió en el amortiguador durante 3 a 7 min en autoclave u horno de microondas (2 minutos).
4. La electroforesis se realizó en aparato horizontal descrito por McDonell (27).
5. El voltaje fué de 12 v/cm (120 v).
6. Se requirieron 50-60 minutos.
7. El control de corrimiento se realizó añadiendo púrpura de bromocresol al ADN depositado en el gel.
8. Un vez que el colorante llegó a la parte inferior del gel, éste se tiñó con bromuro de etilio 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 10-30 min a 23°C.
9. Se tomó fotografía del gel teñido bajo observación con luz ultravioleta con película tipo 55 (o 67) con un filtro naranja.