



11262
26

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POST GRADO

Utilidad de la electroforesis
de campos pulsados para analizar
cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

P R E S E N T A

DRA. ADRIANA ABIGAIL VALENZUELA FLORES

201438

2

0

0

1



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS
SEDE CENTRO

Utilidad de la electroforesis
de campos pulsados para analizar
cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente

TUTOR

DR. FORTINO SOLÓRZANO SANTOS

Jefe de Infectología del Hospital de Pediatría

Centro Médico Nacional Siglo XXI

CO-TUTORA

DRA. MARÍA GUADALUPE MIRANDA NOVALES

Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria

Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

COLABORADORES

TL. BLANCA LEAÑOS MIRANDA

DR. ONOFRE MUÑOZ HERNÁNDEZ

ALUMNA

DRA. ADRIANA ABIGAIL VALENZUELA FLORES

Médico Pediatra

SEDE

Hospital de Pediatría

Centro Médico Nacional Siglo XXI

AGRADECIMIENTOS

A mis maestros

Juan Garduño E., Alejandro Gómez D., Wachter Niels R.,
Sergio Cuevas, Alejandro Reyes, José R. Paniagua y Dante
Amato por toda la orientación que siempre me han brindado.

A

Guadalupe Miranda N., por su enseñanza y dedicación
en este estudio.

Blanca Leños M., por todas las facilidades prestadas para
la elaboración de los métodos en el laboratorio.

En especial al

Dr. Fortino Solórzano S., por su confianza y apoyo en todo
momento para la realización de esta investigación.

A mis revisores

M. Sigfrido Rangel F., Javier Torres y Samuel Ponce de León.,
por sus comentarios y críticas que enriquecieron
el trabajo de investigación.

Al

Dr. Onofre Muñoz H.
quien me apoyo en mi desarrollo académico
en esta institución.

ÍNDICE

7

INTRODUCCIÓN

10

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

10

OBJETIVO GENERAL

10

OBJETIVO ESPECÍFICO

10

MATERIAL Y MÉTODO

15

RESULTADOS

25

DISCUSIÓN

30

CONCLUSIONES

31

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales son una de las complicaciones más frecuentes que pueden presentarse en los pacientes internados en las unidades de atención médica,¹ elevando la morbimortalidad y los costos de atención. En México se reportó en los Institutos Nacionales de Salud, una tasa de nueve infecciones por cada 100 egresos, con una mortalidad del 17% en niños menores de un año y de 4% en niños de uno a quince años.^{2,3} En otros reportes, la tasa fue de 2.5 a 18.9 infecciones por 100 egresos en los años de 1986 y 1995 en hospitales de segundo y tercer nivel de atención, tales como: Hospital Regional de Jalisco, Hospital Infantil de México, Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional y Hospital de Infectología de Centro Médico La Raza.^{1,4-6} Las tasas más altas se reportan en recién nacidos: del 25% en el Hospital Infantil de México⁴ y del 34 % en el Hospital de Pediatría CMN.⁷ Para hospitales pediátricos de tercer nivel, la tasa de mortalidad ha variado de 10.5 a 11.7 por cada 100 infecciones nosocomiales.^{1,8}

La etiología de las infecciones nosocomiales, es muy variada y las fuentes de infección son múltiples. Dentro de los agentes bacterianos, *Klebsiella* es uno de los patógenos aislado con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales, los huéspedes más afectados son pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades crónicas y recién nacidos. *Klebsiella* spp. es causa del 5 a 8% de las infecciones nosocomiales (endémicas) y el 3% de los brotes intrahospitalarios.^{9,10} La mayoría de las infecciones nosocomiales por *Klebsiellae* son ocasionadas por *Klebsiella pneumoniae*, causante de bacteremias en un 26% a 46% de los casos, con una alta mortalidad en todos los grupos etarios sobre todo en recién nacidos (25% a 55%).¹¹⁻¹⁴

Debido a la naturaleza y trascendencia de las infecciones nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae*, es prioritario realizar investigaciones epidemiológicas que permitan identificar, de forma oportuna, el problema y posteriormente efectuar las estrategias de intervención.

Para la investigación de los brotes bacterianos intrahospitalarios se requiere de la identificación y de la diferenciación de la cepa causante. Si el brote está causado por una sola cepa puede inferirse la exposición a una fuente común, o reservorio, y/o que exista transmisión de paciente a paciente dentro de una misma sala y entre los distintos servicios de un hospital.¹⁵ Sin embargo debe precisarse si todas las cepas encontradas en los pacientes y/o reservorios tienen el mismo origen. En este aspecto, el término de clona se aplica a microorganismos que poseen

las mismas características genotípicas que indican que proviene de un mismo origen, sin importar las fuentes o el sitio de la infección en los enfermos.¹⁶

El diagnóstico y la evaluación de un brote pueden ser realizado por técnicas fenotípicas, que se basan en las características físicas que expresan los microorganismos y por técnicas genotípicas o moleculares, que analizan el ADN cromosomal o extra cromosomal del germen en estudio. Ambas pretenden establecer la similitud entre las cepas y conocer la diseminación de una epidemia.¹⁶⁻¹⁸ La utilidad de una característica fenotípica o genotípica en la tipificación está relacionada a su estabilidad dentro de la cepa y a su diversidad dentro de su especie.¹⁶ En el proceso de investigación de epidemias se pueden usar diferentes métodos de tipificación. La selección del mejor método depende de su capacidad para permitir discriminar, reproducir e interpretar, así como de la factibilidad de su realización en cada unidad de atención médica. No existe un estándar de oro para determinar la sensibilidad y la especificidad al comparar una técnica con otra, por lo que los resultados de la tipificación deben ser analizados en conjunto con los datos clínicos y epidemiológicos para establecer recomendaciones sobre las medidas de control en la diseminación del brote.¹⁹

Dentro de los métodos utilizados para el estudio de brotes por *Klebsiella pneumoniae* se encuentran: los métodos de biotipificación y la tipificación por antibiograma que no discriminan entre diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae*, mientras la tipificación de fagos y las bacteriocinas tienen un poder de discriminación mayor pero son arduos, costosos, de difícil reproducibilidad y poco eficaces.^{15,20,21} La ribotipificación tiene un poder de discriminación moderado en aislamientos de *Klebsiella* spp., ya que los patrones obtenidos o ribotipos presentan numerosos fragmentos de restricción difíciles de interpretar, derivados de la presencia de múltiples operones ribosomales.^{16,20,21} Otro de los métodos utilizados, es el de fragmentos de polimorfismo de restricción (RFLP). Con este método se representa solo una fracción del ADN cromosomal y se requiere de cebadores o iniciadores en la tipificación de las especies. Su utilidad se ha demostrado en *Mycobacterium tuberculosis* y en especies de *Acinetobacter*.²² En Hospitales pediátricos, se ha aplicado en conjunto con otros métodos para corroborar la tipificación de algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas.^{24,25}

Actualmente, el método de electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE) es el más utilizado en estudios de brotes y puede considerarse de elección para tipificar la mayoría de las especies responsables de infecciones nosocomiales.²⁶ Este método fue introducido por Schwartz y Cantor,

los cuales usaron dos electrodos en un receptáculo para generar campos magnéticos intrahomogéneos capaces de separar el ADN en un intervalo de 50 kb a 2 mb.¹⁹ Al igual que otros métodos moleculares se analiza el ADN cromosomal, con la diferencia que detecta las más mínimas variaciones cromosómicas. Esta técnica es una variante de la electroforesis horizontal y permite la representación de el 90% del material cromosómico en un solo gel,¹⁵ por lo que requiere del uso de enzimas de restricción. La selección de la enzima depende de la estructura del ADN cromosomal en las bacterias.

En el grupo de bacterias Gram positivos con composición primaria en adenina (A) y tiamina (T), se requieren enzimas de restricción con sitios de reconocimiento basados en guanina (G) y citosina (C) como *Sma* I (CCCGGG), *Csp* I (CGGA/TCCG) o *SgrA1* (CA/GCCGGT/CG), obteniéndose de 5 a 20 fragmentos de restricción de 10 a 800 kb aproximadamente, lo que facilita la comparación e interpretación de los aislamientos aplicando los criterios internacionales, que establecen la relación entre los patrones de restricción de ADN. En contraste, el ADN cromosomal de las bacterias Gram negativas se caracteriza por un alto contenido en G+C, y requieren enzimas que reconozcan secuencias de ADN con ocho pares de bases y poco frecuentes como *Not* I (GCGGCCGC) o *Sfi* I (GGCCN₅GGC) o, si el material cromosómico es principalmente en A+T, se utiliza *Xba* I (T/CTAGA) o *Spe* I (ACTAGT).^{22,26} En la actualidad, la extracción y digestión del ADN cromosomal resulta más sencillo con la utilización de los nuevos reactivos de PFGE (Kit-Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

La técnica de PFGE se ha aplicado en estudios epidemiológicos de *Klebsiella pneumoniae* con diversos fines. Durante la vigilancia de una unidad de cuidados intensivos de Europa, confirmó que varias cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (SHV-13) resultaron de la diseminación de una clona.²⁵ En otro estudio realizado en 14 hospitales de Francia, comprobó que cepas de *Klebsiella pneumoniae* que mostraron diferentes patrones de susceptibilidad y diferentes patrones de plásmidos, tenían un mismo origen clonal.²⁷ Además, se utilizó para corroborar la existencia de transmisión cruzada en pacientes de una misma unidad.²⁸ Con este método es posible confirmar reinfecciones, recaídas o la persistencia de una misma cepa en un mismo paciente y en diversos pacientes de una o de varias unidades hospitalarias. Los resultados obtenidos han demostrado ampliamente la utilidad de PFGE²⁹⁻³³ para dilucidar el modo de diseminación y reservorios de las infecciones nosocomiales así como, en la evaluación de las medidas efectivas para el control de situaciones endémicas o epidémicas en la población intrahospitalaria.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social la tasa de infección nosocomial en los años de 1992 a 1996 fue de 13 a 39 casos por cada 100 egresos. A partir de septiembre de 1996 se encontró un incremento en el número de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en comparación a los meses previos, cifra que se duplicó y triplicó en algunos servicios. Estos hechos sugirieron la presencia de un brote epidémico. En mayo de 1997 se detectó un aumento paulatino en la frecuencia de bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* lo que hizo sospechar la perpetuación de una cepa epidémica.

En esta situación se planteó la siguiente pregunta: ¿fue una misma clona la que causó los brotes nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae* en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante el periodo de agosto de 1996 a noviembre de 1997?

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las cepas de *Klebsiella pneumoniae* responsables de las infecciones nosocomiales que se aislaron de los pacientes hospitalizados en el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997, mediante el método de electroforesis en gel por campos pulsados.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Establecer si hubo predominio de una clona en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* causantes de infecciones nosocomiales durante el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, retrolectivo y observacional en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, centro de referencia de tercer nivel de atención médica, de enseñanza e investigación. Cuenta con 190 camas para hospitalización, está organizado en cinco áreas con los siguientes servicios:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social la tasa de infección nosocomial en los años de 1992 a 1996 fue de 13 a 39 casos por cada 100 egresos. A partir de septiembre de 1996 se encontró un incremento en el número de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en comparación a los meses previos, cifra que se duplicó y triplicó en algunos servicios. Estos hechos sugirieron la presencia de un brote epidémico. En mayo de 1997 se detectó un aumento paulatino en la frecuencia de bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* lo que hizo sospechar la perpetuación de una cepa epidémica.

En esta situación se planteó la siguiente pregunta: ¿fue una misma clona la que causó los brotes nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae* en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante el periodo de agosto de 1996 a noviembre de 1997?

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las cepas de *Klebsiella pneumoniae* responsables de las infecciones nosocomiales que se aislaron de los pacientes hospitalizados en el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997, mediante el método de electroforesis en gel por campos pulsados.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Establecer si hubo predominio de una clona en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* causantes de infecciones nosocomiales durante el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, retrolectivo y observacional en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, centro de referencia de tercer nivel de atención médica, de enseñanza e investigación. Cuenta con 190 camas para hospitalización, está organizado en cinco áreas con los siguientes servicios:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social la tasa de infección nosocomial en los años de 1992 a 1996 fue de 13 a 39 casos por cada 100 egresos. A partir de septiembre de 1996 se encontró un incremento en el número de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en comparación a los meses previos, cifra que se duplicó y triplicó en algunos servicios. Estos hechos sugirieron la presencia de un brote epidémico. En mayo de 1997 se detectó un aumento paulatino en la frecuencia de bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* lo que hizo sospechar la perpetuación de una cepa epidémica.

En esta situación se planteó la siguiente pregunta: ¿fue una misma clona la que causó los brotes nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae* en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante el periodo de agosto de 1996 a noviembre de 1997?

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las cepas de *Klebsiella pneumoniae* responsables de las infecciones nosocomiales que se aislaron de los pacientes hospitalizados en el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997, mediante el método de electroforesis en gel por campos pulsados.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Establecer si hubo predominio de una clona en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* causantes de infecciones nosocomiales durante el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, retrolectivo y observacional en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, centro de referencia de tercer nivel de atención médica, de enseñanza e investigación. Cuenta con 190 camas para hospitalización, está organizado en cinco áreas con los siguientes servicios:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social la tasa de infección nosocomial en los años de 1992 a 1996 fue de 13 a 39 casos por cada 100 egresos. A partir de septiembre de 1996 se encontró un incremento en el número de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en comparación a los meses previos, cifra que se duplicó y triplicó en algunos servicios. Estos hechos sugirieron la presencia de un brote epidémico. En mayo de 1997 se detectó un aumento paulatino en la frecuencia de bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* lo que hizo sospechar la perpetuación de una cepa epidémica.

En esta situación se planteó la siguiente pregunta: ¿fue una misma clona la que causó los brotes nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae* en el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, durante el periodo de agosto de 1996 a noviembre de 1997?

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las cepas de *Klebsiella pneumoniae* responsables de las infecciones nosocomiales que se aislaron de los pacientes hospitalizados en el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997, mediante el método de electroforesis en gel por campos pulsados.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Establecer si hubo predominio de una clona en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* causantes de infecciones nosocomiales durante el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, retrolectivo y observacional en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, centro de referencia de tercer nivel de atención médica, de enseñanza e investigación. Cuenta con 190 camas para hospitalización, está organizado en cinco áreas con los siguientes servicios:

primer piso, unidad de terapia intensiva pediátrica (UTIP) con 12 camas; tercer piso, pre-escolares con 40 camas; cuarto piso, unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) con 24 camas y lactantes con 52 camas; quinto piso, escolares y adolescentes con 60 camas. Los pacientes son referidos de siete hospitales de zona, una unidad de gineco-obstetricia y de un regional (delegación 3 suroeste), así como de los hospitales regionales de tres estados del país (Morelos, Guerrero y Chiapas). El paciente es ingresado a los diferentes servicios de acuerdo a su edad y/o su estado crítico. En la atención de cada paciente participa un servicio tratante (hematología, gastroenterología, oncología, cirugía e infectología, entre otros), un pediatra y varios subespecialistas. La mayoría de los pacientes son inmunocomprometidos a causa de enfermedades hemato-oncológicas o por enfermedades crónicas como displasia broncopulmonar o nefropatías entre otras, o requieren algún tipo de cirugía de alta especialidad. En la atención de los pacientes participan médicos residentes de pediatría médica y de las diferentes subespecialidades. Ellos efectúan diversas funciones que pueden llevarse a cabo en diferentes áreas del hospital durante un mismo día. Al igual que los médicos residentes, el personal de enfermería no es fijo, y puede ubicarse en las diferentes áreas de hospitalización de acuerdo a las necesidades de los distintos servicios.

Para la investigación del probable brote epidémico se incluyeron los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de pacientes hospitalizados, durante los meses comprendidos en el periodo que tuvieron las tasas más elevadas (septiembre de 1996 a octubre de 1997). Para detectar la aparición de la cepa epidémica en el hospital, se consideraron además los aislamientos de un mes antes (agosto de 1996) y también los correspondientes a un mes después (noviembre 1997) para comprobar si desapareció cuando disminuyó el número de casos.

Durante este periodo se realizaron tres muestreos ambientales (incubadoras, nebulizadores, frascos de aspiración, equipo de inhaloterapia, soluciones antisépticos y estetoscopios) y manos del personal. Se buscó intencionalmente colonización en el tracto gastrointestinal de los pacientes hospitalizados. Esto se efectuó en los servicios del hospital con el mayor número de aislamientos por *Klebsiella pneumoniae* (UTIP, UCIN y lactantes).

Todos los procedimientos de laboratorio incluyendo PFGE, se llevaron a cabo en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria, Sección de Microbiología del Laboratorio Clínico del Hospital de Pediatría.

Las muestras biológicas y ambientales fueron sembradas en cajas de agar sangre de carnero 5%, chocolate suplementado y McConkey; posteriormente, se incubaron a 37°C durante toda la noche. A las colonias que por su morfología y características diferenciales en los medios sembrados, sugirieron *Klebsiella pneumoniae* se les realizaron pruebas de identificación con el sistema semiautomatizado de API 20 E (API. bio.Mérieux S, Marcó l'Etoile, France) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez confirmado los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* se conservaron en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) con glicerol 18% a -20° C.

A todos los aislamientos se les realizó susceptibilidad antimicrobiana por el método de dilución seriada en agar (Müeller-Hinton), de acuerdo a las recomendaciones sugeridas por el Comité Nacional de Estándares para el Laboratorio Clínico (NCCLS)³⁴. Se probaron diluciones dobles y seriadas de los siguientes antibióticos y concentraciones: ampicilina (2 a 64 mg/L), carbenicilina (64 a 256 mg/L), gentamicina (2 a 64 mg/L), amikacina (8 a 64 mg/L), cloranfenicol (4 a 16 mg/L), cefotaxima (16 a 64 mg/L), ceftazidima (16 a 64 mg/L), cefepime (4 a 32 mg/L), ceftixozima (8 a 64 mg/L), imipenem de (4 a 16 mg/L), meropenem (4 a 32 mg/L) y norfloxacina (2 a 64 mg/L). La concentración mínima inhibitoria fue definida como la concentración más baja de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

La tipificación molecular se realizó con el sistema y el Kit de Gene-Path. Bio-Rad (Hercules, CA, USA), Grupo 6 (enterobacterias) de serie 310-0116. El módulo universal y el de la enzima corresponden a las series 310-0060 y 310-0071, respectivamente. Se siguieron las recomendaciones de acuerdo al instructivo. Fue inoculada una colonia de un subcultivo de 18 a 24 horas, en un tubo con 5 ml de caldo BHI y se incubó a 37°C por 18 a 24 horas. De este caldo se tomó 1 ml para colocarlo en microtubos que fueron centrifugados a 10x1000 revoluciones por minuto, durante 2 minutos. El sobrenadante se retiró y el paquete de células se resuspendió en 150 ml de buffer celular con 6 ml de lisozima y 150 ml de agarosa al 1.2% por cada microtubo. Los microtubos se colocaron a 50°C por un tiempo no mayor a 15 minutos. Inmediatamente después, se tomaron 100 ml de la mezcla para hacer los bloques de agarosa en los moldes correspondientes. Una vez gelificados los bloques de agarosa se retiraron de los moldes y fueron incubados se colocaron en microtubos a 37°C en 500 ml de buffer de lisis y 20 ml de lisozima durante 60 minutos. Posteriormente, se aspiró la solución buffer de lisis con una pipeta y se lavó cada bloque de agarosa con 1 ml de buffer 1X de lavado. Se aspiró el buffer 1X de lavado y se reemplazó por 500 ml de buffer de proteinasa K y 20 ml de

proteínasa K. Se incubaron los bloques de agarosa de 16 a 20 horas a 50°C. Los bloques se lavaron tres veces en 1 ml de buffer 1X de lavado, con una duración de 60 minutos por cada lavado a temperatura ambiente con agitación suave. Después de esto, los bloques de agarosa fueron colocados en otros microtubos con 500 ml de buffer de *Xba* I e incubados a temperatura ambiente con agitación suave por 60 minutos. Pasado ese tiempo se procedió al retiro del buffer *Xba* I y se agregaron 300 ml de buffer *Xba* I más 5 ml (50 U) de la enzima de restricción *Xba* I a cada microtubo. Los bloques de agarosa se incubaron por 16 a 20 horas a 37°C. Una tercera parte del bloque de agarosa se colocó en el gel de agarosa al 1%, y se corrió en la cámara del aparato de Gene-Path-Bio-Rad con dos litros de buffer 1X de TE (0.089 M tris [base] más 0.089 Borato, 2.5 mM EDTA). Los intervalos de pulso fueron de 5.3 a 49.9 segundos por 19.7 horas a 200 Voltios (6 v/cm) con un ángulo de 120°. Se utilizó la cadena λ como estándar de peso molecular y la cepa de *Escherichia coli* 0157:H7 (G544) para el control de la preparación y digestión del ADN cromosomal (módulo estándar del grupo 6:310-0072). Los geles fueron teñidos por 20 minutos con 1 ml de bromuro de etidio (BE) en 600 ml de agua destilada. Se decoloraron en agua destilada por 30 minutos y se fotografiaron. Una vez tomadas las imágenes fotográficas de las cepas aisladas se analizaron sus características genotípicas de acuerdo al tamaño y número de bandas. Las imágenes se capturaron con el programa de Multyanalysis Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

La comparación se efectuó siguiendo las recomendaciones establecidas internacionalmente.³⁵ Las cepas estudiadas fueron clasificadas de acuerdo a sus patrones genómicos, en *relacionadas* y *no relacionadas*.

A. Dentro del grupo de cepas *relacionadas* se consideraron:

1. *Idénticas*: si los patrones tenían el mismo número de bandas y las bandas correspondientes eran del mismo tamaño, se les denominó patrón A.

2. *Estrechamente relacionadas*: si el patrón de la cepa presentó diferencia respecto de la clona A, en:

2.1. Una o dos bandas se les llamó patrón A1.

2.2. Tres bandas se les llamó patrón A2.

3. *Posiblemente relacionadas*: si los patrones de PFGE de la cepas fueron diferentes del patrón de la cepa de la clona en cuatro o cinco bandas, se les llamó patrón A3.

B. *No relacionadas* (patrón NR): si los patrones de PFGE fueron diferentes en más de cinco bandas de la clona A (se les llamó patrón: B, C, D si habían cepas con patrón idéntico entre ellas, pero diferente del patrón de la clona A).

Además, se realizó el canal endémico de bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* mediante las tasas mensuales por 100 egresos, de enero de 1992 a junio de 1996 utilizando la técnica de cuartiles.

DEFINICIONES GENERALES^{35,36}

Aislamientos relacionados epidemiológicamente: son aquellos aislamientos recuperados de pacientes o del ambiente en una área específica o en un tiempo determinado como parte de una investigación epidemiológica que sugieren una fuente común.

Aislamientos relacionados genéticamente: son aquellos aislamientos que poseen características genéticas iguales o similares que indican que derivan de un mismo origen clonal.

Brote: ocurrencia de casos de infección nosocomial asociados epidemiológicamente en un número mayor de lo esperado.

Cepa (o clona): se denomina a un aislamiento o grupo de aislamientos que poseen características genotípicas similares que se distinguen de otros aislamientos de la misma especie.

Cepa del brote: son los aislamientos de una misma especie que tienen relación epidemiológica (tiempo, espacio o fuente común) y genéticamente (genotipos iguales o similares).

Cepa endémica: es el aislamiento que se recupera, dentro de una ocurrencia estimada, en los pacientes de una área hospitalaria o de una población que presenta mediante los métodos de tipificación características iguales o similares a otros aislamientos de la misma área geográfica.

Caso de infección nosocomial: condición localizada o generalizada ocasionada por la presencia de la bacteria (*Klebsiella pneumoniae*), que no estaba presente o en periodo de incubación en el momento del ingreso del paciente al hospital, o es la infección que ocurrió después de las 72 horas de la admisión.

Caso de infección en sangre; además de lo anterior, un hemocultivo positivo (*Klebsiella pneumoniae*).

Caso de colonización: individuo que alberga *Klebsiella pneumoniae* por lo que constituye una fuente potencial de infección.

Fuente de infección: persona o vector que alberga el organismo o agente causal (*Klebsiella pneumoniae*), y desde el cual éste puede ser transmitido a la población intrahospitalaria.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Estadística descriptiva, frecuencias relativas y absolutas.

RESULTADOS

El número total de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en el Hospital de Pediatría fue incrementándose entre 1995 a 1997. En 1995 se aislaron 160 cepas, en 1996 fueron 297 y en 1997 aumentó a 517. De agosto de 1996 a noviembre de 1997 se obtuvieron 190 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de 135 pacientes hospitalizados que desarrollaron infección sistémica ($\bar{X}=1.4$ aislamientos/paciente) [tabla I]. Durante los 16 meses del periodo, la frecuencia mensual promedio, fue de 12 aislamientos.

En tres ocasiones se incrementó el número de bacteremias y superó al número de casos ocurridos en los meses previos (septiembre de 1996; noviembre de 1996; mayo de 1997 y octubre de 1997) [figura 1]. a excepción de la tasa de septiembre de 1996, las otras tasas se situaron en zona de alarma y epidemia de acuerdo al canal endémico obtenido con las cifras de bacteremias registradas de enero de 1992 a julio de 1996 (figura. 2). Como consecuencia, durante estos meses se intensificaron las medidas de control de infecciones, en estos eventos, y el resultado fue una disminución en el número de bacteremias en el mes posterior a cada intervención. Debido al incremento en el número de infecciones nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae* durante este periodo se sospechó la persistencia de una o de varias clonas en el hospital.

TABLA I

DISTRIBUCIÓN DE LOS 190 AISLAMIENTOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* POR EL SITIO DEL AISLAMIENTO

SITIO DE AISLAMIENTO	AISLAMIENTOS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> N=190	
	No.	%
Hemocultivo / CIV	104	55
LCR	15	8
Líquido de diálisis	14	7
Urocultivo	12	6
Otros	45	24

NOTA. CIV: catéter intravascular; LCR: líquido cefalorraquídeo; Otros: herida quirúrgica, secreciones, líquido pleural, coprocultivo y aspirado bronquial.

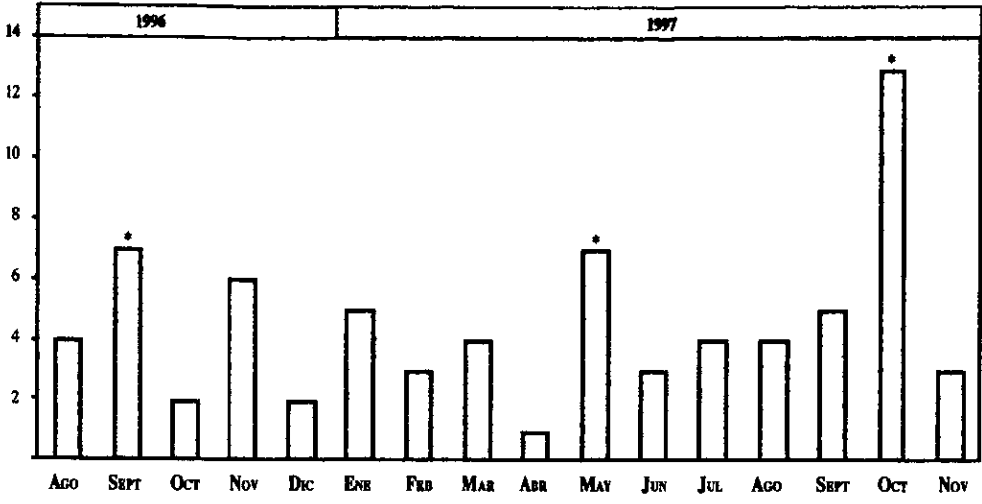


FIGURA 1. Frecuencia (No.) de bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* del periodo de agosto de 1996 a noviembre de 1997.
 * Intensificación de las medidas de control para infecciones intrahospitalarias.

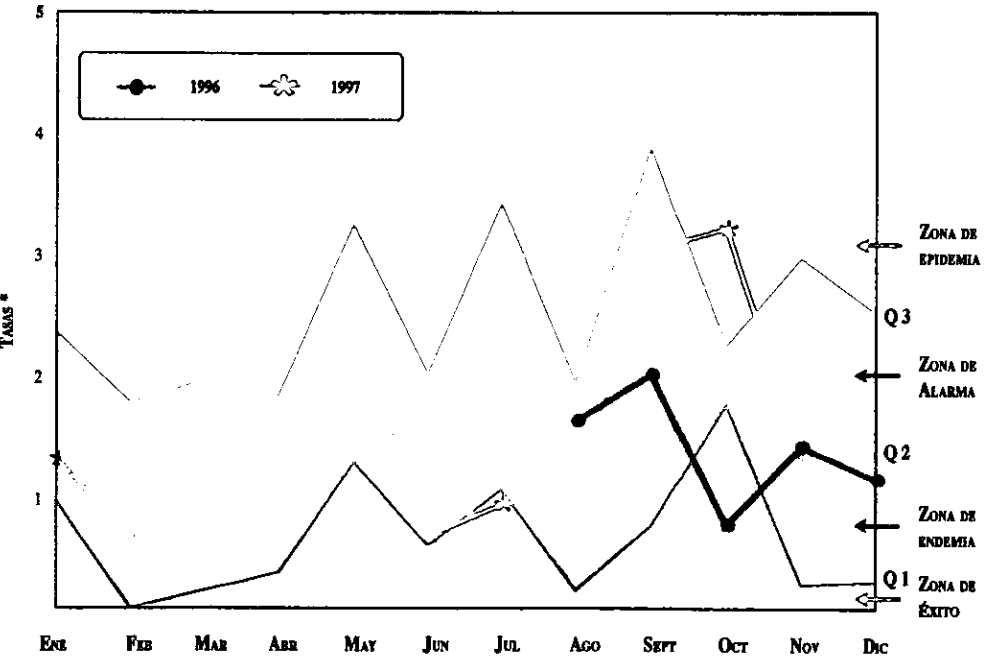


FIGURA 2. Canal endémico (por cuartiles) de las bacteremias nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae* de enero de 1996 a julio de 1996. Se atribuyó zona de endemia de Q1 a Q2; zona de alarma de Q2 a Q3; zona de control de bacteremia por abajo de Q1 y zona de epidemia por arriba de Q3. Las líneas azul y roja representan las tendencias de las tasas de bacteremias de agosto a diciembre de 1996 y de enero a noviembre de 1997, respectivamente.

* Tasas de bacteremia nosocomial/100 egresos.

Se realizó el análisis por PFGE en los 190 aislamientos. 184 cepas pudieron ser tipificadas. De ellas, 91 fueron clasificadas como la clona A (que incluyó 50 cepas idénticas; A1: 30 cepas, A2: 8 cepas; A3: 3 cepas). Esto confirmó la existencia de una clona de *Klebsiella pneumoniae* como causante de casi la mitad de las infecciones nosocomiales. En 93 aislamientos se obtuvieron patrones genómicos totalmente diferentes a la clona A, por lo que se clasificaron como cepas NR. Entre estos aislamientos, se identificaron 14 cepas que tuvieron patrones genómicos similares y se designaron como patrón B (2 cepas), C (4 cepas) y D (8 cepas) [figura 3 y 4]. Seis de los 190 aislamientos no pudieron clasificarse debido a que el ADN cromosomal se había degradado antes de la digestión, posiblemente por producción de nucleasas.

Los primeros aislamientos de la clona A se registraron en el mes de agosto de 1996, posteriormente se presentaron casos en todos los meses y de diciembre a septiembre de 1997 predominaron sobre el número de infecciones por cepas NR. En los meses de diciembre de 1996; enero, febrero, abril, mayo, julio y agosto de 1997 todas las bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* fueron causadas por la clona A. En octubre de 1997, se registró el mayor número de bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* pero sólo dos fueron causadas por la clona A y el resto por cepas NR. En noviembre de 1997, no se detectó ningún caso de bacteremia por la clona A y disminuyó el número de aislamientos, desapareciendo la clona A a partir del mes de diciembre de 1997 (figura 5).

Se encontró que el 68% de los aislamientos de la clona A se ubicaron en los servicios de lactantes y UCIN (cuarto piso) [tabla II], y durante los 16 meses incluidos en el estudio, a excepción de octubre de 1996, se registraron infecciones causadas por esta clona en los mismos servicios, mientras que en otras áreas del hospital los casos fueron esporádicos (figura 6 y tabla III).

En los meses de septiembre y octubre de 1996 así como en octubre de 1997, hubo un predominio de infecciones por las cepas NR (C:4 casos y D:8 casos). En octubre de 1997, se observaron cinco casos de una clona (D) diferente a la clona A. (figura 7 y tabla IV).

PATRONES GENÓMICOS DE AISLAMIENTOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
DIGERIDOS CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN *Xba* I

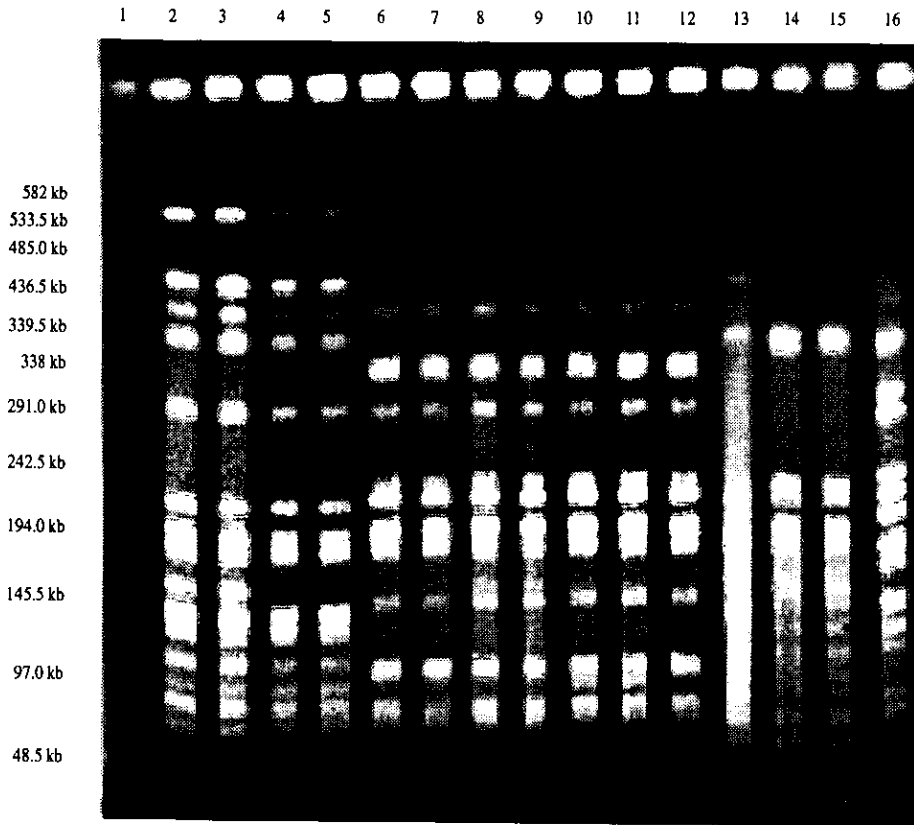


FIGURA 3. Línea 1 contiene la cadena lambda (estándar de peso molecular). Líneas 2-5 clona D. Líneas 6-12 clona A. Línea 13 cepa NR. Líneas 14-15 clona C y Línea 16 control (*E. coli* O157:H7).

PATRONES GENÓMICOS DE AISLAMIENTOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
DIGERIDOS CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN *Xba* I

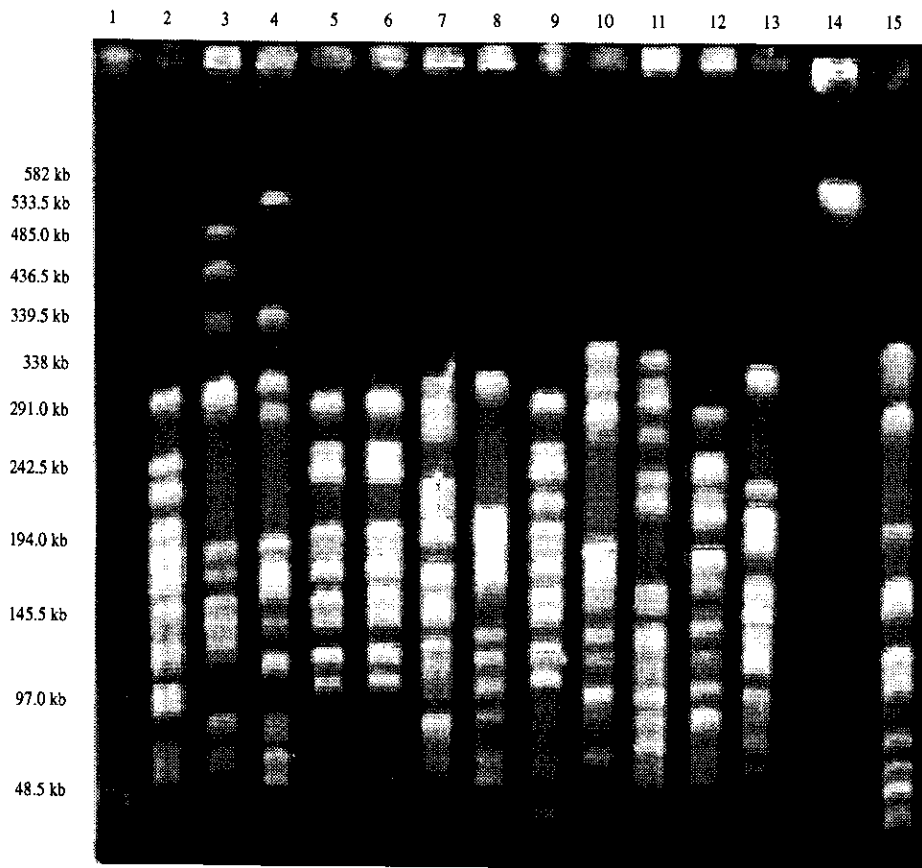


FIGURA 4. Línea 1 contiene la cadena lambda (estándar de peso molecular).
Líneas 2-15 cepas *NR* (algunas por duplicado).

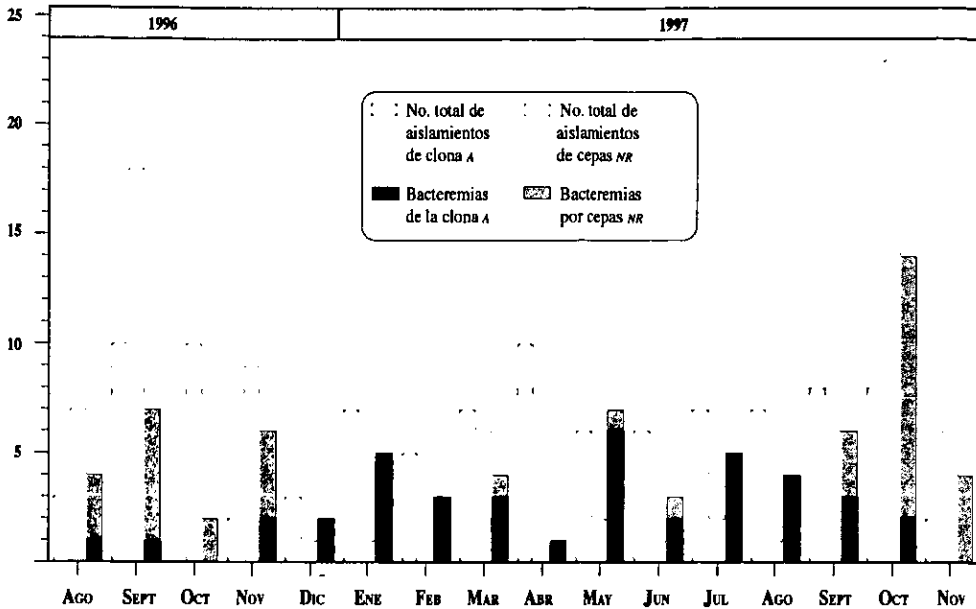


FIGURA 5. Distribución de las bacteremias causadas por la clona A y por cepas NR de *Klebsiella pneumoniae*, comparadas con el número total de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* obtenidos de diferentes productos biológicos en el periodo de estudio.

TABLA II

FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* POR SERVICIOS HOSPITALARIOS
CLASIFICADOS DE ACUERDO SUS CARACTERÍSTICAS GENÓTIPICAS (PFGE)

SERVICIOS	CEPAS DE LA CLONA A n=91		CEPAS NO RELACIONADAS (NR) n=93	
	No.	%	No.	%
Escolares (5º piso)	11	12	7	8
UCN (4º piso)	42	46	35	38
Lactantes (4º piso)	17	19	25	27
Pre-escolares (3º piso)	10	11	3	2
UTIP (1º piso)	11	12	23	25

DISTRIBUCIÓN TEMPORAL DE LAS 91 CEPAS DE LA CLONA A
EN LOS DISTINTOS SERVICIOS DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CMN SIGLO XXI

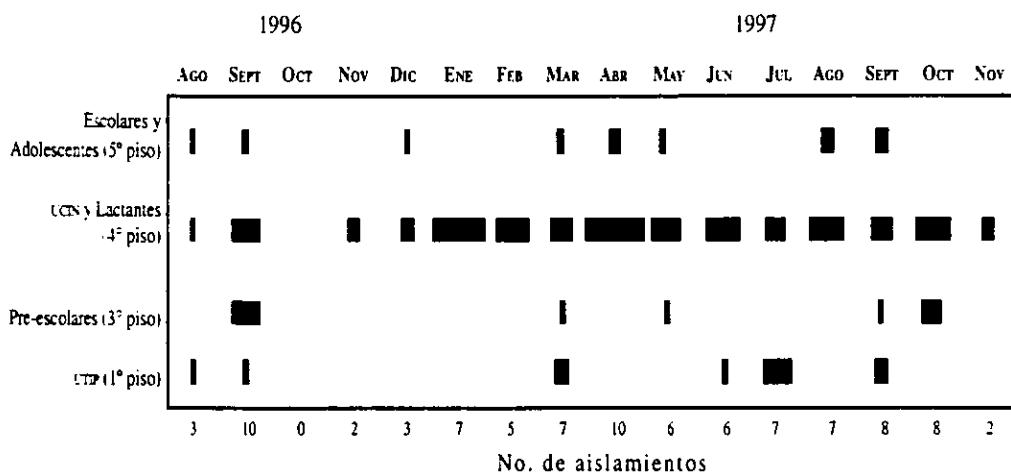


Figura 6

SERVICIOS	1996					1997										
	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV
Escolares y Adolescentes (5º piso)	1	1	0	0	1	0	0	1	2	1	0	0	2	2	0	0
UCN y Lactantes (4º piso)	1	4	0	2	2	7	5	3	8	4	5	3	5	3	5	2
Pre-escolares (3º piso)	0	4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	3	0
UTP (1º piso)	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	4	0	2	0	0

Tabla III

**DISTRIBUCIÓN TEMPORAL DE LAS 93 CEPAS NR (NO RELACIONADAS)
EN LOS DISTINTOS SERVICIOS DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA. CMN SIGLO XXI**

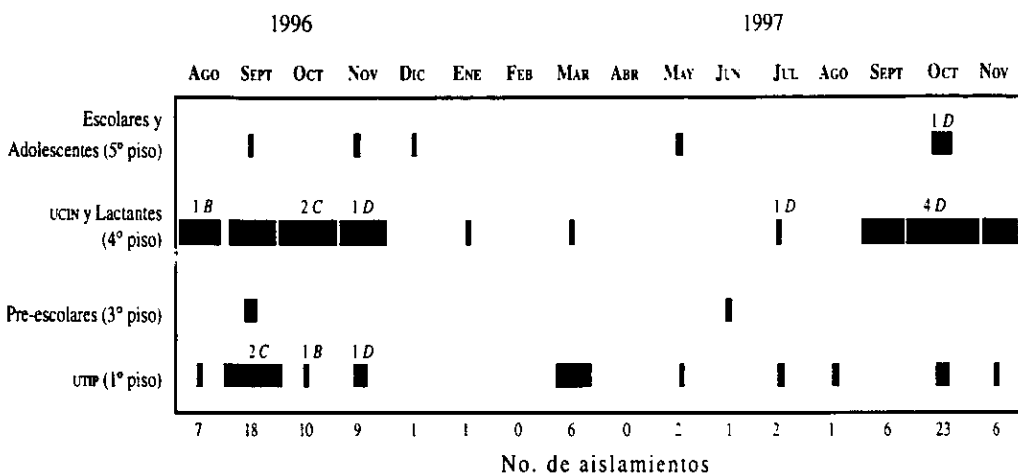


Figura 7

SERVICIOS	1996					1997										
	AGO	SEPT	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEPT	OCT	NOV
Escolares y Adolescentes (5° piso)	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0
UCN y Lactantes (4° piso)	6	7	9	6	0	1	0	1	0	0	0	1	0	6	18	5
Pre-escolares (3° piso)	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
UTP (1° piso)	1	8	1	2	0	0	0	5	0	1	0	1	1	0	2	1

Tabla IV

En el 83% de los casos, las cepas de la clona A fueron aisladas de líquidos habitualmente estériles (sangre, catéteres intravasculares, LCR y líquido de diálisis), lo que permite inferir el número de casos de sepsis (algunos con focalización en el sistema nervioso central) que se presentaron como consecuencia de la diseminación de la clona. Se presentaron ocho casos de peritonitis en pacientes con diálisis peritoneal y cuatro casos de infección de vías urinarias (tabla V).

A pesar de la búsqueda intencionada de una posible fuente común de infección en los muestreos ambientales, no se aislaron cepas de *Klebsiella pneumoniae*. En noviembre de 1997 sólo se identificaron dos pacientes de la UCIN como portadores de la clona A en tubo digestivo, que no desarrollaron enfermedad invasiva.

Al analizar la sensibilidad de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* a los antibióticos, se observó que tuvieron una gran variabilidad; con una resistencia elevada a ampicilina, carbenicilina y aminoglucósidos; con resistencia aceptable a las cefalosporinas de tercera generación y buena susceptibilidad a carbapenems, cefepime y una quinolona (tabla VI). Con respecto a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI50 y CMI90), la única diferencia se observó en la CMI50 para a amikacina entre las cepas relacionadas (≥ 64 mg/mL) y las no relacionadas a la clona A (16 mg/mL) [tabla VII].

TABLA V

DISTRIBUCIÓN (NO.) DE LAS CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* POR EL SITIO DE AISLAMIENTO, CLASIFICADAS DE ACUERDO SUS CARACTERÍSTICAS GENÓTICAS (PFGE)

SITIO DE AISLAMIENTO	CEPAS DE LA CLONA A n=91		CEPAS NO RELACIONADAS (NR) n=93	
	No.	%	No.	%
Hemocultivo / CIV	53	58	50	54
LCR	11	12	4	4
Líquido de diálisis	8	9	6	7
Urocultivo	4	4	7	8
Otros	15	17	26	27

NOTA: CIV: catéter intravascular; LCR: líquido cefalorraquídeo; Otros: herida quirúrgica, secreciones, líquido pleural, coprocultivo y aspirado bronquial.

TABLA VI
SUSCEPTIBILIDAD A 12 ANTIBIÓTICOS DE 184 CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, CLASIFICADAS DE ACUERDO A SUS CARACTERÍSTICAS GENÓTIPICAS (PFGE)

ANTIBIÓTICOS	VALOR DE CORTE mg/dl	CEPAS DE LA CLONA A	
		SENSIBLES (%) n=91	CEPAS NO RELACIONADAS (NR) SENSIBLES (%) n=93
Ampicilina	4	1	1
Carbencicilina	128	10	4
Cloranfenicol	8	21	21
Amikacina	16	30	52
Gentamicina	4	16	25
Ceftazidima	32	34	40
Cefotaxima	32	73	70
Ceftúoxima	16	73	66
Cefepime	8	85	74
Imipenen	8	99	99
Meropenem	8	96	99
Norfloxacina	4	96	94

TABLA VII
CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS (CMI50 Y CMI90), DE LOS 184 AISLAMIENTOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, CLASIFICADAS SEGÚN SUS CARACTERÍSTICAS GENÓTIPICAS (PFGE)

ANTIBIÓTICOS	CEPAS DE LA CLONA A n=91		CEPAS NO RELACIONADAS (NR) n=93	
	CMI50 mg/l	CMI90 mg/l	CMI50 mg/l	CMI90 mg/l
Ampicilina	≥ 64	≥ 64	≥ 64	≥ 64
Carbencicilina	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256
Cloranfenicol	≥ 16	≥ 16	≥ 16	≥ 16
Amikacina	≥ 64	≥ 64	16	≥ 64
Gentamicina	≥ 64	≥ 64	64	≥ 64
Ceftazidima	≥ 64	≥ 64	64	≥ 64
Cefotaxima	≤ 16	≥ 64	≤ 16	≥ 64
Ceftúoxima	≤ 8	64	≤ 8	≥ 64
Cefepime	≤ 4	16	≤ 4	32
Imipenen	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Meropenem	≤ 4	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Norfloxacina	≤ 2	≤ 2	≤ 2	≤ 2

DISCUSIÓN

Durante los últimos años, *Klebsiella pneumoniae* se ha identificado como responsable de brotes nosocomiales en diferentes países alrededor del mundo^{27,37-41} y ocupa el cuarto lugar como causa de bacteremias de adquisición hospitalaria.^{1,4} En el hospital de Pediatría, el comité para el Control de Infecciones Intrahospitalarias (CCIH), mantiene un sistema de vigilancia de los aislamientos bacterianos en líquidos estériles, alertando al personal sobre las medidas de control cuando el número de cultivos positivos para un germen se sobrepasa del canal endémico habitual. A través de este sistema, se registraron tres brotes por *Klebsiella pneumoniae* durante el periodo de septiembre de 1996 a octubre de 1997. Lo anterior planteó la interrogante de si una misma clona había permanecido en el hospital y era responsable en forma repetida de estos brotes.

En este estudio a través del método de PFGE, se pudo establecer que 90 de los 190 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* correspondieron a un mismo origen genético, lo cual hizo evidente la existencia de una clona común que persistió durante un tiempo prolongado, al igual que en otros estudios.^{29,42,43} De enero a agosto de 1997, la frecuencia de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* fue variable, sin embargo casi todas las bacteremias se originaron por la clona A. Se demostró además, que de los tres periodos con elevado número de aislamientos en sangre (septiembre de 1996, mayo y octubre de 1997) que fueron registrados como brotes intrahospitalarios por parte de CCIH, uno cumplió con la definición de brote (mayo de 1997) y en las otras dos ocasiones predominaron las bacteremias causadas por cepas NR, lo cual modificó la información registrada por dicho comité, y se confirmó un brote prolongado.

Las infecciones intrahospitalarias por *Klebsiella pneumoniae* son relativamente frecuentes en lactantes y áreas críticas como la UCIN, debido a los factores predisponentes que presentan los pacientes como la inmadurez transitoria en los recién nacidos, los múltiples procedimientos invasivos que son necesarios para el diagnóstico y tratamiento, y la estancia prolongada, entre otros.^{12,31,40} Fue notorio que el brote prolongado por la clona A se localizó en los servicios de UCIN y lactantes del hospital; probablemente la diseminación se presentó a partir de los casos en la UCIN, donde se registró el mayor número de infecciones. Cuando los recién nacidos ya no requieren de cuidados intensivos al ser trasladados al servicio de lactantes, provocaron la aparición de los casos que se registraron en este servicio y posteriormente, por las característi-

cas de funcionamiento del hospital. permitió la salida de la clona del área crítica y dando lugar a los casos que se presentaron en menor frecuencia en otros servicios del hospital.

Para explicar la existencia de casos aislados y en forma esporádica en el resto del hospital, se conjuntan varios factores: uno es la atención de un 40% de pacientes con enfermedades crónicas y/o hematooncológicas. que reingresan constantemente. Algunos autores⁴³⁻⁴⁸ han descrito la colonización del tracto gastrointestinal como un factor para el desarrollo de bacteremia en pacientes con inmunocompromiso y en este caso, los pacientes pudieron colonizarse durante un ingreso previo. en los periodos donde se registraron un gran número de casos por la clona A, y posteriormente desarrollar una bacteremia de origen endógeno; otro factor es la rotación del personal médico residente. técnicos de laboratorio y radiología. los cuales pueden tener contacto con un paciente infectado. colonizarse temporalmente (manos), y ser los responsables de la transmisión a otros pacientes. Este fenómeno está reconocido en hospitales donde la movilización interna del personal de salud es mayor.^{46,47}

La diseminación de una clona puede ocurrir no solamente dentro de un hospital, existen estudios que demuestran la transmisión entre hospitales de una misma región, como consecuencia del traslado de pacientes colonizados y/o infectados entre un hospital y otro.^{27,39} La UCIN del hospital de Pediatría recibe pacientes de hospitales generales y otras unidades de cuidados intensivos, por lo que no sería difícil que la clona A proviniera de otro hospital (donde se han identificado brotes por *Klebsiella pneumoniae*), lo que puede dificultar la erradicación de una clona.

En este estudio hubo una mayor frecuencia de aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* en sangre y puntas de catéteres intravasculares, lo cual, aunado a la recuperación en líquido de diálisis de pacientes con diálisis peritoneal continua ambulatoria, sugiere la manipulación inadecuada y con deficiencia en las técnicas de asepsia. Entre los pacientes que fueron infectados por la clona A, la letalidad fue baja (20%) comparativamente con lo que se ha informado habitualmente en brotes por enterobacterias en unidades neonatales de cuidados intensivos.¹¹ La detección de casos en etapas iniciales motivó que se tomaran una serie de medidas preventivas y de acción oportuna. por ejemplo, iniciar con un esquema antimicrobiano con cobertura para *Klebsiella pneumoniae* ante sospecha de sepsis nosocomial (cefotaxima-amikacina), y modificación temprana (48 horas) del esquema de antibióticos al no observar mejoría clínica y/o resistencia bacteriana in vitro: se disminuyó el número de días de permanencia de los catéteres

intravasculares; se limitó el uso de esquemas de amplio espectro injustificados; se separaron los pacientes infectados y se reforzaron en el personal (enfermeras, médicos residentes y tratantes) las medidas sobre técnicas de aislamiento.

En la actualidad, los métodos moleculares se utilizan en conjunto con los datos epidemiológicos, para establecer con certeza la existencia de un problema nosocomial o de la persistencia de clonas comunes en uno o varios hospitales. El paso inicial para la sospecha de un brote intrahospitalario es el incremento en el número de aislamientos, la aparición de un microorganismo no aislado habitualmente en el laboratorio, el reporte de un perfil de susceptibilidad antimicrobiana multirresistente o un cambio total con respecto a lo registrado para esa especie bacteriana. Ya que el laboratorio ha verificado la identificación del microorganismo y los perfiles de sensibilidad, los miembros del comité se encargan de iniciar las medidas necesarias para detener la posible diseminación del brote. En ocasiones los laboratorios de rutina no tienen la posibilidad de efectuar estudios genotípicos para demostrar que verdaderamente todos los aislamientos recuperados de los pacientes corresponden a un mismo origen y cuando no se encuentra la posible fuente, reservorio o factor común, es difícil, eliminar o confirmar la existencia de un brote. Esto no impide, desde luego, que toda la investigación epidemiológica y las acciones que se recomiendan ante estas situaciones sean llevadas a cabo y, jamás deberá esperarse la confirmación de un brote mediante un estudio de epidemiología molecular para el inicio de las acciones que son fundamentales y evitan la aparición de casos secundarios.

No hay duda de la superioridad de los métodos de tipificación que se basan en análisis del material genético para la discriminación de aislamientos del mismo género y especie.⁴⁸ En la actualidad existen varios reportes^{28,42,49} donde se menciona la utilidad de PFGE para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae* tanto en situaciones de brotes epidémicos como en ausencia de ellos. En esta investigación fue posible tipificar casi la totalidad de las cepas, con excepción de seis aislamientos donde, a pesar de varios intentos, el resultado indicó que el ADN se degradó probablemente por la presencia de nucleasas endógenas.⁵⁰ Cuando hay dificultad en la tipificación, se recomienda el empleo de métodos alternativos como ribotipificación⁵¹ o RAPD-PCR^{19,45} (random amplified polymerase chain reaction), estos no son superiores a PFGE. Con el método de RAPD-PCR no hay criterios definidos para la interpretación de los resultados en *Klebsiella pneumoniae*. Ya que el número de cepas que no fueron tipificadas no alteraría

sustancialmente los resultados y las conclusiones obtenidas, por lo que no se realizó otro método de tipificación.

Una de las clases de resistencia de *Klebsiella pneumoniae* que ha favorecido la aparición de brotes y ha sido ampliamente estudiada, es la producción de β -lactamasas de espectro extendido.^{52,53} La diseminación de esta resistencia puede resultar de los siguientes mecanismos: clonal, cuando una clona bacteriana adquiere resistencia a uno o varios antimicrobianos por mutación o herencia de un solo plásmido; transferencia de uno o de varios plásmidos, en el que un microorganismo puede heredar un plásmido resistente que se ha diseminado en diferentes especies y transposición, que resulta de la distribución de un tipo determinante de resistencia como transposones o secuencias de inserción. Uno o más de estos mecanismos han contribuido en la diseminación de patrones de resistencia en cepas de *Klebsiella pneumoniae* de un hospital y también desde un hospital a otro. Con la facultad de que algunos de los determinantes de resistencia se han distribuido a otros miembros de las *Enterobacterias*.^{24,53,54}

La mayoría de las cepas incluidas en este estudio tienen concentraciones mínimas inhibitorias, elevadas para cefalosporinas de tercera generación y concentraciones bajas para carbapenems, lo cual podría indicar que son productoras de β -lactamasas de espectro amplio mediadas por plásmidos.⁴¹ La coexistencia con otro tipo de información como resistencia a los aminoglucósidos^{38,52} sugiere que el factor común podría corresponder a plásmidos y la expresión fenotípica puede resultar de manera variable. Al igual que otros antibióticos, la selección de resistencia a la amikacina se relaciona probablemente por su modo de uso en los tratamientos empíricos de los pacientes en el hospital.

En el presente estudio, no se realizó la demostración de que el ADN plasmídico codifica los patrones de resistencia observados en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Aunque el análisis de estas enzimas, incluyendo sus determinantes genéticos, aporta mayor información sobre el microorganismo que da a lugar a un brote, no puede sustituir u ofrecer conclusiones diferentes a las que se obtienen mediante la tipificación por PFGE.

La presencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas en las unidades hospitalarias se ha atribuido, en parte, al uso indiscriminado de cefalosporinas de amplio espectro,^{30,55} por lo que se recomienda que como parte de la vigilancia del control de infecciones nosocomiales, se establezcan medidas periódicas para evitar estos problemas.

El control de las infecciones intrahospitalarias originadas por una clona endémica que ha permanecido por un largo plazo, es más difícil de controlar que los brotes relacionados a un reservorio o fuente de infección común. La identificación y detección de pacientes colonizados por una clona disminuirá la aparición de casos secundarios y finalmente erradicará totalmente este problema. Este estudio sugiere la necesidad de mantener en forma permanente las medidas de control, y notificar a todo el personal del hospital en forma periódica los resultados de la vigilancia epidemiológica.

La concientización de dicho personal y la motivación a través de la retroalimentación continua puede modificar notoriamente las tasas de infecciones nosocomiales en centros especializados de atención.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

- La mitad de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* correspondieron a un mismo origen genético, lo que hizo evidente la existencia de una clona común que persistió durante un periodo de 16 meses, el área de mayor riesgo fue el cuarto piso (lactantes y UCIN).
- Las medidas de control para infecciones nosocomiales aplicadas durante el periodo de agosto de 1996 a octubre de 1997 limitaron los brotes intrahospitalarios y disminuyeron la incidencia de bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* en el hospital, sin embargo no se logró erradicar la clona que ocasionó una diversidad de infecciones en el hospital, predominando las bacteremias.
- La evidencia de brotes persistentes en instituciones de salud, promueve a crear dispositivos durante la vigilancia para evaluar el cumplimiento de las normas y medidas establecidas, lo que permitirá modificar la reglamentación y las políticas para el control de las infecciones nosocomiales.
- La detección temprana de pacientes colonizados por una clona común puede disminuir la aparición de casos secundarios y finalmente, erradicarse el problema.
- Se debe informar periódicamente a la comunidad médica de los resultados de la vigilancia epidemiológica para hacer énfasis en la necesidad de mantener de forma activa y continua las medidas para el control de las infecciones nosocomiales.
- Un programa de control de infecciones resulta exitoso si cuenta con la cooperación de médicos y enfermeras que respondan a las necesidades de los pacientes y estén dispuestos a aprender, enseñar y reconocer los logros del programa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez-Armando, Martínez-Flores M. Perfil epidemiológico de la infección nosocomial. 15 años de experiencia. *Rev Med IMSS (Méx)* 1995;33:307-11.
2. Ponce de León RS. Nosocomial Infection. Control in Latin América. We have to start now. *Infection Control* 1984;5:511-512.
3. Ponce de León RS, García GM, Volkow EP. Resultados iniciales de un programa de infecciones nosocomiales en los institutos nacionales de salud. *Salud Pública Méx* 1986:593-98.
4. Avila-Figueroa R, Ramírez-Galván L, Alpuche-Aranda C, Arrendondo-García, Santos-Preciado JJ. Infecciones nosocomiales en un hospital pediátrico. *Salud Pública Méx* 1986;28:616-622.
5. Martínez-Ramírez, Martínez-Flores. Prevalencia de infección nosocomial y uso de antimicrobianos. *Rev Med IMSS (Méx)* 1995;33:33-37.
6. Fajardo-Velázquez, González-Sánchez, Anaya-Flores E, Osorio-Carranza, Gómez-Navarrete MV. Vigilancia de infecciones nosocomiales. *Rev Med IMSS (Méx)* 1995;33:571-75.
7. Padilla-Barron G, Guiscafré-Martínez H, Martínez-García MC, Vargas de la Rosa R, Palacios-Treviño J, Muñoz-Hernández O. Epidemiología de las Infecciones nosocomiales en un hospital pediátrico. *Salud Pública Méx* 1986;28:599-610.
8. Vargas RR, Gutiérrez I. Prevalencia de infecciones hospitalarias y uso de antibióticos. *Salud Pública Méx* 1980;22:521-29.
9. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens:epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(34):589-603.
10. Stamm, WE, Weinstein RA, Dixon RE. Comparasion of endemic and epidemic nosocomial infections, In Dixon RE, ed. Nosocomial infections. York Medical books. Atlanta, Ga. 1981:9-13.
11. Boo NY, Chor Y. Six year trend of neonatal septicaemia in a large Malaysian maternity hospital. *J Paediatr* 1994;30:23-7.
12. Levy I, Leibovici L, Moshe D, Samra Z, Konisberger H, Askenazi Sh. A prospective study of gram-negative bacteremia in children. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:117-22.
13. Hariharan R, Weinstein RA. Enterobacteriaceae En: Mayhall C. Glen, ed. Hospital epidemiology and infection control. Baltimore: Williams & Wilkins. 1996:345-66.
14. Pittet D. Nosocomial Bloodstream infections. En: Wenzel RP, ed. Prevention and control nosocomial infections. 3a. ed. Baltimore:Williams & Wilkins, 1997:712-769.
15. Greene J, Stratton ChW. Microbiology laboratory in hospital epidemiology and infections control. En: Mayhall C. Glen, ed. Hospital epidemiology and infection control. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996:1126-1138.
16. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993;17:153-64.
17. Podzorski RP, Persing DH. Molecular detection and identification of microorganisms En: Murray PR, ed. Manual of clinical microbiology. 6a. ed. Whashington DC: Asm Press. 1995:130-157.

18. Eisenstein BI. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis* 1990;161:595-602.
19. Arbeit RD. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. En: Murray PR, ed. *Manual of clinical microbiology*. 6a. ed. Washington DC: Asm Press, 1995:190-204.
20. Wong NA, Linton CJ, Jalal H, Millar MR. Randomly amplified polymorphic DNA typing: a useful tool for rapid epidemiological typing of *Klebsiella pneumoniae*. *Epidemiol Infect* 1994;113:445-54.
21. Bingen EH, Desjaridns A, Bourgeois. Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. *J Clin Microbiol* 1993;31:179-84.
22. Lipuma JJ. Molecular tools for epidemiologic study of infectious diseases. *Pediatr Infect Dis J* 1998;17:667-75.
23. Koeleman JG, Stoof J, Biesmans DJ, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment, length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2522-2529.
24. Gniadkowski M, Palucha A, Grzesiowski P, Hryniewicz W. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: Clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:3079-3085.
25. Yuan M, Hall LM, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Livermore DM. SHV-3 a novel extended-spectrum β -lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients in an intensive care unit in Amsterdam. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(4):1081-1084.
26. Goering RV. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993;14:595-600.
27. Arlet G, Rouveau M, Casin I, Phillippe J, Bouvet JM, Lagrange PH. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta lactamase and which were isolated in 14 french hospitals. *J Clin Microbiol* 1994;32(10): 2553-58.
28. Poh CL, Yap SC, Yeo M. Pulsed-field gel electrophoresis of hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* 1993;24:123-128.
29. Gouby CA, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges NJ, Carles-Nurit MJ, Despaux E, Ramuz M. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J Clin Microbiol* 1994;32(2):301-305.
30. Rice LB, Eckstein EC, De-Vente J, Shlaes DM. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland department of veterans affairs medical center. *Clin Infect Dis* 1996;23:118-24.
31. Lucet JC, Chevret S, Decré D, Vanjak D, Macrez A, Bédos JP y col. Outbreak of multiply resistant enterobacteriaceae in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin Infect Dis* 1996;22:430-6.

32. Chetchotisakd P, Phelps ChL, Hartstein AI. Assesment of bacterial cross-transmission as a cause of infections in patients in intensive care units. *Clin Infect Dis* 1994;18:929-37.
33. Schiappa DA, Hayden MK, Matushek MG, Hashimi FN, Sullivan J, Smith KY y col. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case control and molecular epidemiologic investigation. *J Infect Dis* 1996;174:529-36.
34. National Committee for Clinical laboratory Standards. 1994. Methodos for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 3er ed. Approved standard. M7-A3 National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
35. Tenover F, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH y col. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-39.
36. Manual de procedimientos para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales. Norma oficial (clave 2600-54-018-A003) Coordinación de Atención Médica. Instituto Mexicano del Seguro Social. Febrero 1999.
37. Branger C, Bruneau B, Lesimple AL, Bouvet PJ, Bewry P, Sevli-Garcia J. Epidemiological typing of extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates responsible for five outbreaks in a university hospital. *J Hosp Infect* 1997;36:23-36.
38. Shannon K, Stapleton P, Xiang X, Johnson A, Beattie H, Bakri FE, et al. Extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial outbreaks of infection in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 1998;36(10):3105-3110.
39. Monnet DL, DPharm, Biddle JW, Edwards JR, Culver DH, Tolson JS, et al. Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States 1986 a 1993. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:492-498.
40. Arredondo GJL, Díaz RR, Solorzáno SF, Sosa GIE, Beltrán ZM. Neonatal septicaemia due *K. pneumoniae*. *Revista Lat-Amer Microbiol* 1992;34:11-16.
41. Yuk-Fong LP, Tung J, Ke S, Chen S. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a distric hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 1998;36:2759-2762.
42. Decré D, Gachot B, Lucet JC, Arlet G, Bérezin B, Régnier B. Clinical and bacteriologic epidemiologic of extented-spectrum β -lactamse-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a medical intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1998;27:834-44.
43. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Ariza J, Guidol F. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(1):53-58.
44. De Champs C, Sauvart MP, Chanal C, Sirot D, Gazuy N, Malhuret R, et al. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum β -lactamases-producing members of the family *enterobacteriaceae* in an intensive care unit *J Clin Microbiol* 1989;27(12):2887-2890.

45. Lhopital S, Bonacorsi S, Meis D, Brahimi, Mathy S, Aigrain Y, et al. Molecular markers for differentiation of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:743-748.
46. Garrouste-Orgeas, Marie O, Rouveau M, Villiers S, Arlet G, Schlemmer B. Secondary carriage with multi-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in an adult ICU population: relationship with nosocomial infections and mortality. *J Hosp Infect* 1996;34:279-289.
47. Soulier A, Barbut F, Olliver JM, petiti JC, Lienhart A. Decreased transmission of enterobacteriaceae with extended-spectrum β -lactamases in an intensive care unit by nursing reorganization. *J Hosp Infection* 1995;31:89-97.
48. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:426-439.
49. Venezia RA, Scarano FJ, Preston KE, Steele LM, Root TP, Limberg R, et al. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum β -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* in enterobacteriaceae isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 1995;21:915-923.
50. Killgore GE, Kato H. Use of arbitrary-primed PCR to type *Clostridium difficile* and a comparison of results with those by immunoblot typing. *J Clin Microbiol* 1994;32:1591-1593.
51. Kristjánsson M, Samore MH, Gerding DN, DeGirolami PC, Bettin KM, Karchmer AW. Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol* 1994;32(8):1963-1969.
52. Naumovski L, Quinn JP, Myashiro D, Pate M, Bush K, Singer SB, et al. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum β -lactamases in isolates from cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(9):1991-1996.
53. Siu LK, Po-Liang LU, Po-Ren H, Lin FM, Shan-Chewen Ch, Kwen-tay L et al. Bacteremia due to extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Pediatric oncology ward: clinical features and identification of different plasmids carrying both SHV-5 and TEM-1 genes. *J Clin Microbiol* 1999;37 (12):4020-4027.
54. Szabó D, Filetóth Z, Szentandrassy J, Némedi M, Tóth E, Jeney C, Kispál G, Rozgonyi F. Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian Hospital. *J Clin Microbiol* 1999;37(12):4167-4169.
55. Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AE, Eliopoulos GM, Moelering RC, et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:2193-2199.