

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA.

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO.

UNIDAD DE MEDICINA INTERNA HOSPITAL GENERAL
“DR. GONZALO CASTAÑEDA ESCOBAR”

**FACTORES GENÉTICOS QUE DETERMINAN
RESISTENCIA INTRÍNSECA DE *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* CONTRA CARBAPEMENS.**

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

P R E S E N T A :

ANTONIO PELLICER TORRES

NO. DE REGISTRO 129.2006

FEBRERO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**DR. MARIO HORACIO CALDERON RODRÍGUEZ.
DIRECTOR DEL HOSPITAL GENERAL “DR. GONZALO
CASTAÑEDA ESCOBAR” ISSSTE**

**DRA. MARTHA NAVARRO LEÓN
SUBDIRECTORA MEDICA DEL HOSPITAL GENERAL “DR.
GONZALO CASTAÑEDA ESCOBAR” ISSSTE**

**DR. IGNACIO JORGE ESQUIVEL LEDESMA
JEFE DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL GENERAL “DR. GONZALO CASTAÑEDA ESCOBAR”
ISSSTE**

**DR. ARMANDO MENDOZA CORTES
COORDINADOR DEL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA
HOSPITAL GENERAL “DR. GONZALO CASTAÑEDA ESCOBAR”
ISSSTE**

**DRA. MIREYA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ
PROFESORA TITULAR DEL CURSO DE MEDICINA INTERNA
HOSPITAL GENERAL “DR. GONZALO CASTAÑEDA ESCOBAR”
ISSSTE**

**DR. ROGELIO NAVARRETE CASTRO
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE INFECTOLOGÍA
HOSPITAL GENERAL “DR. GONZALO CASTAÑEDA ESCOBAR”
ISSSTE**

COLABORADORES DE TESIS

Dr. Jesús Silva Sánchez

Jefe del Depto. de Resistencia Bacteriana

Instituto Nacional de Salud Pública

Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas

Av. Universidad 655

Col. Sta. Ma. Ahuacatitlan

Cuernavaca, Mor.

QBP. Berta Carrillo, Químico Alejandro Sánchez Pérez, Químico Fernando Reyes,
TCC Teresa Rojas. Investigadores del Departamento de Resistencia bacteriana. Instituto
Nacional de Salud Pública.

QFB. Mónica Tobías: Jefe de la Unidad de Bacteriología Laboratorio del Hospital
General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar”

ÍNDICE

PARTE 1. INTODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

PARTE 2. METODOLOGÍA

OBJETIVOS.....	9
----------------	---

DISEÑO.....	10
-------------	----

TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	10
---------------------------	----

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	10
-----------------------------	----

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	11
-----------------------------	----

MÉTODOS.....	11
--------------	----

GEL DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS.....	13
---	----

DETERMINACIÓN DE PORINAS.....	14
-------------------------------	----

DETERMINACIÓN DE METALO β - LACTAMASAS.....	15
---	----

REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA.....	15
---------------------------------------	----

VARIABLES.....	17
----------------	----

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
---------------------------	----

CONSIDERACIOENS ÉTICAS.....	32
-----------------------------	----

MUESTRAS CLÍNICAS.....	33
------------------------	----

PARTE 3. RESULTADOS

RESULTADOS.....35

GRÁFICAS.....49

PARTE 4. DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES AL HOSPITAL

DISCUSIÓN.....56

RECOMENDACIONES.....61

BIBIOGRAFÍA.....63

ÍNDICE DE CUADROS, GEL Y GRÁFICAS.

CUADROS.

- MUESTRAS CLINICAS.....33,34
- MUESTRAS, EDAD, SEXO, ORIGEN.....35
- CEPAS SENSIBLES Y RESISTENTES.....36
- CONTENIDO CARRILES DE PFGE.....38
- MUESTRAS Y RESULTADOS PFGE.....41
- CONTENIDO CARRILES GEL PORINAS.....44
- RESULTADO DETERMINACIÓN MBL.....45
- RESULTADO SENSIBILIDAD.....46
- INCIDENCIA.....47
- COMPARACIÓN D ERESULTADOS.....48

GEL.

- GEL DE PFGE.....37,39
- GEL DE PORINAS.....43

GRÁFICAS

- SERVICIO DE PROCEDENCIA.....49
- SERVICIO QUE DETECTA INFECCIÓN.....50
- AISLAMIENTOS POR MES.....51
- SITIOS DE INFECCIÓN.....52
- CLSIFICACIÓN TENOVER.....53
- PERFIL DE RESISTENCIA.....54
- FRECUENCIA POR MES.....55

INTRODUCCIÓN.

Diferentes formas por medio de las cuales los organismos muestran resistencia. Resistencia intrínseca es una forma inherente de resistencia de algunas especies. Por otro lado la resistencia adquirida refleja un verdadero cambio en la composición genética de la bacteria, de forma tal que una droga que previamente había mostrado efectividad, ya no lo es, resultando en una resistencia clínica.

Los mecanismos bacterianos de resistencia son: 1) disminución de la concentración intracelular del fármaco por medio de la disminución de la permeabilidad de la membrana externa , disminución del transporte citoplasmático; 2) por medio de las bombas de efusión ; 3) inactivación enzimática de fármacos; 4) modificación de blancos o desvío de blancos.

Limitar la concentración intracelular del fármaco disminuyendo su ingreso a la célula, aumentando su salida, neutralizando el agente por medio de enzimas, o cambiando los blancos son la forma en la cual las bacterias generan resistencia a determinado fármaco.

Por otro lado los blancos de los antibióticos se encuentran en la pared celular, membrana citoplasmática o en el citoplasma. Adicionalmente las bacterias gram-negativas presentan una membrana externa, la cual les confiere una barrera adicional. Modificaciones en la permeabilidad de la membrana externa por alteraciones en las proteínas porinas y por aumento de los sistemas de bombeo hacia fuera contribuyen a la resistencia de organismos gram negativos. Adicionalmente la liberación de enzimas

inactivadoras a través de la membrana citoplasmática protege los confines del espacio periplasmático.

Los mecanismos por medio de los cuales se limita la concentración intracelular de los fármacos incluyen la disminución de la permeabilidad a través de la membrana externa, disminución de la captación de membrana citoplasmática, de sistemas de bombeo hacia afuera. Los cambios adquiridos en la permeabilidad de la membrana externa de los gram-negativos antes atribuidos a proteínas porinas únicamente, permiten una regulación a la alta de sistemas de bombeo hacia afuera cuya expresión se encuentra ligada a sistemas como MexAB-OprM.

La resistencia que muestran las *Pseudomonas* a los carbapenems puede ser mediada por alteraciones en una porina llamada Opr D.

Las enzimas inactivadoras son el principal mecanismo de resistencia a la mayoría de los antibióticos. La resistencia a los B lactámicos es mediada por una amplia variedad de B lactamasas que inactivan ésta droga. Las B lactamasas pueden ser reguladas por cromosomas o plásmidos, su expresión puede ser aumentada o disminuida. En el caso de los gram-negativos, las B lactamasas son confinadas al espacio periplasmático.

Las modificaciones en el blanco son otro importante mecanismo de defensa de las bacterias. Son producidos por mutaciones mínimas en secuencias genéticas con lo que se crea un nuevo blanco, con menor afinidad por el fármaco. Algunas bacterias muestran mutaciones tan grandes que el blanco del antibiótico ya no es necesario para la supervivencia del organismo-. Esto se logra con nuevos canales metabólicos para la desviación del objetivo primario.

Además de las estrategias efectivas para generar resistencia, las bacterias cuentan con mecanismos de transferencia de genes de resistencia a otros organismos y especies. El genoma bacteriano consiste en DNA cromosomal, el cual codifica las características celulares generales, los mecanismos de reparación celular; así como pequeños y circulares elementos de DNA o plásmidos que codifican actividad bacteriana suplementaria como la virulencia y los factores de resistencia. La mayoría de los genes que confieren resistencia son mediados por plásmidos y pueden ser intercambiados por elementos cromosómicos. Ésta transferencia se puede dar por eventos recombinantes simples, proceso facilitado por los transposones. Los transposones son pequeños elementos de DNA con la capacidad de removerse o insertarse en el DNA cromosomal y plásmido del huésped.

Determinados cromosomas de resistencia son transmitidos de forma vertical por diseminación clonal. La resistencia conferida por plásmidos se transmite tanto de forma vertical como de forma horizontal por medio de procesos de conjugación.

Otro importante mecanismo de resistencia en organismos gram-negativos es la producción de β lactamasas cromosomales inducidas, principalmente Amp^C. La presencia de estas enzimas cromosomales son una característica específica de algunas especies de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*. Organismos nosocomiales virulentos causantes de infecciones fulminantes, quienes por medio de mecanismos efectivos de resistencia son difíciles de tratar.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno nosocomial frecuente. Se asocia hasta en un 9% a todas las infecciones nosocomiales identificadas. Es la causa más frecuente de

neumonía nosocomial, llegando a ser de hasta 17%. Dentro de las unidades de cuidados intensivos son los organismos más comúnmente causales de bacteremia (9%), neumonía nosocomial por gram-negativos (28%), infecciones urinarias por gram-negativos (17%). La producción de AmpC se regula mediante complejas interacciones entre los genes bacterianos. Estas alteraciones se ven influenciadas por cambios en las concentraciones citoplasmáticas de productos intermedios de la degradación y síntesis de peptidoglicanos de mureína.

Inicialmente la AmpC no es producida en grandes cantidades, pero la exposición a B lactámicos causa un aumento transitorio en su producción. El aumento en la producción del AmpC es regulado por cambios en los niveles homeostáticos de productos intermedios de la síntesis de mureína.

Además de la resistencia que confiere la AmpC a los organismos, la relativa impermeabilidad de la capa celular externa y sus alteraciones estructurales contribuyen a la resistencia contra B lactámicos.

En el caso de *Pseudomonas* la resistencia a carbapenems puede ocurrir por la pérdida mutacional de porinas, por zinc B lactamasas (metalo B lactamasas). Estas metalo B lactamasas rápidamente hidrolizan cefalosporinas y penicilinas. Pueden ser codificadas por integrones, además de contar con capacidad de transferencia horizontal entre bacterias.

Los sistemas de bombeo hacia fuera representan otro importante mecanismo de resistencia a carbapenems.

El sistema de efusión es un sistema tripartita codificado por el operón mexAB-oprM.

Éste sistema tripartita consiste en un componente intracelular (MexB, MexD, MexF), que funciona como una división nodular de resistencia; una porción fuera de la membrana celular, posiblemente un componente de formación de canales (OprM, OprJ, Opón); así como una proteína de fusión transmembrana que une los dos componentes previos.

La mayoría de los antibióticos exportados por éste sistema se pone en contacto con éste dentro del citoplasma. Los B lactámicos tienen su blanco a nivel periplasmático. Debido a la naturaleza periplasmática de los B lactámicos, la interacción con el sistema es diferente. Estudios reportan que la interacción de los fármacos con éste sistema debe de iniciar siempre con la porción intramembrana, independientemente de tener mecanismos de acción intra o periplasmáticos.

La resistencia a los antibióticos es posible gracias a genes de resistencia. Éstos genes se expresan y capturan en integrones. Los integrones poseen dos regiones, localizadas a cada lado del casete. El segmento 5' contiene el gen codificador de integrasa (int11), el sitio de integración del casete y el promotor (P). El segmento 3' contiene una zona de lectura de significado desconocido y los determinantes de resistencia desinfectante y sulfonamida. La expresión de los casetes depende de las secuencias de los promotores y de la posición del casete respecto al segmento 5'.

El integrón bla-veb1 codifica un extenso espectro de B lactamasas. El gen veb-1 ha sido identificado en diferentes muestras de pseudomonas. El gen codifica principalmente gracias a diferentes secuencias de inserción. Dentro de las más importantes encontramos

IS 1999, IS 2000. Al activarse éstas secuencias de inserción se logra el movimiento de los promotores, lo que es capaz de modular la expresión de genes de resistencia.

P. aeruginosa es un patógeno que exhibe resistencia intrínseca a diferentes antibióticos incluyendo B lactámicos. Cuenta con una membrana externa con baja permeabilidad, sin embargo esto no explica por si mismo la resistencia. Adicionalmente cuenta con mecanismos que interfieren con el mecanismo por medio del cual los antibióticos se ponen en contacto con sus objetivos. Tal es el caso de los ya mencionados sistemas tripartitas de flujo hacia afuera, determinados por ingeniería genética como MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY/OprM.

Recientemente se ha demostrado que e sistema MexXY/OprM se encuentra también relacionado con resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a múltiples antibióticos como tetraciclina, eritromicina, gentamicina.

Reportados en la literatura encontramos diversos mecanismos por medio de los cuales las *P. aeruginosa* son resistentes a los diversos antibióticos, entre los cuales destacamos una membrana externa impermeable a los medicamentos. Ésta baja permeabilidad se ha asociado a las proteínas de membrana, las porinas. Proteínas que tienen la función de producir canales por medio de los cuales la bacteria introduce y/o excreta diversas partículas. Sabemos que las porinas muestran selectividad mediada por cargas eléctricas, lo que implica que la membrana es capaz de permitir o impedir el paso de partículas. Sabemos que dentro de la información genética de las *P. aeruginosa* existe la porción encargada de la generación de éstas porinas. Genes determinados como lo son el OprM, OprJ, OprD, los cuales codifican para la producción de dichas porinas. Se ha

reportado en la literatura que la expresión de dichos genes se encuentra relacionada con la permeabilidad de la membrana y la consiguiente resistencia a los antibióticos.

Como segundo e importante mecanismo de resistencia, la *P. aeruginosa* cuenta con un efectivo sistema de bombeo, por medio del cual es capaz de bombear los antibióticos que han logrado pasar la membrana. Los genes que codifican dicho sistema se comentaron previamente.

Como tercer mecanismo de resistencia, la *P. aeruginosa* cuenta con la capacidad de producción de metalo beta lactamasas (MBL), las cuales le brindan resistencia específica contra imipemen. Existen reportadas 4 principales tipos de MBL, clasificadas según el grupo de Bush-Jacoby-Meiden:

IMP (Imipenemasa)

VIM (Verona Imipenemasa)

SPM (Sao Paulo MBL)

GTM (German Imipenemasa)

Cada una de ellas es producida gracias a la presencia de un gen específico, el cual es designado según la enzima para la cual codifica.

Existe un cuarto tipo de mecanismo por medio del cual la *P. aeruginosa* es capaz de resistir la administración de imipenem. Éste mecanismo le es útil a la bacteria cuando se encuentra adherida a superficies como catéteres, sondas, etc. Las bacterias se agrupan y se unen formando una capa externa, una especie de película gracias a la cual impiden el contacto del antibiótico con las bacterias de capas internas. Es gracias a éste mecanismo que la bacteria coloniza superficies y se hace resistente a los antibióticos.

Campos Pulsados

El análisis epidemiológico de patógenos nosocomiales por medios moleculares nos brinda información valiosa acerca de posibles brotes de infección derivados de una misma clona, bacterias genéticamente idénticas, por lo tanto con las mismas características y con un origen común.

Dentro de los diferentes tipos de análisis epidemiológico molecular, encontramos al análisis de fragmentos cromosomales obtenidos por restricción enzimática mediante gel de electroforesis en campos pulsados. Un método de genotipificación molecular. Consiste en obtener por separado el DNA de diversas cepas y mediante la utilización de enzimas de restricción, realizar cortes específicos del DNA, obteniendo así múltiples fragmentos de DNA. Éstos fragmentos se colocan en un gel especial y se les aplica mediante un aparato de campos pulsados, pulsos eléctricos con variación de polos. Lo que condiciona la migración del material genético. Dependiendo del tamaño del fragmento de DNA es la distancia que recorrerá. Dicho gel es bañado con líquido para teñir y así poder ser observado en cámara de luz UV. Si contamos con el material genético de diversas cepas, y éstas son clonas, la enzima de restricción realizará cortes en las mismas secuencias, por lo que obtendremos los mismos fragmentos de DNA en cada una de ellas. Lo que implica que la migración en el gel será idéntica. De ésta manera obtendremos el mismo patrón de bandas en el gel. Con lo que podemos demostrar que se trata de la misma clona en diferentes muestras clínicas.

OBJETIVOS:

PRINCIPAL: Establecer la correlación de resistencia a carbapenems por *Pseudomonas aeruginosa* entre la determinada genéticamente y la determinada por Mycroscan, de pacientes con infección Nosocomial del Hospital General Gonzalo Castañeda.

ESPECÍFICOS:

- 1) Determinar la Incidencia en 8 meses de infección Nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital General Gonzalo Castañeda.
- 2) Determinar la frecuencia de resistencia genética a Carapenems de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con infección nosocomiales del Hospital General Gonzalo Castañeda.
- 3) Establecer la correlación de resistencia a Carbapenems de *Pseudomonas aeruginosa* determinada por Mycroscan y la determinación molecular del gen.
- 4) determinar si las cepas estudiadas tienen alguna relación genética entre si.

DISEÑO: Cohorte.

TAMAÑO DE LA MUESTRA: Todos los casos nuevos de febrero de 2005 a octubre del 2005.

PACIENTES:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- 1) Todos los pacientes que ingresen al H.G. Gonzalo Castañeda y desarrollen infección nosocomial.
- 2) Todos los casos de infección nosocomial por *Pseudomonas* con cualquier síndrome infeccioso.
- 3) Cualquier edad.
- 4) Cualquier género.
- 5) Cualquier diagnóstico de ingreso.
- 6) Cualquier servicio

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- 1) Pacientes con infección nosocomial por *Pseudomonas* procedentes de otro hospital.

MÉTODOS:

Detección de casos de infección nosocomial a través del monitoreo activo en el H.G. Gonzalo Castañeda, de acuerdo a los criterios de los CDC.

Determinar el agente causal y drogosensibilidad a través del Mycroscan.

Determinación por medio de PCR de genes conocidos de conferir resistencia intrínseca a *Pseudomonas* contra carbapemens.

Laboratorio

Muestras: Procesar las muestras de pacientes en quienes se sospecha de infección a fin de aislar e identificar al germen causal. Las muestras se tomarán con las debidas precauciones, dependiendo del sitio de origen, así como del germen probablemente productor de la infección.

Todo espécimen será procesado en al área de bacteriología del H.G. Gonzalo Castañeda. Inicialmente se realzará tinción de gram. Posteriormente se realizará la siembra en medios de cultivo específicos. Una parte de la muestra será introducida en caldo de cultivo, especialmente cuando sea irrepitible la toma de la muestra. Cuando el caldo de cultivo se torna turbio, se toma muestra para medio sólido. Para los medios de cultivo

sólidos, se utiliza una pequeña asa de metal para sembrar. Incubación de los medios a 37°C. Empezando así la multiplicación bacteriana, las colonias son visibles luego de 18-24hrs de incubación. Cada colonia representa al producto de la reproducción de un organismo, siendo en esencia una clona pura. Tomando en cuenta parámetros como la morfología de la colonia, condiciones atmosféricas de crecimiento, el especialista es capaz de dar un reporte preliminar del tipo de bacteria, tomando así la decisión de qué procedimiento seguir.

Identificación de bacterias gram negativas: La tinción de gram es útil para una presuntiva identificación. El especialista es capaz de identificar bacterias coniformes, *Pseudomonas*, *Haemófilus*.

La identificación de las bacterias así como el patrón de drogosensibilidad se llevará cabo en el H.G. Gonzalo Castañeda por medio del mycroscan, el cual determinará que germen es el que se ha desarrollado, de la misma forma nos brindará la información acerca de su sensibilidad a la aplicación de diversos antibióticos.

El Laboratorio entregó el reporte correspondiente, donde especifica nombre del paciente, fecha de la toma de la muestra, tipo de muestra, germen aislado y patrón de sensibilidad.

De todos los aislamientos obtenidos en el periodo de tiempo del estudio, se seleccionaron aquellos que resultaron positivos para *Pseudomonas aeruginosa* y cuyo patrón de sensibilidad mostraba resistencia a Imipenem.

De todos los cultivos que reunían éstas características, se hizo una nueva selección, para identificar los que cumplieran con los criterios de la CDC para ser considerados como infección nosocomial.

Una vez hecha la selección, se enviaron las cepas en medios de transporte al Instituto Nacional de Salud Pública. A su llegada al instituto, las muestras fueron sembradas en medios de cultivo enriquecido MH, a fin de purificar la cepa para obtener los aislamientos y poder trabajar en ellos. Una vez obtenidos los aislamientos puros, se realizó nueva determinación de germen y patrón de sensibilidad por medio de mycroscan, a fin de corroborar los datos proporcionados por el hospital.

Una vez teniendo la confirmación de germen y sensibilidad se dio paso a las diversas pruebas.

GEL DE ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSADOS.

De los aislamientos obtenidos, se toma una pequeña muestra con asa metálica y se colocan en medio de cultivo MH líquido. Incubación de la cepa en dicho medio entre 16-18hrs en agitación suave a 37oC. Obtener 1 ml de solución bacteriana en un ependorff y centrifugar a 13000 rpm por 2 min a 4oC. Desechar sobrenadante y resuspender con 200microL de PIV frío y agitar. Agregar 240 microL más de PIV. Tomar 150 microL en otro ependorff para hacer discos.

Previamente se pesa 0.075gr de agarosa especial en 5ml de PIV, se lleva al mechero, posteriormente pones azarosa en baño maría a 42oC.

Colocar 1 ml de buffer EC por cepa en tubo de 15ml, agregar 5 ml de RNAasa por muestra más 10microL de lizosima.

Una vez realizado esto, se colocan las muestras a 42oC por 3 minutos.

A la solución bacteriana se agregan 150 microL de azarosa y vortexear, tomar 20 microL para el disco. En una base de vidrio se colocan las muestras, se cubren con cubreobjetos, se llevan a -20oC por 5 minutos. Colocar los discos en tubo de fondo

redondo con el 1ml de buffer EC más 5 microL de RNAasa y lizosima, incubar a 37oC por 3 hrs.

Pesar 0.001gr de Proteinasa K (cisterna) por ml por muestra en ES. Descartar sobrenadante de tubos con discos y agregar el mililitro de ES-proteinasa K y dejar a 50oC en baño maría sin agitación toda la noche. Al día siguiente desechar sobrenadante y agregar 13ml de buffer TE 1x para lavados, los cuales se realizan 5 en una hora. Mantener los discos con el buffer TE1x a 4oC.

Se coloca 1 disco en un eppendorf con 200 microL de buffer de restricción e incubar a 37oC por 30 min. Remover buffer.

Restricción:

Agregar 45microL de buffer de restricción conteniendo 25u de enzima XbaI e incubar a 37oC. Agregar buffer y poner a 4oC.

Electroforesis:

Encender equipo y lavar la cámara. Preparar gel con azarosa previamente calentada. Una vez teniendo el gel listo, colocar los discos dentro, así mismo colocar el gel dentro del equipo, programar equipo y dejarlo por lo menos 24 hrs. Obtener el gel, utilizar revelador y observarlo en cámara de luz UV.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA PORINAS.

Obtener una muestra con asa metálica de los cultivos purificados.

Crece las bacterias toda la noche a 37oC, en matraces con medio líquido LB. Centrifugar a 5000 rpm por 5 min a 4oC. Eliminar sobrenadante. Adicionar 10ml de Na₂HPO₄ y centrifugar. Sonicar por 3min. Centrifugar a 5000 rpm a 4oC, obtener sobrenadante. Ultracentrifugar a 40000 rpm por 40 min a 4oC. Eliminar sobrenadante y

resuspender en tritan X 100 al 2% en Na₂HPO₄ 7.2. Incubar por 15 min a 37oC. Ultracentrifugar a 40000 rpm por 40 MIN a 4oC, Eliminar sobrenadante. Resuspender en 200 microL de Na₂HPO₄ pH 7.2 y congelar.

Preparar gel inferior con archilamida al 40%, Tris 1m pH 8.8, agua, SDS 10%, Temed, APS. Preparar gel superior con archilamida al 40%, Tris IM pH 6.8, agua, SDS 10%, Temed, APS.

Colocar el gel en aparato de electroforesis. Posteriormente obtener gel, revelar y observar en cámara de luz UV.

DETERMINACIÓN DE METABOBETALACTAMASAS

Se realiza la siembra de las cepas estudiadas en medio de cultivo sólido. Se incuban a 37oC toda la noche. Se colocan discos en las regiones donde han crecido las bacterias. El primero de los discos contiene antibiótico imipenem, el segundo disco contiene ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el tercer disco contiene ceftazidima/clavulanato. Posteriormente es necesaria la lectura de los halos de inhibición, en busca del patrón correspondiente a la existencia de metalobetalactamasas.

REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA.

Obtener de las muestras con cepas purificadas una colonia y colocarla en eppendorff con agua estéril. Por medio se choque térmico realizar la obtención de DNA. Una vez obtenido el DNA, utilizar los oligos específicos para las secuencias deseadas. Se utiliza de la misma forma TAC, que es una enzima de restricción, para cortar secuencias

específicas. Utilizando Mg como cofactor. Hecha la mezcla se introduce en amplificador de DNA. Una vez amplificado el material, se coloca en gel previamente preparado, se inicia proceso de electroforesis. Posteriormente de tiñe el gel, se observa en cámara de luz UV.

Por último se realiza una nueva determinación de la sensibilidad de la bacteria pero ahora por método de concentración inhibitoria mínima (MIC) por la técnica de dilución en agar siguiendo las indicaciones del National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS).

VARIABLES:

1) Infecciones nosocomiales, según los criterios de la CDC de 1988.

1. INFECCIÓN DE HERIDA QUIRÚRGICA:

1.1. Infección superficial de la incisión:

1.1.1. Aparición dentro de los 30 días que siguen a la cirugía.

1.1.2. Afectan a la piel, tejido celular subcutáneo o músculo por encima de la fascia y debe cumplir alguno de los siguientes criterios:

- Drenaje purulento.
- Aislamiento de microorganismos en herida cerrada de forma primaria.
- Herida deliberadamente abierta, excepto los casos en los que el cultivo es negativo.
- Diagnóstico de infección por el médico o el cirujano.
- Tipo de variable: Cualitativa
- Escala de medición: Si, No

1.2. Infección profunda de la herida quirúrgica:

1.2.1. En los primeros 30 días, o dentro del primer año si existen implantes.

1.2.2. Ante cualquiera de los siguientes criterios:

- Drenaje purulento.

- Dehiscencia espontánea en paciente febril y/o dolor o hipersensibilidad localizados, excepto los casos en los que el cultivo es negativo.
- Absceso diagnosticado por inspección, cirugía o examen histopatológico.
- Diagnóstico de infección por el médico o el cirujano.
- Tipo de variable: cualitativa
- Escala de medición. Si, No

1.3. Infección de órgano o espacio:

1.3.1. En los primeros 30 días, o dentro del primer año si existen implantes.

1.3.2. Ante cualquiera de los siguientes criterios:

- Líquido purulento recogido por drenaje de órgano o espacio.
- Aislamiento de microorganismos en muestras de órganos o espacios.
- Absceso diagnosticado por inspección, cirugía o examen histopatológico de órgano o espacio.
- Diagnóstico de infección por el médico o el cirujano.
- Tipo de variable: cualitativa
- Escala de medición: Si, No

2. BACTERIEMIA PRIMARIA:

2.1. Patógeno reconocido aislado en hemocultivo y que no está en relación con otra localización, excepto dispositivos intravasculares, ó

2.2. Uno de los siguientes: fiebre $>38^{\circ}\text{C}$, escalofríos o hipotensión, con uno de los siguientes:

2.2.1. Contaminante común de la piel aislado en dos hemocultivos tomados en diferentes localizaciones, y no relacionados con infecciones de otra localización.

2.2.2. Contaminante común de la piel aislado en hemocultivo de paciente con

dispositivo intravascular y sometido a tratamiento antibiótico apropiado.

2.2.3. Antigenemia positiva y que el organismo no esté relacionado con la infección en otra localización.

Tipo de variable: cualitativa.

Escala de medición: Si, No

3. NEUMONÍA: debe cumplir cualquiera de los siguientes criterios

3.1. Estertores crepitantes o matidez a la percusión y al menos uno de los siguientes:

3.1.1. Nueva aparición de esputo purulento o cambio en las características del esputo.

3.1.2. Hemocultivo positivo.

3.1.3. Cultivo positivo de aspirado traqueal, cepillado bronquial o biopsia.

3.2. Infiltrado nuevo o progresivo, consolidación, cavitación o derrame pleural en RX de tórax y cualquiera de los siguientes:

3.2.1. Nueva aparición de esputo purulento o cambio en las características del esputo.

3.2.2. Hemocultivo positivo.

3.2.3. Cultivo positivo de aspirado traqueal (>10⁶ ufc/ml), cepillado bronquial (>10³ ufc/ml) o biopsia (>10⁴ ufc/ml).

3.2.4. Aislamiento de virus o detección de antígeno viral en secreciones respiratorias.

3.2.5. Título diagnóstico de anticuerpos específicos (IgM) aislado, o incremento de cuatro veces en muestras séricas pareadas del patógeno (IgG).

3.2.6. Evidencia histopatológica de neumonía.

(ufc: unidades formadoras de colonias.)

Tipo de variable: cualitativa

Escala de Medición: Si, No

4. INFECCIÓN DEL TRACTO RESPIRATORIO INFERIOR SIN EVIDENCIA DE NEUMONÍA:

4.1. Bronquitis, traqueobronquitis, bronquiolitis, traqueitis: en ausencia de signos clínicos o radiológicos de neumonía cumple dos de los siguientes criterios: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), tos, esputo reciente o incremento en la producción del mismo, estertores, disnea y cualquiera de los siguientes:

4.1.1. Aislamiento de microorganismos en cultivo de secreciones bronquiales por aspirado traqueal o por broncoscopia.

4.1.2. Detección de antígeno positivo en secreciones respiratorias.

4.2. Otras infecciones, incluyendo absceso pulmonar y empiema, deben ajustarse a los siguientes criterios:

4.2.1. Visualización de microorganismos en muestras aisladas del cultivo de tejido, fluido pulmonar o líquido pleural.

4.2.2. Absceso pulmonar o empiema visualizado durante la cirugía o por examen histopatológico.

4.2.3. Absceso cavitado visualizado por estudio radiológico de pulmón.

Tipo de variable: cualitativa.

Escala de medición. Si, No.

5. INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO:

5.1. Infección sintomática de las vías urinarias:

5.1.1. Uno de los siguientes: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), tenesmo, polaquiuria, disuria o dolorimiento suprapúbico. Y cultivo de orina con $\geq 10^5$ organismos/ml con no más de dos especies de organismos, o

5.1.2. Dos de los siguientes: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), tenesmo, polaquiuria, disuria o dolorimiento suprapúbico y cualquiera de los siguientes:

- Nitratos o leucocito-esterasa positivo.
- Piuria >10 leucocitos/ml.
- Visualización de microorganismos en la tinción de Gram.
- Dos urocultivos con $>10^2$ organismos/ml del mismo germen.
- Urocultivo con $\geq 10^5$ colonias/ml de orina de un solo patógeno en paciente tratado con terapia antimicrobiana apropiada.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición. Si, No

5.2. Bacteriuria asintomática:

5.2.1. Paciente sin fiebre, tenesmo, polaquiuria, disuria o dolorimiento suprapúbico con:

- Sonda urinaria presente siete días antes de un cultivo de orina y cultivo de orina con $\geq 10^5$ organismos/ml con no más de dos especies de organismos, o
- Sonda urinaria no presente siete días antes del primero de dos cultivos de orina y cultivo de orina con $\geq 10^5$ organismos/ml del mismo germen.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición. Si, No.

5.3. Infección de otras regiones del tracto urinario:

5.3.1. Microorganismos aislados del cultivo de fluidos, excepto orina, de los tejidos del lugar afectado.

5.3.2. Absceso u otra evidencia de infección apreciable bajo examen directo o análisis

histopatológico,

o

5.3.3. Dos de los siguientes: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), dolor o hipersensibilidad local y alguno de los siguientes criterios:

- Drenaje purulento.
- Hemocultivo positivo.
- Evidencia radiológica de infección.
- Diagnóstico de infección por el médico o el cirujano.
- Prescripción antibiótica adecuada su médico.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición: Si, No

6. INFECCIÓN DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR:

6.1. Infección arterial y venosa:

6.1.1. Organismo aislado del cultivo de arterias o venas obtenidas durante cirugía y hemocultivo negativo o no realizado.

6.1.2. Evidencia de infección en la zona vascular afectada observada durante la cirugía o por examen histopatológico.

6.1.3. Uno de los siguientes: fiebre (38°C), dolor, eritema o calor en la zona vascular afectada y los dos criterios siguientes:

- Cultivo de más de 15 colonias en el extremo del catéter intravascular por el método de cultivo semicuantitativo.
- Hemocultivo negativo o no realizado.

6.1.4. Drenaje purulento de la zona vascular afectada y hemocultivo negativo o no realizado.

6.2.

Endocarditis:

6.2.1. Organismo aislado del cultivo de la válvula o vegetación, o

6.2.2. Dos de los siguientes criterios sin otra causa aparente: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), soplo nuevo diferente, fenómenos embólicos, manifestaciones cutáneas, insuficiencia cardíaca congestiva o trastornos de la conducción cardíaca, y el médico prescribe el tratamiento correcto y cualquiera de los siguientes criterios:

- Germen aislado en dos hemocultivos, organismos visualizados bajo tinción de Gram de la válvula cuando el cultivo es negativo o no se ha efectuado.
- Vegetación valvular observada durante la intervención quirúrgica o durante la autopsia.
- Detección de antígenos en sangre o en orina.
- Evidencia de una nueva vegetación mediante ecografía.

6.3.

Miocarditis

y

pericarditis:

6.3.1. Organismo aislado del cultivo del pericardio o del líquido pericárdico obtenido por punción o por cirugía, o

6.3.2. Dos de los siguientes criterios sin otra causa aparente: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), dolor torácico, pulso paradójico o aumento del tamaño de la silueta cardíaca y cualquiera de los siguientes criterios:

- Alteraciones ECG compatibles con pericarditis o miocarditis.
- Test de antígeno positivo en sangre.
- Evidencia de miocarditis o pericarditis por examen histológico del tejido cardíaco.
- Seroconversión de anticuerpos del tipo específico con o sin aislamiento del virus en faringe o heces.

- Derrame pericárdico diagnosticado por ecografía.
- TAC, RMN, angiografía u otra evidencia radiológica de infección.

(TAC: tomografía axial computerizada; RMN: resonancia magnética nuclear.)

6.4. Mediastinitis:

6.4.1. Organismo aislado del cultivo del mediastino o líquido obtenido por punción o por cirugía.

6.4.2. Evidencia de mediastinitis apreciable durante la cirugía o por examen histopatológico, o

6.4.3. Uno de los siguientes criterios: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), dolor torácico o inestabilidad esternal y cualquiera de los siguientes criterios:

- Drenaje purulento en la zona del mediastino.
- Organismo aislado en hemocultivo o en cultivo de drenaje del mediastino.
- Ensanchamiento mediastínico en el examen radiológico.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición: Si, No.

7. INFECCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL:

7.1. Infección intracraneal:

7.1.1. Organismo aislado del cultivo del tejido cerebral o duramadre.

7.1.2. Absceso o evidencia de infección intracraneal observados durante la cirugía o por examen histopatológico, o

7.1.3. Dos de los siguientes criterios sin otra causa aparente: cefalea, vértigos, fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), focalidad neurológica, cambios del nivel de consciencia y el médico prescribe tratamiento adecuado, y cualquiera de los siguientes:

- Visualización de microorganismos en tejido cerebral o tejido de absceso obtenido por punción, biopsia o autopsia.
- Detección de antígeno en sangre u orina.
- Evidencia radiológica de infección.
- Diagnóstico por anticuerpos simples (IgM) o seroconversión de IgG.

7.2. Meningitis y ventriculitis:

7.2.1. Organismo aislado del cultivo de LCR, o

7.2.2. Uno de los siguientes criterios sin otra causa aparente: cefalea, fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), rigidez de nuca, signos meníngeos, alteraciones en pares craneales y el médico prescribe tratamiento adecuado, y cualquiera de los siguientes:

- Aumento de leucocitos, proteínas elevadas y/o glucosa disminuida en LCR.
- Visualización de microorganismos por tinción de Gram en LCR.
- Organismos aislados en hemocultivo.
- Detección de antígenos en LCR, sangre u orina.
- Diagnóstico por anticuerpos simples (IgM) o seroconversión de IgG.

(LCR: líquido cefalorraquídeo.)

7.3. Absceso espinal sin meningitis:

7.3.1. Aislamiento de gérmenes en absceso de espacio epidural o subdural.

7.3.2. Absceso en espacio epidural o subdural identificado por cirugía o examen histopatológico, o

7.3.3. Uno de los siguientes criterios sin otra causa aparente: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), dolor de espalda, hipersensibilidad local, radiculitis, paraparesia o paraplejía y el médico prescribe tratamiento adecuado, y cualquiera de los siguientes:

- Aislamiento del germen en hemocultivo.
- Evidencia radiológica de absceso espinal.
- Tipo de variable: cualitativa
- Escala de medición. Si, No

8. SINUSITIS:

8.1. Organismo aislado en material purulento de un seno paranasal, o

8.1.1. Uno de los siguientes criterios sin otra causa aparente: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), dolor sobre el seno afecto, cefalea, exudado purulento, obstrucción nasal y los dos siguientes:

- Transiluminación positiva.
- Evidencia radiográfica de infección.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición: Si, No

9. INFECCIÓN DEL TRACTO GASTROINTESTINAL:

9.1. Gastroenteritis:

9.1.1. Diarrea de comienzo agudo

9.1.2. (heces líquidas durante más de 12 h) con o sin vómitos o fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$) y ausencia de causa no infecciosa probable, o

9.1.3. Dos de los siguientes sin otra causa reconocida: náuseas, vómitos, dolor abdominal, cefalea, y alguno de los siguientes:

- Patógeno entérico aislado en coprocultivo o torunda rectal.
- Patógeno entérico detectado por microscopía óptica o electrónica.
- Patógeno entérico detectado por antígenos o anticuerpos en heces o sangre.

- Evidencia de patógeno entérico detectado por cambios citológicos en cultivo de tejidos (toxinas).
- Título diagnóstico de anticuerpos (IgM) o seroconversión (elevación 4 veces) de IgG.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición. Si, No

9.2. Infecciones de esófago, estómago, intestino delgado, grueso y recto:

9.2.1. Absceso u otra evidencia de infección observada por cirugía, examen histopatológico, o

9.2.2. Dos de los siguientes sin otra causa aparente compatible con infección del órgano o tejido afecto: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), náuseas, vómitos, dolor o hipersensibilidad abdominal, y alguno de los siguientes:

- Aislamiento de gérmenes en drenaje o tejido obtenido por endoscopia o cirugía.
- Visualización de microorganismos por tinción de Gram u OHK o células gigantes multinucleadas en drenaje o tejido obtenido por cirugía o endoscopia.
- Aislamiento de gérmenes en hemocultivo.
- Evidencia radiológica de infección.
- Hallazgos patológicos por endoscopia.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición: Si, No.

9.3. Infecciones de vesícula biliar, hígado (excepto hepatitis vírica), bazo, páncreas, peritoneo, espacio subfrénico y otros tejidos y regiones intraabdominales:

9.3.1. Aislamiento de microorganismos en material purulento del espacio intraabdominal por cirugía o por punción.

9.3.2. Absceso u otra evidencia de infección intraabdominal observada por cirugía, examen histopatológico, o

9.3.3. Dos de los siguientes sin otra causa aparente: fiebre ($>38^{\circ}\text{C}$), náuseas, vómitos, dolor abdominal, ictericia, y alguno de los siguientes:

- Aislamiento de gérmenes en drenaje o tejido obtenido por endoscopia o cirugía.
- Visualización de microorganismos por tinción de Gram en drenaje o tejido obtenido por cirugía o endoscopia.
- Aislamiento de gérmenes en hemocultivo y evidencia radiológica de infección.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición. Si, No

10. INFECCIÓN DE PIEL Y TEJIDOS BLANDOS:

10.1. Piel:

10.1.1. Drenaje purulento, pústulas, vesículas o ampollas, o

10.1.2. Dos de los siguientes en la zona afectada: dolor o hipersensibilidad localizados, hinchazón, enrojecimiento o calor y cualquiera de lo que sigue:

- Aislamiento de microorganismos en aspirado o drenaje de la zona afectada. Si el germen es habitual en la piel, deberá haber un cultivo puro de un único germen.
- Hemocultivo positivo.
- Presencia de antígenos en tejido infectado o en sangre.
- Células gigantes multinucleadas en el tejido afectado.
- Diagnóstico por titulación de anticuerpos simples (IgM) o seroconversión de IgG).
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición: Si, No

10.2. Tejidos blandos (fascitis necrotizante, gangrena infecciosa, celulitis necrotizante, miositis infecciosa, linfadenitis o linfangitis):

10.2.1. Aislamiento de gérmenes en el tejido o en material de drenaje de la zona afectada.

10.2.2. Drenaje purulento de la zona afectada.

10.2.3. Absceso u otra evidencia de infección visualizado por cirugía o examen histopatológico, o

10.2.4. Dos de los siguientes en la zona afectada: dolor o hipersensibilidad localizados, hinchazón, enrojecimiento o calor y cualquiera de lo que sigue:

- Hemocultivo positivo.
- Diagnóstico por titulación de anticuerpos simples (IgM) o seroconversión de IgG).
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición: Si, no.

10.3. Infección de úlcera de decúbito:

Enrojecimiento, hipersensibilidad o hinchazón de los bordes de la herida y cualquiera de lo que sigue:

- Aislamiento de gérmenes en fluidos del borde de la úlcera obtenidos por punción o biopsia.
- Hemocultivo positivo.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición: Si, No

10.4. Infección de quemaduras:

10.4.1. Alteración del aspecto o las características de la quemadura y biopsia de la quemadura que muestre invasión de gérmenes en tejido contiguo viable, o

10.4.2. Alteración del aspecto o las características de la quemadura y cualquiera de lo que sigue:

- Hemocultivo positivo sin otra infección identificable.
- Aislamiento de virus del herpes simple, identificación de inclusiones o de partículas virales en biopsias o raspados de la lesión, o

10.4.3. Dos de los siguientes: fiebre (38°C), hipotensión (TAS \geq 90 mm Hg), oliguria (<20 ml/h), hiperglucemia, confusión mental y cualquiera de lo que sigue:

- Invasión de tejido contiguo viable visualizada en biopsia de la quemadura.
- Hemocultivo positivo.
- Aislamiento de virus del herpes simple, identificación de inclusiones o visualización de partículas virales en biopsias o raspados de la lesión.
- Tipo de variable: cualitativa.
- Escala de medición: Si, No.

5) Diagnóstico de ingreso .- Dx motivo de internamiento al H. G. Gonzalo Castañeda de acuerdo a criterios internacionales. Variable cualitativa /escala de medición, Dx. DM, IAM, IVRB, etc.

- 6) Género: Masculino.- género perteneciente al macho, viril. Femenino.- propio de mujer. Tipo de variable: cualitativa. Escala de medición: masculino y femenino.
- 7) Edad. Tiempo transcurrido desde el nacimiento, duración de la vida. Tipo de variable. cuantitativa. Escala de medición: edad en años cumplidos y meses.
- 8) Tratamiento previo con carbapenems. Tipo de variable: cualitativo. Uso de antibiótico por diagnóstico de infección, previo a la toma de muestra. Escala de medición: Si, No.
- 9) Servicio donde adquiere infección nosocomial : 1.- Urgencias, 2.- Medicina Interna, 3.- Cirugía General, 4.- Pediatría, 5.- UCI, 6.- Ginecología, 7.- Quirófano, 8.- Tococirugía.
- 10) Resistencia Genética: Mecanismo genético por medio del cual la bacteria es inmune a los antibióticos.
- 11) Resistencia mycroscan: Parámetro de laboratorio obtenido por el método de sensibilidad automatizada, que indica que la bacteria es inmune al antibiótico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- 1) Los Datos genéricos se analizarán con frecuencias simples y medidas de tendencia central.
- 2) Incidencia: por tasa de incidencia específica. Formula :

TI: Casos nuevos de una enfermedad durante el periodo de seguimiento.

Suma de los tiempos individuales de observación

- 3) Comparaciones: Entre la expresión genética y la CMI del carbapemen por servicio, genero y edad.
- 4) Prueba de significancia λ_2 de Mantel Hanzsel con corrección de Yates. Punto critico de $p < 0.05$

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

La sugerencia al hospital del uso racional de Carbapenems en caso de que se demuestre resistencia genética a éste tipo de antibióticos.

MUESTRAS CLÍNICAS.

No. CEPA	PACIENTE	ORIGEN DE LA MUESTRA
5734	1	Her. Quir.
5735	2	Sec. Escara
5745	3	Cult. catéter
5723-3	4	Cul. Sec. Catéter
5701-2	5	Urocultivo
5763	6	c.sec.cat
5747	7	Sec. Her. Quirúrgica
5726-1	8	Punta de catéter
5741	9	Cul. Her. Qx
5737	10	Urocultivo
5765	11	Urocultivo
5719	12	Cul. Herida
5758	13	c.sec.cat
5739	14	Cul. Her. Qx
5777	15	c. p. Cat.

No. CEPA	NOMBRE PACIENTE	ORIGEN DE LA MUESTRA
5766	16	c. Liq. Diálisis
5705-2	17	Cul. Herida
5703-1	18	Cu. Sec. Escara
5715	19	Cul. Catéter
5776	20	Urocultivo
5722	21	C. Secreción
5749	22	Sec. Her. Quirúrgica
5733	23	Cul. Aspirado Bronq.
5771	24	c. Liq. Diálisis
5761	25	c.sec.cat
2067726	26	Urocultivo
5738	27	Secreción de sitio de inserción de catéter de Tenckhoff
5742	28	Cul. Her. Qx
5764	29	Urocultivo
5702	30	C. Punta catéter

RESULTADOS:

No. CEPA	NOMBRE PACIENTE	SEXO	EDAD (AÑOS)	FECHA AISLAMIENTO	ORIGEN DE LA MUESTRA
5734	CMD	F	93	29/07/2005	Her. Quir.
5735	CRM	F	48	08/07/2005	Sec. Escara
5745	CMA	M	82	19/07/2005	Cult. catéter
5723-3	DRM	F	80	12/05/2005	Cul. Sec. Catéter
5701-2	DHB	F	70	21-02-05	Urocultivo
5763	EHC	F	71	10/04/2005	c.sec.cat
5747	GJM	F	38	17/06/2005	Sec. Her. Quirúrgica
5726-1	GMM	F	66	27/06/2005	Punta de catéter
5741	GRR	F	72	12/08/2005	Cul. Her. Qx
5737	GRR	F	62	03/08/2005	Orina
5765	GCJ	M	59	02/09/2005	Urocultivo
5719	GAC	M	71	25-04-05	Cul. Herida
5758	GFM	F	40	19/08/2005	c.sec.cat
5739	GSG	M	74	12/07/2005	Cul. Her. Qx
5777	HRS	F	76	27/09/2005	c. p. Cat.
5766	IM	M	57	29/08/2005	c. Liq. Diálisis
5705-2	JDM	F	34	14-03-05	Cul. Herida
5703-1	MNJ	M	65	25-02-05	Cu. Sec. Escara
5715	MFF	F	67	22-03-05	Cul. Catéter
5776	MGM	F	43	07/09/2005	Urocultivo
5722	OCM	M	53	03-05-05	C. Secreción
5749	PBA	F	69	07/07/2005	Sec. Her. Quirúrgica
5733	PHG	F	76	29/07/2005	Cul. Aspirado Bronq.
5771	PLJ	M	65	05/10/2005	c. Liq. Diálisis
5761	RCE	F	73	05/09/2005	c.sec.cat
5776	SGC	F	77	04-04-05	Urocultivo
5738	SWM	F	76	21/07/2005	Secreción de sitio de inserción de catéter de Tenckhoff
5742	SAD	M	88	05/08/2005	Cul. Her. Qx
5764	VLC	F	64	21/09/2005	Urocultivo
5702	VLF	M	68	22-02-05	C. Punta catéter

De las 30 muestras enviadas al Instituto Nacional de Salud Pública, a las cuales se les realiza inicialmente nueva determinación bacteriana y sensibilidad a los antimicrobianos, se encuentra lo siguiente:

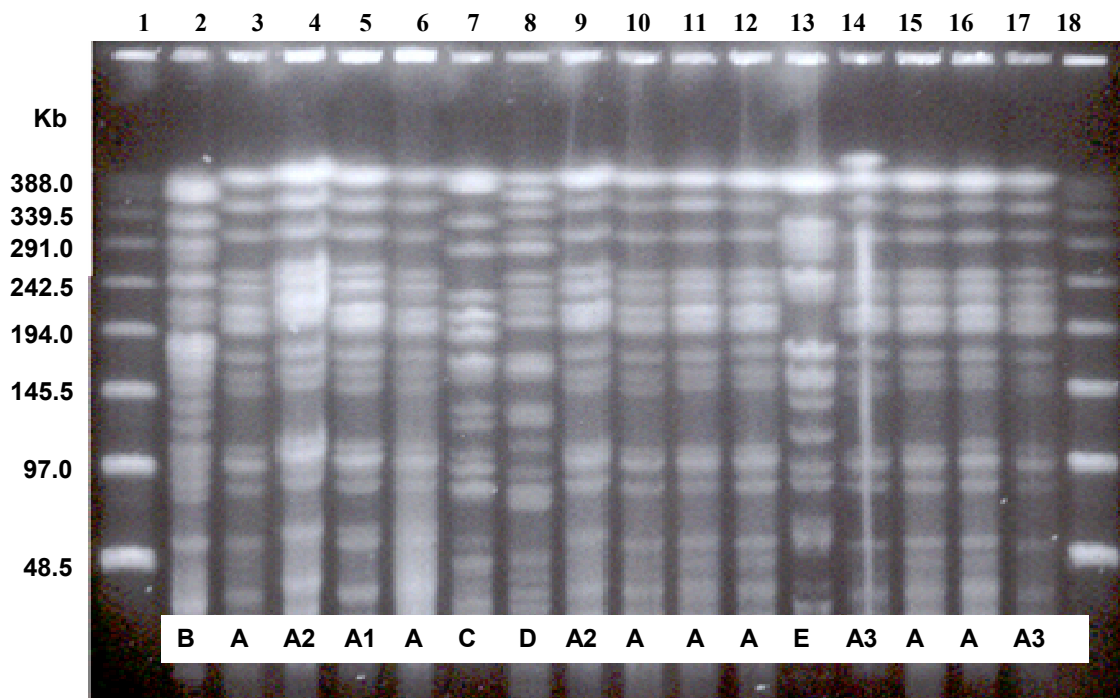
Al momento de iniciar con la siembra de las muestras enviadas del hospital, no fue posible recuperar dos de ellas, las cepas 5715 y 5758, no hubo crecimiento. Una tercera cepa, la 5734 al sembrar la muestra se obtuvo crecimiento de *Shigella*. Una más de las muestras se encontraba repetida, por lo que se procesan 26 muestras.

Del resto de las muestras, un total de 26 cepas distintas, se les realiza nueva determinación de sensibilidad por mycroscam, obteniendo:

CEPAS RESISTENTES	CEPAS SENSIBLES
5719	5702
5722	5738
5733	5742
5735	5747
5737	5761
5739	5763
5741	5765
5745	5771
5749	5777
5764	5746
5766	
5776	
5701-2	
5703-1	
5723-3	
5707	

CAMPOS PULSADOS.

De las cepas que se corroboró la resistencia a imipenem, se tomo nueva muestra y se realizó estudio de electroforesis en gel de campos pulsaos, obteniendo los siguientes resultados:

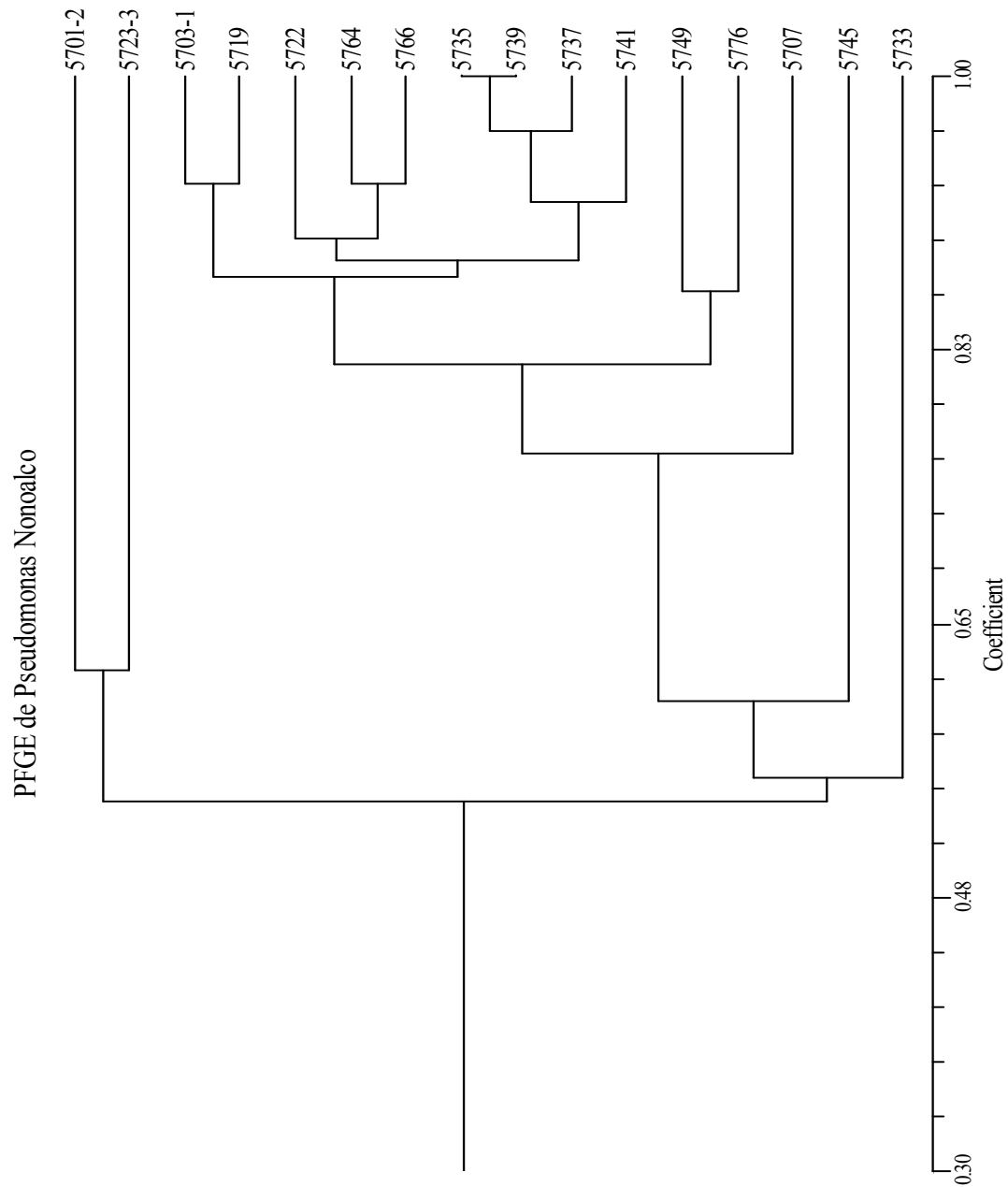


CAMPOS PULSADOS.

CARRILES	CONTENIDO
1	Lambda Ladder PFGE marker
2	5701-2
3	5703-1
4	5707
5	5719
6	5722
7	5723-3
8	5733
9	5735
10	5737
11	5739
12	5741
13	5745
14	5749
15	5764
16	5766
17	5776
18	Lambda Ladder PFGE marker

DENDROGRAMA.

Utilizando un sistema de código binario basado en la ubicación de las bandas en las imágenes previas para la interpretación del estudio de campos pulsados podemos obtener el siguiente dendrograma ó árbol de similitud:



Tomando como base el dendrograma, donde se observa el coeficiente de similitud en la parte inferior de la imagen, y utilizando los criterios de Tenover para interpretación, obtenemos la siguiente clasificación:

No. CEPA	FECHA AISLAMIENTO	ORIGEN DE LA MUESTRA	PFGE
5766	29/08/2005	Cul. Liq. Diálisis	A
5703-1	25/02/2005	Cul. Sec. Escara	A
5739	12/07/2005	Cul. Her. Qx	A
5741	12/08/2005	Cul. Her. Qx	A
5737	03/08/2005	Urocultivo	A
5764	21/09/2005	Urocultivo	A
5776	07/09/2005	Urocultivo	A
5722	03/05/2005	Cul. Secreción	A1
5719	25/04/2005	Cul. Herida	A1
5707	14/03/2005	Cul. Herida	A2
5735	08/07/2005	Sec. Escara	A2
5749	07/07/2005	Sec. Her. Quirúrgica	A3
5701-2	21/02/2005	Urocultivo	B
5723-3	12/05/2005	Cul. Sec. Catéter	C
5733	29/07/2005	Cul. Aspirado Bronq.	D
5745	19/07/2005	Cult. catéter	E

Criterios de Tenover para Campos Pulsados:

Indistinguible.- Los patrones de restricción tienen el mismo número de bandas y éstas son del mismo tamaño. Representan la misma cepa, son clonas. Todas ellas serán denominadas con la letra “A”.

Cercanamente relacionadas.- Son aquellas que presentan discretas diferencias en sus bandas comparadas con la cepa A. Los cambios corresponden con a un evento genético único. Éste cambio está definido por una mutación puntual, ya sea delección ó inserción de DNA. Dichos cambios resultan en diferencias de 2-3 bandas. Se denominan con la misma letra “A”, pero se agrega el subíndice 1.

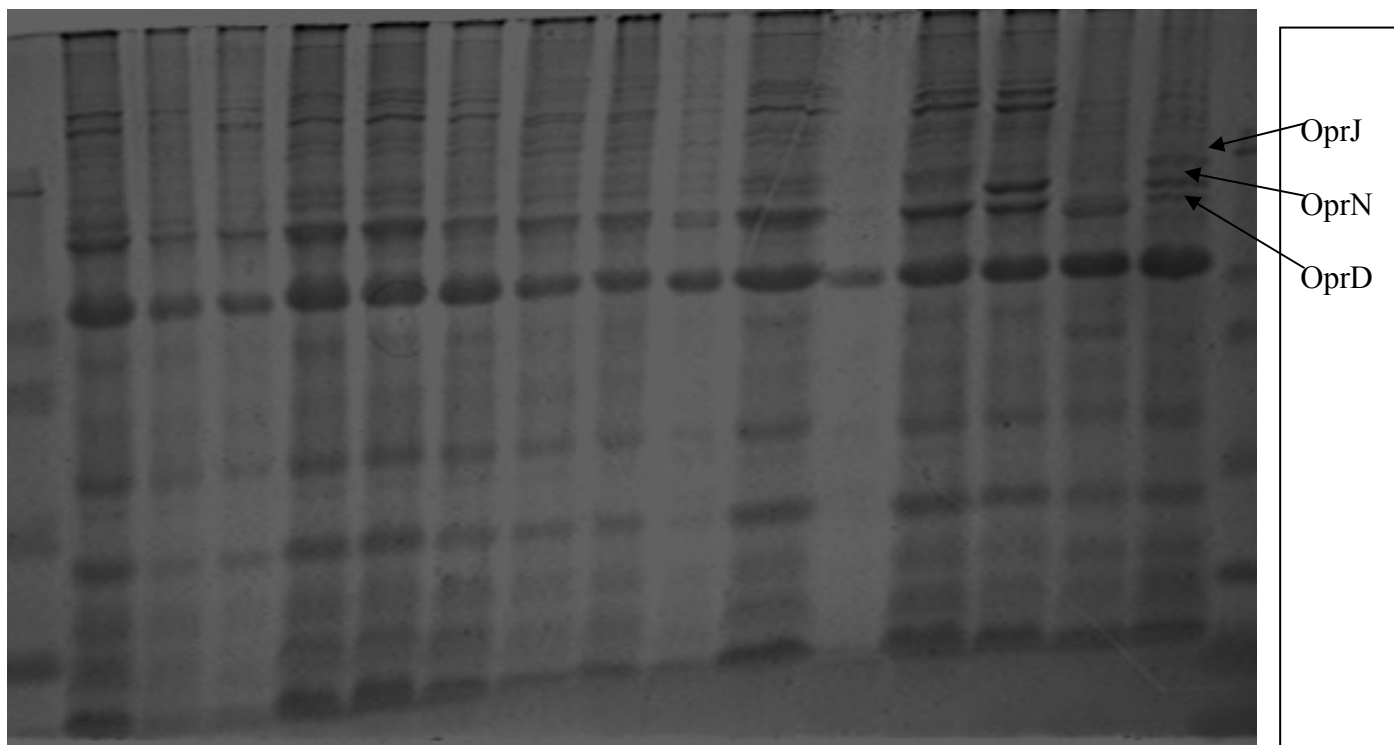
Posiblemente relacionadas.- Son aquellas que presentan diferencias en sus bandas comparadas con la cepa “A”, las cuales corresponden a dos eventos genéticos independientes. Esto se refleja 4-6 diferencias en las bandas, los cuales son fácilmente explicados por inserciones ó delecciones de DNA ó con la ganancia y/o pérdida de sitios de restricción. Son denominadas con la letra “A”, pero con los subíndices 2,3,4, etc.

No relacionadas.- Los patrones de bandas son diferentes de los patrones de bandas “A”. Los cambios son secundarios a 3 o más eventos genéticos independientes, lo que condiciona diferencias en 7 o más bandas. Se denominan con letras B,C,D, etc.

Lo que nos lleva a observar la existencia de una cepa endémica de nuestro hospital, la cual es resistente a imipenem.

DETERMINACIÓN DE PORINAS.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



CARRILES	CONTENIDO	PFGE
1	Marcador de peso	
2	ATCC 27853 (lab)	
3	ATCC 27853	
4	OprD Neg	
5	5776	A
6	5703-2	A
7	5764	A
8	5722	A
9	5719	A1
10	5735	A2
11	5707	A2
12	5749	A3
13	5701-2	B
14	5723-3	C
15	5733	D
16	5745	E
17	Marcador de peso	

DETERMINACIÓN DE METALO BETA LACTAMASAS POR SENSIDISCOS CON EDTA

CEPA	MBL	PCR VIM	PCR IMP
5701-2	NEG	NEG	NEG
5703-1	NEG	NEG	NEG
5707	NEG	NEG	NEG
5719	NEG	NEG	NEG
5722	NEG	NEG	NEG
5723-3	NEG	NEG	NEG
5733	NEG	NEG	NEG
5735	NEG	NEG	NEG
5737	NEG	NEG	NEG
5739	NEG	NEG	NEG
5741	NEG	NEG	NEG
5745	NEG	NEG	NEG
5749	NEG	NEG	NEG
5764	NEG	NEG	NEG
5766	NEG	NEG	NEG
5776	NEG	NEG	NEG

REPORTE DE SENSIBILIDAD POR MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACAS

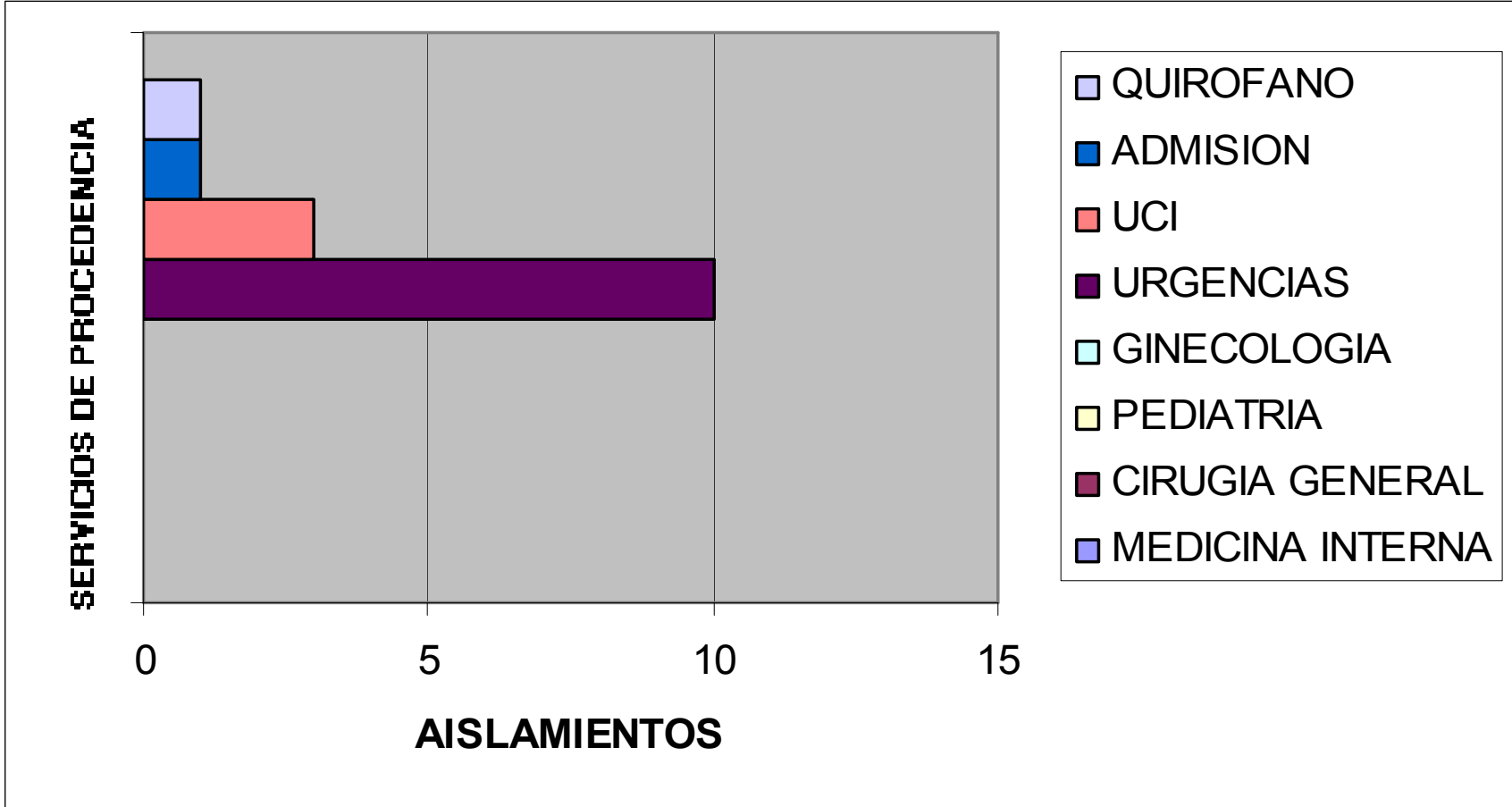
No. CEPA	AMIKACINA	PIPERACILINA	PIPER/TAZO	IMIPENEM	MEROPENEM	CIPROFLOXACINA
5766	> 64	128	>64	32	>64	16
5703-1	>64	>128	>64	32	>64	>16
5739	>64	128	64	64	>64	>16
5741	>64	>128	64	64	>64	>16
5737	>64	>128	64	64	>64	>16
5764	>64	>128	>64	64	>64	16
5776	>64	128	>64	32	>64	>16
5722	>64	>128	64	64	>64	16
5719	>64	128	64	32	64	16
5707	>64	>128	64	64	>64	>16
5735	>64	>128	64	32	>64	16
5749	>64	>128	>64	64	>64	16
5701-2	2	128	0.125	32	4	>16
5723-3	>64	64	64	8	4	4
5733	2	4	0.125	32	4	1
5745	2	4	8	32	0.25	>16
% Resistencia	81%	81%	31%	100%	75%	93%

INCIDENCIA DE CASOS DE INFECCIÓN NOSOCOMIAL TANTO POR CEPAS RESISTENTES COMO POR CEPAS SENSIBLES. CASOS X CADA 100 EGRESOS DEL HOSPITAL.

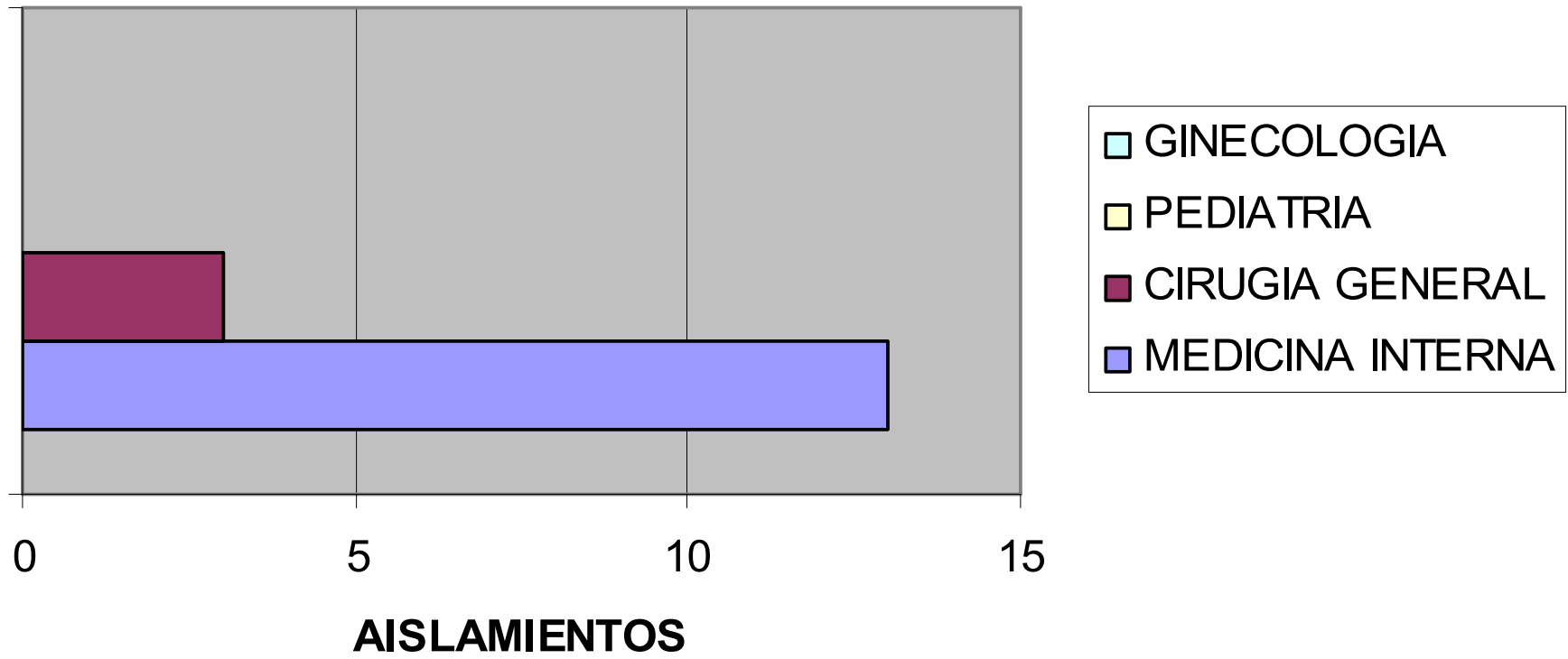
MESES	FEB	MAR	ABR	MAYO	JUN	JUL	AGOS	SEPT	OCT
<i>Pseudomonas</i> Resistentes Incidencia	0.74	0.29	0.22	0.44	0	1.12	0.74	0.44	0
<i>Pseudomonas</i> Sensibles Incidencia	1.85	4.3	2.4	2.9	1.9	2.2	1.99	1.7	1.2

COMPARACIÓN DE RESULTADOS.

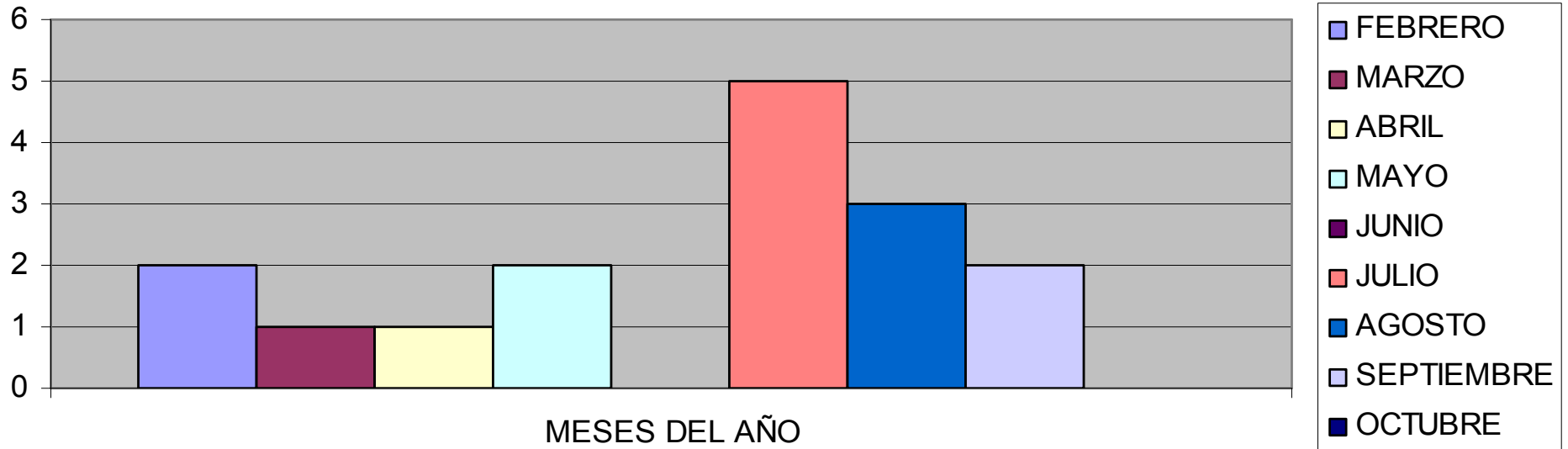
CEPA	MBL (1)	PCR VIM (1)	PCR IMP (1)	PORINAS (2)	AMIKACINA	PIPERACILINA	PIPER/TAZO	IMIPENEM	MEROPENEM	CIPROFLOXACINA
5701-2	NEG	NEG	NEG	OprN	2	128	0.125	32	4	>16
5703-1	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	>128	>64	32	>64	>16
5707	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	>128	64	64	>64	>16
5719	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	128	64	32	64	16
5722	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	>128	64	64	>64	16
5723-3	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	64	64	8	4	4
5733	NEG	NEG	NEG	NEG	2	4	0.125	32	4	1
5735	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	>128	64	32	>64	16
5737	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	>128	64	64	>64	>16
5739	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	128	64	64	>64	>16
5741	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	>128	64	64	>64	>16
5745	NEG	NEG	NEG	OprN	2	4	8	32	0.25	>16
5749	NEG	NEG	NEG	NEG	>64	>128	>64	64	>64	16
5764	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	>128	>64	64	>64	16
5766	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	128	>64	32	>64	16
5776	NEG	NEG	NEG	OprN	>64	128	>64	32	>64	>16
VALOR "P"								(1) Yates 0.34	(1) Yates 0.33	
VALOR "P"								(2) Yates 0.07		



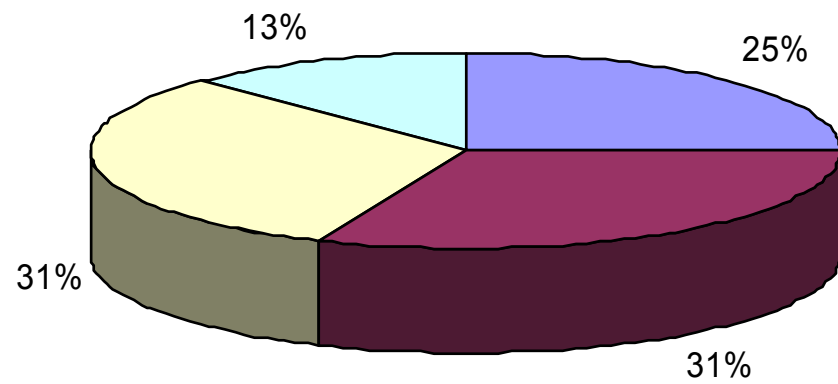
SERVICIO TRATANTE



AISLAMIENTOS POR MES

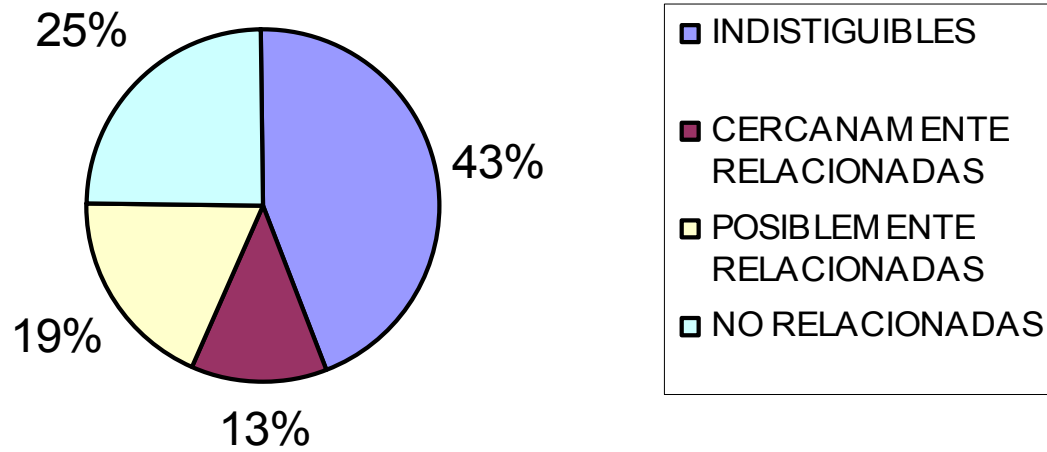


SITIOS DE INFECCIÓN

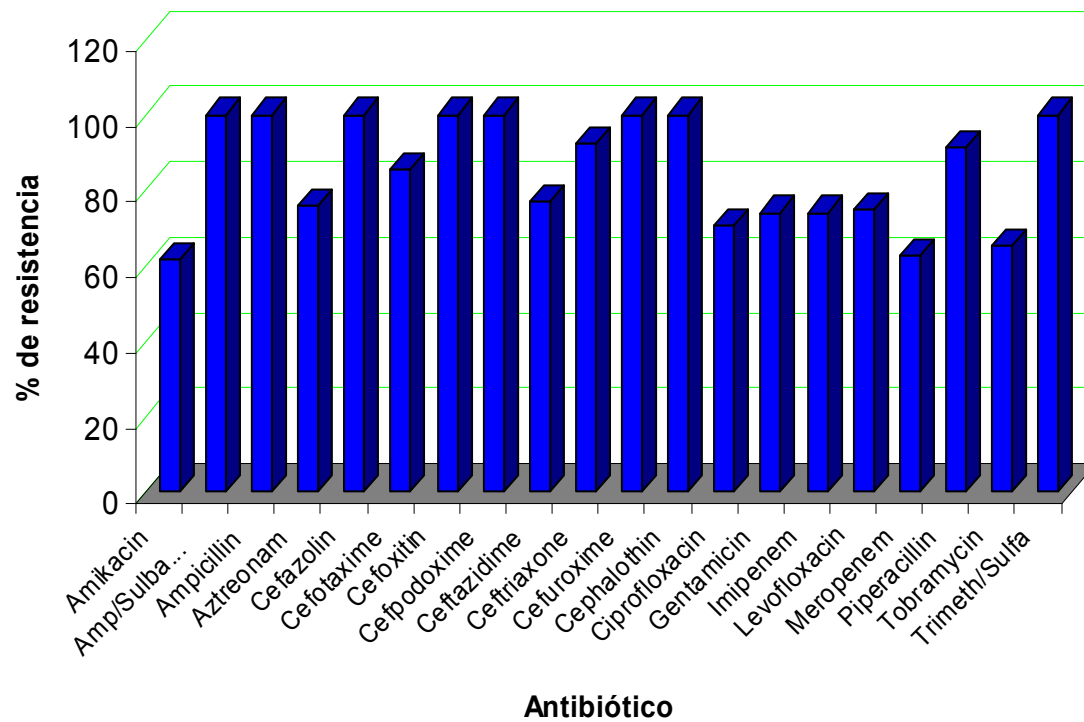


- UROCULTIVO
- HERIDA QUIRÚRGICA
- CULTIVO DE SECRECIÓN CATÉTER
- CULTIVO ESCARA

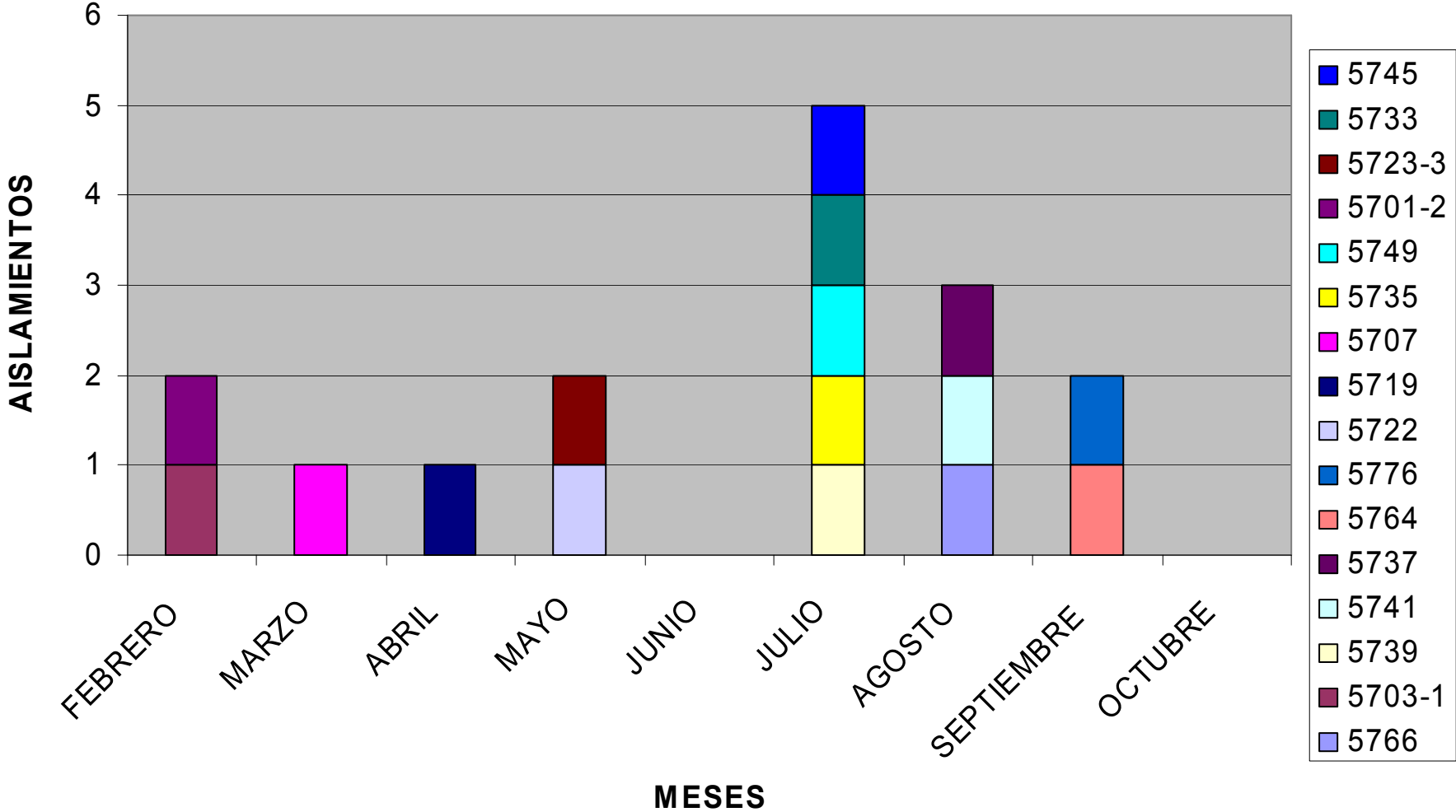
CLASIFICACIÓN TENOVER



Perfil de resistencia en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, Hospital "Gonzalo Castañeda" (ISSSTE)



FRECUENCIA POR MES



DISCUSIÓN.

Las infecciones nosocomiales están entre las principales causas de defunción y de aumento de la morbilidad en pacientes hospitalizados. En una encuesta de prevalencia realizada por la OMS en 55 hospitales de 14 países, se encontró una frecuencia de 8.7% de infecciones nosocomiales. En un momento determinado más de 1.4 millones de personas en el mundo sufren complicaciones por infecciones nosocomiales. Según estudios de la OMS a nivel mundial la máxima prevalencia de infecciones nosocomiales ocurre en UCI y pabellones quirúrgicos así como en pacientes de edad avanzada y/o quimioterapia.

A nivel mundial las infecciones nosocomiales elevan los costos de la atención por aumento en el uso de recursos como estudios, antibióticos, aumento de días de estancia hospitalaria y aumentan la posibilidad de dejar secuelas.

El aumento de la frecuencia de infecciones nosocomiales comprueba la calidad deficiente de la prestación de servicios de atención de salud y ocasiona costos evitables.

Por medio de selección e intercambio de elementos de resistencia genética, los antibióticos promueven el surgimiento de cepas bacterianas multirresistentes.

A nivel mundial las infecciones de vías urinarias nosocomiales son las más comunes, en un 80% asociadas al uso de sondas. Las infecciones de herida quirúrgica son las segundas en frecuencia, abarcan 0.5-15%. Las neumonías nosocomiales son las más frecuentes asociadas a pacientes con apoyo mecánico ventilatorio. La bacteremia nosocomial representa un 5%, pero su tasa de letalidad llega hasta el 50%.

Diversos estudios internacionales como el estudio MYSTIC de las Américas (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection), el cual recluta información de 14 hospitales, 10 en Estados Unidos, 1 en México y 3 en Brasil. Estudio que nos muestra la creciente resistencia de las bacterias a los carbapemens.

En nuestro país son pocos los datos que podemos encontrar acerca de la frecuencia de presentación de infecciones nosocomiales. Existe el RHOVE (Registro Hospitalario de Vigilancia Epidemiológica), que nos muestra cifras obtenidas de 1998-2003. Según sus resultados, las principales infecciones nosocomiales reportadas son: 1.- Neumonía, 2.- IVU, 3.- Bacteremia primaria, 4.- Herida quirúrgica superficiales, 5.- Herida quirúrgica profunda. Los principales gérmenes causantes de morbilidad: 1.- *P. aeruginosa*, 2.- *E. coli*, 3.- *S. aureus*, 4.- *S. coagulasa negativo*, 5.- *K. pneumoniae*. Los principales gérmenes asociados a mortalidad son: 1.- *P. aeruginosa*, 2.- *K. pneumoniae*, 3.- *E. coli*, 4.- *S. aureus*, 5.- *Candida spp*.

En nuestro hospital los gérmenes más frecuentes causantes de infecciones nosocomiales son: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*.

Las porinas son proteínas que producen canales de difusión llenos d agua. La *P. aeruginosa* presenta baja permeabilidad en su membrana gracias las propiedades de las porinas que la componen. Las porinas de las *Pseudomonas* silvestres son denominadas con letras del alfabeto, D,E,F,G,H,I, siendo la porina F la más abundante. Las mutaciones *gyrA* causan alteración en la subunidad A de la DNA girasa. Estas mutaciones pueden ser de tres tipos principales: *nfxA*, *nfxB*,

nfxC. La mutación *nfxC* le confiere resistencia a quinolonas e imipemen. Esta mutación le confiere 2-8 veces mayor resistencia. Las cepas que cuentan con ésta mutación producen baja cantidad de proteína OprD y una alta cantidad de la proteína de membrana llamada OpoN. Se ha observado que ésta proteína le confiere a la bacteria una menor permeabilidad a los carbapemens. Proteína con un peso molecular de 50kDa. Por lo tanto las bacterias que cuenten con ésta proteína de membrana mostrarán resistencia a los carbapemens. Los estudios de determinación de porinas en las cepas de nuestro hospital, muestran la existencia de OprN.

Como se comentó previamente, otro efectivo mecanismo de resistencia es la producción de β lactamasas (MBL). Esta producción está mediada por la presencia de diferentes genes. Reportados en la literatura mundial hay hasta el momento 4 familias: IMP, VIM, SPM, GTM. El gen que codifica para cada una de ellas recibe el mismo nombre. Dentro de cada familia existen varios subtipos. En el mercado encontramos disponible diferentes kits con los oligos específicos para cada familia. Para la determinación del subtipo es necesario secuenciar las bases del producto amplificado. A las cepas estudiadas se les realizó inicialmente determinación de producción de MBLK por método de sensidiscos con EDTA. Los resultados se mostraron negativos por éste método. Sin embargo éste método no es el estándar de oro para la detección de MBL. Por lo que se decidió realizar PCR en busca del gen que codifica para VIM y PCR para el gen que codifica para IMP. Ambos genes se han reportado en cepas productoras de MBL en nuestro país. En nuestro estudio, todos los casos se reportaron negativos para éstos genes. Existe la posibilidad de que resulten positivos para alguna de las otras familias puesto que por método de tiras Etest para detección de MBL algunas de las cepas resultaron productoras de MBL. La

aplicación de éstas tiras con EDTA se llevó a cabo posterior a la realización de PCR en nuestras cepas. Hasta el momento no ha sido posible realizar PCR para detección de genes SPM y GTM.

Como se pudo observar en los resultados, el 75% de las cepas estudiadas tiene gran similitud genética entre ellas. Varias son indistinguibles genéticamente y algunas son cercanamente relacionadas. Lo que implica se trata de cepas con un origen común. Podemos incluso, tomando en cuenta el tiempo que duró la obtención y selección de muestras (9 meses) que se trata de una cepa endémica del hospital, la cual condicionó un brote en los meses de Julio y Agosto. Los estudios de campos pulsados nos ayudan a definir si las cepas tienen origen común y si los brotes son condicionados por cepas endémicas, nuevas o reemergentes. De ésta forma contamos ya en el hospital con esa valiosa información, contamos ya con el patrón de bandas de DNA restringidas enzimáticamente. En caso de que se presente nuevo brote, podríamos determinar si se trata de la cepa endémica o no. Éstos estudios nos ayudan a mantener una adecuada vigilancia epidemiológica desde un patrón molecular.

Podemos afirmar en base al estudio de campos pulsados que en el hospital se llevó a cabo una selección clonal de *Pseudomonas aeruginosa* por el uso y abuso de carbapemens y a la existencia de una posible transmisión cruzada.

Llama la atención que de las 30 muestras seleccionadas para nuestro estudio, 10 muestras resultaron sensibles cuando se les realiza estudio por medio de mycoscan del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP). Ante la discrepancia de resultados, se decidió en el INSP realizar nueva

determinación por mycoscan utilizando control con cepa ATCC. Los resultados confirmaron los datos obtenidos inicialmente por el INSP.

Existen varias condiciones bajo las cuales la determinación de mycoscan en el hospital pudieron arrojar datos falsos. Alteraciones en el aparato, daños o contaminación en las fibras ópticas.

Errores en la preparación de las muestras, que se tratara de cepas impuras, que el inóculo introducido al aparato fuera demasiado grande, que se utilizaran antibióticos caduco o en malas condiciones. Por lo cual es importante que frecuentemente se corran controles con cepas ATCC.

RECOMENDACIONES AL HOSPITAL.

- Mantener una adecuada vigilancia epidemiológica para detección de casos de infección nosocomial.
- Realizar pruebas de mycorscan con cepas control de forma rutinaria.
- Siempre determinar agente causal.
- En caso de brotes realizar determinación de genotipificación molecular
- Manejar antibióticos en base a reportes de microbiología.
- Educación del personal de salud
- Fomentar medidas de prevención
- Fomentar medidas de higiene
- Mantener estándares de calidad
- Recordar que existe un desarrollo de mutaciones por la presión selectiva del antibiótico
- RECORDAR QUE UN AUMENTO EN LA FRECUENCIA DE INEFCCIONES NOSOCOMIALES COMPRUEBA LA CALIDAD DEFICIENTE DE LA PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE ATENCIÓN A LA SALUD.
- 12 pasos para prevenir resistencia a los antibióticos en adultos hospitalizados según CDC:
 1. Vacune
 2. Retire catéteres
 3. Adapte el tratamiento al agente patógeno
 4. Consulte a los expertos

- 5. Practicar el control de antibióticos**
- 6. Use datos locales**
- 7. Trate la infección no la contaminación**
- 8. Trate la infección no la colonización**
- 9. Sepa rechazar la vancomicina**
- 10. Deje de tratar si hay cura**
- 11. Aisle el agente patógeno**
- 12. Rompa la cadena**

BIBLIOGRAFIA.

1. Richard V. Goering, PhD. Molecular Epidemiology of Nosocomial Infection: Análisis of Chromosomal Restriction Fragment Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993;14:595-600
2. Fred C. Tenover, Robert D. Arbeit, et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept.1995, p. 2233-2239
3. Anna King, Kevin Shannon, Ian Phillips. Resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1995); 36. 1037-1041.
4. Ramakrishnan Srikumar, Xian-Zhi, Keith Poole. Inner Membrane Efflux Components Are Responsible for β -Lactam Specificity of Multidrug Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology*, Dec.1997, p. 7775-7881
5. Lixia Liu, Paul D. Shaw. Characterization of *dap B*, a Gene Required by *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* BR2.024 for Lysine and Tobramycin- β -Lactam Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, Jan 1997, p. 507-513.

6. Daniel Aubert, Thierry Naas, Patrice Nordmann. IS1999 Increases Expression of the Extended-Spectrum β -Lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, Sept. 2003, p- 5314-5319.
7. Kiyomi Okamoto, Naomasa Gotoh, Takeshi Nishino. *Pseudomonas aeruginosa* Reveals High Intrinsic resistance to Penem Antibiotic: Penem Resistance Mechanisms and Their Interplay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 2001, p. 1964-1971.
8. Jesús Silva-Sánchez, Cecilia Aguilar-Zacarias. β - Lactamase Bioassay: A Simplified Method to Determine Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) in Enterobacteria. *Archives of Medical Research*, 1997; 28 (2), p, 285-287.
9. Guadalupe Miranda, Blanca Leanos, Luis Marquez, Adriana Valenzuela, Jesús Silva. Molecular Epidemiology of a Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in a Paediatric Intensive Care Unit. *Scand Journal Infection Disease*. 2001; 33, 738-743.
10. Fuminobu Yoshimura, Leora Shalteil Zalman. Purification and Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Porin. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983, 258 (4), 2308-2314.

- 11.** Nobuhisa Masuda, Eiko Sakagawa, Satoshi Ohya. Outer Membrane Proteins Responsible for Multiple Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, May. 1995, p- 645-649.
- 12.** Hiroshi Nikaido, Kishiko Nikaido, Shigeaki Harayama. Identification and Characterization of Porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*. January 1991, 266; 770-779.
- 13.** Kiyomi Okamoto, Naomasa Gotoh, Takeshi Nishino. *Pseudomonas aeruginosa* reveals High Intrinsic resistance to Penem Antibiotics: Penem Resistance Mechanisms and Their Interplay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, July 2001, p. 1964-1971.
- 14.** Prevención de las infecciones nosocomiales. Guía Práctica segunda edición. OMS 2002.
- 15.** Programa de Enfermedades Transmisibles. División de Prevención y Control de Enfermedades Organización Panamericana de la Salud. Prevención y control de la resistencia a los antimicrobianos en las Américas. Plan estratégico de Vigilancia. 1999.

- 16.** Gholam Reza Tavankar, Dimitris Mossialos, Huw D. Williams. Mutation or Overexpression of a Terminal Oxidase Leads to a Cell Division Defect and Multiple Antibiotic Sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. October 2002, 278; 4524-4530.
- 17.** Karl Perron, Olivier Caille. CzcR-CzcS, a Two Component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. March 2004, p- 8761-8768.
- 18.** Keith S. Kaye, John J. Engemann. Pathogens Resistant to Antimicrobial agents: Epidemiology, molecular mechanisms and management. *Infect. Dis. Clin. N. Am*, 2004, 18,467-511.
- 19.** Kinga Kovacs, David L. Paterson. Antimicrobial Therapy for *Pseudomonas aeruginosa*: Therapeutic issues; Resistance, Pneumonia; Endocarditis and Infections of the GI tract, bone and joint. *Infect Med* 15(6): 385-394.
- 20.** Pedro Martínez, Máximo Mercado. *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* productores de metalo beta lactamasas en el principal hospital de Córdoba. *Asociación Colombiana de Infectología*. 2005 vol 9.

21. Michael A. Pfaller, Ronald N. Jones. MYSTIC (Meropenem Yearly susceptibility Test Information Collection) results from de Américas: Resistance Implications in the treatment of Serious Infections. *Journal of Antimicrobial Therapy* (2000)46, 25-37.
22. Ronald N Jones. Global Epidemiology of Antimicrobial Resistance Among Community-Acquired and Nosocomial Pathogens: A Five Year Summary from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-2001. *Semin Respir Crit Care Med* 2003; (24), 121-135.
23. Marilee D. Obritsch, Douglas N. Fish. Nosocomial Infections Due to Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiology and Treatment Options. *Pharmacotherapy* 2005; 25: 1352-1364.
24. Howard S. Gold, Robert C. Moellering. Antimicrobial- Drug Resistance. *The New England Journal of Medicine*. 1996 Nov; 335: 1445-1453.
25. Joseph L. Kuti, Naomi R. Florea. Pharmacodynamics of Meropenem and Imipenem Against Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacotherapy* 2004; 24 .

26. Nicolau DP, McNabb JC, Lacy MK, Quintiliani R, Nightingale CH. Continuous versus intermittent administration of ceftazidime in intensive care unit patients with nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:497–504.
27. Grant EM, Kuti JL, Nicolau DP, Nightingale CH, Quintiliani R. Clinical efficacy and pharmacoeconomics of a continuous-infusion piperacillin-tazobactam program in a large community teaching hospital. *Pharmacotherapy* 2002;22:471–83.
28. Bodey GP, Ketchel SJ, Rodriguez V. A randomized study of carbenicillin plus cefamandole or tobramycin in the treatment of febrile episodes in cancer patients. *Am J Med* 1979;67: 608–16.
29. Kitzes-Cohen R, Farin D, Guillermo P, De Myttenaere-Bursztein SA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of meropenem in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents* 2002;19:105–10.

30. McKindley DS, Boucher BA, Hess MM, Croce MA, Fabian TC. Pharmacokinetics of aztreonam and imipenem in critically ill patients with pneumonia. *Pharmacotherapy* 1996;16:924–31.
31. Kim MK, Capitano B, Mattoes HM, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of two dosing regimens for piperacillin-tazobactam. *Pharmacotherapy* 2002;22:569–77.
32. Friedland I, Stinson L, Ikaidi M, Harm S, Woods GL. Phenotypic antimicrobial resistance patterns in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*: results of a multicenter intensive care unit surveillance study, 1995–2000. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:245–50.
33. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1681–8.

34. Sorensen VJ, Horst H, Obeid F, et al: Endotracheal aminoglycoside in gram negative pneumonia. *Am Surg* 52:391-394, 1986.
35. Brown RB, Kruse JA, Counts GW, et al: Double-blind study of endotracheal tobramycin in the treatment of gram-negative bactericidal pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 34:269-272, 1990.
36. Haddow A, Greene S, Heinz G, et al: Ciprofloxacin (intravenous/oral) versus ceftazidime in lower respiratory tract infections. *Am J Med* 87(suppl 5A):S113-S115, 1989.
37. Kahn FA, Basin R: Sequential intravenous-oral administration of ciprofloxacin vs. ceftazidime in serious bacterial respiratory tract infection. *Chest* 96:528-537, 1989.
38. Kemmerich B, Small G, Pennington JE: Comparative evaluation of ciprofloxacin, enoxacin, and ofloxacin in experimental *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 29:395-399, 1986.

39. Fink MP, Snyderman DR, Niederman MS, et al: Treatment of severe pneumonia in hospitalized patients: Results of a multicenter, randomized, double-blind trial comparing intravenous ciprofloxacin with imipenem-cilastatin. *Antimicrob Agents Chemother* 38:547-557, 1994.
40. Jackson GG: Infective endocarditis caused by *Pseudomonas aeruginosa*, in Baltch AL, Smith RP (eds): *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Treatment. New York, Marcel Dekker, 1994, pp 129-158.
41. Tablan OC, Reyes MP, Rintelmann WF, et al: Renal and auditory toxicity of high-dose, prolonged therapy with gentamicin and tobramycin in *P aeruginosa* endocarditis. *J Infect Dis* 149:257-263, 1984.
42. Daikos GL, Kathalia S, Lolans V, et al: Long-term oral ciprofloxacin: Experience in the treatment of incurable infective endocarditis. *Am J Med* 84:786-790, 1988.

43. Uzun O, Erdal Akalin H, Unal S, et al: Long-term oral ciprofloxacin in the treatment of prosthetic valve endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. Scand J Infect Dis 24:707-800, 1992.
44. Agger WA, Mardan A: *Pseudomonas aeruginosa* infections of intact skin. Clin Infect Dis 20:302-308, 1995.
45. Rolston KVI, Bodey GP: *Pseudomonas aeruginosa* infection in cancer patients. Cancer Invest 10:43-59, 1992.
46. Pollock M: *Pseudomonas*, in Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow N (eds): Infectious Diseases. Philadelphia, W.B. Saunders, 1992, pp 1502-1513.
47. Dan M, Sigeman-Igra Y, Pitlik S, et al: Oral ciprofloxacin treatment of *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis. Antimicrob Agents Chemother 34:849-852, 1990.

48. Dellamonica P, Bernard E, Etesse H, et al: Evaluation of pefloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin in the treatment of 39 cases of chronic osteomyelitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8:1024-1030, 1989.
49. Gentry LO, Rodriguez GG: Oral ciprofloxacin compared with parenteral antibiotics in the treatment of osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother* 34:40-42, 1990.
50. Aquado JH, Arjona R, Valle R, et al: Prolonged oral ciprofloxacin treatment of recalcitrant and severe osteomyelitis. Proceedings of the 30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Atlanta, Oct. 21-24, 1990. Abstract 980.
51. Ball P: Emergent resistance to ciprofloxacin amongst *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Clinical significance and therapeutic approaches. *J Antimicrob Chemother* 16(suppl F):S165-S169, 1990.

52. Jacobs RF, McCarthy R, Elser J: *Pseudomonas* osteochondritis complicating puncture wounds of the foot in children—A 10-year evaluation. *J Infect Dis* 4:657-661, 1989.
53. Kovacs K, Yu VL: Antipseudomonal antimicrobial agent therapy. *Drugs of Today* 30:155-170, 1994.
54. Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC: Determination of activities of levofloxacin, alone and combined with gentamicin, ceftazidime, cefpirome, and meropenem, against 124 strains of *Pseudomonas aeruginosa* by checkerboard and time-kill methodology. *Antimicrob Agents Chemother* 42:953-955, 1998.
55. Citron DM, Appleman MD: Comparative in vitro activities of trovafloxacin against 221 aerobic and 217 anaerobic bacteria isolated from patients with intra-abdominal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2312-2316, 1997.

56. Kuck NA, Jacobus NV, Petersen N, et al: Comparative in vitro and in vivo activities of piperacillin combined with the beta-lactamase inhibitors tazobactam, clavulanic acid, and sulbactam. *Antimicrob Agents Chemother* 33:1964-1969, 1989.