

11262
8



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Caracterización Molecular de *Klebsiella Pneumoniae*
Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido
Causantes de Infecciones Nosocomiales
en Tres Centros Hospitalarios en México.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

P R E S E N T A :
CARLOS ALBERTO DAZA TIMANÁ

TUTORES

DR. JOSÉ IGNACIO SANTOS PRECIADO
DRA. CELIA M. ALPUCHE ARANDA

DR. FORTINO SOLORZANO SANTOS
DRA. MARIA DOLORES ALCANTAR

MEXICO, D.F.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

2002

NOMBRE: Carlos ALBERTO
DAZA TIMANÁ

FECHA: 25 - Sep - 02

FIRMA: Maria Cristina Galindo

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* productoras de Betalactamasas de espectro extendido causantes de infecciones nosocomiales en tres centros Hospitalarios de México

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MEDICAS

PRESENTA

Carlos Alberto Daza Timaná

Realizada en el Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología Clínicas
del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina,
UNAM-Hospital General de México

Tutores

Dr José Ignacio Santos Preciado.*

Dra Celia M. Alpuche Aranda*

Dr Fortino Solorzano Santos. **

Dra María Dolores Alcantar. *

*Departamento de Medicina Experimental. Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología
Clínica. Facultad de Medicina UNAM - Hospital General de México.

** Subdirector del Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano
del Seguro Social.

México D. F., a 3 de abril del 2002

DR. LUIS FELIPE ABREU HERNÁNDEZ
Coordinador del Programa
Presente

Distinguido Dr. Abreu:

La presente es con el fin de informar a usted que el alumno Carlos Alberto Daza Timaná del nivel maestría en Ciencias, en el Campo del conocimiento de las Ciencias Médicas, adscrito a la Unidad operativa o Campo de estudios principal infectología, ha concluido la tesis "Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido causantes de infecciones nosocomiales en tres centros hospitalarios de México" la cual reúne la originalidad y calidad suficiente para ser sometida a consideración del jurado de examen de grado, solicito a usted se sirva poner a consideración del Subcomité Académico del campo de las Ciencias Médicas la conformación del Jurado de Examen de grado.

ATENTAMENTE


Dra Celia Mercedes Alvarado Aranda
Tutor

RECIBIDO

3.10.02

12:15 hr.

A W A S O T O



SECRETARÍA NACIONAL
DE SALUD
Y PROTECCIÓN
SOCIAL

**COORDINACIÓN DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIÉRREZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité Académico de las Ciencias Médicas, del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, según acuerdo AA3(CM/SCA/SO/27/02) acordó designar y se formaliza por el Comité Académico del Programa, el jurado para el examen de grado de **Maestro en Ciencias**, (Plan 4006) del C. **Carlos Alberto Daza Timana**, quien defenderá la tesis denominada "**Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido causantes de infecciones nosocomiales en tres centros hospitalarios de México**".

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
SUPLENTE
SUPLENTE

DR. JOSÉ IGNACIO SANTOS PRECIADO
DR. MANUEL SIGFRIDO RANGEL FRAUSTO
DRA. CELIA MERCEDES ALPUCHE ARANDA
DR. FORTINO SOLÓRZANO SANTOS
DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F. a, 8 de mayo de 2002.

DR. LUIS FELIPE ABREU H.
El Coordinador

LFAH/KGT/MEIK

A mi esposa, al pequeño bebe que pronto estará con nosotros, a mis padres y hermano que siempre me han dado su apoyo.

Al igual que cada una de las personas que de una manera u otro colaboró con la realización del presente trabajo. Gracias a todos, en especial al grupo del Dr. José I. Santos particularmente a la Dra Celia Alpuche que sin su trabajo y dedicación no hubiera sido posible la realización del presente trabajo.

INDICE

RESUMEN	1
RESUMEN EN INGLES	2
I. ANTECEDENTES	
I.1) Infecciones Nosocomiales	3
I.2) La importancia de los programas de control de Infecciones Nosocomiales	3-4
I.3) Microbiología de Infecciones Nosocomiales	4-5
I.4) Resistencia bacteriana	5-6
I.5) Betalactamasas	6-8
I.6) Clasificación de Betalactamasas y su importancia	8-9
I.7) La importancia de conocer el origen clonal de las bacterias causales en los estudios de Infecciones Nosocomiales	9-10
I.8) Importancia del Estudio de Epidemiología Molecular en períodos endémicos.	10-
II. JUSTIFICACIÓN, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, OBJETIVOS E HIPÓTESIS	12-13
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
III.1) Diseño, Tamaño de la muestra, criterios de inclusión y de no inclusión	14
III.2) Definición de variables del estudio	14-16
III.3) Muestras	17
III.4) Identificación Microbiológica	17
III.5) Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	17-18
III.6) Caracterización de Betalactamasas	18-19
III.7) Huella digital genómica	19-20
III.8) Caracterización de material plasmídico	20-21
IV. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO	21-22
V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y ASPECTOS ETICOS	23
VI. RESULTADOS	
VI.1) Hospital General de Durango	24-25
VI.2 Hospital Civil de Guadalajara	26-27

VI.3 Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS	28-30
VII. DISCUSIÓN	31-34
VIII. CONCLUSIONES	35
IX. TABLAS Y FIGURAS	
Tabla 1 y Figura 1	36
Tabla 2	37
Tabla 3 Figura 2	38
Figura 3	39
Figura 4	40
Figura 5	41
Figura 6 y Tabla 4	42
Tabla 5 y Figura 7	43
Tabla 6	44
Figura 8 y Tabla 7	45
Figura 9	46
Figura 10	47
Figura 11	48
Tabla 8 y Figura 12	49
Tabla 9 y Figura 13	50
Tabla 10	51
Tabla 11	52
Figura 14 y Tabla 12	53
Figura 15	54
Figura 16	55
Figura 17	56
Tabla 13 y Figura 18	57
Figura 19	58
X. BIBLIOGRAFÍA	59-65

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae (*K.pn*) es causa importante de infecciones nosocomiales (IN) en México y en el mundo. Y se ha reportado cada vez con mayor frecuencia como resistente a cefalosporinas de tercera, cuarta generación y monobactámico por producción de betalactamasas de espectro extendido (ESBL). Este trabajo se describe la variabilidad clonal por centro hospitalario de las *K.pn* aisladas de IN, el tipo de ESBL producida y si el origen genético de las mismas.

Métodos. Se estudiaron los aislamientos consecutivos de *K.pn* identificadas como causantes de IN por el Servicio de Epidemiología o Infectología de cada uno de los tres hospitales participantes basado en las normas del Registro Hospitalario de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) durante un periodo de al menos 6 meses. El método Kirby-Bauer se empleó en la determinación de susceptibilidad antimicrobina a ampicilina (AMP), amikacina (AMK), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX) e Imipenen/Cilastatina (IMP/CIL), Aztreonam (AZT) entre otros. La clonalidad fue determinada por electroforesis de campos pulsados (PFGE). La presencia de ESBL se detectó por E-test y su caracterización inicial por isoelectroenfoque, complementada con la prueba biológica de hidrólisis de Caz. El origen cromosomal o plásmidico fue determinado por transferencia de la resistencia a CAZ mediante conjugación de plásmidos.

Resultados. Los resultados obtenidos demuestran que en el Hospital General de Durango de abril a octubre del 2000 se detectaron 41 eventos consecutivos de infecciones causados por *Kpn*; 36 de IN y 5 de infecciones urinarias comunitarias. La principal fuente de aislamiento fueron los hemocultivos con un 61%, la resistencia a CAZ fue 72% y AMK del 69%. La Unidad de Cuidados intensivos Neonatales (UCIN) fue la principal área de IN (41%), con predominio de dos clonas. Las ESBL están codificadas en un plásmido, y su punto isoeléctrico es de (pI) de 9.0 y ocasionalmente 8.2.

En el Hospital Civil de Guadalajara de septiembre de 1999 a noviembre del 2000 se estudiaron 50 eventos consecutivos de IN causadas por *Kpn*. El principal sitio de aislamiento fueron los hemocultivos con 60%. La resistencia a CAZ fue del 90% y para AMK del 60%. La UCIN fue la principal área de aislamiento con un 58%. Se encontró predominancia de dos clonas en el área pediátrica y diversidad clonal en las áreas de adultos. La ESBL se encontró codificada en un plásmido y su pI fue de 8.2. Durante el periodo de estudio se presentaron dos brotes en las áreas de UCIN cada uno por una clona diferente, pero compartían igual plásmido de multirresistencia.

En el Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI de Octubre 2000 a mayo 2001 se analizaron 80 eventos infecciosos causados por *Kpn*. el 74% de IN y 26% de infecciones comunitarias. El principal sitio de aislamiento fueron los hemocultivos con 39%. La resistencia a CAZ se encontró en un 72% y a AMK 69%. La principal área de IN fue la UCIN con el 24% y existe gran diversidad clonal de las *Kpn* identificadas. Las ESBL se encuentran codificadas en un plásmido y su pI es 8.2.

Conclusiones. Se puede concluir que en los tres centros analizados existe una alta frecuencia de resistencia a CAZ por producción de ESBL la mayoría de estas enzimas tienen un pI de 8.2 que sugiere pertenecer a la familia SHV. Los genes para estas ESBL se acarrean en un plásmido de 50 a 60 Kilopares de bases en donde también se co-transfiere resistencia otros antibióticos. La mayor frecuencia de aislamiento de *Kpn*-CAZ^R fue en las áreas pediátricas particularmente UCIN en los Hospitales Generales Regionales, donde predominan diseminación clonal que sugiere diseminación cruzada de estas clonas. El Hospital Pediátrico de tercer nivel por el contrario presentó mayor variabilidad clonal de estas *Kpn* lo que sugiere infección endógena. La transmisión cruzada parece ser importantes en el surgimiento y mantenimiento de las clonas de *K.pn* multirresistentes a lo que se suma la transmisión horizontal de plásmidos de multirresistencia entre diferentes clonas.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae (*Kpn*) is prominent among Gram-negative causing nosocomial infections (NI) and these bacteria, as the most of Gram-negatives are usually susceptible to Extended Spectrum Cephalosporins (ESC). The increasing use of the ESC has been associated with a rising frequency of isolation of Gram negatives resistant to these antibiotics. The production of Extended, Spectrum β -lactamases (ESBLs) enzymes are considered as the main mechanism of resistance to ESC. In this work we present the molecular analysis of ESBL- producing *K. pneumoniae* causing endemic NI in three different Institutions in Mexico.

Methods. We collected all *Kpn* consecutive isolations from NI in three different Institutions in Mexico during a surveillance period of at least six month. NI diagnosis was determined following the National Hospital Epidemiology Surveillance Program of Mexico (RHOVE). Antimicrobial susceptibility patterns were determined by Kirby Bauer using disk of ampicillin (AMP), amikacin (AMIK), cefatazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), Aztreonam (AZT), imipenem/cilastatin among others. Genomic fingerprint was detected by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). ESBL production and characterization was determined by isoelectrical focusing complemented by CAZ hydrolysis bioassay. If the CAZ resistant (CAZ^R) phenotype was coded in plasmids or chromosomal was determined by plasmid conjugations assays.

Results. In the Durango General Hospital (DGH) we detected 41 *Kpn* isolations (04/2000-10/2002); 36 were NI and 5 were urinary tract infections (UTI) community acquired (CA). Blood cultures were the main source of isolation (61%). 72% of the strains were CAZ^R and 69% AMIK^R. Neonatal Intensive Care Unit (NICU) was the main Hospital Ward for *Kpn* identification. Two predominant clones were identified in 50% of the NI cases. The ESBL were coded in a megaplasmid and the isoelectrical point (pI) was 9.0 and occasionally 8.2.

In Guadalajara Civil Hospital (GCH) we analyzed 50 *Kpn* isolations (19/1999-11/2000) all of them causing NI. Blood cultures were the main source of identification (60%). 90% of the strains were CAZ^R and 60% AMIK^R. NICU was also the main hospital ward of identification (68%). In this Hospital we also found two predominant clones. The ESBL were coded in a large plasmid and the pI was 8.2. Two small outbreaks were present during the study period.

In the Pediatric Hospital of The National Medical Center (PHNMC-IMSS) we detected 80 isolations of *Kpn* (10/2000-05/2001). 74% were NI and 26% were CA. In NI cases the main source of isolation was also blood cultures (24%) and 72% were CAZ^R and 69% were AMIK^R. In this Hospital we found clonal diversity with no clear evidence of clonal predominance. The ESBL production was coded in a megaplasmid and the pI was 8.2.

Conclusions. These data clearly demonstrated that there is a very high frequency of isolation of *Kpn*- CAZ^R causing NI in these three institutions in our country. In all the cases the CAZ^R is mediated by ESBL production. Also In all the Institutions we detected ESBL with a pI of 8.2 that could be part of the SHV betalactamases family. We demonstrated that the ESBL are coded in a megaplasmid that also carries genetic information for multiresistant phenotype. Pediatric wards mainly NICU were the predominant Hospital ward of *Kpn*-CAZ^R phenotype in the two General Hospitals. The clonal predominance detected suggested a high frequency of cross-transmission in this two Institutions. However the PHNMC-IMSS is a very specialized pediatric hospital and the absence of clonal predominance suggested endogenous infections. In this way both clonal dissemination and maybe horizontal transmission of megaplasmids among different clones selected by the unrestricted use of ESC could be the explanation of the high frequency of *Kpn*-CAZ^R in these hospitals.

I. ANTECEDENTES

I.1) INFECCIONES NOSOCOMIALES (IN)

Las IN son aquellas que no están presentes ni en periodo de incubación cuando el paciente ingresa al hospital¹. Una IN prolonga el tiempo de estancia hospitalaria, incrementa la mortalidad, eleva los costos de atención y afecta la calidad de vida del individuo durante la recuperación de su enfermedad de base. La preocupación por estas infecciones llevó al desarrollo de una verdadera disciplina en la Epidemiología Hospitalaria en las últimas tres décadas y a la creación de programas de control de IN en 1950 en los Estados Unidos de Norteamérica². En países desarrollados las IN representan 5 a 10 casos por cada 100 ingresos y en los Estados Unidos de Norteamérica en 1986 representaron gastos por 2.5 billones de dólares en cuidados directos del paciente³ y para 1992 su costo ascendió a 4.5 billones de dólares⁴. Estudios tendientes a determinar la frecuencia de IN en diferentes Hospitales de México presentan gran variación. Ponce de León y col. estimaron la frecuencia de las IN entre el 10 -15% en los hospitales de segundo y tercer nivel⁵. En México la tasa de mortalidad asociada con IN en promedio es 5% y si calculamos el total de muertes por IN reportadas a la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica y las comparamos con las causas de mortalidad de reporte obligatorio este problema se ubicaría como la séptima causa de muerte^{5,6}. El costo anual de las IN pediátricas en México asciende a 19.4 millones de dólares⁷. El problema es mayor en presencia de brotes y en México se estima que en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales ocurren hasta 120 brotes por cada 10.000 egresos⁸. El problema por IN se agrava con el incremento de resistencia bacteriana a los antibióticos de uso común siendo más evidente en las áreas quirúrgicas, salas de inmunocomprometidos, Unidades de Cuidados Intensivos Pediátricos y de Adultos⁹.

I.2) LA IMPORTANCIA DE LOS PROGRAMAS DE CONTROL DE LAS IN

El impacto en la prevención y control de las IN depende de un programa activo y efectivo de control, como se demostró en el proyecto SENIC (Study on Efficacy of Nosocomial Infection Control Project) donde se logró una disminución en el 32% de estas infecciones¹⁰. Las IN no son un problema exclusivo de los países desarrollados. A pesar de ello en América Latina, solo el 5% de los hospitales tienen comités con programas regulares de control¹¹. En México se ha iniciado un programa nacional de vigilancia denominado Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) donde se incluyen las IN.

Un ejemplo de los beneficios de un programa activo de control de IN, se ha llevado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INNSZ) reduciendo la frecuencia de un 22.3% en 1984¹² a 12.5% para 1991, durante los siguientes cinco años, continuó descendiendo hasta alcanzar una tasa de 10% en 1996 y la mortalidad asociada a IN disminuyó en 36%¹³. Esta misma tendencia de las IN se observa en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (HP-CMN Siglo XXI- IMSS) donde la incidencia de IN de 25.7% por 100 egresos ha presentado un descenso anual cercano al 1% con la puesta en práctica del programa de control de IN¹⁴.

I.3) MICROBIOLOGIA DE LAS IN

Los *Streptococcus spp* y *Staphylococcus spp* fueron los patógenos predominantes en las IN al principio del siglo pasado siglo. Con la introducción de los antibióticos se llevó a cabo una disminución de las infecciones causadas por estos organismos y las infecciones pasaron a ser producidas principalmente por bacterias Gram negativas¹⁵. A finales del milenio pasado las IN causadas por bacterias Gram positivas han reaparecido como patógenos predominantes en algunas partes del mundo^{15,16}, a pesar de ello las bacterias Gram negativas siguen causando muchas de las IN¹³. Durante las dos últimas décadas en México, las especies de *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* y *Pseudomonas spp* son las más frecuentes, con una alta mortalidad asociada^{17,18,19,20}. Brotes por *K.pn* multiresistente como el reportado por Silva y col. en Morelos²¹, y otros reportes como los del Hospital Civil de Guadalajara, Hospital General de México, Querétaro y más recientemente en Durango (comunicación verbal). También, se han reportado brotes nosocomiales por Gram negativos como *Serratia marcescens*^{22,23}.

La importancia de las bacterias Gram negativas y en especial de *K.pn* se ha determinado en los diferentes estudios realizados en México. En un estudio de prevalencia de IN de 21 hospitales pediátricos, se estudiaron 1183 pacientes de ellos 116 presentaron IN para una prevalencia de 9.8%, el principal microorganismo identificado en los hemocultivos fue *K. pneumoniae* 31%, *E. coli* 10%, *Pseudomonas spp* 8.2%, *S. aureus* 8.2%, *Candida spp* 6.1% y *Staphylococcus coagulasa negativo* 6.1%²⁴. En el HP-CMN Siglo XXI-IMSS los principales microorganismos aislados de hemocultivos durante un periodo de siete años (1991 a 1998) fueron los cocos Gram positivos con predominio de *Staphylococcus coagulasa negativo* y *S. aureus*, pero dentro del grupo de las enterobacterias *K.pn* fue el principal agente causal ocupando el segundo lugar de la tabla general (comunicación verbal). Este mismo hallazgo se observa en un estudio que incluyó

infecciones comunitarias y nosocomiales de niños y adultos en la ciudad de Guadalajara, realizado en dos centros hospitalarios uno de tercer nivel (Hospital Civil de Guadalajara) y de un hospital de segundo nivel²⁵. En todos estos estudios se desconoce cuales son los mecanismos de resistencia que predomina en las cepas aisladas en estas infecciones.

I.4) RESISTENCIA BACTERIANA

La determinación de susceptibilidad antimicrobiana de los aislados clínicos es crucial para una terapia óptima de los pacientes infectados. Su conocimiento también es importante para monitorizar la diseminación de organismos resistentes así como sus genes de resistencia a través del hospital y la comunidad.

La resistencia bacteriana puede ser definida como la capacidad de un microorganismo para evitar la acción inhibitoria o letal del agente antimicrobiano y se presenta tanto en infecciones adquiridas en la comunidad como hospitalarias. Sin embargo, es en las IN donde el problema es mas acentuado. Se conocen diferentes mecanismos por los cuales una bacteria puede resistir el efecto de los antibióticos²⁶: **a)**. Disminución de la accesibilidad del antibiótico al blanco de acción ya sea por alteración en la permeabilidad o por disminución en la concentración del antibiótico a través de bombas de transporte activo hacia el exterior²⁷, **b)**. Inactivación del antibiótico por hidrólisis o modificación enzimática²⁸ y **c)**. Alteración del blanco de acción. Estos mecanismos de resistencia son producto de variaciones genéticas en el material cromosómico y extracromosómico^{15,26,28,29,30,31}. Los genes que se encuentran asociados con la resistencia pueden ser transferidos en forma vertical o por vía horizontal. Existen varios mecanismos descritos que facilitan la transferencia de material genético como la transformación, conjugación y/o por fagos que infectan bacterias (transducción). Muchos de los genes asociados con la resistencia bacteriana a los antibióticos se encuentran en plásmidos. Otros elementos móviles de material genético son los transposones e integrones que son pequeños elementos móviles de DNA con capacidad de transferir DNA por remoción e inserción de dicha información dentro del DNA bacteriano, esta diseminación se puede llevar a cabo entre un amplio rango de especies bacterianas. De estos mecanismos de transferencia de material genético se destaca la mediada por plásmidos de resistencia que ha sido demostrado *in vivo* especialmente entre las diferentes especies de enterobacterias^{15,26,28,29,30,31}.

Los factores clínicos asociados con la adquisición y diseminación de cepas resistentes parecen estar relacionados con prolongada estancia hospitalaria, procedimientos invasivos y uso de antibióticos de amplio espectro^{29,30,31}.

La resistencia bacteriana puede ser determinada por métodos clásicos como las pruebas de difusión en disco (Kirby-Bauer) o métodos de micro y macro dilución que determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento del organismo³². Estos métodos no nos informan cuáles y cuántos son los mecanismos implicados en mediar esa resistencia, sin embargo, son los métodos estándares para la práctica clínica. Se han desarrollado otros métodos basados en la identificación de las proteínas mediadoras de la resistencia, la presencia de fagos que acarrean esta resistencia o aún más sofisticados como la detección de la secuencia del material genético que codifica para algún mecanismo de resistencia.

Los antibióticos betalactámicos se han utilizado en el tratamiento de las infecciones por enterobacterias, incluidas las cepas de *Klebsiella spp* asociadas con IN, pero desde su introducción en la práctica clínica ha ido disminuyendo su efectividad por la emergencia de bacterias que resisten su modo de acción particularmente en el caso de Gram negativos causantes de IN³³. La resistencia a los betalactámicos, incluyendo a las cefalosporinas, puede ser mediada por tres mecanismos: **a)**. alteración del sitio blanco que se conoce como proteínas fijadoras de penicilina (PBP), **b)**. producción de betalactamasas que hidrolizan el anillo betalactámico y **c)**. cambios en la estructuras externas bacterianas que impiden el ingreso del antibiótico. Sin embargo, entre las bacterias Gram negativas de importancia clínica el principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos es la producción de betalactamasas³⁴.

1.5) BETALACTAMASAS

Las betalactamasas son un grupo de enzimas que rompen el anillo betalactámico inactivando a estos antibióticos. La ruptura del anillo betalactámico puede ser llevada a cabo en una pequeña proporción a través del ion zinc, pero la gran mayoría lo hace por la vía del éster de serina, formando un complejo no covalente con el antibiótico, el cual facilita que el anillo betalactámico sea atacado por el hidroxilo libre de la cadena lateral de la serina, conduciendo a la formación del éster acil covalente. La hidrólisis del éster finalmente libera el sitio activo de la enzima hidrolizando e inactivando el medicamento³⁵. Las mutaciones en los genes que codifican estas enzimas amplían el espectro de acción, dando origen a las betalactamasas de amplio espectro que son

capaces de hidrolizar antibióticos como ampicilina y cefalosporinas de primera y segunda generación, estas enzimas han evolucionado a un espectro de actividad más amplio llegando a hidrolizar cefalosporinas de tercera, cuarta generación y monobactámicos recibiendo el nombre de betalactamasas de espectro extendido (ESBL por las siglas en inglés Extended Spectrum Beta Lactamasas)³⁵. Entre las más importantes de estas enzimas se hallan las familias TEM y SHV³⁵. El nombre de "TEM" es una contracción de Temoniera, que era el nombre de la paciente de quien se aisló una *E. coli* con esta enzima. En contraste "SHV" es una contracción de sulphhydriyl variable (sulfidril variable) nombre que describe las propiedades bioquímicas de estas betalactamasas³⁶. La resistencia bacteriana producida por hidrólisis del antibiótico mediada por ESBL está codificada en genes localizados principalmente en plásmidos y dado que estos son fácilmente transmisibles entre los diferentes miembros de las enterobacterias y particularmente prevalentes en *Klebsiella spp*³⁷. La acumulación con otros genes que codifican resistencia es factible, lo que genera transmisión de multiresistencia en un solo plásmido o en otros elementos extracromosomales o inclusive en áreas específicas del cromosoma³⁴.

Cepas productoras de ESBL han sido encontradas principalmente en *Klebsiella spp*, *Enterobacter*, *E. coli* y *Serratia spp* asociadas a brotes nosocomiales. Estudios recientes demuestran que las IN producidas por cepas multiresistentes incluyendo resistencia a cefalosporinas de tercera generación se han incrementado. En Europa la multiresistencia de las cepas de *Klebsiella spp* es producida principalmente por betalactamasas del tipo SHV-5 y las betalactamasas del tipo TEM-10 y TEM-12 son las más prevalentes en los Estados Unidos^{38,39,40}. La incidencia de aislamiento de *K.pn* productoras ESBL, en los Estados Unidos se ha reportado en el 5% de las cepas productoras de IN en ese país^{38,41}. La frecuencia de dichas cepas en Europa es mayor encontrándose hasta en un 14 -16% en Francia e Inglaterra^{38,42, 43}.

En México, existe escasa información al respecto. El primer estudio sobre la presencia de ESBL fue realizado en aislamientos clínicos de enterobacterias de hospitales de la ciudad de México durante el periodo 1991 a 1992. Se analizaron 43 cepas resistentes a cefotaxima y ceftazidima, de estas cepas: 13 correspondía a *K.pn*, 7 a *E. coli*, y 23 a *Enterobacter cloacae*. Se encontró que las betalactamasas con punto isoeléctrico (pI) de 7.0, 7.6 y 8.2 derivadas de SHV fueron las enzimas predominantes con un 42% (18 de 43). Adicionalmente 12 de 43 (25 %) de las betalactamasas presentaban un pI mayor de 8.2 las cuales no estaban relacionadas con TEM o las SHV⁴⁴ a la cual se le denominó TLA-1 y su pI es 9.0⁴⁵.

Para enfrentar el problema de resistencia a los antibióticos betalactámicos se han desarrollado nuevos antibióticos con mayor estabilidad a las betalactamasas conocidas y con mayor espectro antimicrobiano pero el resultado ha sido la selección de mayor diversidad y betalactamasas potencialmente con un espectro más amplio de actividad hidrolítica. La diversidad de estas enzimas ha crecido considerablemente como se observa en datos del año 1995 al año 2000 donde 5 de los 11 (sub) grupos 1, 2be, 2br, 2d y 3 incrementaron su número al menos en un 50%⁴⁶. Otras ESBL descritas como no relacionadas con TEM o SHV son las CTX-M, Toho y TLA-1, esta última fue aislada de una *E. coli* en orina de un paciente de la ciudad de México⁴⁵.

Una forma práctica para la detección de ESBL puede ser realizada por las pruebas de susceptibilidad con ceftazidima⁴⁷. Si la susceptibilidad a la ceftazidima se encuentra reducida, la prueba sinérgica o de doble disco entre ceftazidima y clavulanato debe ser realizada, la producción de ESBL es inferida si la zona de inhibición de la ceftazidima es aumentada por el clavulanato. Actualmente, se cuenta con prueba E (E-test) en la cual una tira contiene concentraciones crecientes de ceftazidima en un extremo y en el otro ceftazidima más clavulanato, los resultados de esta prueba han permitido una adecuada detección de ESBL aunque no indican el tipo de betalactamasas que esta siendo producida por la bacteria⁴⁸, para conocer el tipo de ESBL que está siendo producida se requiere de la caracterización por punto isoeléctrico o la identificación del material genético por amplificación con PCR hibridación por sondas de DNA o secuenciación de DNA.

I.6) CLASIFICACIÓN DE BETALACTAMASAS Y SU IMPORTANCIA

Diferentes esquemas de clasificación de las betalactamasas han sido propuestos. La primera clasificación de esta familia se basó en la división de las betalactamasas según la actividad bioquímica y el sustrato que hidrolizaban dando la denominación de penicilinasas a las enzimas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinasas aquellas que hidrolizaban cefalosporinas⁵⁰. Posteriormente, los esquemas de clasificación incorporan si la resistencia era mediada en plásmidos o cromosómicamente en conjunto con el pl^{51,52}. El fundamento del pl esta basado en que las proteínas son moléculas anfotéricas que acarrean cargas positivas, negativas o no tienen carga neta dependiendo del pH de su ambiente local. Existe un valor de pH para cada proteína en la cual su carga neta es cero. Esto es lo que se conoce como valor de pH isoeléctrico o pl, que es una propiedad fisicoquímica de cada proteína. La localización de las proteínas por pl es una

técnica ampliamente utilizada para el análisis, el aislamiento y caracterización de las proteínas⁵³. Es también una de las técnicas más aceptadas en la literatura internacional para la caracterización de las betalactamasas^{54,55,56}. Por otra parte, el desarrollo de los métodos moleculares ha permitido que esta tecnología sea utilizada en la clasificación de betalactamasas, hasta el momento los esquemas basados en la tecnología molecular presentan una buena correlación con las clasificaciones fenotípicas³⁵.

La importancia de conocer el tipo de betalactamasa es por una parte epidemiológica, ya que si el gen que codifica la resistencia se acarrea en un plásmido o en el cromosoma tiene diferentes implicaciones en las estrategias para el control de las infecciones, o una vez conocido el tipo de betalactamasa a través del gen que la codifica y el elemento transferible en que está insertado se puede seguir una ruta epidemiológica con mayor seguridad o evaluar como se ha diseminado este problema evolutivamente en una región, entre diferentes hospitales o dentro del mismo hospital. Adicionalmente, el conocimiento de los tipos de enzimas que están presentes pueden servir para guiar al clínico a escoger la terapia empírica apropiada inicial o que tipo de programa de control de antibióticos necesita implementar en sus hospitales para disminuir la presión de cepas resistentes⁴⁹. El conocimiento básico de la forma como actúan las betalactamasas ha permitido el desarrollo de nuevos betalactámicos más estables al efecto de las mismas.

1.7) LA IMPORTANCIA DE CONOCER EL ORIGEN CLONAL DE LAS BACTERIAS CAUSALES EN LOS ESTUDIOS DE LAS IN

Es importante destacar que todos los organismos, aun en ausencia de presión selectiva presentan variación genética, esta puede estar dada por mutaciones, deleciones, adquisición de nuevo material genético. Lo anterior con el tiempo lleva a los microorganismos a presentar variaciones en su genoma a pesar de tener un mismo origen, la rapidez con que este evento se da, está en relación con el microorganismos en cuestión y a factores externos que favorezcan una presión de selección. Es decir, aquellos microorganismos que tengan sistemas que faciliten la conjugación, intercambio de plásmidos y sistemas de recombinación activos de DNA como en el caso del virus de la influenza y el virus de la inmunodeficiencia humana la variación genética se presentará con rapidez⁵⁷. En las bacterias estos eventos se presentan con menor frecuencia, por lo tanto, individuos de la misma especie pueden tener diferencias genéticas que le confieran fenotipos diferentes. Por ello en el estudio de las IN, es fundamental determinar si los microorganismos

causantes de estas infecciones son idénticos o semejantes y para ello es crucial establecer una caracterización más específica a fin de sustentar la relación de esos organismos con el evento epidemiológico en investigación, particularmente en la determinación de la fuente y ruta de diseminación^{58,59,60,61}. Varias aproximaciones se han dado a este reto, como son los métodos convencionales, entre los que se cuenta con: perfil bioquímico, perfil de susceptibilidad antimicrobiana, tipificación serológica, tipificación por bacteriocinas y patrones de susceptibilidad a bacteriófago. Los resultados de estos métodos han sido de gran ayuda pero generalmente presentan variaciones difíciles de controlar y no pueden discriminar específicamente las diferentes cepas, lo que resta validez epidemiológica necesaria para ser utilizados en el establecimiento de una relación directa en los estudios de los agentes causales nosocomiales. Pero ha sido el advenimiento y desarrollo de la tecnología molecular al facilitar el análisis del material genético, molécula fundamental de la identidad celular, el poder establecer una relación epidemiológica directa, generando lo que se ha conocido como "epidemiología molecular"^{60,61}. Se conoce como clonas a los aislados que son indistinguibles uno de otro por una variedad de pruebas fenotípicas y genotípicas independiente de la fuente, localización, y el tiempo, lo cual infiere que tengan un origen común. Dentro de las pruebas desarrolladas para la tipificación genotípica del cromosoma completo de una bacteria, la electroforesis de campos pulsados (PFGE por las siglas en inglés Pulse Field Gel Electrophoresis) permite separar moléculas de DNA mayores de 1.000.000 pares de bases de longitud denominadas como mega-base de DNA. El principio de ésta técnica es el cambio en la dirección de los pulsos eléctricos, lo que permite que las moléculas de DNA se reorienten en el gel de agarosa dando como resultado la separación (resolución) de moléculas de DNA en unas pocas bandas que generan un patrón de 10 - 15 bandas el cual es fácilmente comparable. Debido a su poder discriminatorio, reproductibilidad, y a la gran variedad de microorganismos que pueden ser valorados por ésta técnica la PFGE es actualmente considerada como la prueba de oro para el análisis epidemiológico clonal de las IN,^{62,63}.

I.8) IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR EN PERIODOS ENDEMICOS

Existe escasa información tanto a nivel nacional como internacional del comportamiento de IN por *K.pn* durante periodos endémicos. Los estudios que han utilizado PFGE para el análisis de las IN durante periodos no epidémicos han encontrado gran diversidad clonal entre los microorganismos Gram negativos que colonizaron o infectaron a sujetos hospitalizados, en dichas publicaciones

sólo el 10 a 20% de las infecciones por estos bacilos demostraron diseminación clonal lo que implica que pocos fueron causados por contaminación de un enfermo a otro es decir por transmisión cruzada^{64,65}. En México, no se cuentan con estudios que determinen cual es el comportamiento de las IN producidas por Gram negativos productores de ESBLs durante periodos endémicos. Los pocos estudios que sean realizado en cepas productoras de ESBL en México han sido durante brotes^{21,22,23} o describiendo nuevas ESBL^{44,45}, desafortunadamente en estos estudios últimos estudios no se tomó en cuenta si el origen era nosocomial, comunitario, o el universo de colección de estas cepas, tampoco se comenta como se realizó la selección de las cepas recolectadas para el estudio, ni la similitud o diferencia clonal o plasmídica que median la resistencia a cefalosporinas de tercera generación de las cepas incluidas en el estudio. Esto refleja el poco conocimiento que se tiene del comportamiento de estas infecciones durante periodos endémicos tanto a nivel nacional como internacional, por lo cual sería importante realizar un estudio dirigido a conocer cuales son las características de estas infecciones durante estos periodos. Adicionalmente, mucha de la información que existe con respecto a la diseminación nosocomial de esos organismos ha sido derivada de estudios en pacientes adultos críticamente enfermos y durante periodos epidémicos. Sin embargo, es posible que la mayoría de esos datos puedan ser aplicados a los pacientes de las unidades de cuidados intensivos pediátricas^{66,67}.

JUSTIFICACION

En México se ha identificado a *K.pn* como uno de los principales agentes implicados en las IN en diversos centros hospitalarios, en algunos casos las cepas han sido multirresistentes, llamando la atención la aparición de resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Se desconoce si existe predominancia clonal o no en las *K. pn* causantes de IN que nos sugiera de primera instancia si la diseminación de estas cepas es en forma cruzada o por vía enógena. Por otra parte tampoco se conoce una frecuencia de producción de ESBLs y de que tipo en *K. pn* de origen nosocomial. El conocimiento de las clonas existentes de *K.pn* nosocomiales y su frecuencia de diseminación permitirá mejorar los programas de vigilancia y control específicos en IN en las áreas estudiadas. El estudio de tres centros hospitalarios permitirá conocer cual es la frecuencia y variación de estas clonas y las características moleculares que rigen la resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la frecuencia y variación de las clonas de *K.pn* productoras de ESBL en tres centros hospitalarios de México?

¿Cuáles son las características moleculares de las ESBL producidas por las cepas *K.pn* nosocomiales que rigen la resistencia a cefalosporinas de tercera generación en tres centros hospitalarios de México?

OBJETIVOS:

Objetivo General

1. Describir la frecuencia y variación de las clonas de *K.pn* productoras de ESBL en tres centros hospitalarios de México.
2. Identificar si el origen genético de las ESBL en las *K. pn* nosocomiales es plasmídico o cromosomal e identificación del tipo de ESBL producido por cepas de *K.pn* nosocomiales.

Objetivos específicos

1. Describir la frecuencia de *K.pn* resistentes a cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) causantes de IN en tres hospitales: Hospital General de Durango HGD), Hospital Civil de Guadalajara (HCG) y Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto mexicano del Seguro Social (HPCMN-IMSS) de la Ciudad de México, durante un periodo de cuando menos 6 meses de los años 1999 y 2000.
2. Determinación de la huella digital genómica por electroforesis de campos pulsados de todas las cepas identificadas en el objetivo 1 y clasificarlas por clonas en cada centro.
3. Determinar la presencia, número, tamaño de los plásmidos y el perfil del patrón de restricción por endonucleasas de las cepas de las cepas identificadas en 1.
4. Determinar de la capacidad de transmitir por conjugación de plásmidos la resistencia a CTX y CAZ de cuando menos 5 de las clonas más frecuentes identificadas en 2 en cada centro.
5. Caracterización inicial de las ESBL producidas por las clonas de *Klebsiella pneumoniae* ceftazidima resistente (*K.pn* CAZ^R).

HIPÓTESIS

1. En las cepas de *K.pn* productoras de ESBL causantes de IN en México predominancia de un mismo origen clonal por centro hospitalario aunque exista variación de las clonas entre los centros hospitalarios.
2. La resistencia a CTX y CAZ de *K.pn* causantes de IN en algunos centros Hospitalarios de México es producida por ESBL que son acarreadas en plásmidos que se pueden transferir de forma horizontal.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1) DISEÑO DEL ESTUDIO. Transversal descriptivo

TAMAÑO DE LA MUESTRA. Para el tamaño de la muestra se tomaron los aislamientos consecutivos de las cepas de *K.pn* consideradas como agentes causales de IN de cada uno de los tres centros hospitalarios mencionados, durante un periodo de al menos seis meses consecutivos de los años 1999 al 2000. Mensualmente se esperaban al menos 10 cepas provenientes de éstos centros hospitalarios (por información personal de la RHOVE). Se desconoce cuántas de ellas producen ESBL.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

1. Cepas de *K.pn* aisladas como agentes causales de IN durante un periodo de seis meses consecutivos de los años 1999 al 2000 en el Hospital General de Durango, Hospital Civil de Guadalajara y HP-CMN Siglo XXI-IMSS.
2. Se cuente con todos los datos de la hoja de recolección de la RHOVE e identificación de las muestras.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN.

1. Cepas no viables de *K. pn*.

III.2) VARIABLES DEL ESTUDIO Y SU DEFINICION.

1. Infección Nosocomial
2. Transmisión cruzada
3. Evento de IN
4. Sala
5. Hospital
6. ESBL
7. Plásmido

8. Clona

INFECCION NOSOCOMIAL

Definición conceptual y operacional: Las IN bacterianas son aquellas que no están presentes, ni en periodo de incubación cuando el paciente ingresa al hospital¹. Se basó en los criterios de la RHOVE y corroborado por el Servicio de Infectología o Epidemiología de cada hospital.

Tipo de variable: nominal dicotómica: IN si la infección identificada por el Servicio de Infectología o Epidemiología cumplía con los criterios de la RHOVE. En caso contrario, se consideró como infección comunitaria (IC).

TRANSMISION CRUZADA

Definición conceptual y operacional: Aislamientos que presenten clonas idénticas o subclonas en diferentes pacientes⁶⁴.

Tipo de variable: Cualitativa dicotómica. El hallazgo de una misma clona o subclona en pacientes diferentes se consideró como transmisión cruzada, en caso contrario, se interpretó como ausencia de transmisión cruzada.

EVENTO

Definición conceptual y operacional: Cada uno de los sitios estériles donde se logró aislar a la *K.pn* como causa de infección corroborado por el servicio de Infectología o Epidemiología de cada hospital.

Tipo de variable: Cualitativa nominal. Cada uno de los sitios estériles donde se logró aislar a la *K.pn* se tomaron como eventos independientes, corroborados por el Servicio de Infectología o Epidemiología de cada hospital.

SALA

Definición conceptual: Cada una de las áreas en que se dividió el hospital para la atención de los pacientes.

Definición operacional: Area del hospital donde se hizo el diagnóstico de infección corroborado por el Servicio de Infectología o Epidemiología de cada hospital, basados en los criterios de la RHOVE.

Tipo de variable: Cualitativa nominal.

BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (ESBL)

Definición conceptual: Enzimas que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación como CTX, CAZ, monobactámicos (aztreonam), y son inhibidas por el clavulanato^{35,68}.

Definición operacional: La presencia de betalactamasas de ESBL se determinó por la realización de la prueba E test^{48,69}.

Tipo de variable: nominal dicotómica: Si la CIM de CAZ/ MIC de CAZ clavulanato fue mayor o igual de 8 indicó la presencia de ESBL y ausencia si es menor de 8⁶⁹.

TIPIFICACION DE LAS BETALACTAMASAS

Definición conceptual: De acuerdo a su pl^{54,55,56}

Definición operacional: De acuerdo a su pl^{54,55,56}

Tipo de variable: nominal. Se realizó de acuerdo al pl⁵⁶.

PLASMIDO

Definición conceptual y operacional: Elementos genéticos extracromosómicos formados por moléculas de DNA de doble cadena circular^{30,70}.

Tipo de variable: Cuantitativa dicotómica. Para el análisis de estos plásmidos se utilizó endonucleasas de restricción EcoRI, Hind III (Boehringer Manhein o New England Biolab) si presentaban igual patrón de fragmentos se tomó como igual plásmido si no como diferente plásmido.

CLONA

Definición conceptual: Se conoce como clona a los aislados que son indistinguibles uno de otro por una variedad de pruebas fenotípicas y genotípicas independiente de la fuente, localización y el tiempo lo cual infiere que tengan un origen común⁶².

Definición operacional: Se hará, basado en los patrones de diferencias de las bandas obtenidas en electroforesis de campos pulsados siguiendo las recomendaciones de Tenover y col⁶².

Tipo de variable: nominal. Clona si no existe diferencias en el patrón de bandas, estrechamente relacionados el patrón de bandas varía solo en una, posiblemente relacionados presenta dos bandas diferentes y diferente si el patrón de bandas difiere en tres o más bandas⁶².

III.3) MUESTRAS. Se tomaron las cepas de *K.pn* aisladas como agente causal de infección en el Hospital General de Durango, Hospital Civil de Guadalajara y HP-CMN Siglo XXI-IMSS durante un periodo consecutivo de cuando menos 6 meses de los años 1999 y 2000. La identificación de la infección se realizó por el departamento de Infectología o Epidemiología de cada Hospital participante, los cuales siguen los lineamientos de la RHOVE. Los colaborados por centro hospitalaria fueron: Dr. Juan Carlos Tinoco, Dr. Gerardo Martínez del HGD en Durango, Dra. Rayo morfín Otero y el Dr. Eduardo Rodríguez Noriega del HCG en Guadalajara y el Dr. Fortino Solórzano y la Dra. Guadalupe Miranda en el HPCMN –IMSS en la Ciudad de México

III.4) IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA. Los laboratorios de Bacteriología Clínica de cada uno de los tres hospitales realizaron la identificación primaria de los microorganismos hasta género y especie y el patrón de susceptibilidad antimicrobiano requerido en cada centro. Los laboratorios del HGD y del HCG pertenecen a la RED NACIONAL DE RESISTENCIA DE MÉXICO. Posteriormente estos aislamientos se enviaron al Laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología del Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UME-UNAM), donde se procedió a una nueva identificación hasta género y especie mediante análisis bioquímico con sistema comercial API⁷¹. Esta identificación se realizó con el fin de contar con un sistema estricto de control de calidad en cuanto a la definición de *Klebsiella pneumoniae* en nuestro Laboratorio utilizando a la RED NACIONAL DE RESISTENCIA DE MÉXICO como nuestro estándar de oro.

III.5) PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA. Posterior a la re-identificación se procedió a realizar de nuevo un panel de susceptibilidad antimicrobiano más limitado. La prueba de susceptibilidad se realizó por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer⁷². Para ello se tomó de 3-5 colonias de una placa de agar Luria no suplementado, las cuales se diluyeron en 5 ml de solución salina para llegar a una concentración de 2×10^8 UFC/ml. Se inoculó con un hisopo de una manera uniforme sobre agar Mueller-Hinton no suplementado, dejándose secar la placa por 5-10 minutos y se colocaron los discos de antibióticos con una separación de cuando menos 24 mm de centro a centro de los discos sin exceder de 12 discos en una placa de 150 mm o más de 5 en una placa de 100 mm. Se utilizaron sensidiscos comerciales Beckton Dickinson. Las placas se incubaron a 35°C por 16 a 18 horas en posición invertida, y posteriormente se leyó e interpretó con una escala en mm basado en las líneas de cortes para sensibilidad de sensible, intermedio o resistente según las especificaciones de los Estándares Nacionales de los Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (NCCLS). La cuantificación de estos resultados se

determinó mediante la técnica computarizada BIOMIC⁷³. Este sistema también proporciona valores de CIM por regresión lineal estandarizada a partir del Kirby-Bauer.. Las cepas identificadas como resistentes a CAZ se corroboraron por la técnica específica de determinación de CIM. La cepa *E. coli* ATCC 25922 susceptible a CAZ y la *Kpn* ATCC 700603 productora de ESBL, se utilizaron como controles en todos los ensayos de susceptibilidad y de E-Test.

Para la determinación de las CIM de *K.pn* a CAZ y AMK también se utilizó el procedimiento de dilución en agar, donde el agente antimicrobiano fue incorporado en el medio de agar, cada placa contenía una diferente concentración del agente (diluciones dobles seriadas 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml, etc). El agar Mueller- Hinton y la solución antimicrobiana se mezclaron completamente y esta mezcla se depositó en placas de Petri, el agar se dejó solidificar a temperatura ambiente las placas se utilizaron inmediatamente o se almacenaron en bolsas plásticas selladas a una temperatura de 4 a 8°C para ser utilizadas dentro de los primeros 5 días de preparación. Para adecuar la densidad del inóculo se utilizó el patrón de turbidez de 0.5 de McFarland ajustando los cultivos bacterianos a 2×10^8 UFC/ml este se diluyó en una relación 1:10 en una solución salina y se obtuvo una concentración del inóculo de 10^7 UFC/ml, se utilizó un replicador que transfiere 36 inóculos en cada placa el cual deposita en cada inóculo 1µl en la superficie del agar. El inóculo final en el agar fue de 10^4 UFC/ml. Las placas inoculadas se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente las placas fueron invertidas e incubadas a 35 °C por 18 horas⁷². La cepa *E. coli* ATCC 25922 susceptible a CAZ y la *Kpn* ATCC 700603 productora de ESBL, se utilizaron como control en todos los ensayos.

III.6) CARACTERIZACION DE BETALACTAMASAS

E-TEST. La confirmación de la producción de ESBL se realizó por medio de la prueba E(E-test)⁴⁸, para ello se inoculó las placas de agar Mueller- Hinton con *K.pn* CAZ^R o *E. coli* transconjugantes ajustadas a una turbidez de 0.5 de McFarland dejando secar por 15 minutos posteriormente se colocó una tira que contenía concentraciones crecientes de CAZ en un extremo y en el otro un gradiente de CAZ con una concentración fija de clavulanato. Luego de 18 horas de incubación a 35°C se comparó las CIM (punto de intersección de la elipse de inhibición con el borde la tira), si la relación de CIM de CAZ/ CIM de CAZ-ácido clavulánico fue ≥ 8 indicó la presencia de enzima con actividad de ESBL. La cepa *E. coli* ATCC 25922 susceptible a CAZ y la *Kpn* ATCC 700603 productora de ESBL, se utilizaron como control en todos los ensayos.

ISOELECTROENFOQUE (IEF). La técnica de IEF se utilizó en la determinación del pI de las betalactamasas y para ello se obtuvo extractos crudos de los aislamientos clínicos por el método de sonicación⁷⁴. La determinación del punto isoeléctrico se realizó por el método de Matthew y col⁵⁴, usando un PhastSystem (Farmacia AB, Uppsala, Sweden) con minigeles de un pH de 3 a 9 (Phast gels Farmacia)⁷⁵. El pI de cada enzima se evidenció por la determinación colorimétrica del betalactámico Nitrocefin en el mismo gel de IEF⁴⁹. Las betalactamasas con pI conocido (5.4, 7.0, 7.6, 7.8, 8.2 y 9.0) fueron enfocadas en paralelo, adicionalmente se utilizó proteínas premarcadas de pI estándar (BIORAD) con intervalo de 4.5 a 9.6 como marcadores de pI. Una vez que se obtuvo el IEF (separación de proteínas por pI) se complementó con el bioensayo de hidrólisis de CAZ (prueba biológica) para determinar cual de las betalactamasas presentaba actividad de ESBL. Para ello el gel de IEF se impregnó con una mezcla de nitrocefin (500 µg/ml) en combinación con CAZ (8 µg/ml) en 0.1 M de buffer fosfato, pH 7.4. Cuando las bandas se hicieron evidentes el papel filtro se removió y el gel se incubó a 37°C por 30 minutos en una cámara húmeda para permitir la hidrólisis del antibiótico por la enzima. Posteriormente, el gel se cubrió con una mezcla de agar suave y 10⁶ UFC de bacterias/ml de una cepa sensible a CAZ (*E. coli* J53-2 cultivo en crecimiento logarítmico). Nuevamente se incubó en la cámara húmeda durante toda la noche a 37°C⁷⁶. El crecimiento de la bacteria sensible al antibiótico CAZ sobre el gel, indicó cual es el pI de la enzima con capacidad de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación.

III.7) HUELLA DIGITAL GENOMICA

ELECTROFORESIS POR CAMPOS PULSADOS (PFGE por las siglas en Inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis). Se determinó mediante la técnica de PFGE. Se cultivó la bacteria en 3 ml de caldo de Luria Bertani (LB), 18 a 24 horas a 37°C. El cultivo bacteriano se centrifugó y se obtuvo un botón de 2 a 3 mm, el cual se lavó con 0.5 ml de amortiguador de suspensión (100 mM Tris: 100 mM EDTA, pH 8.0). Se resuspendió en 0.5 ml de amortiguador, y se mantuvo a 37°C hasta adicionar el agar. Posteriormente, se agregó 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) a cada tubo mezclándose suavemente al cual se agregó 0.5 ml de agarosa al 1% precalentada a 55°C a cada tubo y se mezcló gentilmente con pipeta Pasteur. De esta mezcla se tomó 100 µl para cada uno de los bloques, se dejó gelificar a temperatura ambiente. En un tubo se mezcló 5 ml de amortiguador de lisis (50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8 y 1% Sarcosine) y 25 µl de proteinasa K. en el cual se puso el bloque e incubó a 54°C por 2 horas en agitación en baño María. Se retiró el amortiguador y se adicionó agua destilada estéril precalentada a 54°C por 10 minutos en agitación, posteriormente se desechó el agua se repitió la etapa de lavado con 10 ml de TE (10

mM Tris: 1mM EDTA, pH 8) estéril precalentado a 54°C, en suave agitación en baño María a 54°C. Se removió el TE y se repitió 2 veces la etapa de lavado con TE. Se cortó el bloque a la mitad, colocándose en tubo eppendorf con 200 µl de amortiguador de restricción, incubándose por 15 minutos a 37°C. Luego se removió el amortiguador de restricción y adicionó 200µl de amortiguador fresco y 50 U de enzima de restricción, se incubó 2 horas a 37°C. Los bloques se colocaron dentro del gel de agarosa al 0.8 % en amortiguador TBE (0.089 M Tris, 0.089 borato, 2.5 mM EDTA) para la realización de la electroforesis de campos pulsados en un CHEF-DRII System (Bio-Rad) con pulsos de 5 a 60 segundos por 15 a 17 horas a 200 V, luego se tiñó el gel por 10 minutos con 1µl/ml de bromuro de etidio y se decoloró con agua destilada por 30 minutos²². Se analizaron las imágenes por Gel Doc basados en los patrones de diferencias de las bandas obtenidas en electroforesis de campos pulsados siguiendo las recomendaciones de Tenover y col⁶².

III.8) CARACTERIZACION DE MATERIAL PLASMIDICO

Obtención y análisis de material plasmídico de cepas representativas de las clonas de *K. pn CAZ^R*. De un crecimiento bacteriano en caldo LB suplementado con CAZ 10 µg/ml de cuando menos 12 horas de incubación se tomó 1.5 ml se centrifugó a 12,000 rpm por 2-3 minutos. El botón bacteriano fue resuspendido en 100 µl de buffer de lisis (50mM glucosa, 25mM Tris Cl [pH 8.0] y 10mM EDTA [pH 8.0]Tris [pH 8.0]). Luego se adicionó 200µl de solución de lizosima (10 mg/ml en 10mM Tris Cl [pH 8.0]) y 150µl de acetato de sodio (3.0 M Na acetato [pH 4.8]) se dejó en hielo 30 minutos posteriormente se centrifugó 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se diluyó en igual volumen de phenol/cloroformo, nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm, se tomó la fase acuosa y se agregó dos volúmenes de cloroformo y se centrifugó. Se tomó la fase acuosa a la cual se añadió dos volúmenes de etanol al 95% y se incubó a menos 70°C por 15-30 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos a 4°C y se lavó una vez con 1ml de etanol al 70% a temperatura ambiente y posterior al secado se resuspendió en 50µl de TE más RNAsa y se almacenó a menos 20°C hasta su utilización. El material obtenido se evaluó en presencia y ausencia de las endonucleasas para verificar tamaño total y número de los plásmidos y el polimorfismo de los fragmentos por restricción enzimática *EcoR I*, *Hind III* (Boehringer Manhein o New England Biolab) mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Se utilizaron marcadores estándar de un rango de peso molecular de 2-23 y 8-48 Kb (Boehringer Manhein o New England Biolab). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y se analizaron la

imagen por sistema computarizada "Gel Doc". Si presentaban un patrón igual de fragmentos se tomó como un mismo plásmido, en caso contrario como diferente plásmido.

Transferencia de la resistencia a CAZ mediante conjugación de material plasmídico. Se efectuó apareamientos mezclando cantidades iguales (1ml) de cultivo en medio líquido en fase de crecimiento logarítmico (3 horas), de *K.pn* productora de ESBL con *E. coli* J53-2 originalmente sensible a CTX, CAZ, AMK y resistente a rifampicina. La mezcla se colocó en la superficie de agar de LB sin antibióticos cuando menos por 6 horas. Posteriormente, se cosechó la mezcla y se diluyó en un ml de LB sin antibióticos y se plaqueó en diluciones seriadas (100µl directos y 1:10, 1:100, 1:1000) en medio de agar de Tergitol con la mezcla de antibióticos de 30µg/ml de CAZ y 25µg/ml de rifampicina, con el fin de seleccionar las transconjugantes de *E. coli* J53-2 que adquirieron el plásmido asociado con la producción CAZ^R, se recuperó cuando menos 20 colonias que por morfología eran pequeñas y no mucoides con bordes estrellados. Se utilizó el sistema API para confirmar si el crecimiento bacteriano correspondía a *E. coli* J53-2 transconjugantes que adquirieron la multiresistencia ⁷⁷. La producción de ESBL de las transconjugantes se determinó mediante la prueba de E-test (AB Biodisk). A si mismo se analizó la susceptibilidad antimicrobiana de la tranconjugante comparada con la cepa donadora. El tipo de plásmido adquirido por la transconjugante se analizó por la misma técnica descrita previamente.

IV. DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

Los aislamientos de *K.pn* identificados como causantes de IN por el Servicio de Epidemiología o Infectología de cada hospital participante basados en las normas de la RHOVE se enviaron al laboratorio de Infectología, Microbiología e Inmunología Clínica del Departamento de Medicina Experimental de la UNAM, donde se realizó una nueva identificación por el sistema comercial API y sensibilidad por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer y determinación de CIM. Las cepas con resistencia a CAZ se les determinó la producción de ESBL por E-test. Posteriormente, se realizó el análisis genómico por electroforesis de campos pulsados para ver si pertenecen a una misma clona las bacterias agrupadas por centro hospitalario, sala, mes y perfil de susceptibilidad antimicrobiano de las cepas aisladas. Se realizó una comparación de las clonas obtenidas con el fin de determinar diseminación o variabilidad clonal. En todas las cepas se evaluó si contenían perfil plasmídico nativos semejantes por clona o entre clonas. De cuando menos cinco de las cinco clonas *K.pn* CAZ^R mas prevalentes por hospital, se realizaron pruebas de

conjugación con *E. coli* J53-2 receptora para determinar la capacidad de transferencia de resistencia a CAZ a través de plásmidos. Adicionalmente, se realizó la determinación de producción de ESBL mediante prueba de E test tanto a las cepas donadoras como transconjugantes obtenidas que presentaron una sensibilidad intermedia o resistencia a CAZ, y posterior tipificación con pl complementado con la prueba biológica que ayuda en la determinación de actividad de ESBL. Ver gráfico adjunto.

Infección Nosocomial



Caracterización de género y especie de *K.pn*

Determinación de patrón de susceptibilidad



Determinación de la producción de ESBL por E-test



Determinación de huella digital genómica cromosomal por PFGE.

→↓← Determinación de pl ESBL y Prueba Biológica

↓← Análisis de los plásmidos



Determinación de la capacidad de transmitir por conjugación la resistencia a CTX, CAZ de cuando menos 5 clonas del tipo más representativo de ESBL.

ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó cálculo de medidas de resumen. Los datos se presentan mediante estadística descriptiva utilizando gráficas de barras para mostrar la frecuencia de las betalactamasas de amplio espectro y las clonas por centro y área hospitalaria.

ASPECTOS ETICOS

La realización del estudio no significó ningún riesgo para los pacientes, ya que no se realizaron procedimientos adicionales o diferentes a los recomendados en el estudio de las IN, los datos recolectados solo se utilizaron con el propósito exclusivo del trabajo de investigación y posterior publicación del mismo.

VI. RESULTADOS

VI.1) Hospital General de Durango (HGD)

Se analizaron 41 aislamientos de *K.pn* provenientes de igual número de pacientes, identificadas como causantes de bacteremias e infecciones urinarias diagnosticadas por el Servicio de Infectología o Epidemiología, durante el periodo de abril a octubre 2000. Los hemocultivos y urocultivos representan el 85% de la fuente de aislamientos nosocomiales de *Kpn* en este hospital. De estos, 36 aislamientos (88%) correspondieron a IN y 5 aislamientos (12%) a infecciones comunitarias. La mediana mensual de IN fue 5. No se identificó ningún brote durante los 7 meses del estudio. De acuerdo a la sala donde se identificaron las infecciones, la mayor frecuencia se encontró en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) con un 41,5% (17/41), Unidad de Cuidados Intensivos Pedriátrica (UTIP) 9.8% (4/41), Pedriatria General 7,2% (3/41) y la Unidad de Transición 4.9% (2/41). En el caso de las salas que atienden pacientes adultos, en Medicina Interna se encontró 22% (9/41) y un 2.4% (1/41) en la Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIA). Las infecciones comunitarias (IC) atendidas por Consulta Externa constituyeron el 12.2% (5/41) (**Tabla 1**).

En el caso de las IN (**Figura 1**) los aislamientos fueron recuperados de hemocultivos 61% (22/36) y urocultivos 39 % (14/36). Los 5 aislamientos de IC fueron de urocultivos. El perfil de susceptibilidad antimicrobiano que determinó en el laboratorio de investigación de la UME de las cepas de IN por el método de Kirby Bauer, reveló que todos los aislamientos son resistentes a AMP. La resistencia a AMK fue del 69% (25/36), intermedia 5% (2/36) y sensible 25% (9/36). Para CTX, la resistencia fue de 61% (22/36), intermedia de 8% (3/36) y sensible 31% (11/36). Para CAZ la resistencia fue del 72% (26/36) y sensible en un 28% (10 /36), la resistencia a AZT fue 70% (27/36) y 30% de resistentes y no se encontró resistencia a IMP/CIL y a CIP. (**Tabla 2**). Al determinar CIM por el por el método de dilución para CAZ, se detectó que la MIC₉₀ para este antibiótico fue de más de 128µg/ml. Los 5 aislamientos obtenidos de IC fueron todos resistentes a AMP pero sensibles a aminoglicósidos CAZ, CTX y a IMP/CIL.

De las 41 cepas analizadas por PFGE, se obtuvieron 16 clonas diferentes las cuales se muestran en la **Figura 2**, las cuales recibieron nomenclatura en orden alfabético. Se encontró un predominio de las clonas E y B. La clona E produjo el 39 % (14/36) y la clona B el 14% (5/36) de las IN (**Tabla 3**).

De los 41 aislamientos, 26 cepas de *K.pn* fueron CAZ^R y estas se agruparon en 6 clonas diferentes: la clona E en 14 cepas. La clona B se identificó en 8 cepas, as clonas L y D con dos cepas cada una y con una cepa cada una las clonas F y G. La clona B fue la única clona que se identificó como susceptible y resistente a CAZ. (**Tabla 3**). De la comunidad se analizaron 5 cepas de *K.pn* en las cuales se encontró diversidad clonal (clonas K, I, M, J y N). La clona M se identificó como CAZ susceptible tanto en la comunidad como en el hospital. La clona E fue la única que se aisló en todos los meses que duró el estudio y siempre con el fenotipo CAZ^R (**Figura 3**). Se observó predominio de las clonas CAZ^R (B y E) en los servicios de Pediatría a diferencia de los servicios de Medicina Interna donde existe mayor variabilidad clonal y las cepas son principalmente susceptibles a CAZ (**Figura 4**). Las cepas aisladas de la comunidad y de las salas de adultos tienden a ser sensibles a diferencia de los aislamientos de cepas nosocomiales particularmente las de las áreas pediátricas.

Con respecto al perfil de plásmidos todas las cepas identificadas como parte de la misma clona exhiben el mismo perfil y número de plásmidos nativos (datos no presentados). Las 6 clonas de *K.pn* CAZ^R tienen diferente perfil de plásmidos nativos de 1-3 (**Figura 5A**).

El fenotipo de multirresistencia incluyendo CAZ^R fue transferido por un plásmido de 50-60 Kb que se conjugo de las clonas de *K.pn* CAZ^R a una *E. coli* previamente susceptible a CAZ (**Figura 5B**). El plásmido transconjugante de las clonas B, F y G son idénticos por análisis de restricción por endonucleasas *Pst*-I (**Figura 5C**), y *Eco*R1 (datos no presentados) y los plásmidos transconjugantes de las clonas L y D también son idénticos entre sí (**Figura 5C**) y el de la clona E es diferente a los anteriores(**Figura 5C**). Esté plásmido fue determinado mediante la selección de la resistencia a CAZ y CTX pero se pudo determinar que co-transfiere la resistencia a AMIK, GENT, y AMP.

El análisis de la producción de betalactamasas por isoelectro enfoque mostró que todas las cepas producen betalactamasas con pI de 5.4 y 9.0 algunas veces asociadas a 7.0, 7.5 y 8.2. Sin embargo, la prueba biológica de hidrólisis d CAZ demostró que la actividad ESBL se encuentra en la betalactamasas de pI 8.2 y 9.0 (**Tabla 4 y Figura 6 A-C**). De esta forma la principal betalactamasa con actividad de ESBL en las *K.pn* de este hospital corresponde a una de pI 9.0 (**Figura 6D**).

VI.2) Hospital Civil de Guadalajara (HCG)

Del HCG se analizaron 50 aislamientos *K.pn* provenientes de 48 pacientes identificadas como causantes de IN, durante el periodo de septiembre de 1999 a diciembre del 2000. En uno de ellos se aisló una cepa diferente a la que se había identificado una semana antes, y en otro paciente se logró aislar la misma clona de tres sitios diferente (hemocultivo, líquido cefalorraquídeo y en coprocultivo). El promedio mensual de eventos en 1999 fue de 2 y en el año 2000 la mediana de eventos fue de 4. Se identificaron dos pequeños brotes en el año 2000 durante los 16 meses del estudio, los cuales se presentaron en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales: Unidad de Recién Nacidos (mes de agosto) con cinco casos y en septiembre en la sala de UCINEX con otros cinco casos. Es importante mencionar que en el HCG existen tres unidades de cuidados intensivos neonatales: UCIN y la Unidad de Recién Nacidos reciben pacientes nacidos en el HCG y la UCINEX recién nacidos referidos de otro hospital. En este hospital no se recolectaron muestras de IC.

La distribución de los eventos por sala donde se identificó la IN mostró que la mayor frecuencia de aislamientos de *K.pn* se presentó en las salas de Cuidados Intensivos Neonatales que en conjunto representaron 66%: UCINEX con el 34% (17/50), Unidad de Recién Nacidos el 24% (12/50) y UCIN el 8% (4/50). Cirugía Pediátrica tuvo el 10% (5/50), Infectología de Adultos 6% (3/50), cada una de las salas de Urgencias de Pediatría, Ortopedia y Neurocirugía con 4% (2/50), además, se encontró un aislamiento que representó el 2% (1/50) en las salas de Nefrología, Cardiología y Oncología.

La principal fuente de aislamientos la constituyeron los hemocultivos con 60% (30/50), los urocultivos 8% (4/50) y las punciones lumbares 6% (3/50) (**Figura 7 y Tabla 5**). El resultado del perfil de susceptibilidad antimicrobiano (realizado en la UME) de estas cepas por el método de Kirby Bauer mostró que todas las cepas son resistentes a AMP y sensibles a IMP/CIL y ciprofloxacina. La resistencia a AMK fue del 60% (30/50), intermedia en el 28% (14/50) y sensible en un 12% (6/50). Para CTX la resistencia fue del 42% (21/50), intermedia 50% (25/50) y un 8% (4/50) sensibles. Para CAZ la resistencia fue del 90% (45/50), intermedia 4% (2/50) y sensible 6% (3/50) (**Tabla 6**). En la determinación de CIM se demostró que el CIM₉₀ para CAZ fue de más de 128 g/L y la resistencia a CTX se incrementó al 90% a expensas de las que nos habían dado valores intermedios en el método de difusión en agar y solo un 2% de las cepas se corroboraron con valores de susceptibilidad intermedia.

Del total de 50 cepas analizadas por electroforesis de campos pulsados se obtuvieron 21 clonas (**Tabla 7 y Figura 8**) las cuales recibieron nomenclatura en orden alfabético. Se demostró un predominio durante la epidemia de las clonas A, F y Q. La clona A produjo el 14% (7/50), la clona F el 24% (12/50) y la clona Q el 20% (10/50). Las 45 cepas *K.pn* CAZ^R se agruparon en 16 clonas diferentes: con predominio de las mismas A, F y Q. Ninguna de las cepas aisladas presentó simultáneamente un fenotipo sensible y resistente para CAZ. Se encontraron 5 cepas sensibles que correspondieron a 5 clonas diferentes que se denominaron: B, D, E, J y P (**Tabla 7**). Las clonas predominantes A, F, y Q únicamente se encontraron en áreas de pediatría, principalmente en salas de Cuidados Intensivos Neonatales: UCIN, Unidad de Recién Nacidos (RN) y la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales de pacientes nacidos fuera del Hospital (UCINEX). La clona Q se encontró en una ocasión en el servicio de oncología, fuera del área exclusivamente pediátrica, sin embargo se trataba de un paciente pediátrico ingresado en esa área. No se encontró evidencia de transmisión cruzada de clonas entre los servicios de pediatría y las salas de adultos (**Figura 9**). La clona F se introduce en el Hospital a partir del año 2000 y la clona A se encontró en forma intermitente desde el año 1999 (**Figura 10**).

Con respecto al análisis de plásmidos, todas las cepas pertenecientes a la misma clona presentaron el mismo perfil (datos no presentados) y se analizó una clona representativa de cada una de las 16 clonas de *K.pn* CAZ^R. Estas clonas presentaron un patrón plasmídico variable de uno a 7 plásmidos compartiendo todas un plásmido de ~ 50 a 60 Kb (**Figura 11A**). La transferencia de resistencia a CAZ en todas las clonas fue a través de este plásmido de ~50 a 60 Kb (**Figura 11B**). Se han podido analizar 14 de las 16 clonas en cuanto a perfil de restricción por endonucleasas de los plásmidos transconjugantes y las clonas K y O han demostrado degradación continua de DNA cada vez que se someten a restricción. De las 14 clonas analizadas hemos encontrado: 1) Las clonas A, F, G, M, N, Ñ, Q y V comparten un plásmido idéntico. 2) Las clonas H, I, y R comparten otro plásmido idéntico. 3) Las clonas L y C tienen un plásmido diferente entre sí y a las otros dos perfiles descritos (**Figura 11C**). El análisis de la producción de betalactamasas por isoelectroenfoque mostró que todas las cepas producen betalactamasas con pI de 8.2, la mayoría asociadas a betalactamasas de pI de 5.4 y en ocasiones 7.6 Sin embargo, la prueba biológica de hidrólisis de CAZ demostró que la actividad ESBL se encuentra en la betalactamasa con un pI de 8.2 (**Figura 12 y Tabla 8**).

HP-CMN Siglo XXI-IMSS

Durante el periodo de octubre 2000 a mayo del 2001 se obtuvieron 80 aislamientos de *K.pn* provenientes de 78 pacientes. Un paciente presentó durante su hospitalización dos IN. Otro paciente presentó dos infecciones, una durante su hospitalización (IN) y la otra se catalogó como IC. De estos aislamientos 59 (74%) correspondieron a IN y 21 (26%) a IC. La mediana mensual de IN fue 8. Para las IC se encontró una mediana mensual de 3. No se identificaron brotes durante los 8 meses del estudio.

El 32% (19/59) de las IN se encontraron en la UCIN, siendo esta el área donde se identificó la mayor frecuencia de aislamientos, seguido por las áreas de Lactantes 20% (12/59), Preescolares 19% (11/59), un 15% (9/59) en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátrica (UTIP) y en la Unidad de Transplantes Renales un 5% (3/59). De las IC, 21 cepas se aislaron de pacientes con infección urinaria de repetición, la gran mayoría asociado a malformaciones congénitas de vías urinarias y todos se encontraban recibiendo trimetoprin sulfá o macrodantina.

La principal fuente de aislamientos de las IN fueron los hemocultivos con un 39% (23/59), seguido por los urocultivos 29% (17/59), líquido cefalorraquídeo 10% (6/59), las punciones aspiraciones 8% (5/59), lavado bronquial 3% (2/59), líquido peritoneal y líquido pleural cada uno constituyó el 5% (3/59). Con respecto a la fuente de aislamiento de IC el 90% (19/21) fueron de urocultivos y un 10% (2/21) de hemocultivos (Tabla 9 y Figura 13). El resultados del perfil susceptibilidad antimicrobiano de estas cepas por el método de Kirby Bauer (tabla 10 y 11) demuestra la diferencia importante de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos entre las cepas comunitarias y las cepas nosocomiales ya que el 76% de las cepas de IN son CAZ^R y el 69 % AMIK^R, mientras que solo el 19% de las cepas de la comunidad fueron CAZ^R y 24% AMIK^R. En el caso de las cepas de IN se encontró que la determinación de CIM de CTX para estas cepas demostró que del 24% que se reportaron con valor intermedio, el 20% eran resistentes en realidad y correspondían exactamente al 76% reportado previamente por el método de Kirby Bauer. La CIM₉₀ de CAZ de las cepas resistentes fue de > de 128 g/L. En el caso de las cepas comunitarias también se demostró una ligera discrepancia entre el Kirby Bauer y la determinación de CIM para CTX y encontramos que El CIM de CTX para estas cepas demostró que de las 5 cepas (24%) que se reportaron con valor intermedio cuatro de ellas eran resistentes en realidad y correspondían exactamente a las mismas CAZ^R y una volvió a dar valor intermedio, reportado previamente por Kirby bauer. El CIM₉₀ de CAZ de las cepas resistentes fue de > de 128 g/L.

De las 4 cepas que fueron aisladas de pacientes de consulta externa con el fenotipo CAZ^R dos de ellas se aislaron de pacientes que recibieron cefalosporinas de tercera generación en los tres meses anteriores, los otros dos aislamientos no tenían el antecedente de haber estado hospitalizados o de haber recibido cefalosporinas en los 6 meses previos.

Debido a la gran diversidad clonal que se encontró durante el periodo de estudio, la nomenclatura que se utilizó fue numérica y no alfabética y debido a la gran diversidad clonal que se encontró durante el periodo de estudio, la nomenclatura que se utilizó fue numérica y no alfabética. De las 80 cepas analizadas, por electroforesis de campos pulsados se obtuvieron 38 clonas (**figura 14**). Por lo tanto en esta Institución, se encontró diversidad clonal siendo discretamente predominantes las clonas: 6, 7, 10, 12, 19 y 23. La clona 6 produjo el 3.8% (3/80), la clona 7 el 11.3% (9/80), la clona 10 y 19 cada una con un 6.3% (5/80) y la clona 23 con 5% (4/80) (**Tabla 12**). Es decir la clona 7 que fue la que más se encontró solo provocó 9 casos en todo el periodo de estudio

De las 49 cepas *K.pn* CAZ^R, se identificaron 22 clonas diferentes. Algunas de las cepas aisladas presentaron un fenotipo sensible y resistente para CAZ. Las principales salas afectadas por las IN fueron UCIN y lactantes. Se observó transmisión cruzada de clonas entre las diferentes salas hospitalarias. Algunas de las clonas encontradas en hospitalización también se aislaron en consulta externa (**Figura 15**). Ninguna de las cepas se encontró como endémica durante todo el periodo de estudio. Las clonas 6, 7, 10, 19 y 23 se encontraron en forma intermitente durante el periodo de estudio (**Figura 16**).

De las 8 clonas más frecuentes (la 2,6,7,10,12,19,23,26) de *K.pn* CAZ^R se analizó el perfil de plásmidos nativos, los cuales son variable de 1-5 (**Figura 17 A**), compartiendo el de 50 a 60 Kb el cual fue el que transmitió la multiresistencia incluyendo la CAZ^R (**Figura 17B**). En cuatro, la 2,7,12 y 19, de estas clonas, se encontró un plásmido idéntico, la 23 y la 6 comparten otro plásmido idéntico y las clonas 10 y 26 continene un plásmido diferente entre sí y de los otros dos perfiles identificados (**Figuras 17C-E**).

El análisis de la producción de betalactamasas por isoelectro enfoque mostró que todas las cepas producen betalactamasas con pI de 8.2, la mayoría asociadas a betalactamasas de pI de 5.4 y 7.6 (**Tabla 12 y Figura 18A y B**). La prueba biológica demostró que la actividad ESBL se encuentra en la betalactamasas con un pI de 8.2. (**Tabla 13 y Figura 18 C**).

Al comparar cinco de las clonas mas frecuentes de cada uno de los tres centros hospitalarios por huella digital genómica con PFGE no se encontró evidencia de transmisión cruzada entre estos (Figura 19).

VII. DISCUSION

A pesar de un incremento en las IN por las bacterias Gram positivas en los últimos años, las bacterias Gram negativas continúan causando gran parte de las IN en México y dentro de estas la *K.pn* ocupa un lugar preponderante²⁴. Uno de los grandes retos que enfrentan los clínicos en el tratamiento específico de estas infecciones es la resistencia bacteriana, la cual cada vez se describe con mayor frecuencia sin ser exclusivos de las IN, dado que también se presenta en la comunidad. Sin embargo, el problema es más acentuado en las IN^{29,30,31}. Dentro de nuestro estudio las *K.pn* fueron principalmente causantes de bacteremias e infecciones urinarias nosocomiales con predominio en áreas pediátricas particularmente en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales. Este estudio no está diseñado para analizar factores de riesgo sin embargo la severidad de la enfermedad, monitoreo invasivo, soporte vital, edades extremas y uso de antibióticos de amplio espectro entre otros pudieran explicar dicho hallazgo como ha sido sugerido por otros estudios^{29, 30, 31}.

Uno de los grupos de antibióticos más usados en el tratamiento de las IN son los betalactámicos sin embargo el incremento en la prevalencia de las cepas productoras de ESBL y los brotes de organismos multirresistentes que han sido reportados en el mundo y también en México plantea la necesidad de aportar mayores datos a los pocos que existen^{21,25,44}.

Se encontró una alta prevalencia de *K.pn* nosocomiales resistentes a CAZ en los tres centros hospitalarios: 72% en el HGD, 76% HP-CMN Siglo XXI-IMSS y 90% en el HCG, unido en un 69% a la resistencia a AMK en los primeros dos centros y en un 60% en el HCG, estos hallazgos son superiores a los datos de la Red Nacional de Resistencia Mexicana del año 1999 (comunicación personal), donde la resistencia a CAZ fue 27.8% y del 27% a AMK. Nuestros datos también superan la prevalencia de resistencia de *K.pn* reportada por el programa de vigilancia antimicrobiana SENTRY que encontró una resistencia a CAZ del 45% en América Latina, 23% en Europa, 8% en los Estados Unidos y 5% en Canadá, en corresponsión con AMK en el 60%⁷⁸. Probablemente esta disparidad pueda deberse a que nuestro estudio se realizó en cepas particularmente nosocomiales. En Hospitales de Tercer nivel, la mayoría de los aislamientos son de pacientes de las Unidades de Terapias Intensivas Neonatales y los datos de la Red Nacional de Resistencia Mexicana y del programa SENTRY son el global de IN y comunitarias. Sin embargo, estos datos sugieren la necesidad de reforzar los programas de uso de antibióticos debido a que la presión de selección por el empleo de cefalosporinas de tercera generación se ha descrito como uno de los más importantes factores en la aparición y mantenimiento de estas

cepas multirresistentes^{79,80}, siendo posible que el uso de estas cefalosporinas sea más frecuente en América Latina y particularmente en los tres hospitales de segundo y tercer nivel como los de nuestro estudio. Otros datos que apoyan la hipótesis de presión de selección en nuestro estudio son que las clonas identificadas tienen un alto grado de resistencia a CAZ (MIC₉₀ > de 128 g/L), y la presencia de un mismo plásmido predominante en diferentes clonas que acarrea el fenotipo CAZ y AMK resistente y producción de una ESBL de igual pl por centro hospitalario^{81,82,83}.

La utilización de técnicas moleculares de genotipificación por PFGE nos proporciona evidencia que sugiere fuertemente transmisión cruzada de estas clonas predominantes, fundamentalmente en las áreas de Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales en dos de los hospitales analizados, durante el periodo de estudio. Se descarta la posibilidad de una epidemia prolongada ya que los datos de la vigilancia epidemiológica llevada a cabo en cada centro no reportan brotes a excepción de dos pequeños que se presentaron en el HCG. Este evento de predominio de diseminación clonal fue mayor en el HGD donde las clonas E y B representaron en conjunto el 54% de las IN y en el HCG las clonas F y Q el 44%. De tal forma que en estos Hospitales General estudiados las IN causadas por *K pn* por transmisión cruzada son significativamente más altas que el Latiratura Internacional⁶⁴. Estos datos contrastan con el HP-CMN Siglo XXI-IMSS donde se encontró gran diversidad clonal que sugiere que las infecciones nosocomiales son endógenas, semejante a los hallazgos de países desarrollados, donde la transmisión cruzada es menor del 20%^{64,65}. Lo anterior nos demuestra que la alta frecuencia de aislamiento de *K.pn* CAZ^R causando IN tanto en Hospitales muy especializados como HP-CMN Siglo XXI-IMSS o en Hospitales Generales de provincia es un problema grave particularmente de áreas Pediátricas probablemente asociado al extenso uso de cefalosporinas de tercera generación de forma generalizada en todo nuestro país. Sin embargo en la Institución de tercer nivel tiene una explicación diferente de lo que ha ocurrido en los Hospitales Generales de segundo nivel estudiados, donde parece asociarse otro factor como la colonización temprana en el hospital o dado que se trata de un hospital de tercer nivel de referencia es posible que se trate de pacientes transferidos de otro hospital colonizados con estas bacterias CAZ^R. A pesar que en nuestro trabajo no se realizó una investigación de las causas de este evento pudieran estar implicados factores como, el reservorio gastrointestinal de los pacientes infectados o colonizados, el sobre cupo de los servicios, el intercambio de personal o de pacientes entre las diferentes salas, la poca atención que se presta a las medidas precaución de contacto universales como se ha propuesto por otros investigadores^{67,84,85}.

De los tres hospitales estudiados, solo en el HGD se encontró la clona E durante todo el periodo de estudio. Algunas clonas se encontraron en forma intermitente pero frecuente durante el periodo de estudio como: la clona B en el HGD, la clona A en el HCG y las clonas 6, 7 y 10 en el HP-CMN Siglo XXI. La permanencia de una clona que aparece en diferentes periodos de tiempo ha sido reportada por otros autores. Las posibles explicaciones a este evento pueden estar dadas por el reservorio gastrointestinal de pacientes que permanecen hospitalizados por largos periodos de tiempo, pacientes con enfermedades crónicas que reingresan frecuentemente o al traslado de pacientes de otras unidades de atención médica donde esta clona es endémica^{67,86}.

Durante el periodo de estudio únicamente se presentaron brotes en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales del HCG: Unidad de Recién Nacidos (mes de agosto) y en septiembre en la sala de UCINEX, cada una por una clona diferente pero compartían el mismo plásmido de multirresistencia. Entre los factores que parecen haber facilitado estos brotes están: la gran presión de selección antibiótica sugerida por una alta prevalencia del fenotipo CAZ^R, la presencia de un mismo plásmido en diferentes clonas y la poca adherencia a los programas de control de infecciones evidenciado por la diseminación de una sola clona durante los brotes.

Se encontró un comportamiento diferente dentro de las salas del mismo hospital, la transmisión cruzada fue más evidente en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales adicionalmente no se encontró evidencia de transmisión cruzada entre las salas de pediatría y de adultos. Sugiriendo que cada una de las áreas hospitalarias necesita medidas de control específicas y las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales requieren reforzar las medidas de precauciones universales.

Con respecto al tipo de ESBL, en el HCG y HP-CMN Siglo XXI-IMSS únicamente se encontró ESBL con pl de 8.2 que sugiere pertenecer a la familia SHV, acorde con los datos de J. Silva donde la mayor frecuencia de ESBL en México son de tipo SHV⁴⁴. Contrastando con dichos hallazgo, en el HGD se encontró el predominio de una ESBL con pl 9.0 la cual puede corresponder a TLA-I, descrita por J. Silva en cepas de *E. coli* y que hasta el momento solo ha sido descrita en México⁴⁵ no tenemos una explicación para dicho hallazgo.

Con respecto a las cepas de IC analizadas del HP-CMN Siglo XXI-IMSS, se observó un claro predominio de cepas sensibles sobre las resistentes. Algunas clonas de IC se identificaron también como de IN (clonas 12 y 15) pero los aislamientos nosocomiales correspondieron a cepas resistentes y los de la comunidad a cepas sensibles, estos datos apoyan que la presión de selección antibiótica particularmente en los hospitales son factores importantes para el

mantenimiento y establecimiento de clonas resistentes y además sugiere que la comunidad y el hospital no son sitios cerrados, sino que intercambian clonas como ha sido reportado por otros autores⁶⁷. Sin embargo el tipo de pacientes de los cuales se recolectaron las *K.pn* causando IC fueron muy particulares ya que son pacientes con problemas de Infecciones Urinarias de repetición, la gran mayoría asociados a malformaciones congénitas de vías urinarias los cuales han recibido varios esquemas antimicrobianos así como varios ingresos hospitalarios previos. De tal forma que estos antecedentes pudieran estar sobrevaluando el problema de *K.pn* CAZ^R causantes de IC en esta Institución.

El análisis de plásmidos de la mayoría de las clonas en los tres hospitales claramente demuestra la diseminación horizontal de un plásmido como un elemento predominante en la diseminación del fenotipo CAZ^R, que en conjunto con los factores de posible colonización bacteriana y transmisión cruzada explica la alta frecuencia de *K.pn* resistente en estos hospitales. Es posible que este mismo plásmido puede estar diseminando el fenotipo CAZ^R en otros Gram negativos como *E. coli* o *Enterobacter spp*, característica que puede estar mantenida y estabilizada por la presión de selección antibiótica por lo tanto la necesidad de reforzar los programas de uso racional de antibióticos.

A pesar de las limitaciones de nuestro estudio se ejemplifica la utilidad de tecnología molecular en el estudio de las IN para definir la diseminación de los microorganismos y sus genes de resistencia a través del hospital y la comunidad dando un fuerte soporte para establecer mejores programas de control prioritarios por área hospitalaria y por hospital. Particularmente nos demuestra la conjunción de diversos factores genéticos de la propia bacteria para acarrear y diseminar plásmidos que contienen información de multiresistencia entre las diversas clonas que unido al problema de a el problema epidemiológico de transmisión cruzada ha permitido la diseminación tan dramática del fenotipo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación y a otros antibióticos en una bacteria de gran importancia como agente causal de IN. Es evidente que en todos los centros analizados existe una alta prevalencia de producción de ESBL por estas *K.pn* (fundamentalmente con un pl de 8.2 que sugiere una SHV). La presión de selección antibiótica al igual que la transmisión cruzada parecen ser importantes en diseminación y mantenimiento de las clonas de *K.pn* multiresistentes y plásmidos de multiresistencia siendo las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales las principalmente áreas afectadas por las IN.

CONCLUSIONES

1. Se encontró una alta frecuencia de aislamientos de *Kpn* CAZ^R causando IN en las tres Instituciones estudiadas. Esta resistencia se con-transmite con resistencia a Aminoglucósidos como GENT y AMIK.
2. Las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales fueron las principales áreas afectadas por las IN causadas por *Kpn* CAZ^R.
3. Los hemocultivos se constituyeron en la principal fuente de aislamiento.
4. La producción de ESBL por cepas de *K.pn* causantes de IN fué el principal mecanismo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación detectado en estos tres centros hospitalarios.
5. La endemicidad por bacterias productoras de ESBL es diferente en cada hospital y en cada una de las áreas que lo constituyen.
6. El problema de diseminación clonal probablemente por transmisión cruzada de IN por *Kpn* CAZ^R fue característico de dos de los Hospitales Generales Regionales pero no fue el caso del Hospital pediátrico de tercer nivel (HP-CMN Siglo XXI) donde no predominó diversidad clonal sugiriendo infección endógena.
7. La ESBL más frecuente presenta un pl 8.2 que sugiere pertenecer a la familia SHV.
8. El gen de estas ESBL se acarrea en un plásmido en donde también se co-transmite resistencia a otros antibióticos (plásmido de multirresistencia).
9. La diseminación horizontal de estos plásmidos y la transmisión clonal cruzada parecen ser importantes en el surgimiento y mantenimiento de las clonas de *K.pn* multirresistentes y plásmidos de multirresistencia en los Hospitales Generales Regionales.
10. La diseminación horizontal de estos plásmidos en diferentes clonas de *K pn* así como las infecciones cruzadas y endógenas se sugiere como los mecanismos más importantes para la frecuencia de aislamiento de *Kpn* CAZ^R en las Instituciones estudiadas.
11. No se encontró evidencia de transmisión cruzada de clonas entre los tres hospitales analizados.

Tabla 1 y Figura 1

En el Hospital General de Durango predominaron los hemocultivos como la principal fuente de aislamientos de *K.pn* causantes de IN y las salas de Cuidados Intensivos Neonatales fueron las áreas más afectadas

SALAS	Frecuencia	%	% acumulado
UCIN	17	41.5	41.5
TRANS	2	4.9	46.3
M.INT	9	22.0	68.3
UTIP	4	9.8	78.0
PED	3	7.3	85.4
UCIA	1	2.4	87.8
C.EXT	5	12.2	100.0
Total	41	100.0	

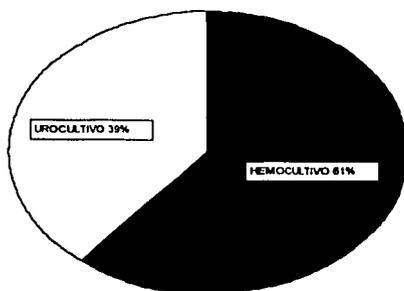


Tabla 1 y Figura 1. área hospitalaria y fuente de aislamiento de las *K. pn* aisladas en el HGD. En la tabla 3 se presenta las áreas hospitalarias del HGD donde se identificaron las IN durante el periodo de abril a octubre 2000. En la figura 1 se presenta la frecuencia de las dos fuentes de aislamientos de las IN investigadas en el HCG durante el periodo de estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 2

La resistencia a CAZ se presenta en el 72% de las *K.pn* que producen IN en el HGD y se asocia a coresistencia con AMK

	RESISTENTE % (número eventos)	INTERMEDIO % (número de eventos)	SENSIBLE % (número de eventos)
Ampicilina	100% (36/36)	0	0
Amikacina	69% (25/36)	5% (2/36)	25% (9/36)
Cefotaxima	61% (22/36)	8% (3/36)	31% (11/36)
Ceftazidima*	72% (26/36)	0	28% (10/36)
Imipenem	0%	0	100% (36/36)
Ciprofloxacina	0%	0%	100% (36/36)
Aztreonam	70% (28/36)	0%	30% (8/36)

- La CIM de CAZ en todas las cepas resistentes por Kitby Bauer fue de > 128 mg/L

Tabla 2. Patrón de susceptibilidad antimicrobiano de las cepas de *K pn* aisladas en el HGD.

Tabla 3 y Figura 2

Se encontró diversidad clonal entre todos los aislamientos de *K.pn* con evidente predominio de dos clonas: B y E con fenotipo CAZ^R

CLONA	Fcia	%	% acumulativo
E*	14	34.1	34.1
B*+	8	19.5	53.7
D*	2	4.9	58.5
A	2	4.9	63.4
L*	2	4.9	68.3
M	3	7.3	75.6
G*	1	2.4	78.0
C	1	2.4	80.5
F*	1	2.4	82.9
H	1	2.4	85.4
I	1	2.4	87.8
J	1	2.4	90.2
K	1	2.4	92.7
N	1	2.4	95.1
N	1	2.4	97.6
O	1	2.4	100.0
Total	41	100.0	

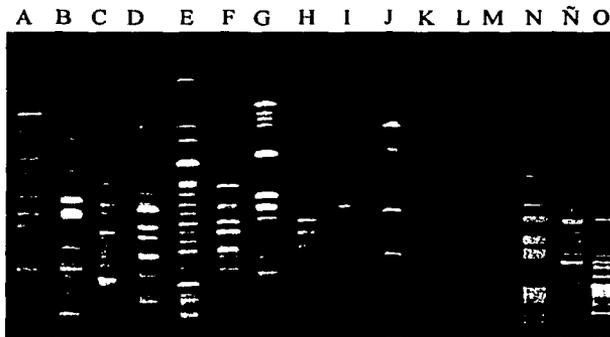


Tabla 3 Figura 2. Análisis de la huella digital genómica por PFGE de las cepas de *K.pn* aisladas en el HGD. En la Tabla 4 se presenta la frecuencia de aislamiento de las clonas identificadas. Las 26 cepas CAZ^R se agruparon en 6 clonas (*). La clona B se presentó como sensible y resistente (*+). En la Figura 2 se presenta la huella digital genómica por PFGE de las *K.pn* de IN identificadas en el HGD. El gel muestra una cepa representativa de cada una de las 16 clonas en que se agruparon las 41 cepas identificadas.

Figura 3

La clona E predominante en el HGD fue identificada como endémica

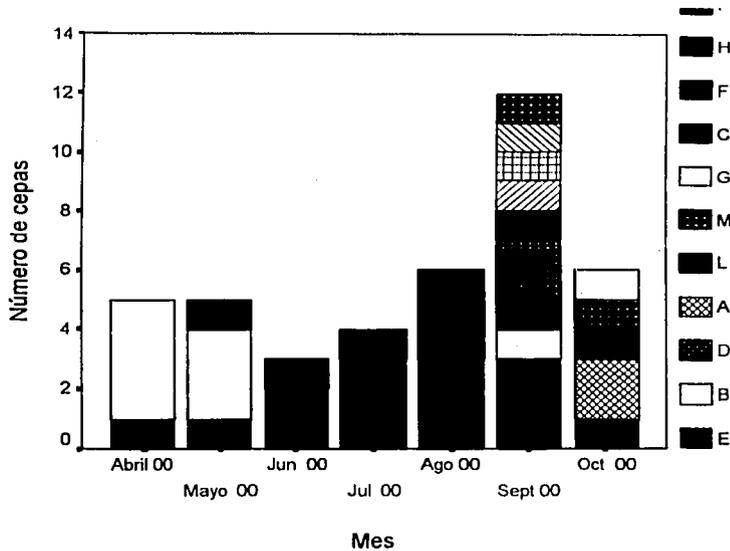


Figura 3. Distribución de las clonas por mes de todas las cepas de *K.pn* identificadas durante el periodo de estudio en el HGD. La clona E fue identificada en cada mes durante todo el periodo de estudio y la clona B se encontró en forma intermitente (se aisló en abril y mayo del 2000 y reapareció en septiembre del 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4

La clona E predominante, fue únicamente identificada en las áreas de pediatría del HGD

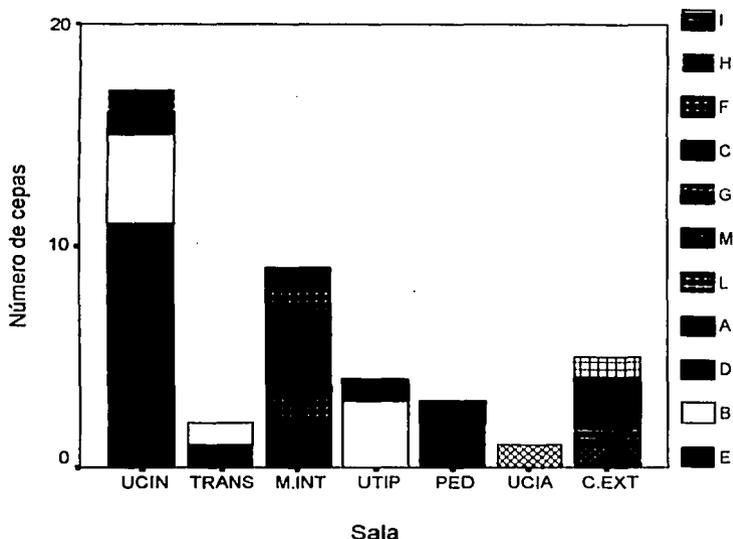


Figura 4. Análisis de las clonas, en relación al área hospitalaria, de todas las cepas *K.pn* identificadas en el HGD. La clona E fue principalmente encontrada en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN). La otra clona predominante fue B y se aisló de la UCIN, Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP), sala de Cuidados Intermedios Neonatales (TRANS). Las salas de Medicina Interna (M. INT), Unidad de Cuidados Intensivos de Adultos (UCIA) y Consulta Externa (C.EXT) presentaron diversidad clonal. No se encontró transferencia de clonas entre las salas de M. INT y las salas de pediatría.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5

Las 6 clonas de *K.pn* CAZ^R tienen diferente perfil de plásmidos nativos (1-3 plásmidos) y el fenotipo de multirresistencia fue transferido por la conjugación de un plásmido de 50-60 Kb

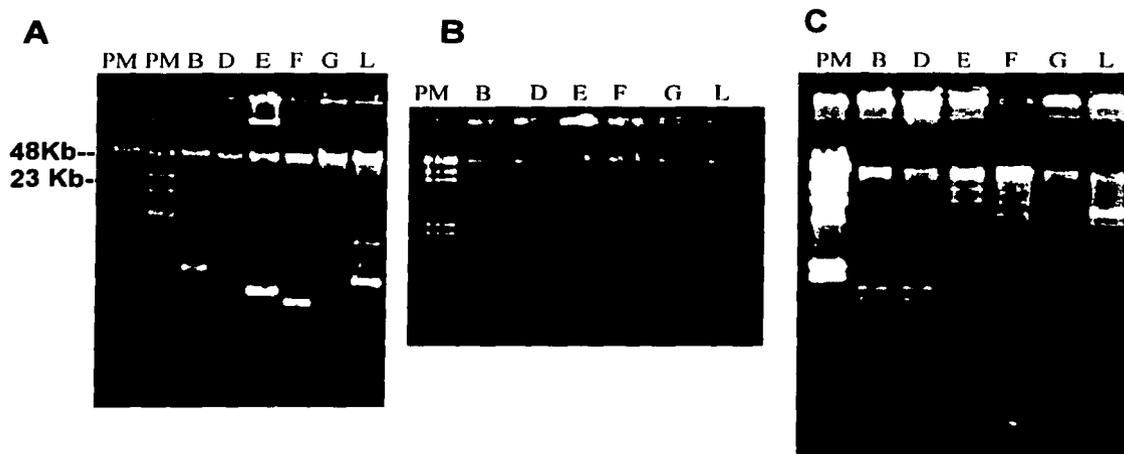


Figura 5. Perfil de plásmidos nativos y de la restricción por endonucleasas del plásmido tranconjugante de las clonas *K.pn* CAZ^R del HGD. En 5A se presenta el perfil de plásmidos nativos de una cepa representativa de cada clona *K.pn* CAZ^R en los carriles 3 al 8, con un patrón de plásmidos nativos de 1 a 3. En 5B se presenta el plásmido de 50-60 Kb que transfirió la resistencia a CAZR de cada una de las clonas CAZ. En 5C se observó la restricción enzimática con Pst1 de los plásmidos obtenidos como transconjugantes y se detecta que algunas de las clonas comparten plásmidos idénticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 6 y Tabla 4

La actividad de ESBL de las *K.pn* CAZ^R del HGD se asoció predominantemente con una enzima de pI de 9.0

Figura 6.

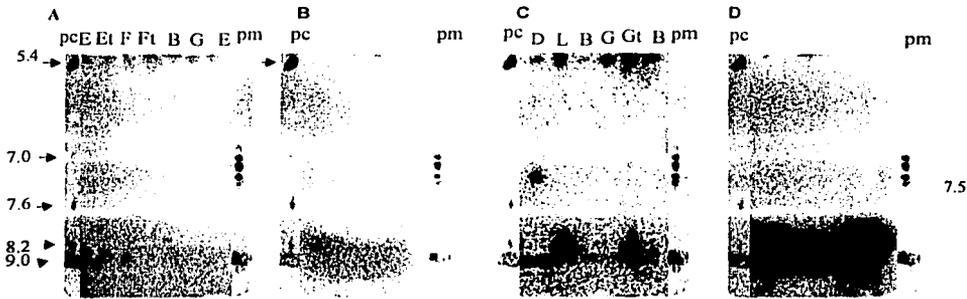


Tabla 4.

Clona	Betalactamasas	Actividad de ESBL (Prueba biológica)
B	5.4, 9.0	9.0
D	5.4, 7.6, 9.0	9.0
E	5.4, 9.0	9.0
F	5.4, 9.0	9.0
G	5.4, 8.2, 9.0	8.2, 9.0
L	5.4, 8.2, 9.0	8.2, 9.0

Tabla 4 y Figura 6. caracterización por IEF de las betalactamasas producidas por las *K pn* del HGD. En la Figura 6 se presentan las imágenes de IEF que demuestran la producción de betalactamasas con pI 5.4 y 9.0 (A y B) por todas las clonas *K.pn* CAZ^R del HGD de y sus transconjugantes. Algunas clonas también producen betalactamasas con un pI de 7.6 y 8.2 (C). La actividad de ESBL detectada por el bioensayo de hidrólisis de CAZ, corresponde a enzimas con pI de 8.2 y 9.0 (D) . En la tabla 5 se describe lo detectado por IEF en cada una de las clonas CAZ^R(Primera columna) en cuanto al total de betalactamasas producidas (segunda columna) y aquellas con actividad de ESBL (tercera columna).

Tabla 5 y Figura 7

Las bacteremias fueron la principal fuente de aislamiento de *K. pn* en las infecciones nosocomiales del Hospital Civil de Guadalajara (HCG)

FUENTE	Fcia	%	% acumulado
HEMOCULTIVO	30	60.0	60.0
UROCULTIVO	4	8.0	68.0
LCR	3	6.0	74.0
COPROCULTIVO	1	2.0	76.0
SECRECIONES	10	20.0	96.0
CATETER	2	4.0	100.0
Total	50	100.0	

Figura 7.

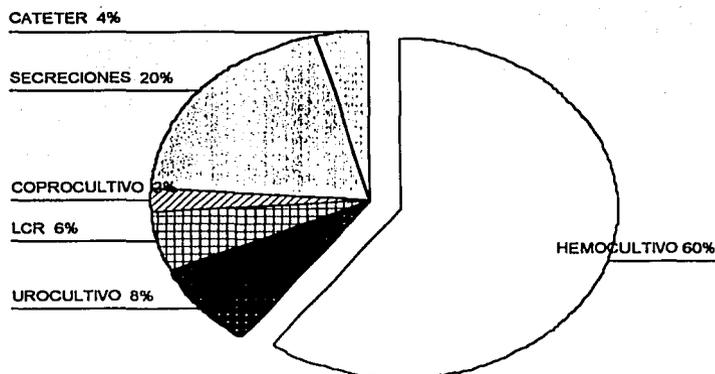


Tabla 5 y Figura 7. Fuente de aislamiento de las cepas de *K. pn* aisladas del HCG. En la tabla y Figura 7 se presenta la frecuencia de aislamiento de todas las cepas de *K. pn* nosocomiales del HCG de acuerdo a la fuente. Un total de 50 *K. pn* causantes de infección nosocomial fueron identificadas en el HCG durante el periodo de septiembre de 1999 a diciembre 2000. El 60% de las cepas fueron aisladas de hemocultivos, 20% secreciones, 8% urocultivos, 6% líquido cefalorraquídeo (LCR) y 4% puntas de catéteres.

Tabla 6

**En el HCG la resistencia a CAZ se presenta en el 90% de las *K.pn* que producen IN y en
corresistencia con AMK en el 60%.**

	RESISTENTE % (número eventos)	INTERMEDIO % (número de eventos)	SENSIBLE % (número de eventos)
Ampicilina	100% (50/50)	0	0
Amikacina	60% (30/50)	28% (14/50)	12% (6/50)
Cefotaxima*	42% (21/50)	50% (25/50)	8% (4/50)
Ceftazidima**	90% (45/50)	4% (2/50)	6% (3/50)
Imipenem	0	0	100% (50/50)
Aztreonam	86% (44/50)	4% (2/50)	8% (3/50)
Ciprofloxacina	0	0	100% (50/50)

*La CIM de CTX para estas cepas demostró que la gran mayoría de las cepas con valor intermedio por Kirby bauer fueron CTX^R y solo el 2% permaneció realmente como intermedias. **

La CIM₉₀ de CAZ fue de > 128 g/L.

Tabla 6. Patrón de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *K.pn* de IN, durante el periodo de Septiembre 1999 a Diciembre del 2000 en en el HCG.

Figura 8 y Tabla 7

El 58% de las *K.pn* identificadas en el Hospital Civil de Guadalajara pertenecieron a tres clonas (F,Q y A) y son Resistentes a Cefotaxima



CLONA	Fcia	%	% acumulado
F*	12	24.0	24.0
Q*	10	20.0	44.0
A*	7	14.0	58.0
B	1	2.0	60.0
C*	2	4.0	64.0
D	1	2.0	66.0
E	1	2.0	68.0
G*	1	2.0	70.0
I*	1	2.0	72.0
J	1	2.0	74.0
K*	1	2.0	76.0
L*	3	6.0	82.0
M*	1	2.0	84.0
N*	1	2.0	86.0
N*	1	2.0	88.0
O*	1	2.0	90.0
P	1	2.0	92.0
R*	1	2.0	94.0
H*	1	2.0	96.0
T*	1	2.0	98.0
V*	1	2.0	100.0
Total	50	100.0	

Figura 8 y Tabla 7. Huella digital genómica por PFGE de las cepas de *K. pn* del HCG. En la figura 8 se presenta la huella digital genómica por PFGE de una cepa representativa de cada una de las clonas (21) de *K.pn* nosocomiales identificadas en el HCG. Las clonas fueron denominadas por orden alfabético como fueron identificadas. En la Tabla 8 se presenta la frecuencia de cepas identificadas por cada clona. Las cepas CAZ^R se agruparon en 16 clonas (*) y no se encontró ninguna clona con fenotipo CAZ^R y CAZ^S a la vez.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9

La transmisión cruzada de clonas de *K. pn*-CAZ^R (F, Q y A) en el HCG es un problema común en las áreas de pediatría principalmente en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales

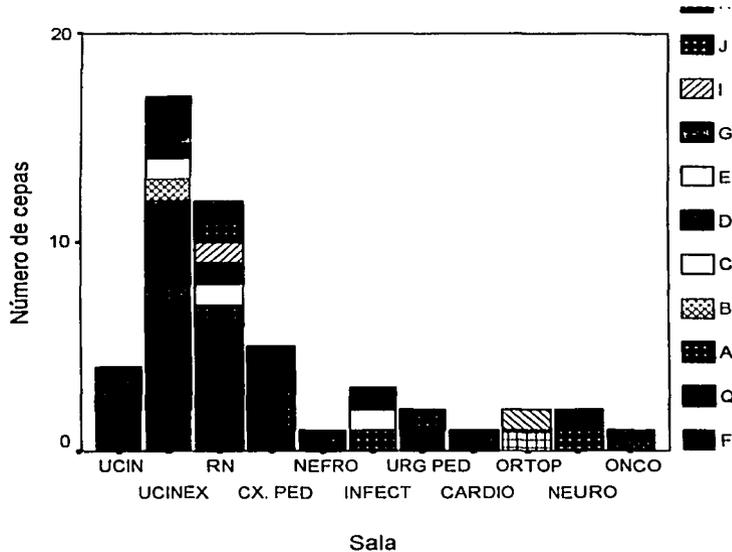


Figura 9. Análisis de la distribución de las clonas de *K. pn* por con relación al área hospitalaria del HCG en que fueron identificadas. Las clonas predominantes F y A únicamente se encontraron en áreas de pediatría principalmente en salas de Cuidados Intensivos Neonatales: UCIN, Recién Nacidos (RN) y la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales de pacientes nacidos fuera del Hospital (UCINEX). No se encontró evidencia de transmisión cruzada de clonas entre los servicios de pediatría y las salas de adultos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10

La clona A de *K. pn CAZ^R* se aisló en forma intermitente en las áreas de Pediatría del HCG durante todo el periodo de estudio

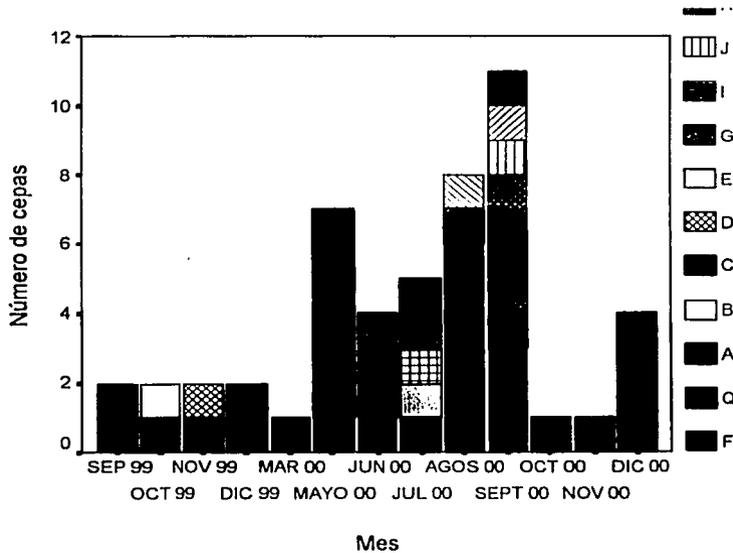


Figura 10. Distribución por mes de aislamiento de las clonas de *K. pn CAZ^R* identificadas en el HCG en el periodo de estudio. Se observa que la clona F aparece desde el año 2000 y la clona A se aisló en forma intermitente desde el año 1999 en el HCG.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 11

Las 16 clonas *K.pn* CAZ^R presenta un perfil de plásmidos nativos difentes (1 a 9)

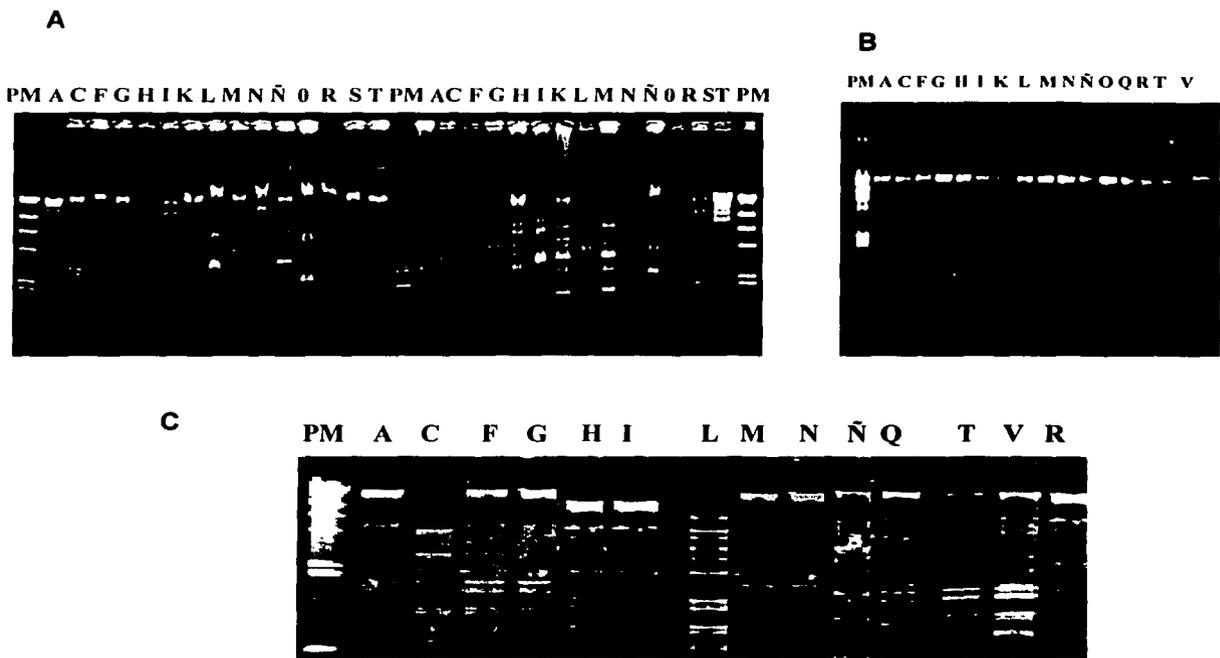


Figura 11. Análisis del perfil de plásmidos nativos y la restricción con endonucleasas de las transconjugantes de las clonas de *K.pn* CAZ^R del HCG. En 11-A se presentó el análisis electroforético del ADN de plásmidos nativos de una cepa representativa de cada una de las 16 clonas *K.pn* CAZ^R. Todas las cepas pertenecientes a una misma clona exhibieron el mismo perfil de plásmidos (datos no presentados). Las clonas *K.pn* CAZ^R presentan un perfil de plásmidos nativos de 1 a 7, sin embargo todas ellas comparten un plásmido de 50-60 Kb. En 11-B se presentan las transconjugantes *E. coli*-CAZ^R que adquirieron la CAZ^R de las clonas de *K.pn* CAZ^R por conjugación del plásmido de 50 a 60 Kb el cual también co-transfiere resistencia a otros antibióticos. En 11C se presenta el análisis de este plásmido con endonucleasa *Pst* 1 de 14 de las 16 clonas originales ya que las clonas K y O muestran degradación en cada restricción realizada. Se observa que algunas de las clonas comparten plásmidos idénticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 8 y Figura 12.

La actividad de ESBL en las cepas de *K.pn* CAZ^R del HCG está asociada a una betalactamasa con pl de 8.2

Clonas	Betalactamasas	ESBL
		Prueba biológica
At	5.4, 8.2	8.2
Ct	5.4, 8.2	8.2
Ft	5.4, 8.2	8.2
Gt	5.4, 8.2	8.2
Ht	5.4, 8.2	8.2
It	8.2	8.2
Kt	5.4, 8.2	8.2
Lt	8.2	8.2
Mt	5.4, 8.2	8.2
Nt	5.4, 8.2	8.2
Nt	5.4, 8.2	8.2
Qt	5.4, 8.2	8.2
Rt	5.4, 8.2	8.2
St	5.4, 8.2	8.2
Tt	5.4, 8.2	8.2

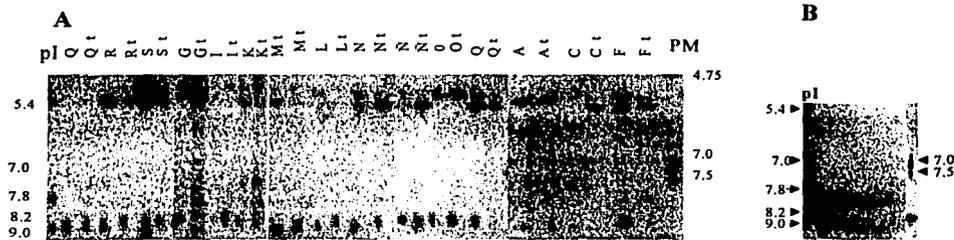


Tabla 10 y Figura 12. Caracterización por IEF de las betalactamasas producidas por las clonas de *K.pn* CAZ^R del HCG. En la tabla 10 se describen las betalactamasasa producidas por cada una de las clonas *K. pn* CAZ^R y la actividad de ESBL en cada una. En la Figura 10-A se presentan los geles de IEF que demuestran los datos descritos en la tabla 10. Las betalactamasas producidas por todas las clonas de *K. pn* CAZ^R exhiben un pl de 5.4 y 8.2. En la figura 10-B se presenta un gel de IEF más bioensayo de hidrólisis de CAZ de las clonas más frecuentes (F,Q,A) y la actividad de ESBL corresponde a la enzimas con pl de 8.2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9 y Figura 13.

La principal fuente de aislamiento de *K.pn* nosocomiales del HP-CMN Siglo XXI-IMSS fueron los hemocultivos

FUENTE	Fcia	%	% acumulado
HEMOCULTIVO	23	28.8	28.8
UROCULTIVO	17	21.3	50.0
LCR	6	7.5	57.5
LAV.BRONQ	2	2.5	60.0
PUNCION	5	6.3	66.3
LIQ	3	3.8	70.0
PERITONEAL			
LIQ PLEURAL	3	3.8	73.8
URO.CEXT	19	23.8	97.5
HEMO.CEXT	2	2.5	100.0
Total	80	100.0	

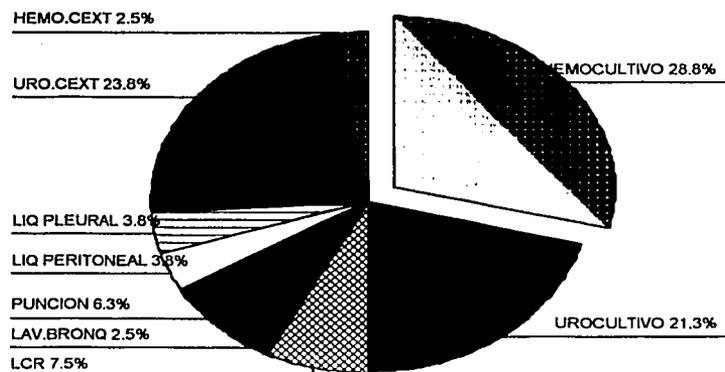


Tabla 9 y Figura 13. Fuente de aislamiento de las cepas de *K. pn* del HP-CMN Siglo XXI-IMSS. Se describe la frecuencia de las fuentes de aislamiento de las *K. pn* de un total de 80 causantes de IN que fueron identificadas en el HP-CMN Siglo XXI-IMSS durante Octubre 2000 a mayo del 2001.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 10

La resistencia a CAZ se encontró en el 76% de las K.pn que producen IN en el HP-CMN Siglo XXI-IMSS y se asocia a corresponsencia con AMK en el 69%.

	RESISTENTE % (número eventos)	INTERMEDIO % (número de eventos)	SENSIBLE % (número de eventos)
Ampicilina	100% (59/59)	0	0
Amikacina	69% (41/59)	2% (1/59)	29% (17/59)
Cefotaxima	56% (33/59)	24% (14/59)	20% (12/59)
Ceftazidima	76% (45/59)	0	24% (14/59)
Imipenem	0	0	100% (59/59)
Ciprofloxacina	0	0	100% (59/59)
Gentamicina	67% (40/59)	2% (1/59)	30% (17/59)
Aztreonam	72% (43/59)	0	28% (14/59)

* El CIM deCTX para estas cepas demostró que del 24% que se reportaron con valor intermedio 20% eran resistentes en realidad y correspondían exactamente al 76% reportado previamente por Kirby bauer. ** El CIM90 de CAZ de las cepas resistentes fue de > de 128 g/L.

Tabla 10. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de K.pn de IN, durante el periodo de octubre 2000 a mayo del 2001 del HP-CMN Siglo XXI-IMSS.

Tabla 11

La resistencia a CAZ se presenta en el 19% de las *K.pn* que producen IC en el HP-CMN Siglo XXI-IMSS y se asocia a coresistencia con AMK en el 24%.

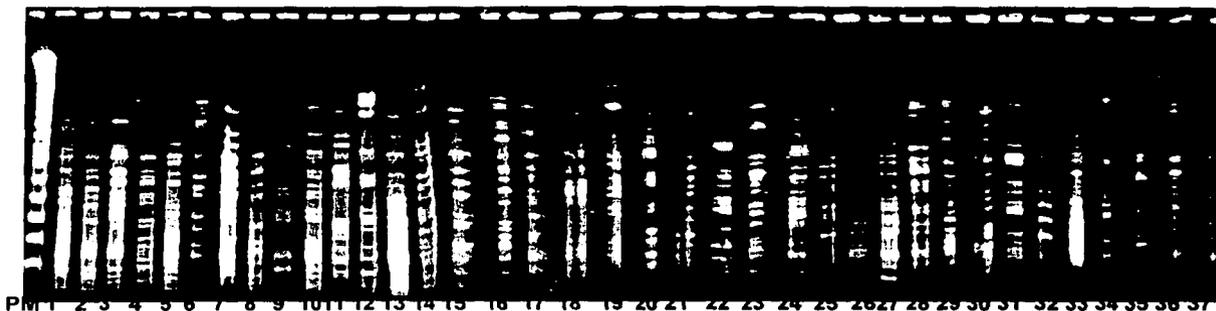
	RESISTENTE % (número eventos)	INTERMEDIO % (número de eventos)	SENSIBLE % (número de eventos)
Ampicilina	100% (21/21)	0	0
Amikacina	24% (5/21)	5% (1/21)	71% (15/21)
Cefotaxima	0	24% (5/21)	76% (16/21)
Ceftazidima	19% (4/21)	0	81% (17/21)
Imipenem	0	0	100% (21/21)
Ciprofloxacina	0	0	100% (59/59)
Gentamicina	19% (4/21)	5% (1/21)	76% (16/21)
Aztreonam	24% (5/21)	0	76% (16/59)

* El CIM deCTX para estas cepas demostró que de las 5 cepas (24%) que se reportaron con valor intermedio cuatro de ellas eran resistentes en realidad y correspondían exactamente a las mismas CAZ^R y una volvió a dar valor intermedio, reportado previamente por Kirby bauer. ** El CIM90 de CAZ de las cepas resistentes fue de > de 128 g/L.

Tabla 11. Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *K.pn* de IC, durante el periodo de octubre 2000 a mayo del 2001 del HP-CMN Siglo XXI-IMSS.

Figura 14 y Tabla 12

Se encontró gran diversidad clonal entre todos los aislamientos *K.pn* con discreto predominio de las clonas 7, 10, 12, 19 y 27



CLONA	Fcia	%	% acumulativo
CLONA 7*+	9	11.3	11.3
CLONA 10*+	5	6.3	17.6
CLONA 12*	5	6.3	23.9
CLONA 19*	5	6.3	30.2
CLONA 2*+	4	5.0	35.2
CLONA 27+	4	5.0	40.2
CLONA 6*	3	3.8	44
CLONA 8*+	2	2.5	46.5
CLONA 16*	2	2.5	49
CLONA 24+	2	2.5	51.5
Restantes clonas	1	1.3;	100
		en conjunto	
		48.5	
Total	80	100	

Figura 14 y Tabla 12. Análisis de la huella digital genómica por PFGE de una cepa representativa de las 38 clonas identificadas entre las 80 cepas de *K.pn* en el HP-CMN Siglo XXI-IMSS. Las clonas se denominaron por orden numérico como ellas fueron identificadas. Las 49 cepas con fenotipo CAZ^R se agruparon en 22 clonas. En la tabla se presentan las 10 clonas más frecuentes, se señalan con asterisco las clonas CAZ^R(*) algunas presentaron un fenotipo sensible y resistente (*+).

Figura 15

Se observó una gran diversidad clonal y transmisión cruzada entre los diferentes servicios del HP-CMN Siglo XXI-IMSS

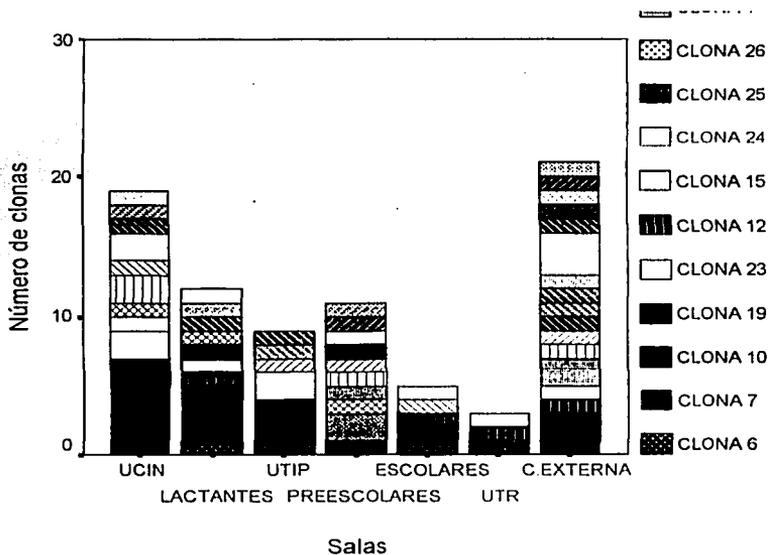


Figura 15. Distribución de las cepas de *K. pn* por clona y el área hospitalaria de aislamiento en el HP-CMN Siglo XXI-IMSS. Las principales salas afectadas por las IN fueron UCIN y lactantes. Se observa transmisión cruzada de clonas entre las diferentes salas hospitalarias. Algunas de las clonas encontradas en hospitalización también se aislaron en consulta externa.

Figura 16

No se encontró una clona endémica durante el periodo de estudio EN EL HP-CMN Siglo XXI-IMSS

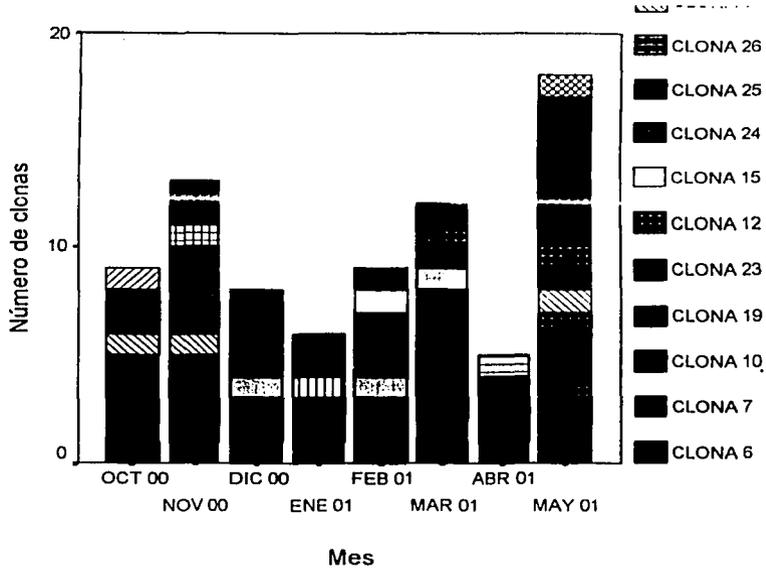


Figura 16. Distribución en el tiempo de estudio de las clonas de *K pn* identificadas en el HP-CMN Siglo XXI-IMSS. Se presenta el análisis de la distribución del aislamiento de las clonas por mes en todo el periodo de estudio. Las clonas 6, 7, 10, 19 y 23 se encontraron en forma intermitente durante el periodo de estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 17

Las 8 clonas de *K.pn* CAZ^R más frecuentes del HP-CMN Siglo XXI-IMSS tienen un diferente perfil de plásmidos nativos (1 a 5 plásmidos), y comparten un plásmido de ~ 50 a 60 Kb el cual acarrea la resistencia a CAZ y otros antibióticos

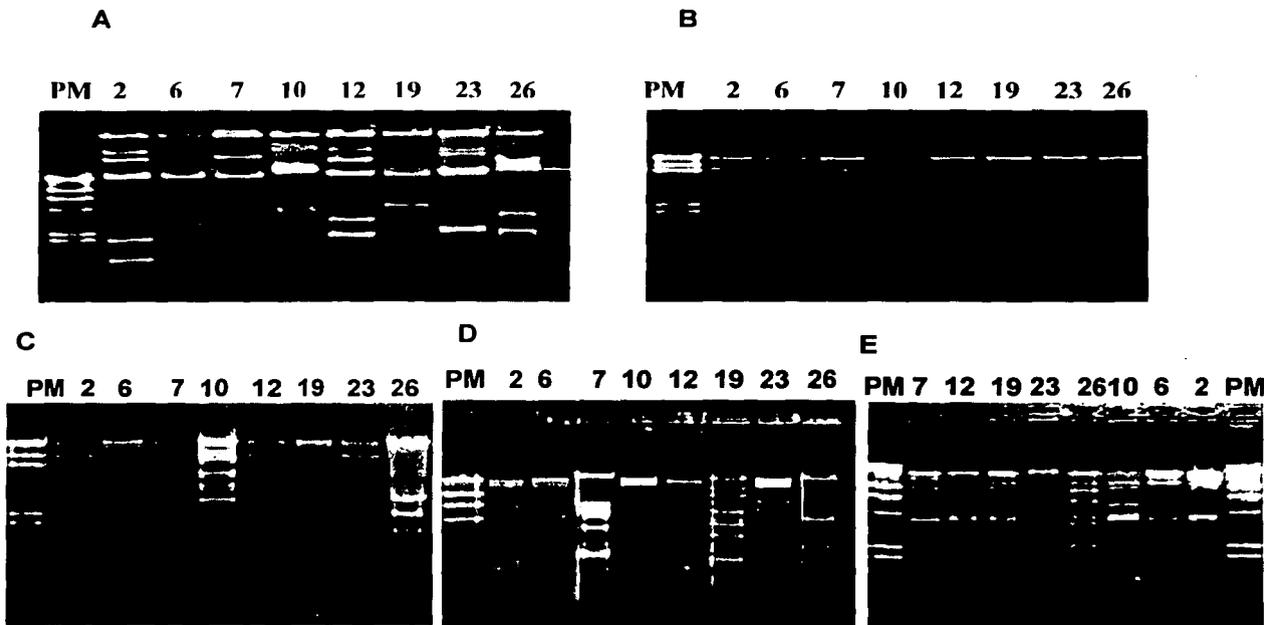


Figura 17. Análisis del perfil de plásmidos nativos y la restricción con endonucleasas de los plásmidos transconjugantes de las clonas más frecuentes de *K. pn* del HP-CMN Siglo XXI-IMS. En A se observó el perfil de plásmidos nativos de una cepa representativa de las 8 clonas más frecuentes de *K. pn* CAZ^R nosocomiales del HP-CMN Siglo XXI-IMSS y en B se presentan las transconjugantes *E. coli* CAZ^R/RIF^R obtenidas de las conas presentadas en A y que solo adquirieron el plásmido de ~50-60Kb. En C, D y E se presenta el análisis de restricción por endonucleasas *EcoRI*, *PstI* y *EcoRV* respectivamente. Se observa que algunas de las clonas comparten un plásmido idéntico que transfiere la multiresistencia.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 18 y Tabla 13

La actividad de ESBL de *K.pn CAZ^R* de las cepas del HP-CMN Siglo XXI-IMSS está asociada con un pl de 8.2

Clona	Betalactamasas	ESBL Pba biológica
6	5.4, 7.6, 8.2	8.2
6 t	5.4, 8.2	8.2
7	5.4, 7.6, 8.2	8.2
7 t	5.4, 8.2	8.2
10	5.4, 8.2	8.2
10 t	8.2	8.2
19	5.4, 7.6, 8.2	8.2
19 t	5.4, 8.2	8.2
23	7.6, 8.2	8.2
23 t	8.2	8.2

Figura 18.

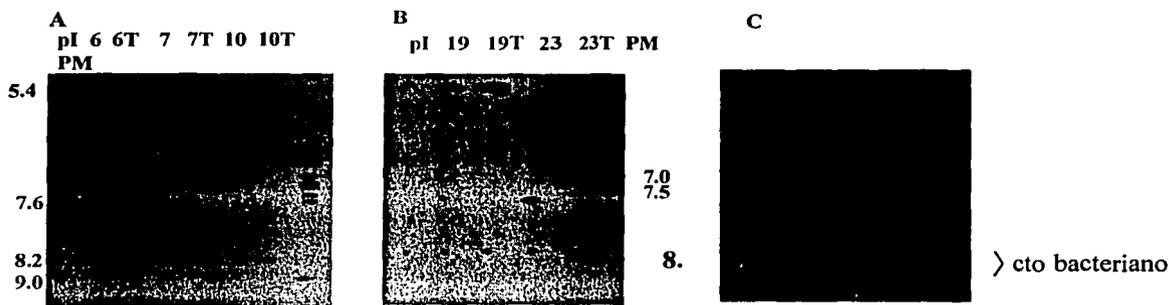


Tabla 13 y Figura 18. Determinación por IEF de las betalactamasas producidas por las clonas de *K pn CAZR* identificadas en el HP-CMN Siglo XXI-IMSS. El Isoelectroenfoco (EIF) de las betalactamasas producidas por *K.pn CAZ^R* y sus transconjugantes presentan un pl de 5.4 y 8.2, algunas clonas también producen betalactamasas con un pl de 7.6 (Figura 18 A y B y Tabla 13). La actividad de ESBL detectada por el bioensayo (hidrólisis de ceftazidima), corresponde a enzimas con pl de 8.2 (Figura 18C y Tabla 13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 19

No se encontró evidencia de transmisión cruzada entre los tres centros hospitalarios

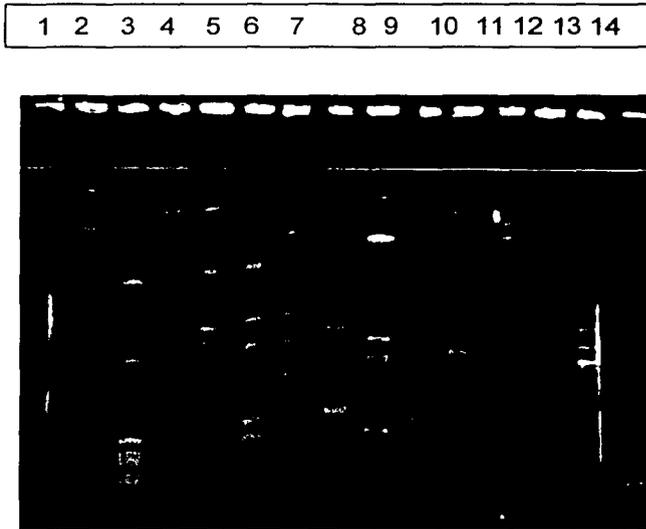


Figura 19. Análisis comparativo por PFGE de las 5 clonas frecuentes por cada centro hospitalario estudiado. se observa las 5 clonas más frecuentes, Hospital de Durango clona B carril 1, clona D carril 2, clona E carril 3, clona L carril 4, clona G carril 5. Hospital Civil de Guadalajara clona A carril 6, clona C carril 7, clona F carril 8, clona L carril 9, clona Q carril 10. Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI-IMSS clona 19 carril 11, clona 12 carril 12, clona 10 carril 13, clona 7 carril 14, clona 2 carril 15.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

1. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control*. 1988;16:128-40.
2. MMWR. Public health focus: surveillance, prevention, and control of nosocomial infections. 1992; 42:783-787.
3. Wenzel RP & Pfaller MA. Infection control: the premier quality assessment program in United States Hospitals. *Am J Med* 1991; 91(suppl 3B):27S-31S.
4. Martone WJ, Jarvis WR et al. Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections. En: Bennett JV, Brachman PS, eds. *Hospital infections*. Boston: Little, Brown, and Company. 1992:577-96.
5. Ponce de León R S, Rangel FMS. Infections control in developing countries. En: J. Bennett y P Brachman, eds. 1998. *Hospital Infections*. Philadelphia: Lippincott Raven:291-295.
6. Ponce de León R S, Magnitud del problema y propuestas de control. Ponce de León S y Soto JL. 1996. *Infecciones intrahospitalarias*. Mc Graw-Hill Interamericana, México, D.F.
7. Avila Figueroa C. Evaluación del impacto económico y la mortalidad de las infecciones nosocomiales en pediatría. *Enferm Infecc Microbiol* 1996; 16: 53.
8. Molina BI, Avila FC. Outbreack of nosocomial infection in a pediatric network of public hospitals (abstract 404). In *Program & Abstract of the 38 Th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America*. September 2000 7-10. New Orleans Louisiana. 2000:10.
9. Edmond MB and Wenzel RP. Nosocomial Infections. In *principles and practice of infectious diseases*. Mandell GL. Benett JL, Dolin R. Fifth De. Churchill Linvingstone, 2000. U.S.A. Vol 2 pp 2988-3074.
10. Haley RW, Culver DH, et al. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infections in U.S. hospitals. *Am J Epidemiol*. 1985; 121: 182-205.
11. Organización Panamericana de la Salud-Organizacio Mundial de la Salud. Directorio Latinoamericano y del Caribe de Hospitales. Washintong, D.C. OPS- OMS. 1995.
12. Ponce de León S, Ruiz PG et al. Infecciones nosocomiales: Características del problema en el Instituto Nacional de La Nutrición "Salvador Zubiran" y en México. *Salud Pública de México*. 1986; 28: 29-36.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

13. Ponce de León S, Rangel Frausto S, López E JI, Oliveros RC, y Jiménez Huertas M. Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México. *Salud Pública de México*. 1999; 41:S5- S11.
14. Díaz RRD, Solórzano SF, Padilla BG, Miranda NMG, González RR y Pérez JA. Infecciones nosocomiales. Experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Salud Publica de Mex*. 1999; 41 suppl I: S12-S17.
15. Amyes SGB & Gemmell CG. Antibiotic resistance. *J Med Microbiol*. 1997; 46: 436-470.
16. Lucieni OC, Sergio BW & Aduato Castelo. Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1992;13:725-737.
17. Navarrete NS, Muñoz HO y Santos PJI. En: *Infecciones nosocomiales en Pediatría*. Eds McGraw Hill. Interamericana. México D.F. 1998.
18. Livrelli V, De Champs C, Di Martino et al. Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1963-1969.
19. Martínez LA, Mancilla RJ & Santos PJI. Sepsis neonatal. Experiencia 1980-1985 del Hospital Infantil de México. *Bol Med Hosp Inf Mex*. 1988; 46: 77-78.
20. Macías AE, Muñoz JM, Bruckner DA, et al. Parenteral infusions bacterial contamination in a multi-institutional survey in Mexico: Considerations for nosocomial mortality. *AJIC* 1999; 27:285-290.
21. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Outbreak of infection with extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Mexican Hospital. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3193-3196.
22. Miranda G, Kelly C, Solórzano F, Leañós B, Coria R, and Patterson JE. Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of infection due to *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 3138-3141.
23. Miranda MG, Gordillo MG, Solórzano F, Leañós B, Villasis MA, Villegas R. Estudio de casos y controles en un brote de *S. marcescens* en una unidad de cuidados intensivos. 1998; 50: 13-18.
24. Figueroa CA, Cruz C M, Patrón EA, León RA, y col. Prevalencia de infecciones nosocomiales en niños: encuesta de 21 hospitales en México. *Salud Pública de México* 1999; 41: S18- S 25.
25. Rodríguez Noriega E, Morfin Otero R, y Esparza Ahumada S. Producción de betalactamasas y patrones de resistencia bacteriana, 1988-1991. *Gac Med Mex* 1994; 5: 355- 360.

26. Fascículo N°1 Resistencia bacteriana: Origen, epidemiología, consecuencias clínicas y medidas de limitación. Dra Celia M. Alpuche Aranda. 1-26.
27. Cherry JD. *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections. In textbook of Pediatric Infectious Disease. Edit by Feigin RD, Cherry JD. 4th edition Sandors Co. Philadelphia, Pennsylvania. 1998: 2259-2286.
28. Frimow HS & Abrutyn E. Pathogens resistance to antimicrobial agents. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect Dis Clin North Am.* 1995; 9: 497-530.
29. Davies J. Inactivation of antibiotic and the dissemination of resistance genes. *Science.* 1994;264;375-382.
30. Opal SM, Mayer KH and Medeiros AA. Mechanisms of bacterial antibiotic resistance. In principles and practice of infectious diseases. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Fifth De. Churchill Livingston, 2000. U.S.A. Vol 2 pp 236-252.
31. Gold HS, Moellering RC. Drug therapy: antimicrobial drug resistance. *N Engl J Med.* 1996; 335:1445-1453.
32. Cockerill III F R. Conventional and genetic laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc.* 1998; 73: 1007-1021.
33. Heritage J, M'Zali F H, Gascoyne-Binzi D, and Hawkey P M. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamasas in Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 37: 797-802.
34. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamasas accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24: S19-45.
35. Livermore D M. β -Lactamasas in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995; 8 : 557-584.
36. Neu C H. Contribution of beta-lactamasas to bacterial resistencia and mechanisms to inhibit beta-lactamasas. *The American Journal of Medicine* 1985; 79 (suppl 5B): 2-12.
37. Quinn JP. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamasas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994 (Suppl 1). 39-42.
38. Podschun R & Ullmann. *Klebsiella* ssp as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:589-603.

39. Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, et al. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. *Infeccion* 1993; 21: 18-22.
40. French GL, Shannom KP, & Simmons N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad spectrum cephalosporins and B-lactam-B-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 B-lactamase. *J Clin Microbiol.* 1996;34:358-363.
41. Jacoby GA. Antimicrobial resistant pathogens in the 1990s. *Annu Rev Med.* 1996; 47: 169-179.
42. Sirot D. Extended spectrum plasmid mediated beta lactamases. *J Antimicrob. Chemoter.* 1995;36:19-34.
43. C de Champs, D Sirot, C Chanal, R Bonnet, J Sirot, and The French Study Group. A 1998 survey of extended-spectrum β -lactamase in enterobacteriaceae in France. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2000; 44: 3177-3179.
44. Silva J., Aguilar C, Becerra Z., López- Antuñano F., and R. García.. Extended -spectrum β -lactamases in clinical isolates of enterobacterias in Mexico. *Microbial Drug Resistance.* 1999; 3: 189-193.
45. Silva J., Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza Ramos U, Lara Lemus R, and Ledezma L. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2000; 44: 997-1003.
46. Bush K. New β -lactamases in Gram negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *CID* 2001; 32: 1085-9.
47. Katsanis G P, Spargo J, Ferraro M J, Sutton L, and Jacoby G A. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended spectrum betalactamase. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 691-696.
48. Vercauteren E, Descheemaeker P, Ieven M, Sanders CC, and Goossens H. Comparison of screening methods for detection of extended spectrum β -lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia Coli* and *Klebsiella spp.* In a Belgian Teaching Hospital. *J. Clin Microbiol* 1997; 35: 2191-2197.
49. Bush K. Is it important to identify extended-spectrum beta-lactamase-producing isolates? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996; 15: 361-364.
50. Jack GW, Sykes R B, and Richmond M H. The β -lactamases of Gram-negative bacteria. *Postgraduate Medical Journal.* 1970; 46: Suppl. 41-43.

51. Matthew M and Hedges R W. Analytical isoelectric focusing of R factor-determined β -lactamases: correlation with plasmid copatibility. *J Bacteriol.* 1976; 125: 713- 718.
52. Sanders CC, Sanders WE and Moland E. Characterization of β -lactamases in situ polyacrylamide gels. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 951-952.
53. Sykes R B, and Matthew M. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 1976; 2: 115-157.
54. Matthew M, Harris AM, Marshall MJ & Ross Gw. The use of analytic isoelectric focusing for detection and identification of Beta lactamase. *J Gen Microbiol.* 1975; 88: 169-178.
55. Steward CD, Rascheed JK, Hubert SK, et all. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the national committee for clinical laboratory standards' Extended-Spectrum β -lactamase detection methods. *J. Clin. Microbiol* 2001; 39: 2864-2872.
56. Jacoby GA: Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended spectrum beta-lactamases. Available at: <http://www.lahey.hitchcock.org/pages/1hc/studies/webt.htm>. Accessed 1999.
57. Eisenstein B I. New Molecular Techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infec Disease.* 1990;161: 595-602.
58. Levin BR, Lipsitch M & Bonhoeffer. Population biology, evolution, and infectious disease: Convergence and Synthesis. *Science.* 1999; 283 :806-809.
59. 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.
60. Pfaller MA & Cormican MG. Microbiology: the role of the clinical laboratory. In Prevention and control of nosocomial infections. Edit by Wenzel RP. 3th edition Williams & Wilkins averly company, Baltimore, Maryland. 1997: 95-118.
61. Arbeit RD. Laboratory procedure for the epidemiologic analysis of microorganisms. In Manual of clinical microbiology 7th edition . Edit by Morray PKR, Baron E, Faller MAP, Tenover FC and Yolken RH. American Society for Microbiology. 1999:116-137.
62. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, and Swaminathan B. Interpretin chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed - field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2233-2239.

63. Arbeit R D. 1995 Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms, p. 190-208. In P.R. Murray, E J Baron, M A Pfaller, F C Tenover, and RH Tenover (de.), Manual of clinical microbiology, 6th de. American Society for microbiology, Washington, D.C. Goering R V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. 1993; 14:595-600.
64. Chetchotisak P, Phelps CL, Hartstein AI: Assessment of bacterial cross-transmission as a cause of infections in patients in intensive care units. Clin Infect 1994; 18: 929.
65. Flynn DM, Weinstein RA, Nathan C, et al: Patients endogenous flora as the source of "Nosocomial" enterobacter in cardiac surgery. J Infect Dis 1987; 156: 363.
66. Jacoby GA, Madeiros AA. More extended spectrum β -lactamaes. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1697-1704.
67. Toltzis P and Blumer JL. Nosocomial acquisition and transmission of antibiotic resistant gram negative organisms in the pediatric intensive care unit. Pediatric Infect Dis J. 2001; 20: 612-18.
68. Bush K. A classification of β -lactamases: groups 1, 2^a, 2b, and 2b'. Antimicrobial Agents and Chemotherapy . 1989; 33: 264-270.
69. Cormican MG, Marshall S A, and Jones R N. Detection of extended-spectrum B-lactamase (ESBL)-producing straining by the Etest ESBL screen. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1880-1884.
70. Maniatis TE, Fritsh E and Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory; 1982: 86.
71. Appelbaum PC & Leathers DJ. Evaluation of the rapid NFT system for identification of gram negative, non fermentin rods. J Clin Microbiol. 1984; 20: 730-734
72. NCCLS. M100-S10 (M7) January 2000.
73. Giles Standar Interface RS-232. 1996. Manual BIOMIC. Revisión 1.4/nov.1996.
74. Bush K, and SB Singer. Effective cooling allows sonication to be used for liberation of β -lactamases from gram negative bacteria. J Antimicrob Chemother. 1989; 24: 82-84.
75. Huovinen S. Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated β -lactamasas with Pharmacia PhastSystem. Antimicrob Agents Chemoter. 1988; 32: 1730-1732.
76. Silva J and Aguilar Zacarias C. β -lactamase bioassay: A simplified method to determine extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in enterobacteria. 1997 Archives of Medical Research; 28: 285-287.

77. Miller J. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1992:82-85.
78. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, and Legakis. Variations in the prevalence of strains expressing an extended spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. CID 2001;32 (Suppl 2): S 94-S 103.
79. Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994; 13: S17-29.
80. Thomson KS, Prevan AM, Sander CC. Novel plasmid mediated β -lactamases in enterobacteriaceae: emerging problems for new β -lactam antibiotics. Curr Clin Topic Infect Dis. 1996; 16:151-63.
81. Griadkowski M. Evolution and epidemiology of extended spectrum β -lactamases (ESBL) and ESBL-producing microorganisms. Clinical Microbiology and Infection 2001; 7:597-608.
82. Rice LB, Willey STT, Papanicolaou GA et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. Antimicrob Agents Chemother 1996; 34: 2193-2199.
83. Kitzis MD, Billot-Klein D, Goldstein FW et al. Dissemination of the novel plasmid-mediated CTX-1, which confers resistance to broad-spectrum cephalosporins and its inhibition by β -lactamase inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 9-14.
84. Branger C, Bruneau B, Lesimple AL, Bouvet PJ, Bewry P, Sevil-Garcia J. Epidemiological typing of extended-spectrum beta-lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolates responsible for five outbreaks in a university hospital. J Hosp Infect 1997; 36: 23-36.
85. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, Gudiol F. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 53-58.
86. Gouby CA, Neuwirth C, Bouziges NJ, Carles-Nurit MJ, Despaux E, Ramuz M. Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. J Clin Microbiol 1994; 32: 301-305.