

11227

2
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
HOSPITAL CENTRAL SUR
DE ALTA ESPECIALIDAD
PEMEX**

**PATRON DE SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA
de Pseudomonas aeruginosa. Comparación del
método de Kirby Bauer y Las Determinaciones
de Concentración Inhibitoria Mínima**

TESIS DE POSTGRADO

**PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN
MEDICINA INTERNA
P R E S E N T A**

**DR. FREDDY RAFAEL DUMINGUEZ SOSA
TUTOR DE LA TESIS: DR. FRANZ PEREZ ANCONA**

FALLA DE ORIGEN



PEMEX MEXICO, D. F.

MAYO DE 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

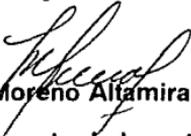
DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

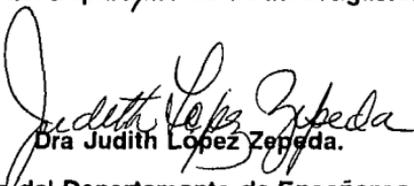
Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

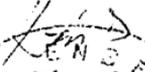
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

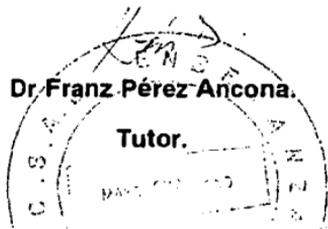
Dr José de Jesús González Jasso.
Director General Hospital Central Sur PEMEX.


Dr Jesús Arturo Caballero Hermosillo.
Jefe de Servicio de Medicina Interna.


Dra Laura Moreno Altamirano.
Jefe del Departamento de Investigación.


Dra Judith Lopez Zepeda.
Jefe del Departamento de Enseñanza.


Dr. Franz Pérez Ancona.
Tutor.



AGRADECIMIENTOS

A mi Madre, por otorgarme todo su cariño y apoyo, sin lo cual no hubiera podido realizar este trabajo.

A mi esposa, por su amor, paciencia y comprensión.

A los químicos Emma Zamora Dorbecker, Concepción De la Torre, Antonio Castillo y Bárbara Chávez Mazari, por su enseñanza y colaboración en la realización de este estudio.

INDICE

Introducción	1
Antecedentes	3
Mecanismos de Resistencia	5
Método de Difusión	10
Método de Dilución	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
Planteamiento del Problema	19
Objetivos	22
Hipótesis	23
Material y Método	24
Tipo de Estudio	24
Muestra	24
Definición de variables	25
Técnicas y Procedimientos	27
Resultados	30
Discusión	34
Conclusiones	40
Bibliografía	41
Anexo	45

INTRODUCCION

Desde la aparición de los primeros medicamentos antimicrobianos como la penicilina y sulfadiazina, los microorganismos han desarrollado mecanismos de defensa para crear resistencia a las drogas empleadas en su contra. Esto a llevado al desarrollo de nuevos medicamentos y concomitantemente a la aparición de nuevos mecanismos de resistencia por las bacterias, lo que a su vez ha condicionado que la mayoría de los microorganismos que habitan en los hospitales y que pueden causar infecciones nosocomiales sean resistentes a múltiples medicamentos y requieran de más de una droga para su manejo.

También es conocido, que el inicio de esquemas antimicrobianos empíricos en contra de estos microorganismos, de acuerdo a la experiencia previa en otros hospitales, es de utilidad en el pronóstico de los pacientes. En este estudio se intentó conocer con exactitud el perfil de susceptibilidad y resistencia de uno de los gérmenes oportunistas más

frecuentemente aislado en los hospitales, como es *Pseudomonas aeruginosa*. Esto se logró mediante la determinación de concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de antibióticos utilizados en su tratamiento, y a su vez, se valoró la utilidad del método de Kirby-Bauer, en comparación con el MIC. En muchos hospitales del país y particularmente en el Hospital Central Sur de Alta Especialidad (HCSAE) de Petroleos Mexicanos se efectúa el método de Kirby-Bauer.

Como resultado del estudio, se conoció el sitio de procedencia y fuente de aislamiento de las *Pseudomonas aeruginosa* de este hospital, tanto por servicio evaluado, como por variedad de cultivo empleado.

ANTECEDENTES

La aparición de gérmenes con capacidad de resistencia a la acción de algunos antimicrobianos, ha sido y es un problema de gran importancia que el médico debe de enfrentar en su práctica diaria, sobre todo a nivel intrahospitalario. Esto se viene produciendo desde el descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1946 ⁽¹⁾. El desarrollo de resistencia, como se denomina a la capacidad de los microorganismos de no ser destruidos por los antibióticos, se ha dado a la par con la aparición de nuevos medicamentos sintetizados para evitar este problema, sin embargo, hasta el momento no se ha podido asegurar la existencia de algún medicamento capaz de evitar la defensa de las bacterias en su totalidad. Por un lado los gérmenes son cada vez menos susceptibles a los antimicrobianos y por otro, las diferentes casas farmacéuticas desarrollan nuevos medicamentos con mayor cobertura, drogas que evitan la defensa de las bacterias, sin que hasta el momento se haya logrado vencer la resistencia de las mismas.

Como ejemplo de esta carrera entre gérmenes y medicamentos se puede describir el desarrollo de las cefalosporinas, antimicrobianos del tipo de los β -lactámicos ^(1,2), de uso relativamente común en el medio intrahospitalario. Su primera generación se desarrolló en 1948 por Brotzu ⁽¹⁾ a partir del hongo *Cephalosporium acremonium* , unos ejemplos son la cefalotina y la cefalexina, cuya actividad estaba dirigida específicamente contra gérmenes Gram positivos y algunos Gram negativos; sin embargo, al poco tiempo de su síntesis, aparecieron las primeras cepas resistentes, al parecer como consecuencia a resistencia cruzada con la penicilina. Posteriormente se desarrolló la llamada segunda generación de cefalosporinas como la cefuroxima, el cefaclor y cefamandol, cuya cobertura fué dirigida contra los Gram negativos. Fué de gran efectividad inicialmente pero poco tiempo después de su aparición, se detectaron las primeras cepas resistentes. Consecuentemente y en un período de tiempo menor al que transcurrió entre la primera y segunda generación, aparece una tercera generación de Cefalosporinas, como Cefotaxima, Cefoperazona, Ceftriaxona y Ceftazidima, con mayor cobertura

para Gram negativos, especificidad contra *Pseudomonas aeruginosa* y muy poca cobertura contra cocos Gram positivos. Con esto parecía que se había ganado la carrera contra la resistencia pero de nueva cuenta aparecieron cepas resistentes e incluso *Pseudomonas aeruginosa* adquirió resistencia contra la mayoría de estos medicamentos ^(3,4). Lo mismo sucedió con otros antimicrobianos, como las quinolonas, los carbapenems y los aminoglucósidos, contra los cuales ha aparecido algún tipo de resistencia por parte de los gérmenes y principalmente por los Gram negativos ⁽⁴⁾.

Es conocido que para poder establecer este tipo de mecanismos de defensa, las bacterias han desarrollado diversos medios para ser resistentes y transmitir esta información entre especies y generaciones del mismo microorganismo ^(2,5,7). Las formas de resistencia bacteriana se agrupan en alguno de los siguientes mecanismos generales :

- 1.- Impermeabilidad.
- 2.- Alteración en molécula blanco.

3.- Inactivación enzimática de la droga.

4.- Expulsión de la droga.

5.- Bloqueo al acceso de la droga.

1.- Impermeabilidad, es el mecanismo de resistencia intrínseca más frecuente que se encuentra en gérmenes como los anaerobios, y es prácticamente específico para Aminoglucósidos. En este mecanismo pueden influir tanto factores celulares específicos de la bacteria como la producción de "Slime", y/o alteraciones de pared, como factores del medicamento como el tamaño de su molécula o la estructura química secundaria. En microorganismos del género Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Enterobacter cloacae*, existe disminución global a la permeabilidad para los antibióticos β -lactámicos^(6,8,9), debido a cambios en los canales de entrada para los medicamentos denominados "PORINAS". Existen por lo menos 5 variedades de porinas que pueden condicionar resistencia (Omp c, Omp F, Lam D, Pho E, y la proteína K). Se codifican por cromosomas y tienden a ser más constantes que lo establecido para resistencia mediada por plásmidos. Aproximadamente el

15% de la resistencia para aminoglucósidos en *Pseudomonas aeruginosa* en los Estados Unidos de Norteamérica, está condicionado por este mecanismo.⁽¹³⁾

2.- **Alteración de la molécula blanco**, a diferencia del mecanismo anterior, este está genéticamente determinado por plásmidos y trasposones, codifica alteraciones en las moléculas blanco para los antibióticos. Los medicamentos más afectados por este mecanismo son los β -lactámicos, los aminoglucósidos y las quinolonas. Un ejemplo de esto lo constituye la alteración en las proteínas de unión para penicilinas, lo cual impide la fijación de las mismas a la bacteria. Este mecanismo ocurre frecuentemente en *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*^(8,10).

3.- **Modificación enzimática de la droga**, este mecanismo se ha detectado desde los años 40, por ejemplo la enzima penicilinasas, aislada en *Staphylococcus aureus* es capaz de hidrolizar el anillo β -lactámico de las penicilinas, por esta razón se han denominado β -lactamasas. Son las responsables de la gran mayoría de resistencia encontrada para Penicilinas,

Cefalosporinas y Carbapenems. La mayor parte de ellas se pueden clasificar como parte de las familias T.E.M o S.H.V, de acuerdo a su estructura química y sus elementos de codificación genética, generalmente dado por plásmidos o trasposones. Dentro de este grupo de modificadores de medicamentos existen las denominadas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs) de las que se cuentan aproximadamente 40 subtipos . Todas ellas son codificadas por plásmidos o trasposones, se reúnen en tres diferentes grupos de acción que son: fosfotransferasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas ^(12,13,14,15,16,17).

4.- Expulsión de la droga, mecanismo descrito unicamente para medicamentos del tipo de las tetraciclinas, existe tanto en Gram positivos como Gram negativos, esta codificado por plásmidos y su acción consiste en eliminar el medicamento del interior de la bacteria por medio de cambios en su carga eléctrica ^(13,17,18).

5.- Bloqueo al acceso de la droga o atrapamiento. Este mecanismo se describe para antimicrobianos del grupo de los Glucopéptidos como la Vancomicina, en el se describe un atrapamiento del medicamento y bloqueo de la unión del mismo a su sitio activo, particularmente al pentapéptido de la pared celular ^(12,19,20,21).

METODOS PARA EVALUAR SUSCEPTIBILIDAD / RESISTENCIA DE DIFERENTES MICROORGANISMOS.

1.- METODO DE DIFUSION (Kirby-Bauer) , el principio activo de este método consiste en la difusión del antimicrobiano en un medio de AGAR. Para obtener confiabilidad en este método es necesario que la técnica descrita para su realización sea controlada y estandarizada. Su utilidad es más como prueba cualitativa que cuantitativa .^(22,23)

El procedimiento consiste en diluir el microorganismo a probar en un buffer conocido como PBS o agua destilada estéril, a una concentración conocida de acuerdo a la turbidez de la solución, teniendo como estándar de referencia el 0.5 de Mcfarland (Nefelometría) y se siembra en un agar de características conocidas como el Müeller-Hinton en caso de enterobacterias y Gelosa-sangre para cocos Gram positivos, esto se efectúa con un isopo para distribución uniforme en toda la superficie del Agar. Una vez realizada la distribución, se procede a colocar discos con antimicrobianos seleccionados de acuerdo

a la cepa a probar, estos discos tienen una potencia conocida determinada por el fabricante y de acuerdo con el antimicrobiano y cepa a probar. Se deja incubar de 16 a 18 hrs mínimo, no mas de 24 hrs y se observa si existe o no crecimiento alrededor del disco de cada antimicrobiano y de acuerdo a la existencia de "halo" libre de crecimiento alrededor del disco y del tamaño de la zona, se podrá definir si el microorganismo es sensible o resistente a ese antimicrobiano,⁽²⁴⁾ de acuerdo a tablas establecidas para este propósito. El principio activo es que una vez colocado el disco, absorbe agua del Agar y difunde el antibiótico a través del mismo una vez hidratada la sal del medicamento, y al mismo tiempo, las colonias de la bacteria crecen, pero en donde el antibiótico es efectivo, no se produce crecimiento, dando lugar al mencionado halo libre de crecimiento bacteriano. ^(22,23,24)

2.- METODOS DE DILUCION, en esta categoría únicamente se hará referencia a la determinación de **Concentración Inhibitoria Mínima (MIC)** del antimicrobiano en

contra de los gérmenes, como representante de todo este grupo, obviando la descripción de otras pruebas como la determinación de actividad bactericida ⁽¹¹⁾.

La forma de determinar MIC para los gérmenes es la siguiente: primero se prepara una microplaca que consta de 12 filas de 8 pozos , en los cuales se deposita inicialmente un caldo de cultivo preparado con medio de Mueller-Hinton suplementado con calcio y magnesio; se inicia en la fila 2 y se finaliza en la fila 12. La cantidad a depositar es de 50 μ l en cada pozo. Posteriormente se pesa la cantidad deseada de antimicrobiano de acuerdo a la potencia del mismo y se diluye en agua desionizada estéril , se depositan también 50 μ l en las filas uno y dos de la microplaca. A partir de la fila dos se efectúa dilución uno a uno por medio de micropipetas múltiples, hasta llegar a la fila 11, en donde debe de restar 50 μ l, los cuales se eliminan. De esta forma, en la primera fila únicamente deberá existir antimicrobiano a probar y en la última fila medio de cultivo, de tal forma que la fila uno sea el control del antibiótico y la fila 12 el control de crecimiento del germen.⁽¹²⁾

Los antibióticos se utilizarán en diferentes concentraciones de acuerdo a la potencia establecida por el fabricante. En cada microplaca se pueden probar hasta 7 cepas problema y debe de colocarse una cepa control (en este caso *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), con patrón de susceptibilidad conocida.^(10,12) La forma de interpretación corresponde a la lectura de las placas posterior de 16 a 18 hrs de incubación. Se observará patrón de crecimiento en los micropozos (turbidez) y de acuerdo a la dilución efectuada se dará la concentración mínima a la cual no creció el germen, comparada con los patrones de referencia establecidos para cada antimicrobiano y los gérmenes a probar; De esta forma se establece la susceptibilidad o resistencia del microorganismo ⁽¹¹⁾.

De particular importancia es el hecho de que los perfiles de susceptibilidad/resistencia establecidos en un centro hospitalario, carecen de valor para otros centros ya que la flora es diferente en cada hospital e incluso en las diferentes áreas de un mismo hospital. ⁽²⁶⁾

La duración de un perfil de susceptibilidad/resistencia para un microorganismo determinado depende de los mecanismos de resistencia a los diferentes antimicrobianos, y de la correcta o incorrecta utilización de los medicamentos. ^(3,7,8,10,25)

Gilardi ⁽²⁵⁾ y Morrison ⁽²⁶⁾, mencionan que en los centros hospitalarios que estudiaron, la duración del perfil de resistencia es variable, pero que puede ser válido durante aproximadamente dos años; Sin embargo, si en la práctica clínica se observan cambios en la susceptibilidad de los gérmenes de acuerdo a un tratamiento dado, se deberá de efectuar una nueva determinación del perfil de los microorganismos más frecuentemente involucrados en la resistencia.

Como se informa en otras series, la resistencia a los antimicrobianos es un problema mundial, ⁽³⁴⁾ se considera que en hospitales de concentración y de tercer nivel, como el HCSAE, el número de pacientes que se complica con infecciones nosocomiales es importante, esto por padecimientos complicados, porque generalmente ya han sido estudiados y la mayoría de las

veces multitratados en otros centros hospitalarios. En este tipo de infección, al igual que lo publicado en E U A, *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los principales microorganismos involucrados en las infecciones nosocomiales ^(25,26,27,28). En el HCSAE no existía algún informe confiable de la susceptibilidad y resistencia del germen.

PSEUDOMONAS aeruginosa

Uno de los patógenos oportunistas intrahospitalarios, que por su frecuencia y resistencia a los antimicrobianos es considerado dentro de los más importantes es *Pseudomonas aeruginosa*, es el cuarto germen más frecuentemente aislado en forma intrahospitalaria , ocupa aproximadamente el 9.9% de las infecciones nosocomiales en los Estados Unidos de Norteamérica, es la segunda causa más frecuente de neumonía nosocomial (13%) y la tercera causa de infección de vías urinarias en pacientes hospitalizados (11.7%) asimismo, es la cuarta causa de infección de heridas quirúrgicas (7.4%). Más importante aún, es comentar que constituye la cuarta causa de bacteremia en los hospitales de EE UU .^(25,26,27,28)

Es un bacilo Gram negativo, que ocupa cerca del 70% de los no fermentadores. En forma normal puede habitar en la luz intestinal de animales mamíferos y el hombre, su principal reservorio es el paciente grave hospitalizado en unidades de

terapia intensiva o pisos de hospital. También se encuentra en cosméticos, suelo, agua, aparatos de ventilación mecánica y sustancias de asepsia y antisepsia como benzal, isodine, etc.^(27,28)

Cuando crece en medios de cultivo lo hace libremente en los medios de Mc Conkey y Müeller-Hinton, forma colonias de coloración y olor peculiar secundarios a sus características bioquímicas como la aminoacetofenona que le confiere su olor característico.⁽²⁹⁾ La coloración que le caracteriza y da su nombre, es amarillo verdoso o amarillenta, aunque en ocasiones se puede observar de color rojizo o café. Este color es debido a la combinación de pigmentos como la pioverdina y la piocianina. La coloración rojiza es por piorrubina y café por piomelanina .

También se distingue por crecer a 42°C , ser catalasa y oxidasa positivo, así como experimentar rectificación en su morfología al aplicarse hidróxido de potasio (KOH), algunas cepas tienen flagelo único. Posee una gran variedad de toxinas, las cuales pueden, en un grado menor o mayor, contribuir a su patogenicidad. Estas son: glucoproteína "slime", hemolisina, fibrinolisina, lipasa, esterasa, lecitinasa, elastasa, fosfolipasa, DNAsa, Endotoxina, enterotoxina y exotoxina^(27,28,29).

Infección Nosocomial.- Es aquella detectada en un paciente hospitalizado, que no se encontraba presente o en período de incubación al momento de ingresar al hospital. Cuando el período de incubación se desconoce, la infección puede ser considerada nosocomial si se desarrolla en cualquier momento después de la admisión del paciente al hospital. También se debe considerar como nosocomial a una infección presente al momento del ingreso pero que se desarrolla 48 o 72 hrs después de haberse egresado el paciente de algún centro hospitalario.⁽³⁵⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Es de conocimiento general la existencia de gérmenes con gran resistencia a los antibióticos en la mayoría de los hospitales del mundo, que condicionan las llamadas infecciones intrahospitalarias o nosocomiales, y que llevan a mayor morbimortalidad de los pacientes, y mayor tiempo de estancia hospitalaria. ^(26,28) También se sabe, que los sitios en los cuales la utilización irracional de antibióticos por períodos y dosis inadecuados condiciona la aparición de cepas resistentes a los medicamentos ⁽²⁸⁾, lo que condiciona que cada día existan más cepas resistentes y que además sean multirresistentes, es decir, que sean resistentes a más de un antimicrobiano. En los diversos hospitales de los Estados Unidos de Norteamérica y México, casi es una regla que las cepas sean más resistentes en las unidades de terapia intensiva, unidades de cuidado para pacientes quemados y unidades de cuidados coronarios ⁽²⁸⁾ así como en los plisos de medicina interna y neurología, donde por las características de los pacientes (pérdida de barreras naturales, compromiso inmunológico, etc) y el tiempo de estancia

hospitalaria así como el manejo que deben de recibir, permite la infección por estos gérmenes. Los microorganismos más frecuentemente involucrados en las infecciones intrahospitalarias son los bacilos Gram negativos ⁽²⁸⁾, y de estos son las enterobacterias las que más frecuentemente son aisladas, y también las más resistentes.⁽²⁶⁾

En el Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos, se han efectuado estudios en donde por medio del método de Kirby-Bauer se conoce la susceptibilidad y resistencia de los bacilos Gram negativos y especialmente de *Pseudomonas aeruginosa* ⁽³⁰⁾, sin embargo, aún cuando esta bacteria es frecuentemente aislada, no se conoce con exactitud su verdadero patrón de susceptibilidad o resistencia de este hospital, debido a que el método utilizado (Kirby-Bauer) puede ser poco confiable y en ocasiones no proporciona una información fidedigna.⁽²⁴⁾

Ante esto se propone conocer el verdadero perfil de susceptibilidad de estos microorganismos por medio de métodos

de detección más confiables, específicamente mediante la determinación de concentraciones inhibitorias mínimas por método de microdilución en placa, en cepas que previamente tengan determinado su perfil de susceptibilidad o resistencia por método de Kirby-bauer .

Una vez efectuado esto, como un efecto secundario del estudio, se podrá establecer un esquema de tratamiento empírico adecuado para los pacientes con probable infección por estos microorganismos , tomando como base la susceptibilidad de los gérmenes de este hospital y no las referencias publicadas de otros centros hospitalarios.

Si esto es funcional, permitirá de alguna manera disminuir el tiempo que transcurre entre la detección de gérmenes y la instauración de tratamientos adecuados, así como de forma secundaria disminuir la estancia hospitalaria, la morbimortalidad y los costos de los pacientes que contraen infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.⁽²⁶⁾

OBJETIVOS

- 1.- Determinar el Patrón de Susceptibilidad/ Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos.**

- 2.- Comparar la utilidad del método de Kirby-bauer vs la cuantificación de Concentraciones Inhibitorias Mínimas en la determinación de Susceptibilidad/ Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos.**

HIPOTESIS

El método de Kirby-Bauer tiene poca concordancia con la determinación de Concentraciones Inhibitorias Mínimas (MIC) para determinar el perfil de Susceptibilidad/ Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petroleos Mexicanos.

MATERIAL Y METODOS

Tipo de Estudio.- Prospectivo, Experimental comparativo y prolectivo.

Muestra.- Se incluyeron todas las cepas de *Pseudomonas aureginosa* aisladas en el Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petr6leos Mexicanos, durante el per6odo comprendido de julio de 1992 a mayo de 1993, sin importar el 6rea de procedencia (Medicina interna, Unidad de cuidados intensivos, Unidad de quemados, Cirugia general, etc), ni la fuente de cultivo (hemocultivos, secreciones, urocultivos, heridas, etc). Las cuales contar6n con determinaci6n de susceptibilidad/resistencia por m6todo de Kirby-Bauer.

DEFINICION DE VARIABLES

Las variables a estudiar fueron en orden de importancia:

- 1.- La susceptibilidad/resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* , esto evaluado por medio de los dos métodos ya descritos.**
- 2.- Sitio de procedencia, ya que aunque se sabe que las cepas procedentes de unidades de cuidados intensivos suelen ser multirresistentes, es posible que las aisladas en otras áreas hospitalarias también lo sean.**
- 3.- Fuente de aislamiento, importante para valorar la frecuencia de aislamiento de diferentes fuentes como secreciones diversas, sangre, orina, biopsias, etc.**

- 4.- **Enfermedades subyacentes importantes, puesto que en los pacientes con ruptura de barreras naturales o alguna inmunodeficiencia, los oportunistas se presentan con mayor frecuencia.**

- 5.- **Dispositivos invasivos al momento del aislamiento, permitieron conocer en forma completa el perfil del paciente infectado por oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa*.**

- 6.- **Infección Nosocomial, ya que es conocido que las infecciones por gérmenes adquiridos en el hospital son mas resistentes que las procedentes de la comunidad.**

TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Una vez recopiladas las cepas, se incluyeron en un medio enriquecido de soya tripticasa específico para Gram negativos, y se congelaron en alicuotas de 2.5cc a -70°C.

Posteriormente, se obtuvieron las cepas previamente incluidas mediante la descongelación de los viales y se sembraron en cajas de Petri con medio de Müeller-Hinton, se incubaron por 24 a 48 hrs en estufa a 42°C, con ambiente húmedo.

Una vez recuperadas se registraron las características clínicas del aislamiento (paciente) en instrumento diseñado para este propósito (ver anexo 1) y se efectuó la determinación de concentraciones inhibitorias mínimas de los diferentes antimicrobianos para las cepas recuperadas, de acuerdo al método de microdilución anteriormente descrito.

Los antibióticos probados tanto por MIC como por Kirby-bauer fueron Aztreonam (AZT), Carbencilina (CB), Cefoperazona (CFP), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP), Norfloxacina (NOR), Pefloxacina (PFX), Ofloxacina (OFX), Imipenem (IMP), Gentamicina (GM), Amikacina (AK), Tobramicina (TB), Netilmicina (NET), y Piperacilina (PIP).

Las sales fueron proporcionadas por las casas comerciales fabricantes de cada antibiótico, en las potencias estipuladas de acuerdo a los estándares del comité nacional de laboratorios clínicos en Villanova, Filadelfia , Estados Unidos de Norteamérica de 1990 ⁽⁶⁾.

Las características clínicas de los aislamientos y los datos de fuente de procedencia, padecimientos subyacentes, etc, se evaluaron por medio de estadística descriptiva simple.

Finalmente, se comparó el perfil de susceptibilidad/resistencia obtenido por el método de Kirby-Bauer con el obtenido con la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas,

por medio de tablas de contingencia 2x2 y análisis de concordancia y ajuste de concordancia esperada por azar mediante cálculo de índice de kappa.⁽³⁶⁾

De acuerdo a los resultados de las concentraciones inhibitorias mínimas se estableció el perfil de susceptibilidad/resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Central Sur de Alta Especialidad . Petróleos Mexicanos.

RESULTADOS

Durante el período de estudio se reclutaron 60 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, procedentes de las diferentes áreas del hospital. Se recuperaron 56 para efectuarles determinación de concentraciones inhibitorias mínimas (MIC), lo que representa un porcentaje de recuperación de 93.3%.

La distribución de las cepas de acuerdo al sitio de procedencia mostró (Gráfica 1) que la unidad de cuidados intensivos (UTI), fué el sitio con mayor número de aislamientos con 32 (37%), seguido por ortopedia con 8 (19.3%) y cirugía general con 6 (10.7%). En el servicio de medicina interna, únicamente se aislaron 4 cepas (7.1%). Las cepas restantes fueron aisladas en nefrología, neurocirugía, otorrinolaringología y urología.

De acuerdo a la fuente de cultivo, 24 cepas (42.9%) se aislaron de secreción bronquial obtenida mediante trampa de Müller, 18 (32.1%) procedentes de secreción de herida abierta. Se

obtuvieron 5 cepas (8.9%) de expectoración y 5 (8.9%) de orina. Los restantes de otras fuentes como drenaje percutáneo de senos paranasales y secreción de túnel de catéter de Tenhckoff.

(Gráfica 2)

Todos los casos estudiados fueron considerados infecciones nosocomiales. El 80% de todos los pacientes de donde se aislaron las cepas, habían recibido antimicrobianos previos al aislamiento. Todos los pacientes tenían algún dispositivo invasivo al momento de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*; los mas frecuentes (Gráfica 3) fueron los catéteres venosos de acceso central (85%), sondas urinarias (90%) y cánulas endotraqueales en la UTI (50%)

En lo referente a las enfermedades subyacentes, 30 pacientes tenían diabetes mellitus tipo II, 8 osteomielitis, 5 neumonía y 5 con colecistitis litiásica, 15 con hipertensión arterial sistémica, 2 con insuficiencia renal crónica terminal, 2 con sinusitis y 1 con enfermedad vascular cerebral trombótica, en mesencefalo. 1 paciente con estado hipercoagulable por

deficiencia de proteina S. 45 pacientes tuvieron un padecimiento subyacente , 9 dos padecimientos y 2 con tres enfermedades. (Tabla 1)

Coincidentemente con el período de estudio, se desarrolló un brote de *Pseudomonas aeruginosa* resistente en la UTI.

Los diferentes números de cepas susceptibles y resistentes a los antimicrobianos probados se señalan en las gráficas 4 y 5, tanto para el método de Kirby-Bauer como para la determinación de Concentraciones Inhibitorias mínimas (MIC). De esto es importante comentar la creciente aparición de cepas resistentes a aminoglucósidos como netilmicina, gentamicina, tobramicina y amikacina. La susceptibilidad del microorganismo fué buena para quinolonas (ciprofloxacina y norfloxacina), así como para carbapenems como Imipenem. La actividad de cefalosporinas de tercera generación como ceftazidima continua siendo adecuada.

Como se puede apreciar en la tabla 2, la concordancia observada fué baja en general (63.6%), aunque los valores mas altos fueron para ceftazidima (75%) ciprofloxacina (82%) y Norfloxacin (71%), después de ajustar por concordancia esperada por el azar (kappa) todas las concordancias fueron bajas demostrando escasa correlación entre un método y otro.

DISCUSION

El porcentaje de recuperación de cepas para el estudio fué adecuado (93.3%). En lo referente al tipo de enfermedad subyacente, procedencia de gérmenes y sitios de cultivo no encontramos diferencia para lo documentado en otro estudio ⁽³¹⁾ puesto que las enfermedades crónicas, con componentes de inmunosupresión, la ruptura de barreras naturales de protección y la instalación de dispositivos intravasculares ocurren con frecuencia semejante en los hospitales de concentración.⁽³²⁾

La susceptibilidad y resistencia observada en el estudio, difiere de lo publicado previamente ⁽³⁰⁾ en el HCSAE, sin embargo los informes previos fueron hechos unicamente con método de Kirby-bauer, y no se había efectuado una mejor prueba para detección como determinación de concentraciones inhibitorias minimas (MIC), lo cual confiere poca validez a los informes previos. Por otro lado, las cepas seleccionadas en este período fueron clasificadas como multirresistentes (resistentes a 2 o mas antibióticos de elección). es decir eran cepas consideradas

problema, lo cual pudo haber influido en los resultados obtenidos.

Como se pudo observar en la gráfica 4, las cepas continúan con sensibilidad aceptable a CIP, CAZ, IMP, PIP, CFP, y AK. También fueron sensibles a norfloxacin, pero este medicamento únicamente se distribuye en forma oral y no es de elección para las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, tanto por la vía de administración como por su concentración en el organismo. Su única indicación podría corresponder a infección de vías urinarias no complicada, y esto porque alcanza excelentes concentraciones en orina. Estos resultados correlacionan con los mecanismos de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* ⁽³⁻⁸⁾ que requiere de algún tiempo de exposición al antimicrobiano a dosis inadecuadas, o incluso adecuadas, para generar algún cambio en su membrana (porinas) ⁽⁶⁾ u algún otro mecanismo mediado por plásmidos ⁽³²⁾ para hacerse resistente a las drogas, este último mecanismo relacionado a imipenem, el cual es un medicamento eficaz, pero que en el HCSAE va disminuyendo su efectividad. Esto puede estar condicionado por su uso como monodroga en algunas ocasiones, lo cual está comprobado que genera aparición

de resistencia en forma temprana, e incluso, durante la terapia antimicrobiana ⁽¹⁴⁾. Por esta razón se sugiere el uso de terapia combinada con aminoglucósidos en casos de infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

Con respecto a los aminoglucósidos, específicamente amikacina, esta tuvo buena actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque su resistencia se codifica por plásmidos, esta es de aparición lenta en comparación con la generada contra otros agentes como las cefalosporinas de tercera generación ⁽¹⁰⁾. No sucede lo mismo para netilmicina, que se sugiere tiene un espectro de acción similar al de amikacina, pero que su actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* es limitada y su génesis de resistencia mucho más rápida. ⁽¹³⁾

Aún cuando en este reporte la sensibilidad para las quinolonas como CIP y NOR fué buena, la resistencia se observó en forma importante para PFX y OFX, hecho ya reportado en otras series ⁽²⁰⁾ y que al parecer ocurre en forma semejante a la resistencia contra imipenem.

La resistencia observada en otros agentes como cefalosporinas de tercera generación "sin actividad antipseudomonas" (ceftriaxona), monobactams con escasa actividad y ureidopenicilinas de primera generación (carbencilina), así como aminoglucósidos puede explicarse por escasa o "nula" actividad actual contra *Pseudomonas aeruginosa*, y por aparición de nuevas formas de resistencia.

La escasa correlación observada con el método de Kirby-Bauer y las concentraciones inhibitorias mínimas para determinar susceptibilidad/resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el HCSAE, puede obedecer a diferentes razones. La primera es que el método (Kirby-bauer) "per se" tiene características que producen variación en su realización, como son el tiempo de vida media de los discos con antibiótico, la desecación de los mismos de acuerdo al sitio de almacenamiento, las condiciones en que se encuentre el medio de Mueller-hinton, humedad del mismo, variabilidad en la cantidad de inóculo bacteriano al realizar la prueba, así como falta de homogeneidad al distribuir el inóculo.^(22,23,24) Aún cuando con cada serie de

pruebas se tenga un control con cepa de sensibilidad conocida, estos errores pueden presentarse, siendo esta la razón primordial por la cual el método se encuentra practicamente en desuso.

Por otro lado las determinaciones de concentraciones inhibitorias mínimas,⁽¹¹⁾ tienen menor margen de error porque trabajan con las sales de antibiótico a concentraciones que difícilmente serían equívocas, además de que en cada microplaca se verifica un control de crecimiento, un control de antimicrobiano, un control de cepa sensible conocida y los inóculos son por medios semiautomatizados con escasa posibilidad de error humano en su elaboración. Sin embargo uno de los riesgos mayores al efectuar MIC es la contaminación de los medios de cultivo durante el proceso . En esta serie no ocurrió contaminación en ninguna de las microplacas, sin embargo, cuando ocurre contaminación se debe de repetir la prueba incluyendo las mismas cepas problema y los controles susceptible y resistente.

De acuerdo con los resultados obtenidos los esquemas empíricos a utilizar cuando se sospecha de *Pseudomonas aeruginosa* deberán incluir ceftazidima y amikacina, o combinaciones con ciprofloxacina. Otra opción es el uso de piperazilina con amikacina. El uso de imipenem se debe de reservar para cepas resistentes a los previamente mencionados y no debe de utilizarse como monoterapia. Aunque la sensibilidad de los gérmenes fué adecuada para CFP, en la práctica clínica se ha observado pobre respuesta, por lo cual no se recomienda para esquemas empíricos. Norfloxacina no es recomendable para tratamiento de estas infecciones, a excepción de manejo ambulatorio de pacientes con infecciones de vías urinarias no complicadas. Se sugiere que estos esquemas empíricos se tomen en cuenta unicamente hasta contar con aislamiento bacteriano y determinación de susceptibilidad o resistencia del mismo.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

- 1.- El método de Kirby-bauer es poco concordante con el estandar ideal (MIC) para determinar susceptibilidad o resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el HCSAE.
- 2.- Se encontró alto índice de resistencia para Monobactams como aztreonam, así como para Aminoglucósidos como netilmicina.
- 3.- Estos resultados sugieren que en el HCSAE el método de Kirby-Bauer tiene escasa utilidad para determinar susceptibilidad/resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*, y condiciona la necesidad de utilizar otros métodos como los semiautomatizados (API system Beckton-Dickinson, o Bactec) que se describen con mejor concordancia al estandar ideal (MIC) que el Kirby-Bauer, son más rápidos de efectuar y con menor margen de error que los comentados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Mandell GI, Sande MA. Antimicrobial agents. Penicillins, Cephalosporins and other beta lactam antibiotics. In: Goodman and Gilman's Ed. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Singapore . Mc Graw-Hill International editions 1992. 1065-1067.
- 2.- Tipper DJ. Mode of Action of β -lactam antibiotics. *Pharmacol Ther* 1985;27:1-35.
- 3.- Follath F, Costa E, Thommen A, Frei F, Burdeska A, Meyer J. Clinical consequences of development of resistance to third generation cephalosporins . *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:446-450.
- 4.- Sanders WE, Sanders CC. Inducible β -lactamases: Clinical and epidemiological implications for use of newer cephalosporins. *Rev Infect Dis* 1988;10:830-838.
- 5.- Malonin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:1-5.
- 6.- Lindberg F, Normark S. Contribution of chromosomal β -lactamases to β -lactam resistance in enterobacteria. *Rev Infect Dis* 1986;8(suppl 3):292-304.
- 7.- Kresken M, Wiedemann B. Development of resistance in the past decade in central Europe. *J antimicrob chemother* 1986;18(suppl C):235-242.
- 8.- Buscher KH, Cullman W, Dick W, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* resulting from diminished expression of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:703-708.
- 9.- National Nosocomial Infection Surveillance. Centers for Disease Control 1989;35(155):17-24.

- 10.- Dworzack DL, Pugsley MP, Sanders CC, Horowitz EA. Emergence of resistance in Gram negative bacteria during therapy with expanded-spectrum cephalosporins. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:456-459.
- 11.- National Committee for clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for grow aerobically Approved Standard M7-A2, 1990 NCCLS, Villanova PA.
- 12.- Sabath LD. Biochemical and psychologic basis for susceptibility and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial agents. *Rev Infect Dis* 1984;6:S643-S656.
- 13.- McNeill WF, John JF Jr, Twitty JA. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Cystic fibrosis patients. *Am J Clin Pathol* 1984;81:742-747.
- 14.- Quinn JP, Dudeck EJ, DiVicenzo C, Lucks DA and Lerner SA. Emergence of Resistance to Imipenem During Therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 1986;154(2):289-294.
- 15.- Godfrey AJ, Hattelid L, Bryan LE. Correlation between lipopolysaccharide structure and permeability resistance in β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* . *Antimicrob agents Chemother* 1984;26:181-186.
- 16.- Quinn JP, Miyashiro D, Darzins A and Miller R. Imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* .*Antibiot Chemother* 1991;44:240-244.
- 17.- Dalhoff A. Clinical perspectives of Quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 1991;44:221-239.
- 18.- Appelbaum PC. Mechanisms and frequency of resistance to Temafloxacin. *Am J Med* 1991;91(6A):275-30S.
- 19.- Sanders C, Watanakunakorn Ch. Emergence of Resistance to β -lactams, aminoglycosides, and Quinolones During Combination Therapy for infection due to *Serratia marcescens*. *J Infect Dis* 1986;153(3):617-619.

- 20.- Ogle J, Reller B, Vasil M. Development of Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* to Imipenem, Norfloxacin, and Ciprofloxacin During Therapy: Proof Provided by Typing with a DNA Probe. *J Infect Dis* 1988;157(4):743 - 748.
- 21.- Jones L, Riddberg WK. Resistance mechanisms during treatment with vancomycin. Interscience Conference in Antimicrobial agents and chemotherapy 1989. Abst;271:146.
- 22.- Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M2-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 1984;4:16.
- 23.- Berry AL, Garcia F, Thrupp L. An improved single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. *Am J Clin Pathol* 1970; 53:149-158.
- 24.- Barry AL, Coyle MB, Thornsberry C, Gerlach EH, and Hawkinson. Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. *J Clin Microbiol* 1979;10:885-889.
- 25.- Gilardi GL. *Pseudomonas spp.* in clinical Microbiology. *Mt Sinai J Med* 1976;43:710-726.
- 26.- Morrison AJ, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* (Review). *Rev Infect Dis.* 1984;6(suppl):S627.
- 27.- Brokopp CD, Farmer JJ. Typing methods for *Pseudomonas aeruginosa*. In: Doggett RG ed. *Pseudomonas aeruginosa*. New York; Academic press; 1989:89.
- 28.- Kreger BE, Craven DE, Carling PC, et al. Gram-negative Bacteremia III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med* 1980;68:332.

- 29.- Doudoroff M, Palleroni NJ, Genus I. *Pseudomonas*. In: Buchanan RE, Gibbons NE, eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore; Williams & Wilkins ;1974: 217.
- 30.- Domínguez SF, Caballero J, Perez F. *Pseudomonas* y otros Gram negativos. Patrón de susceptibilidad Antimicrobiana en el Hospital de Concentración Nacional de Alta Especialidad PEMEX México, D.F. XVII Reunión anual de la Asociación Mexicana de Infectología 1992; Abst.61-5:71.
- 31.- Kunim CM MD. Resistance to Antimicrobial Drugs- A worldwide Calamity. *Ann Intern Med* 1993;118:557-561.
- 32.- Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992;257:1050-5.
- 33.- Neu HC. The Crisis of antibiotic resistance. *Science*, 1992;257:1064-73.
- 34.- Quinn JP, Darzins A, Miyashiro D, Ripp S, and Miller RV. Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* PAO: Mapping of the OprD2 Gene. *Antimicrob Agents and Chemother*, 1991;35(4):753-55.
- 35.- Wenzel R. Ed. *Infection Control Manual*. University of Iowa, Hospital and clinics. 9th edition 1992. pp 3-13.
- 36.- Kramer MS and Feinstein AR. *Clinical Biostatistics*. LIV. The biostatistics of concordance. *Clin Pharmacol Ther*. 1981;29(1):111-123.

ANEXO I

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

Ficha Lab _____ Reg Paciente _____ Fecha aislado _____

Fuente del Aislamiento ()

1.Sangre 2.Orina 3.Herida Abierta 4.Absceso cerrado
5.Expectoración 6.Trampa Müeller 7.Fistula osea.
8.Médula osea 9.LCR 10.cateter (especificar) 11.otros

Patron de Sensibilidad (Kirby-bauer)

S. sensible R. resistente I. intermedio. N. no hay dato

1.Aztreonam () 2.Carbencilina () 3.Cefoperazona ()
4.Ceftazidima () 5.Ceftriaxona () 6.Ciprofloxacina () 7.Norfloxacina ()
8.Pefloxacina () 9.Ofloxacina () 10.Imipenem () 11.Gentamicina ()
12.Amikacina () 13.Tobramicina () 14.Netilmicina () 15.Piperacilina ()

Lugar de Aislamiento en el hospital _____

Infección Nosocomial Si () No ()

Fecha ingreso al Hospital _____

Fecha de Aislamiento _____

Enfermedad de Base _____

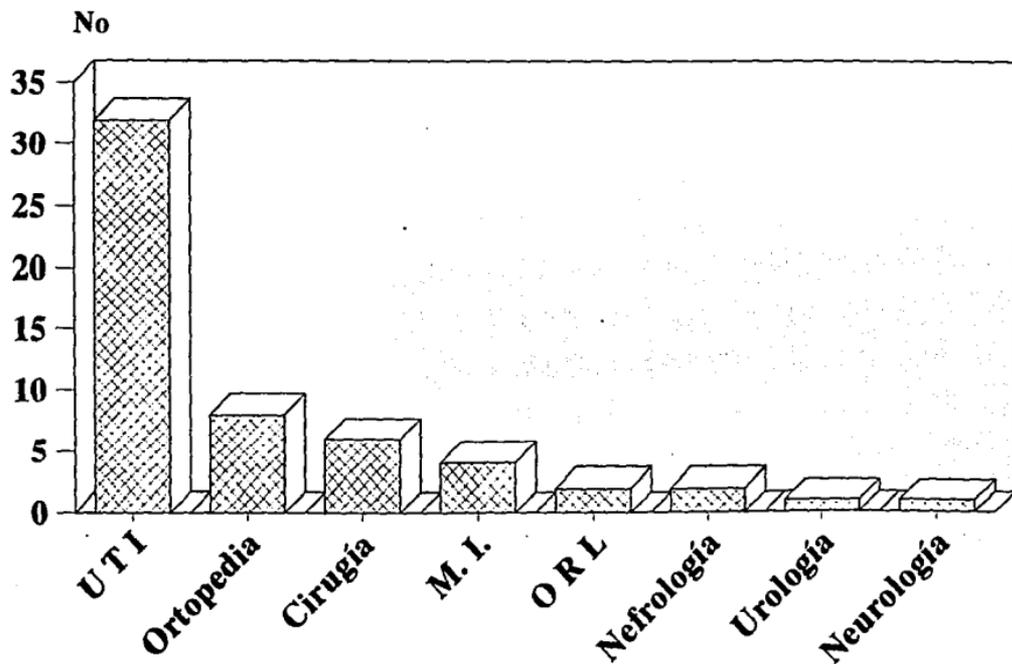
Dispositivos Invasivos al momento de aislamiento _____

Patron de Sensibilidad (MIC)

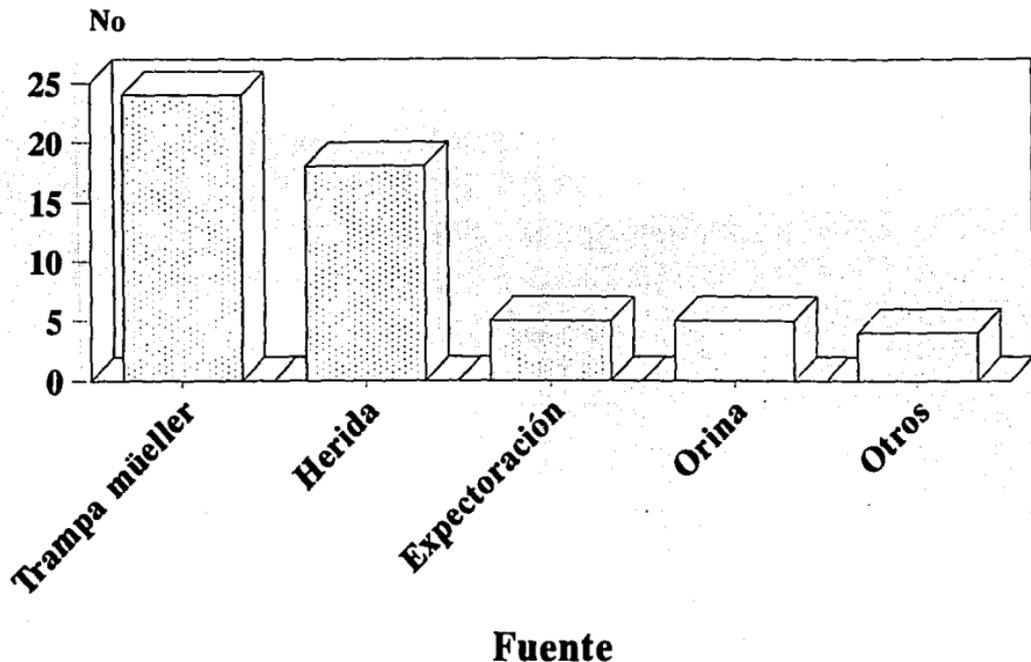
S.sensible R.resistente I.intermedio.

1.Aztreonam () 2.Carbencilina () 3.Cefoperazona ()
4.Ceftazidima () 5.Ceftriaxona () 6.Ciprofloxacina ()
7.Norfloxacina () 8.Pefloxacina () 9.Ofloxacina () 11.Imipenem ()
11.Gentamicina () 12.Amikacina () 13.Tobramicina () 14.Netilmicina ()
15.Piperacilina ()

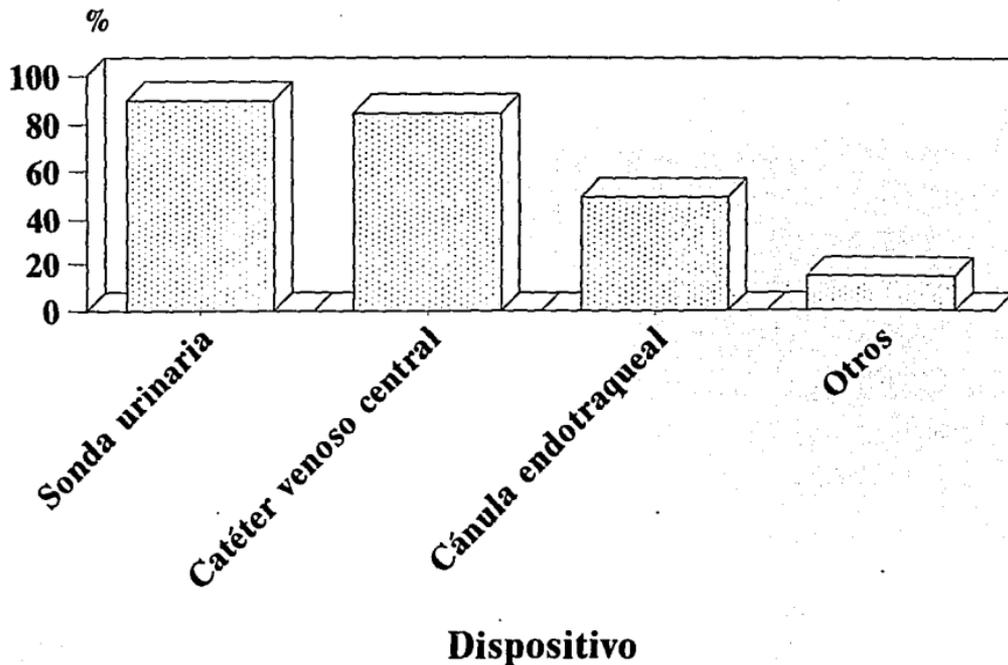
Gráfica 1.- Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo al servicio de procedencia



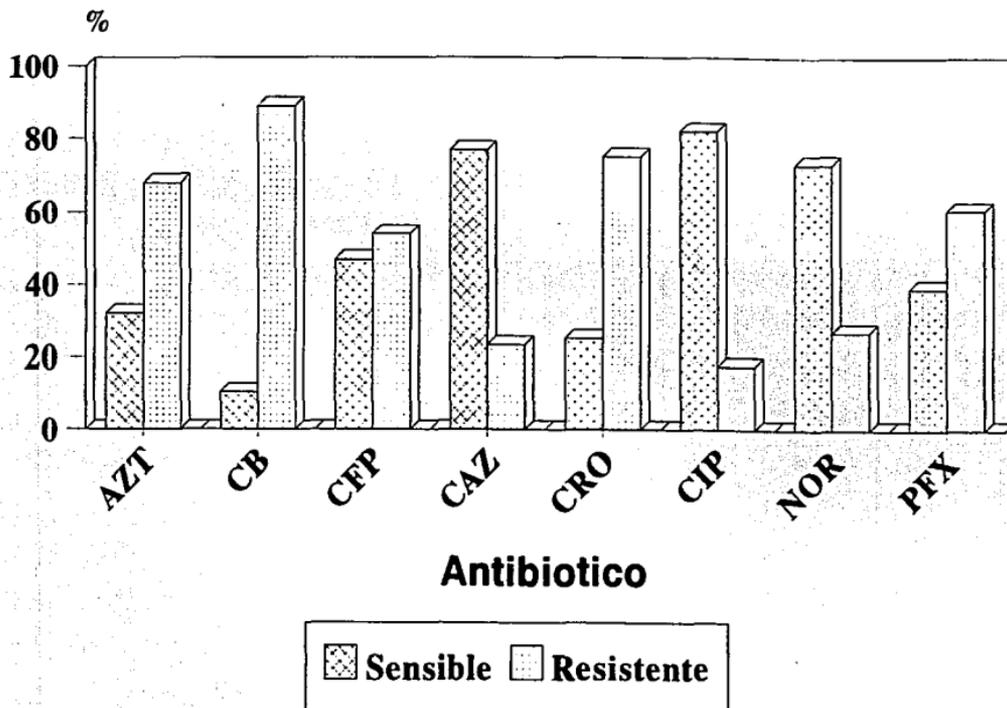
Grafica 2.- Aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo a la fuente



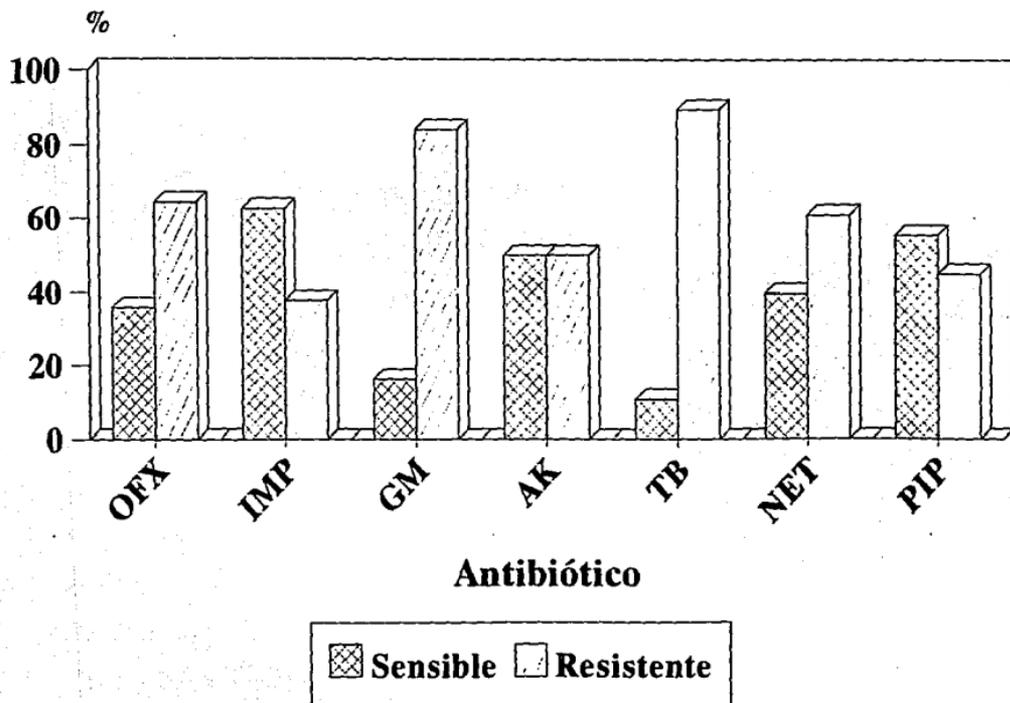
Grafica 3.- Dispositivos invasivos al momento del aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*



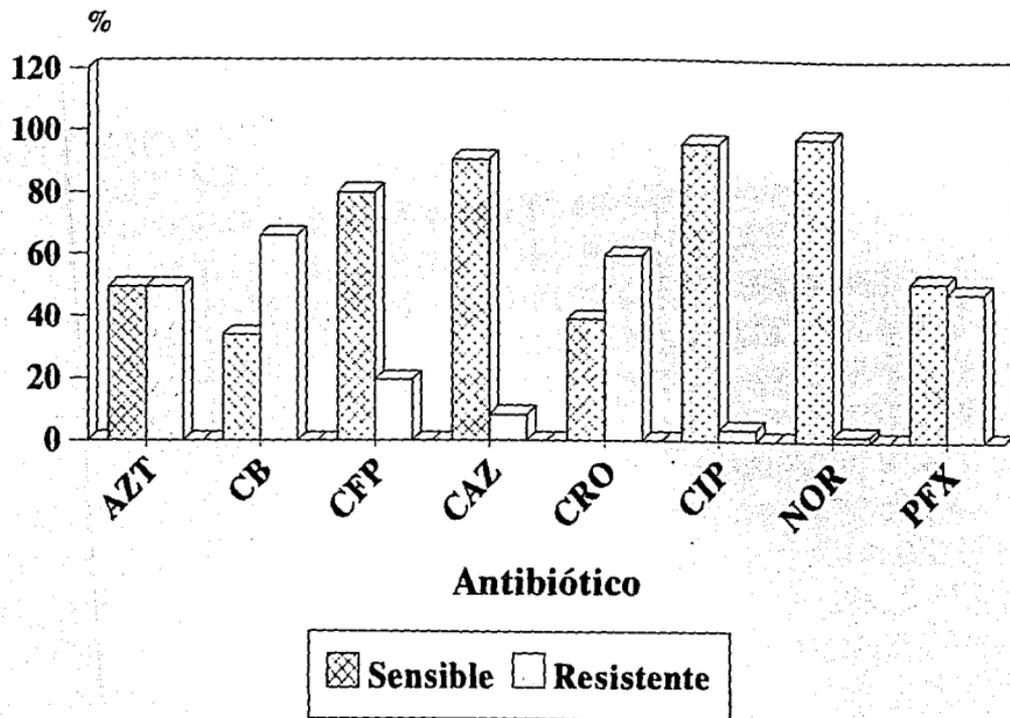
Grafica 4.- Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes antimicrobianos (Kirby-Bauer)



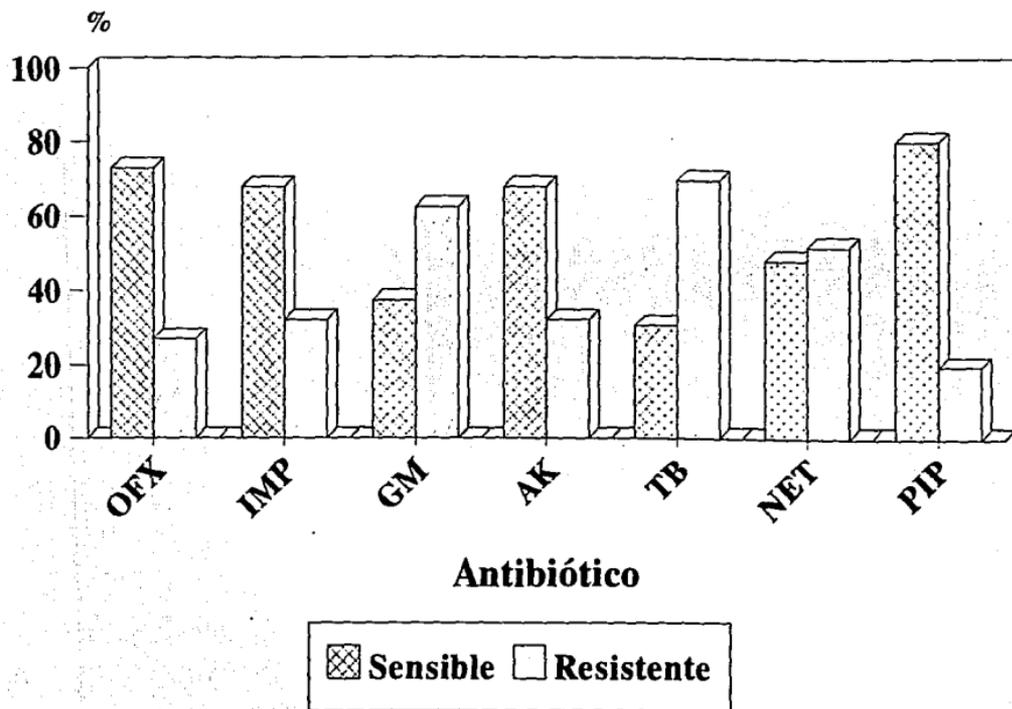
Grafica 4.- Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes antimicrobianos (Kirby-Bauer)



Gráfica 5.- Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes antimicrobianos (M I C)



Gráfica 5.- Sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes antimicrobianos (M I C)



**Tabla 1.- Enfermedades subyacentes en
pacientes con *Pseudomonas aeruginosa***

ENFERMEDAD	NUMERO
Diabetes mellitus	30
Hipertensión arterial	15
Osteomielitis	8
Colecistitis	5
Neumonía	5
Insuficiencia Renal	2
Sinusitis	2
E V C	1
Estado Hipercoagulable	1

Tabla 2.- Valoración estadística del método de Kirby-Bauer

Antibiótico	Concordancia	Concordancia esperada al azar	Indice de kappa
AZT	60%	50%	0.20
CB	66%	62%	0.10
CFP	51%	47%	0.07
CAZ	75%	72%	0.10
CRO	53%	55%	0.04
CIP	82%	79%	0.14
NOR	71%	72%	-0.03
PFX	66%	49%	0.33
OFX	58%	43%	0.26
IMP	58%	54%	0.08
GM	64%	58%	0.14
AK	60%	50%	0.20
TB	69%	65%	0.11
NET	58%	50%	0.16
PIP	64%	53%	0.23

Tabla 3.- Susceptibilidad/Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* (56 cepas) de acuerdo a MIC y Kirby-Bauer

Antibiótico	Kirby-Bauer		MIC	
	Sensible	Resistente	Sensible	Resistente
AZT	18	38	28	28
CB	6	50	19	37
CFP	26	30	45	11
CAZ	43	13	51	5
CRO	14	42	22	34
CIP	46	10	54	2
NOR	41	15	55	1
PFX	22	34	29	27
OFX	20	36	41	15
IMP	35	21	38	18
GM	9	47	21	35
AK	28	28	38	18
TB	6	50	17	39
NET	22	34	27	29
PIP	31	25	45	11