



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR
ZUBIRÁN**

**Epidemiología Molecular de las Infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en un
Hospital de Tercer Nivel: Impacto Clínico y Factores de Riesgo**

**T E S I S DE POSGRADO
QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN INFECTOLOGÍA
P R E S E N T A**

Dra. Claudia Méndez Mercado

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Guillermo M. Ruiz-Palacios y Santos

COTUTOR

Dr. José Sifuentes Osornio

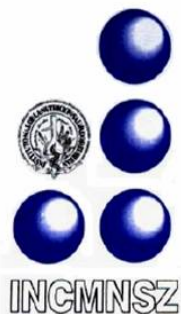
ASESORES DE TESIS

Dr. Arturo Galindo Fraga

Dr. Alfredo Ponce de León

Dra. J. Miriam Bobadilla del Valle

México, DF, Septiembre 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.

COLABORADORES

QFB. Pilar Ramos Cervantes

QFB. Ana Lilia Rolón Montes de Oca

QFB. Fernando Tuz Dzib

Dr. Santiago Pérez Patrigeon

Dra. Jennifer M. Cuellar Rodríguez

Dr. Francisco Belaunzaran Zamudio

Dr. Antonio Mazas García

Dra. Brenda Crabtree Ramírez

Dr. José Millan Oñate Gutiérrez

Dra. María Lorena Cabrera Ruiz

Dr. Víctor Guevara Sánchez

Dra. Andrea Sada Mier y Terán

Dra. Jimena Muciño Bermejo

Del Laboratorio de Microbiología Clínica y del Departamento de Infectología
del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

DEDICATORIAS

A mi madre por su amor incondicional

*A mis hermanos Lilia, Bertha y Miguel Ángel que siempre me han dado su apoyo en la
realización de mis metas*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jose Sifuentes Osornio por tu tiempo, enseñanza y apoyo

A Arturo Galindo, por su apoyo en aspectos metodológicos

A Francisco, Jennifer y Santiago por los buenos momentos durante la residencia

Al todo el personal del laboratorio de Microbiología Clínica y Biología Molecular del

INCMNSZ por su apoyo en especial a Ana Lilia, Melissa, Pilar y Fernando

INDICE

RESUMEN	1
MARCO TEORICO.....	2
Infecciones Nosocomiales	2
Brotos Nosocomiales.....	3
Susceptibilidad Antimicrobiana en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
Características Microbiológicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Estructura Antigénica y Factores de Virulencia	7
Resistencia Bacteriana en <i>P. aeruginosa</i>	8
Aspectos Epidemiológicos	7
Aspectos Biológicos	9
Co-resistencia y Resistencia Cruzada.....	9
Aspectos Genéticos y Moleculares	9
Métodos de Tipificación en <i>P. aeruginosa</i>	11
Métodos de Tipificación Fenotípica	12
Métodos de Tipificación Genotípica.....	13
JUSTIFICACION	18
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVOS	19
PACIENTES Y METODOS.....	20
Diseño del Estudio.....	20
Descripción del Sitio.....	20
Selección de Casos y Controles.....	20
Definición de las Infecciones por <i>P. aeruginosa</i>	21
Variables Evaluadas.....	22
Cultivos Clínicos y Ambientales.....	22
Pruebas de Identificación y Susceptibilidad de aislados clínicos y ambientales	23
Tipificación de Aislados Clínicos y Ambientales	24

Análisis Estadístico	25
RESULTADOS	26
Descripción del Brote	26
Estudio de Casos y Controles	27
DISCUSION	31
Estudio de Casos y Controles	32
Epidemiología Molecular	34
Mortalidad	35
CONCLUSIONES	36
FIGURAS	37
CUADROS	46
REFERENCIAS	54
ANEXOS	61

RESUMEN

Epidemiología Molecular de las Infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en un Hospital de Tercer Nivel: Impacto Clínico y Factores de Riesgo.

Introducción: *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista y causa frecuente de infecciones nosocomiales, suele ocasionar sepsis en pacientes graves. La unidad de cuidados intensivos (UCI) es un reservorio natural en los hospitales, donde hasta el 40% de los pacientes pueden ser colonizados. Estudiamos un brote ocurrido entre enero y agosto de 2005.

Objetivos: a) Identificar los factores de riesgo para infección por *P. aeruginosa* b) Determinar el impacto clínico y la mortalidad asociados a las infecciones por *P. aeruginosa*, c) Investigar los mecanismos de transmisión relacionados. d) Detectar la fuente de infección relacionada al brote.

Métodos: Describimos un brote y determinamos los factores de riesgo para infección por *P. aeruginosa* en un estudio de casos y controles. Caso paciente hospitalizado infectado por *P. aeruginosa* (criterios de CDC). Control paciente hospitalizado y no infectado por *P. aeruginosa* internado en la misma sala que el caso al momento del aislamiento. Se realizaron cultivos de los grifos y de las manos del personal de salud de la UCI. Los aislados clínicos fueron tipificados mediante amplificación de ADN, empleando polimorfismo de la amplificación aleatoria de ADN por PCR (Random Amplified Polimorphic DNA, RAPD-PCR). Aplicamos análisis univariado con prueba U de Mann-Whitney y χ^2 ; se construyó un modelo multivariado y se calculó la razón de momios. Se consideró significativa una $p \leq 0.05$.

Resultados: Identificamos 75 casos, 38/75 (50.66 %) fueron hombres; la mediana de edad fue de 48 años; 31 (41.33%) ocurrieron en la UCI, y 44 (58.66%) en otras áreas del hospital. Los eventos infecciosos fueron: neumonía 35 (46.66%), bacteremia primaria 18 (24%), infección del tracto urinario 5 (6.66%), infección de herida quirúrgica 5 (6.66%), infección en sitio quirúrgico profundo 5 (6.66%), infección de tejidos blandos 3 (4%), osteomielitis 2 (2.66%), infecciones intrabdominales 2 (2.66%). La mortalidad cruda en los casos fue de 33% (n=25), en 22 de ellos el deceso fue atribuido a la infección; en los controles fue 18.7% (RM 2.18 (1.61-4.1)). Las variables asociadas a infección fueron: traslado de otro hospital, RM 4 (1.62-10.21), hospitalización durante 3 meses previos 2.87 (1.59-5.1), estancia en la UTI 1.91 (1.08-3.36), hemodiálisis 2.65 (1.12-6.24), sonda nasogástrica 3.13 (1.74-5.6), ventilación mecánica 2.7 (1.52-4.78), uso de antibióticos antes del ingreso 4.05 (1.96-8.38), y durante este internamiento, administración de aminoglucósidos 2.28 (1.27-4.07) o de carbapenémicos 1.37 (1.19-1.57). Con el análisis multivariado fueron significativos: estancia en la UCI 9.75 (2.1-44.22), tiempo de estancia en la misma 1.08 (1.0-1.17) y el tiempo de hospitalización 1.06 (1.03-1.1). Se analizaron 145 aislados (125 aislados clínicos y 20 ambientales de manos y grifos). Se identificaron 8 genotipos en 39/75 pacientes (52%). Predominaron 2 clonas, la clona 1 (19 cepas/12 pacientes) y la clona 2 (22 cepas/14 pacientes); ambas representan 34.6% de los casos. Se aisló *P. aeruginosa* en las manos de 4 enfermeras y un médico, así como en 5 grifos de la UTI, no relacionadas genéticamente con los aislados clínicos. Las clonas predominantes (1 y 2) presentaron un patrón de multiresistencia (100% en promedio de resistencia a todos los antibióticos actividad anti-pseudomonas).

Conclusiones: Nuestros datos revelan que aunque este brote fue secundario a múltiples cepas genéticamente relacionadas, por lo menos dos clonas fueron las más numerosas indicando transmisión reciente. Los microorganismos clonales se asociaron a mayor mortalidad. Los factores de riesgo para adquirir infección por *P. aeruginosa* fueron estancia en la UCI, y hospitalización prolongada. Aunque no pudimos identificar una fuente común de infección, el brote fue controlado con el reforzamiento de las medidas de control de infecciones nosocomiales, la limitación del uso de antibióticos de amplio espectro y la mejoría de las medidas de aislamiento de los pacientes en áreas de riesgo elevado.

MARCO TEORICO

Infecciones Nosocomiales

Las infecciones nosocomiales constituyen un serio problema de salud pública, ya que contribuyen al aumento de la morbilidad, mortalidad, incrementan el tiempo de estancia hospitalaria y los costos de tratamiento. Se estima que 5-10% de los pacientes hospitalizados adquieren una infección nosocomial.^{1,2}

La invasión bacteriana al huésped es facilitada en el ambiente hospitalario. Ya que se rompen las barreras naturales de defensa, asociada a heridas quirúrgicas, colocación de sondas, cánulas, uso de antimicrobianos que disminuye la flora normal, permitiendo la colonización e infección de gérmenes hospitalarios. Infección del tracto urinario, bacteremia, neumonía, infección de herida quirúrgica representan el 88% de las infecciones nosocomiales, y predominan en la unidad de cuidados intensiva asociados a procedimientos invasivos.³

Los programas de vigilancia de infecciones nosocomiales tienen importancia en conocer el canal endémico local, la prevalencia de resistencia antimicrobiana y facilitan la detección de brotes hospitalarios.

De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNIS) patrocinado por el Centro para el Control y prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta, EE.UU.) *Pseudomonas aeruginosa* es la segunda causa de neumonía nosocomial, solamente precedido por *Staphylococcus aureus*, la sexta causa de bacteremia primaria, y la tercera si solamente se consideran bacilos gramnegativos, precedida por enterobacterias, ocupa el cuarto lugar en infecciones de sitio quirúrgico y es la tercera causa en infecciones de tracto urinario.^{1,4,5,6}

De acuerdo al Programa de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) *P. aeruginosa* ocupa el tercer sitio en frecuencia de microorganismos aislados en infecciones nosocomiales.⁷

Brotos Nosocomiales

Un brote nosocomial se define como una infección de adquisición hospitalaria que representa un incremento en la incidencia sobre los rangos esperados. Los casos generalmente se asocian temporal o geográficamente, sugiriendo una fuente común de infección, o un incremento en la transmisión de persona-persona.^{8,9}

Aunque los brotes nosocomiales ocurren infrecuentemente alcanzan una proporción importante de las infecciones nosocomiales, de hecho en los EE UU entre 5 y 8% de las infecciones nosocomiales ocurren en epidemias. La cadena epidemiológica de infección nosocomial y el desarrollo potencial de un brote implican elementos relacionados con el organismo causante, la forma de transmisión y el hospedero susceptible. Los reservorios o fuentes de infección de *P. aeruginosa* incluyen fuentes endógenas (piel, tubo digestivo, boca, vías respiratorias) y fuentes exógenas.

El mecanismo de transmisión más frecuente es por contacto directo o indirecto con la fuente de infección. Las manos del personal de salud son un medio frecuente de transmisión entre un paciente enfermo y otro susceptible. Otros vehículos importantes incluyen dispositivos de nutrición parenteral, dispositivos uretrales, intravasculares, dispositivos para hemodiálisis, ventilación mecánica, antisépticos, desinfectantes, soluciones. Por otra parte, el paciente hospitalizado es

sometido a procedimientos diagnósticos y terapéuticos que abren puertas de entrada a *P. aeruginosa*, además de otros factores como desnutrición, uso de esteroides, inmunosupresores, etc. ¹⁰

Estudios de brotes nosocomiales reportados previamente han encontrado asociación entre infección por *P. aeruginosa* y estancia en la UCI, por otra parte fuentes de infección documentadas incluyen equipo médico contaminado, soluciones, agua de grifos y manos del personal de salud.

Miranda, en un estudio de brote nosocomial por *P. aeruginosa* multiresistente en una UCI pediátrica, analizó 55 aislados de 23 pacientes, por electroforesis en gel por campos pulsados, (PFGE) se demostró un origen clonal en 14 pacientes, 4 de ellos ocurrieron fuera de la UCI. Los cultivos ambientales y de manos del personal de salud fallaron en encontrar el reservorio de *P. aeruginosa*. En la investigación de brotes nosocomiales, la fuente epidémica usualmente es difícil de identificar. ¹¹ Como evidencia de ello, la experiencia ha demostrado que las medidas de intervención sencillas pueden ser de gran utilidad, (ver figura 1).

Susceptibilidad Antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa*

El programa de vigilancia sobre susceptibilidad antimicrobiana a meropenem (MYSTIC), brinda un panorama global sobre prevalencia de resistencia, ya que abarca 120 centros de 32 países. El último reporte comprende un periodo de 8 años (1997-2004) y reporta una susceptibilidad global para *P. aeruginosa* de 75.4% incluyendo centros de Norte y Sur América, Europa y Australia, para otros antibióticos con actividad anti-*pseudomonas* reportan susceptibilidad global de 62-70%. En Norte América meropenem, tobramicina y

piperacilina-tazobactam son los agentes más activos vs. *P. aeruginosa* mientras que ciprofloxacina solo inhibió al 72-74% de los aislados. En Europa, meropenem y piperacilina-tazobactam son los agentes más activos, mientras que ciprofloxacina y gentamicina los menos activos. De todos los agentes actualmente disponibles, las quinolonas pierden actividad anti-pseudomonas rápidamente, con rangos de resistencia $\geq 30\%$. La resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* se ha incrementado rápidamente en Estados Unidos de Norte América, con una resistencia para meropenem de 17% en 1997 a 36% en 2001. ¹²

La multiresistencia es un problema en incremento. Datos del estudio de monitoreo de resistencia de Estados Unidos de Norte América (TRUST, *Tracking Resistance in the United States Today*), se mostró un incremento progresivo en multiresistencia (≥ 3 antibióticos) de 7.2% en 2001 a 8.8% y 9.9% en 2002 y 2003 en Estados Unidos. Durante el periodo de 3 años 29.7% de los aislados con multiresistencia mostraron resistencia a 4 grupos de antibióticos (ceftazidima, imipenem, gentamicina y ciprofloxacina o levofloxacina). ¹³

Kato Maeda y cols. en un estudio de resistencia en agentes causantes de bacteremia, realizado en el INCMNSZ, durante un periodo de 5 años (1995-2000), los agentes más activos para *P. aeruginosa* en 2000 fueron imipenem y piperacilina-tazobactam, con susceptibilidad $\geq 90\%$, amikacina, gentamicina y ticarcilina/ac. clavulánico con susceptibilidad de 80%, los menos activos fueron ciprofloxacina y ceftazidima con susceptibilidad 70%.¹⁴

Sifuentes Osornio y Cols. en un estudio realizado en México en 153 casos bacteremias por *P. aeruginosa*, (1981-1992), la fuente primaria más frecuente fue tracto biliar (25%), y presentaron una mortalidad de 46%, los factores asociados a

mortalidad fueron edad \geq 40 años, choque, ventilación mecánica, uso previo de antibióticos esplenectomía y terapia antimicrobiana inadecuada.¹⁵

Maravilla E. realizó en el INCMNSZ, un estudio con los aislados clínicos de *P. aeruginosa* con resistencia a aminoglucósidos entre 1991-1995 para evaluar su relación genómica. La subpoblación de *P. aeruginosa* con fenotipo de resistencia a aminoglucósidos causó 8 brotes a lo largo de 5 años estudiados, prevaleció en muestras de vías respiratorias y orina. Los brotes predominaron en verano. Los aislados de *P. aeruginosa* resistente a aminoglucósidos estuvieron relacionados a distintas líneas clonales, causantes de brotes.¹⁶

Características Biológicas de *Pseudomonas Aeruginosa*

Este microorganismo de la familia Pseudomonadaceae, es un bacilo curvo, gramnegativo, aerobio estricto, puede observarse en forma aislada, en pares o cadenas cortas, es móvil debido a su flagelo monologar. Característicamente produce pigmentos como la piocianina, piorrubina y piomelanina que dan coloración azul, rojo o negro respectivamente, a las colonias. En su clasificación de especie se consideran ciertas características metabólicas, es una bacteria no fermentadora de carbohidratos, productora de citocromo oxidasa. Sus requerimientos nutricionales son mínimos y posee tolerancia a diferentes condiciones físicas, así como resistencia intrínseca a antimicrobianos, todo ello contribuye a su éxito ecológico y su rol como un patógeno oportunista. La unidad de cuidados intensivos (UCI) es un reservorio en el ambiente hospitalario, y se calcula que de 13 a 39% de los pacientes hospitalizados en ella se colonizan.¹⁷

Estructura Antigénica y Factores de Virulencia

La patogenicidad de bacilos gramnegativos no fermentadores depende de la adherencia a las células hospederas, la producción de polisacáridos extracelulares, toxinas extracelulares, resistencia a factores bactericidas y la presencia de lipopolisacárido de pared celular (endotoxina).

Los pilis, se han propuesto como mediadores locales de adherencia a tejidos del hospedero, se unen a receptores de gangliosidos GM-1 presentes en la superficie de las células epiteliales del huésped. El alginato, un polímero polisacárido que confiere a las colonias una apariencia mucoide, funciona como mediador de adherencia a mucina y promueve resistencia parcial a mecanismos de defensa del sistema inmune, inhibiendo la unión de anticuerpos y fagocitosis. Este polímero se produce en cepas de *P. aeruginosa* que afectan a pacientes con fibrosis quística y es un mecanismo relacionado con patogenicidad en estos pacientes. Dentro de los factores de virulencia extracelulares que facilitan el rompimiento de la integridad epitelial podemos citar las elastasas, proteasa alcalina, fosfolipasa C, neuraminidasa, exoenzima S, lectina y proteasas como hemolisinas y exotoxinas. La fosfolipasa C destruye la membrana citoplasmática, destruye surfactante pulmonar e inactiva las opsoninas.

Su enterotoxina interrumpe la actividad gastrointestinal normal, produciendo diarrea. Entre las proteasas extracelulares, principalmente elastasa y proteasa contribuyen a la adherencia y a la virulencia, causan necrosis tisular por degradación de elastina, laminina y colágeno, inactivan componentes del complemento y degradan citoquinas, incluyendo interleucina (IL2), interferon γ (INF γ) y factor de necrosis tumoral (FNT α). Un lipopolisacárido de pared celular

que existe en múltiples inmunotipos, permite determinar el serogrupo, y es responsable de las capacidades endotóxicas de sepsis clínica, choque, oliguria, leucopenia y coagulación intravascular diseminada. La producción de un biofilm permite la colonización de catéteres intravasculares, peritoneales, urinarios y nasogástricos, y dispositivos ortopédicos. ¹⁸

Resistencia Antimicrobiana en *Pseudomonas Aeruginosa*

Aspectos Epidemiológicos. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista y de los principales agentes causantes de infecciones nosocomiales. El aumento en la resistencia a antimicrobianos es un problema actual y creciente. De acuerdo al reporte del NNIS en pacientes de la UCI la resistencia a cefalosporinas de tercera generación con actividad anti-*pseudomona*, imipenem y quinolonas incremento 20%, 15% y 9% respectivamente en 2003 comparando aislados entre 1998-2002. En América Latina la resistencia a carbapenemicos ha incrementado más rápidamente que en EE UU, del 17% en 1997 a 36% en 2001. La multiresistencia [definida como resistencia a por lo menos un antibiótico de cada grupo (β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas)] se ha incrementado ≥ 4 veces, de 4.1% a 17.1% en este periodo. En EE UU, la multiresistencia, definida como resistencia a más de 3 antibióticos, incrementó, de acuerdo al estudio TRUST de 7.2% en 2001 a 8.8% 2002 y 9.9% en 2003, respectivamente. ^{13,19}

Todo esto traduce los mecanismos de adaptación que tiene *P. aeruginosa* para sobrevivir, donde intervienen mecanismos genéticos, moleculares, biológicos para expresar resistencia a antimicrobianos, aunado a la presión selectiva inducida por el uso no racional de antimicrobianos.

Aspectos Biológicos. Las estrategias bacterianas para evitar la acción de antimicrobianos incluyen: a) disminuir la concentración intracelular del agente, disminuyendo el influjo o aumentando el eflujo, b) inactivación del antimicrobiano por enzimas c) alteración del sitio blanco d) eliminación del sitio blanco por creación de nuevas vías metabólicas.

P. aeruginosa muestra resistencia intrínseca a macrólidos y varios β -lactámicos debido a la relativa impermeabilidad de su membrana externa y aunado al aumento del eflujo del antibiótico por bombas de eflujo. La sobreexpresión de bombas de eflujo implica resistencia a la mayoría de antibióticos incluyendo penicilinas con actividad anti-pseudomonas, cefalosporinas, quinolonas, carbapenémicos y aminoglucósidos.^{11,19}

Co-resistencia y Resistencia Cruzada. La resistencia a una clase de antibióticos se asocia frecuentemente con a resistencia a otras clases de antibióticos en *P. aeruginosa*. Esto puede ser causado por co-resistencia y/o resistencia cruzada. La co-resistencia hace referencia a la presencia de varios mecanismos diferentes en la misma bacteria. Un mecanismo frecuente de co-resistencia involucra la adquisición de genes que confieren resistencia a una variedad de clases de antimicrobianos. Resistencia cruzada se refiere a que un mismo mecanismo confiere resistencia a la mayoría de los miembros de una clase de antimicrobianos.^{11,20}

Aspectos Genéticos y Moleculares. *P. aeruginosa* produce una β -lactamasa inducible cromosomal AmpC que contribuye a la resistencia intrínseca o rápidamente inducible a ciertos β -lactámicos. La producción de AmpC es regulada por interacciones complejas entre los genes cromosomales. La expresión genética

es regulada por la síntesis citoplasmática del peptidoglucano mureina. La exposición a β -lactámicos, incluyendo cefalosporinas, cefamicinas, monobactams, y penicilinas de espectro extendido inducen la producción de AmpC, asimismo, ciertas mutaciones genéticas llevan a la producción constitutiva de cefalosporinas.

21

La resistencia a penicilinas anti-pseudomonas y cefalosporinas anti-pseudomonas puede ocurrir por sobreexpresión de bombas de eflujo, sobreexpresión de β -lactamasa AmpC por mutación cromosómica o inducción o producción o adquisición de β -lactamasas de espectro extendido clase A, adquiridas a través de plásmidos. Los genes que codifican para **BLEE (β -lactamasas de espectro extendido)** se asocian con transposones y cassettes genéticos. La resistencia a penicilinas anti-pseudomonas también puede ocurrir por proteínas de unión a penicilinas de baja afinidad. Los carbapenémicos son resistentes a la hidrólisis por β -lactamasas AmpC o BLEE, sin embargo, se han reportado la emergencia de cepas productoras de metalo β -lactamasas hidrolizan carbapenémicos y cefalosporinas y penicilinas pero no aztreonam. Son codificadas por integrinas. Se reportó por primera vez la producción de **metalo- β -lactamasas** en *P. aeruginosa* en Japón en 1991 y desde entonces se han reportado en Europa, América Latina, Japón y otros países asiáticos, Australia, y más recientemente, Canadá y Estados Unidos de Norteamérica. Las más comunes son IMP e VIM. La expresión de β -lactamasa AmpC, mediada genéticamente reduce la susceptibilidad a penicilinas y cefalosporinas. ^{21,22}

La sobreexpresión de **bombas de eflujo** juega un rol importante en la resistencia a quinolonas, pero no parece ser suficiente para conferir resistencia

significativa. Típicamente se combina con mutaciones en la DNA girasa y topoisomerasa IV, para conferir alto nivel de resistencia. Recientemente, se ha descrito el sistema de MexAB-OprM, con el cual se ha observado que aparece un sistema de eflujo que remueve β -lactámicos, cloramfenicol, quinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfas, tetraciclonas y trimetropin. Este mecanismo de resistencia se ha caracterizado en el transposon o SI o plásmido.²³

La resistencia a aminoglucósidos frecuentemente se asocia con sobreexpresión de bombas de eflujo, o producción de enzimas modificadoras (mediadas por plásmidos o cromosómicamente), acetilación, fosforilación y/o adenilación de la molécula de aminoglucósidos.²⁴

Otro mecanismo descrito es la pérdida de la porina OprD, que forma un canal transmembrana accesible a carbapenémicos confiere resistencia a imipenem y susceptibilidad reducida a meropenem.²¹

Métodos de Tipificación de *Pseudomonas aeruginosa*

La mayoría de métodos de tipificación bacteriana son de tipo fenotípico, sin embargo se ha observado que estos métodos no hacen una discriminación correcta de los organismos causantes de brotes nosocomiales. Por ello, se emplean métodos de tipificación genómica como análisis de ácidos nucleicos y polimorfismos de secuencias genéticas (DNA cromosomal, DNA extracromosomal, y RNA). Como fueron descritos inicialmente por Maslow y cols. , Tenover y cols, y Lipuma y cols.

Métodos de Tipificación Fenotípica

Tipificación por características morfológicas. Tradicionalmente *P. aeruginosa* se puede diferenciar por sus características fenotípicas: crecimiento y morfología, bioquímica, serología, pruebas funcionales o fisiológicas ya comentadas previamente. ¹⁸

Tipificación por características bioquímicas. Las cepas de *P. aeruginosa* pueden diferenciarse por un panel de pruebas bioquímicas, basado en su actividad metabólica, es decir, su biotipo. Estas dependen de la actividad metabólica del microorganismo, por lo que la información no siempre es reproducible. Si se combinan con técnicas moleculares pueden ser útiles.

Tipificación por pruebas serológicas. La serotipificación se basa en características de determinantes antigénicos de la cepa a estudiar reconocida por anticuerpos de un huésped infectado. Los determinantes pueden ser proteínas, polisacáridos y lipopolisacáridos (LPS), se basan en el antígeno somático O. La principal limitación de la serotipificación es que diferentes cepas de la misma especie, o cepas de diferentes especies pueden hacer una reacción cruzada, dando resultados falsos positivos. ²⁵

Tipificación por características funcionales o fisiológicas. Los aislados bacterianos se pueden diferenciar por su respuesta a manipulaciones específicas, esto incluye diferencias en la susceptibilidad a antimicrobianos (antibiograma), lisis y susceptibilidad a bacteriófagos (tipificación por fagos), inhibición de crecimiento por bacteriocinas (tipificación por bacteriocinas), patrones de asociación en cultivos celulares, (ensayos de cultivos celulares), toxigenicidad, etc.

Tipificación por susceptibilidad antimicrobiana. La diferencia en la susceptibilidad de un organismo a un panel de antimicrobianos genera un antibiograma del organismo. Es útil como una herramienta de escrutinio, ya que no posee un poder discriminatorio específico requerido para una aplicación epidemiológica. Su principal limitación es que cepas que expresan diferentes genotipos pueden presentar antibiogramas similares o cepas con antibiogramas similares presenten distintos genotipos.

Tipificación por fagos. La tipificación por fagos clasifica las bacterias de acuerdo a la susceptibilidad del microorganismo a lisis por un panel de bacteriófagos. La prueba consiste en inocular la bacteria en estudio en una placa de agar y agregar una suspensión de varios bacteriófagos y después de un periodo de incubación, observar el patrón de lisis de acuerdo a la susceptibilidad y determinar el fagotipo. Esta prueba no está ampliamente disponible.

Tipificación por bacteriocina. Similar a tipificación por fagos, la tipificación por bacteriocinas clasifica los microorganismos de acuerdo a su susceptibilidad a bacteriocinas (productos proteínicos producidos por otras bacterias que inhiben el crecimiento bacteriano). Este método sólo tiene interés histórico. ²⁵

Métodos de Tipificación Genotípica

Todos los métodos de tipificación basados en ácidos nucleicos se fundamentan en diferencias en el contenido de ácidos nucleicos, o secuencias de ácidos nucleicos cromosomal y extracromosomal. Existen tres categorías de métodos de tipificación basados en el análisis del contenido genómico de un organismo. a) Basada en las diferencias alélicas que ocurren con restricción con

endonucleasas, b) análisis comparativo del genoma entero o secuencias específicas y c) técnicas de hibridación.²⁵

Análisis por Endonucleasas de Restricción

Análisis del polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP). Los organismos bacterianos expresan endonucleasas de restricción que se encargan de reconocer secuencias únicas de varios nucleótidos y fragmentar la molécula de DNA en sitios de reconocimiento específico. Las bacterias lo usan para evitar inserción de DNA extraño. Son utilizadas en biología molecular. La comparación de patrones electroforéticos de acuerdo al peso molecular de los fragmentos, es denominado análisis por endonucleasas de restricción, o análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, **RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis). En esta técnica se ha desarrollado dos modalidades a) *Hibridación*, que facilita la detección de los fragmentos de DNA de interés y facilita la interpretación de un patrón de electroforesis. La imagen de los fragmentos de restricción separados en un gel de agarosa se transfieren en una membrana de nitrocelulosa, esta membrana se expone a una sonda de DNA marcada con la molécula que facilita la detección visual de un fragmento de DNA blanco. La sonda es un fragmento de DNA de cadena sencilla que se une a su DNA complementario (hibridación). Así se genera la huella del organismo en estudio (fingerprint). b) *Ribotipificación* (Ribotyping) esta técnica utiliza genes ribosomales (rrn) en la membrana como blanco. Su poder discriminatorio es estrecho y no está recomendada en casos de investigación epidemiológica.

Electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE). En esta técnica se utilizan endonucleasas que reconocen sitios de restricción infrecuentes, para facilitar la interpretación de las bandas. Así se generan grandes fragmentos de DNA. Las piezas de más de 25 kb se desplazan pobremente en el gel de electroforesis. La electroforesis en gel por campos pulsados, se realiza en una matriz de gel de agarosa donde la orientación eléctrica a través del gel se cambia periódicamente. Así se permite que grandes piezas lineales puedan migrar. Todos los organismos son potencialmente tipificables con este método.

Secuenciación. La capacidad de secuenciar el genoma entero de un organismo abre una nueva disciplina llamada comparativa genómica. Esta técnica se basa en conocer la secuencia del genoma completo del organismo en estudio y se utiliza principalmente para fines taxonómicos.

Comparaciones de Microensayos. La disponibilidad del genoma completo permite comparar genomas de acuerdo a patrones de hibridación generados por sondas de DNA de una secuencia conocida en una membrana de nitrocelulosa. Los microensayos también se pueden hacer a partir de fragmentos de DNA productos de PCR.

Técnicas de Tipificación Basadas en PCR

Se clasifican en dos tipos a) basados en polimorfismos de pesos moleculares de un único producto amplificado, b) patrones de bandas de múltiples productos amplificados (fingerprints), y estos pueden dividirse de acuerdo a como se obtienen en 1.)Utilización de secuencias aleatorias para PCR, 2) Utilización de

endonucleasas de restricción y 3) Basados en elementos repetitivos del genoma blanco.

- a) DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD).** Del inglés (Randomly Amplified Polymorphic DNA), es una técnica basada en PCR que aleatoriamente amplifica segmentos de DNA, utilizando iniciadores que alinean específicamente un templete de DNA en un organismo dado. Secuencias de nucleótidos cortas pueden ser amplificadas por reacción en cadena de polimerasa (PCR) con bajas condiciones de especificidad, generando patrones de bandas polimórficas que son útiles en detectar conglomerados de organismos y demostrar la diversidad genética.
- b) Análisis del polimorfismo en la Longitud del fragmento de restricción de productos amplificados por PCR (PCR-RFLP).** (Restriction Fragment Length Polimorphism). Análisis por restricción enzimática, utiliza endonucleasas de restricción a los productos amplificados por PCR. Parte de la secuencia blanco a ser amplificada se conoce, por lo que es específica de especie.
- c) Análisis genómico de la longitud de polimorfismos de fragmentos amplificados (AFLP),** (Amplified Fragment Length Polymorphism Genomic Analysis). Se basa en la amplificación por PCR selectiva del DNA genómico por restricción de fragmentos. El DNA se digiere con 2 tipos de endonucleasas para producir fragmentos con distinta secuencia en cada extremo, en estos extremos se unen secuencias que contienen los sitios de restricción, y así sirven como sitios de alineamiento o iniciadores para la PCR.

Las técnicas consideradas con mayor poder discriminativo para investigación epidemiológica son electroforesis en gel por campos pulsados y RAPD-PCR.^{25,26}

JUSTIFICACIÓN

P. aeruginosa es una de las bacterias gramnegativas más comúnmente aisladas en infecciones nosocomiales, especialmente en las unidades de cuidados intensivos. En Estados Unidos, causa el 10% de todas las infecciones nosocomiales, es la segunda causa de neumonía nosocomial, la sexta causa de bacteremia primaria, ocupa el cuarto lugar en infecciones de sitio quirúrgico y la tercera causa en infecciones de tracto urinario.^{1,3}

La susceptibilidad global a antimicrobianos, incluyendo centros de Norteamérica, América del Sur, Europa y Australia es de 75.4%. En América Latina, las infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos se ha incrementado de 17% en 1997 a 36% en 2001.

En los últimos años (1995-2000) Kato y cols, en un estudio sobre la resistencia en bacteremias en el INCMNSZ, la susceptibilidad a carbapenémicos fue de 90%, a aminoglucósidos de 80%, con menor susceptibilidad a ciprofloxacina y ceftazidima (70%).¹⁴ Recientemente, la tasa de casos de infección por *P. aeruginosa* fue de 1 caso por 100 egresos entre 1999 y 2004. A partir del 2005, se presentó un incremento sustancial en el número de casos de infección por *P. aeruginosa*, (figura 2).

HIPOTESIS

Las infecciones por *P. aeruginosa* ocurridas entre enero-agosto del 2005 fueron ocasionadas por brote nosocomial causado por una clona dominante.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el brote de infecciones por *P. aeruginosa* ocurridas entre enero-agosto del 2005 fue secundario a una clona.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar los factores de riesgo para infección por *P. aeruginosa*
2. Determinar el impacto clínico y la mortalidad asociadas a las infecciones por *P. aeruginosa*
3. Investigar los mecanismos de transmisión relacionados.
4. Detectar la fuente de infección relacionada con el brote.

PACIENTES Y METODOS

Diseño del Estudio

Realizamos un estudio de casos y controles para definir los factores de riesgo asociados a infección por *P. aeruginosa* y para determinar el impacto clínico de las infecciones.

Descripción del Sitio

El estudio fue realizado en el INCMNSZ, un hospital de referencia de tercer nivel de atención que cuenta con 180 camas. Cuenta con cuatro pisos, área de urgencias y una unidad de cuidados intensivos de 20 camas donde se atienden pacientes de especialidades médicas y quirúrgicas.

Selección de Casos y Controles

A partir de los registros del laboratorio de microbiología clínica se identificaron los aislados clínicos durante el periodo de estudio. Se revisó el expediente clínico, y los pacientes que cumplían con criterios de infección de acuerdo al CDC fueron incluidos en el estudio.²⁷ Se definió como caso todo paciente hospitalizado con un aislado clínico positivo para *P. aeruginosa* durante el periodo de estudio, que cumpliera con los criterios de infección de acuerdo a criterios de infección del CDC (neumonía, bacteremia primaria y secundaria, infección del tracto urinario, infección de herida quirúrgica, infección de sitio quirúrgico con afección de órganos y espacios, y osteomielitis) Los controles fueron pacientes hospitalizados en la misma sala que el caso al momento del evento y que no hubieran cursado con infección por *P. aeruginosa*, todos ellos fueron seleccionados al azar con base en un generador de números aleatorios sobre la lista de ingresos hospitalarios durante el periodo de estudio y se eligieron con una relación de 2:1.

Definición de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*

Neumonía intrahospitalaria. Aislamiento de *P. aeruginosa* en muestra respiratoria: expectoración, (lavado bronquioalveolar (LBA), secreción bronquial tomada por trampa de Muller, ó sangre posterior a las 48-72 hrs. del ingreso, o antes si hubo el antecedente de ser trasladado de otro hospital, o una hospitalización en los últimos 14 días, más uno de los siguientes (o dos en el caso de esputo purulento); a) presencia de estertores y/o consolidación a la exploración clínica b) presencia de infiltrado, consolidación o derrame pleural por técnicas de imagen c) Evidencia histológica de neumonía d) Esputo purulento con ≥ 10 PMN en tinción de Gram.

Bacteremia primaria. Aislamiento de *P. aeruginosa* en uno o más hemocultivos sin relación con infección en otro sitio anatómico.

Bacteremia secundaria. a) Aislamiento de *P. aeruginosa* en uno o más hemocultivos. b) El organismo cultivado de sangre, se relaciona con la infección con el mismo organismo en otro sitio anatómico, documentado con cultivo.

Infección del tracto urinario: Por lo menos uno de los siguiente sin otra causa conocida (temperatura ≥ 38 , urgencia, disuria, poliaquiuria, dolor suprapúbico) más urocultivo positivo ($\geq 10^5/\text{cm}^3$, no más de 2 organismos). En pacientes con sonda urinaria se considera el cultivo positivo cuando se obtiene el aislamiento en dos muestras diferentes.

Sitio quirúrgico con afcción de Órganos y Espacios: aislamiento de *P. aeruginosa* obtenido asépticamente de líquido o tejido más uno de los siguientes: drenaje purulento a través de tubos de drenaje o formación de abscesos, durante los siguientes 30 días del procedimiento quirúrgico.

Infección de herida quirúrgica: Aislamiento *P. aeruginosa* (obtenido asépticamente) de la herida y por lo menos uno de los siguientes: drenaje purulento de la incisión quirúrgica, dolor, edema, eritema, aumento temperatura local, durante los siguientes 30 días del procedimiento.

Osteomielitis: Aislamiento de *P. aeruginosa* a partir de biopsia de hueso más uno de los siguientes: hallazgos radiográficos compatibles, examen histopatológico sugerente de osteomielitis.

Variables evaluadas

Se evaluaron las siguientes variables: edad, género, estancia hospitalaria, desenlace al egreso, procedencia de la comunidad o de otro hospital, motivo de hospitalización, enfermedades subyacentes, evaluación de severidad al ingreso por escala APACHE II y SOFA ^{28,29} (Sepsis-related Organ Failure Assesment) al ingreso y al momento del aislamiento, área de hospitalización al momento del evento. En pacientes diagnosticados fuera de UTI, se revisó la estancia en UCI previa durante la hospitalización, procedimientos invasivos durante la hospitalización (catéter venoso central, sonda urinaria, línea arterial, ventilación mecánica, sonda nasogástrica) cirugía, neutropenia grave, uso de terapia inmunosupresora, procedimientos endoscópicos, y tratamiento antimicrobiano. (anexo 1) . La figura 3 muestra el algoritmo de trabajo.

Cultivos Clínicos y Ambientales

Realizamos cultivos de manos del personal de salud entre agosto y septiembre 2005 en una sola toma al personal de la UCI, incluyendo enfermeras, auxiliares y médicos. Utilizando método de guante, que consiste en colocar solución estéril en un guante libre de talco donde se introduce la mano del personal

en estudio, dando un masaje externo y se extrae esta solución que fue destilada por un filtro de nitrocelulosa y este fue incubado en agar McConkey por 12-18 hrs. ³⁰

Tomamos cultivos ambientales de la siguiente manera: se realizaron cultivos del agua de grifos de la UCI, entre agosto y septiembre 2005, una vez a la semana durante seis semanas. Se tomaron 50 mL. de agua de chorro medio en un contenedor estéril, posteriormente se pasaron por un filtro de nitrocelulosa y este se colocó en agar McConkey. ³¹

Los aislados clínicos y ambientales se procesaron de acuerdo a los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*).³²

Pruebas de Identificación y Susceptibilidad de los aislados clínicos y ambientales

Las pruebas de identificación y susceptibilidad a antibióticos en aislados clínicos y ambientales se realizaron con el método semiautomatizado VITEK 1 (bioMerieux, Lyon, Francia), utilizando tarjeta para gramnegativos (GNI (+) REF V 1316) y susceptibilidad a antibióticos GNS-604 V 4223 (bioMerieux). Se realizaron además pruebas bioquímicas complementarias para todos los aislados (reducción de nitratos, crecimiento a 42°). Posteriormente, se confirmó la susceptibilidad a antibióticos con el método de microdilución en placa, para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), de acuerdo a las recomendaciones del CLSI. Los antibióticos evaluados fueron amikacina (AK), ceftazidima (CAZ), cefepima (CEF), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), gatifloxacina (GAT), piperacilina (PIP), piperacilina/tazobactam (PTZ),

ticarcilina/ácido clavulánico (TIM), imipenem (IMP), meropenem (MER). Se utilizaron cepas de referencia *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 5922 recomendadas por CLSI.³²

Tipificación de los Aislados Clínicos y Ambientales

Extracción del DNA. El DNA genómico fue extraído utilizando el método de tiocianato de guanidina. La bacteria fue suspendida en 500 uL de tiocianato de guanidina (5M/ EDTA 0.1M) y 25 uL de sarcosil (10%) hasta observar lisis de la bacteria. Se añadió 250 uL de acetato de amonio frío (7.5 M) dejando la preparación 10 min en hielo. Se realizaron 3 lavados con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se precipito el DNA con 0.54 volúmenes de isopropanol. Se realizo un último lavado con 1 ml de etanol (70%) y resuspender en H₂O.³³

DNA polimórfico amplificado aleatoriamente por PCR (RAPD-PCR).

Para la obtención de los patrones de RAPD, se utilizó el iniciador 1290 5'-GTGGATGCGA-3' ². Se amplificaron aproximadamente 10 ng de DNA genómico purificado en un volumen de 20 uL que contenía 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dNTP (deoxinucleótido trifosfato), 1 U de AmpliTaq DNA polimerasa, (Applied Biosystems, Foster, CA, EE UU) y 30 pmol de primer (SIGMA, Ciudad, Edo, U.S.A.). Las condiciones de ampificación consistieron de 35 ciclos de 15s a 92°, 45s a 36 °, y 1 min 72 °C con una extensión final de 5 min a 72 °C en un termociclador (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn, EE UU). Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%, y visualizado bajo luz ultravioleta después de tinción con bromuro de etidio. Las imágenes fueron digitalizadas con el ChemiDoc System (Bio-Rad

Laboratories, Hercules, Calif, EE UU). Los patrones de amplificados se analizaron con el programa Gel-Compar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgica) asistido por computadora para identificar la similitud genética. La matriz de similaridad y dendrograma fueron calculados usando el coeficiente de Jaccard y el algoritmo de Ward. ³⁴

Análisis Estadístico

En la estadística descriptiva, las variables continuas se expresan en mediana e intervalo mínimo y máximo y las variables categóricas se expresan en frecuencias. En el estudio de casos y controles, se realizó un análisis univariado, utilizando la prueba U de Mann-Whitney para las variables continuas y χ^2 para las variables categóricas. Se consideró significativa una $p \leq 0.05$. Posteriormente, se construyó un modelo de regresión logística utilizando estas variables, y aquellas clínicamente significativas que alcanzaron hasta una $p \leq 0.09$. Se reportan los índices de asociación y se consideró significativa una $p \leq 0.05$. ^{35, 36}

RESULTADOS

Descripción del Brote

Identificamos 75 casos de infección por *P. aeruginosa*, que correspondió a una tasa de 3.14 casos por 100 egresos, comparada con 1.37 casos por 100 egresos en los seis meses previos. La tasa de infecciones por *P. aeruginosa* por 100 egresos rebasó el percentil 100 del canal endémico del Instituto durante 7 meses consecutivos en los ocho meses del periodo de estudio, ver figura 4. Treinta y ocho de los 75 pacientes (50.7%) fueron hombres; la mediana de edad fue de 48 años (16-85). La distribución de los casos y la selección de los controles fueron homogéneas por áreas de hospitalización, ver Cuadro 1. Al final del brote implementamos medidas de control, como regulación estricta y restricción en el uso de antibióticos, reforzamiento de las medidas de aislamiento y vigilancia sobre el lavado de manos del personal las autoridades con lo que observamos disminución en la frecuencia de los casos, la tasa de infecciones por *P. aeruginosa* bajó de 3.14 casos x 100 egresos a 2.37 casos x 100 egresos.

La neumonía intrahospitalaria y la bacteremia primaria fueron los tipos de infección predominantes, con 35 (46.66%) y 18 (24%) de los casos, respectivamente, ver Cuadro 2. Ocurrieron 19 episodios de bacteremia secundaria, 14 asociados a neumonía (73.7%), 2 a infecciones de sitio quirúrgico de órganos y espacios (10.5%), 1 (5.3%) a tejidos blandos, 1 (5.3%) a osteomielitis y 1 (5.3%) a herida quirúrgica, ver Cuadro 2. El desarrollo de bacteremia secundaria no tuvo impacto significativo en la mortalidad RM 0.98 (IC95% 0.31-3, $p=0.78$).

Estudio de Casos y Controles

Ambos grupos (casos y controles) fueron similares en cuanto a edad y género. El hecho de provenir de otro hospital fue más frecuente entre los casos 18.7% que en los controles 5.3% ($p < 0.001$); otras condiciones que fueron más comunes entre los casos que en los controles fueron: la hospitalización en los 3 meses anteriores ($p < 0.001$), el tiempo de estancia hospitalaria (mediana 45 días vs. 14 días, $p < 0.001$), estancia en la UCI ($p \leq 0.024$), hospitalización prolongada en la UCI ($p < 0.001$). Al momento del diagnóstico de la infección, 31 casos (41%) se encontraban en la UCI y 44 (59%) en otras áreas del hospital. De estos últimos, 14 (31.8%) habían estado en la UCI antes de la infección por *P. aeruginosa*. De manera que, 45 pacientes (60%) estuvieron en la UCI antes del evento infeccioso, Cuadro 1. Las comorbilidades más frecuentes incluyeron diabetes mellitus (18/22%), (casos/controles expresados en porcentajes), lupus eritematoso generalizado (10.7/12%), neoplasia de órgano sólido (10.6/9.3%), hipertensión arterial (9/2.7%), leucemias (6.7/3.4%), insuficiencia renal crónica (5.3/5.3%), cirrosis hepática (2.7/6%), trasplante renal (2.7-2%). No hubo relación entre uso de inmunosupresores e infección por *P. aeruginosa*. Los casos presentaron mayor gravedad al ingreso según el resultado de la escala APACHE II (mediana 14 vs. 8.5 puntos, $p = 0.003$).

Procedimientos invasivos. Al evaluar los procedimientos invasivos, los casos requirieron de hemodiálisis con mayor frecuencia, 17.3% vs. 7.3% ($p < 0.039$), uso durante tiempo prolongado de sonda urinaria, con una mediana 7 vs. 3 días (p

<0.001), empleo de sonda nasogástrica y tiempo de uso, 50% vs. 24.7% ($p < 0.001$), ventilación mecánica y tiempo de apoyo ventilatorio ($p < 0.001$), ver Cuadro 3.

Antibióticos antes de la infección por *Pseudomonas aeruginosa*. El uso de antibióticos durante la semana previa al ingreso fue más común en los casos (31%) que en los controles (10%) [RM 4, IC95% 1.96-8.38, $p < 0.001$]. Además, los casos recibieron más antibióticos de distintas familias que los controles [mediana 3 vs. 2, $p < 0.001$]. En el empleo de antibióticos, las variables de mayor relevancia fueron: uso de aminoglucósidos 53% en los casos y 28.6% en los controles [RM 2.84, IC95% 1.6-5, $p < 0.001$] y el tiempo de suministro mediana 0 días en casos (0-35) y 0 días en controles (0-0), tiempo de uso de cefalosporinas con actividad anti-pseudomonas, mediana 0 (0-33) y 0 (0-0), respectivamente ($p < 0.001$); uso de quinolonas 17.3% y 12%, (RM 1.53 IC95% 0.7-3.3) respectivamente y el tiempo de suministro mediana 0 (0-113) y 0 (0-0), respectivamente ($p < 0.001$), el uso de carbapenémicos 26.7% vs. 8.7% [RM 3.82 (1.7-8.2)], y duración mediana 0 (0-60), 0 (0-0), respectivamente ($p < 0.001$), Cuadro 3.

Análisis de regresión logística. Después de hacer el análisis multivariado, encontramos que la estancia hospitalaria prolongada, RM 1.06 (1.03-1.1)], la hospitalización en la UCI [RM 9.75 (2.1-44.2)], y el tiempo de estancia en la UCI [RM 1.08 (1.0-1.17)] fueron los factores de riesgo asociados de manera independiente a infección por *P. aeruginosa*, ver Cuadro 4.

Epidemiología molecular. Realizamos la genotipificación por RAPD-PCR de 145 aislados, 125 aislados clínicos de los 75 pacientes y 20 aislados ambientales (14 de grifos y 6 de manos). Encontramos 55 aislados en 8 conglomerados que

denominamos “clonas”, de los cuales escogimos un aislado por evento infeccioso en 39 casos, los cuales se distribuyen de la siguiente manera: la clona 1 incluyó 19 cepas de 12 pacientes, la clona 2 compuesta por 22 cepas de 14 pacientes, la clona 3 integrada por 2 cepas de 2 casos, la clona 4 compuesta por 3 cepas de 3 casos, la clona 5 formada por 3 cepas de 2 casos, y las clonas 6, 7 y 8 con 2 cepas de 2 casos en cada una. Las 70 cepas restantes recuperadas de 30 pacientes presentaron un genotipo único. Ver figura 5 y figura 6.

Comparación de los casos de transmisión horizontal con los casos de genotipo único.

Encontramos plausibilidad clínica y epidemiológica de transmisión horizontal en 26 casos correspondientes a las clonas 1 (n=12) y 2 (n=14). Los 13 casos restantes con infección por cepas pertenecientes a las clonas 3 a 8 fueron organismos con relación genética pero sin plausibilidad epidemiológica de transmisión horizontal por no compartir relación en tiempo y espacio. Encontramos que todas las cepas de las clonas 1 y 2 fueron recuperadas pacientes hospitalizados en UCI antes de la infección, en 20 casos la infección fue neumonía y los otros 6 infecciones diversas. Los casos de infección por la clona 1 aparecieron de enero a agosto y los casos de infección por la clona 2 se presentaron de marzo a agosto. Ambas clonas mostraron un patrón de multiresistencia a cefalosporinas, quinolonas, carbapenémicos, ureidopenicilinas y carboxipenicilinas. Las características demográficas, las condiciones clínicas, procedimientos invasivos, el uso de antibióticos, y comorbilidades de los casos de infección causados por cepas clonales fueron semejantes a los no clonales. (Ver cuadro 5 y 6).

Mortalidad. La letalidad cruda fue de 33% en los casos (n=25) y de 18.7% en los controles (n=28) [RM 2.18 (1.61-4.1)]; la mortalidad atribuible a la infección fue de 14.3%; la muerte asociada a infección fue de 29.3% (n= 22) vs. 8% (n=12) [RM 4.77 (2.2-10.3)], respectivamente; el tiempo entre el ingreso y muerte fue mediana 66 (5-232) vs. 9 (1-31), respectivamente ($p < 0.001$). La neumonía fue la principal causa de muerte en los casos 56% y 2.6% en los controles [RM 8.3, IC 95% 2.6-26.4, p]. La bacteriemia secundaria no mostró impacto en la mortalidad, (ver cuadro 7).

La mortalidad en los casos de infección por cepas clonales fue de 42.3% y en los casos no clonales de 28.6% (Figura 7). La tasa de mortalidad de los casos clonales fue de 5.3 por 100 egresos y en los casos no clonales de 2.3 por 100 egresos. El riesgo de muerte de los casos de infección por *P. aeruginosa* en comparación con los controles fue de 1.8 ($p \leq 0.035$) y finalmente el riesgo de muerte fue mayor en los casos de infección por cepas clonales en comparación con los controles 2.33 ($p \leq 0.001$), ver cuadro 8.

Cultivos ambientales. En cultivos de agua de grifos, se aisló *P. aeruginosa* en 4 de los 15 grifos localizados en la UCI, uno localizado en la entrada de la UCI, otro grifo localizado en baño de médicos y 2 en la zona de control de enfermería. (Figura 8). La tipificación molecular de estas cepas, no mostró relación genética con los aislados clínicos (Figura 9) Los cultivos de las manos del personal de UCI, fueron positivos para *P. aeruginosa* en 5/76 personas (6.7%), y el análisis molecular no mostró relación genética con los aislados clínicos. (Figura 9).

DISCUSION

En este estudio describimos un brote extenso de infecciones graves por *P. aeruginosa* (75 episodios en un lapso de 8 meses) en un hospital de tercer nivel del Sistema Nacional de Salud con repercusiones graves en los pacientes infectados por este organismo. Además, encontramos que este brote fue secundario a múltiples cepas relacionadas genéticamente (8 clonas), sin embargo dos clonas fueron dominantes (26 casos) como evidencia contundente de transmisión horizontal en esta institución. Documentamos una relación clara en tiempo y espacio con la hospitalización en la UCI, más relevante en aquellos casos de infección pulmonar y muy especialmente con los casos de infección por las cepas clonales. Los factores de riesgo para adquirir la infección por *P. aeruginosa*, después de un modelo de regresión logística, fueron: la estancia en la UCI (RM 9.75, IC 95% 2.1-44.22), el tiempo de estancia en la UCI (RM 1.08, IC 95% 1.0-1.17) y el tiempo de hospitalización antes de adquirir la infección (RM 1.06, IC95% 1.03-1.1). Por otro lado, las infecciones por cepas clonales se asociaron a una tasa más elevada de mortalidad que los controles, que los pacientes hospitalizados en la UCI, y que los casos de infección por cepas no clonales. Aunque no pudimos identificar una fuente común de infección, el brote fue controlado con el reforzamiento de las medidas de control de infecciones nosocomiales, la limitación del uso de antibióticos de amplio espectro y la mejoría de las medidas de aislamiento de los pacientes en áreas de riesgo elevado.

En la literatura se han reportado diversos brotes por *P. aeruginosa*.^{38,39,40,41} Generalmente asociados a estancia en la unidad de cuidados intensivos, hospitalización prolongada, uso de antibióticos y colonización del personal de salud

o de instrumental médico. En este estudio analizamos factores de riesgo para infección por *P. aeruginosa* en un modelo de casos y controles. Para buscar la fuente y mecanismos de transmisión realizamos cultivos ambientales de manos a médicos y enfermeras de la UCI, y en agua de grifos de la ICU. Además realizamos tipificación molecular de todos los aislados analizando polimorfismo de la amplificación aleatoria de ADN por PCR (RAPD-PCR).

Estudio de Casos y Controles

Analizamos 75 casos de infección por *P. aeruginosa* en un lapso de 8 meses. La mayoría se presentaron en la UCI (41.3%), los tipos de infección más encontrados fueron neumonía y bacteremia primaria, que juntas suman el 70.6% de todas las infecciones. Del análisis invariado encontramos como factores de riesgo para infección el traslado de otro hospital RM 4 (IC 95% 1.62-10.21, $p \leq 0.001$) y hospitalización en los 3 meses previos al ingreso RM 2.87 (IC95%1.59-5.1 $p \leq 0.001$). Los casos presentaron hospitalización prolongada comparada con los controles, la mediana de estancia en los casos fue de 45 días (rango de 1-232) y 14 días en los controles (rango 1-108) $p \leq 0.001$. La estancia en la UCI fue el factor con mayor riesgo para infección en el análisis multivariado (RM 9.75, IC 95% 2.1-44.22), además los casos tuvieron mayor tiempo de estancia en la UCI antes de la infección 4 días (rango 0-114) y 0 días (rango 0-50 días) en controles ($p \leq 0.001$).

Estos datos ya han sido reportados en estudios previos, *P. aeruginosa* es un germen que puede permanecer por periodos prolongados en superficies inertes y la hospitalización favorece pérdida de las barreras naturales facilitando la colonización e infección, aunado a factores que favorecen la transmisión

relacionadas con el personal de salud que pueden transportar de un paciente enfermo a otro susceptible.⁴² La UCI reúne las condiciones propicias para facilitar la infección. El estudio SCENIC reporta que más de la mitad de los pacientes hospitalizados en la UCI adquieren una infección nosocomial.³⁸

Al momento del ingreso los casos presentaron mayor puntaje de gravedad por escala de APACHE II, 14 puntos a diferencia de controles 8.5 puntos ($p \leq 0.001$), por escala de SOFA, aunque mostró tendencia a mayor gravedad en los casos, no alcanzo significancia estadística; 4 puntos en casos y 2 puntos en controles ($p \leq 0.19$).

Encontramos que en los casos fue más frecuente la realización de procedimientos invasivos que los controles. Particularmente el uso de catéter venoso central RM 2.27 (IC95% 0.99-5.2 $p \leq 0.049$), hemodiálisis RM 2.65 (IC95% 1.12-6.24 $p \leq 0.039$), sonda nasogástrica RM 3.13 (IC95% 1.74-5.6 $p \leq 0.001$), ventilación mecánica RM 2.7 (IC95% 1.52-4.78 $p \leq 0.001$) y la ventilación mecánica prolongada $p \leq 0.001$. Estudios previos han reportado el uso de procedimientos invasivos como factores de riesgo para adquirir infección Nosocomial por *P. aeruginosa*, Aloush y cols. reporta en un estudio de 82 casos con infección por *P. aeruginosa*, estancia en UCI con RM 17 (2.3-127 $p \leq 0.001$), ventilación mecánica RM 27 (3.6-198 $p \leq 0.001$).

El uso de antibióticos de amplio espectro se han asociado a infección por *P. aeruginosa*. Cefalosporinas y aminoglucósidos específicamente son considerados factores de riesgo importantes.⁴² En nuestro estudio, el uso de cefalosporinas con actividad anti-pseudomonas, mostró tendencia a ser mayor en los casos, pero no alcanzó significancia estadística RM 1.27 (0.73-2.2 IC95% 0.479), el uso de

aminoglucosidos mostro mayor frecuencia en casos RM 2.84 (IC95% 1.6-5.05 $p \leq 0.001$). Meropenem e imipenem mostraron asociación a infección, con RM 3.82 (IC95% 1.78-8.2 $p \leq 0.001$), sin embargo el uso de ertapenem no fue significativo. Nosotros relacionamos este efecto con la inducción de presión selectiva que favorecen la expresión de resistencia, además de la erradicación de flora normal que favorecen la invasión de cepas resistentes.

Epidemiología Molecular

Analizamos 125 aislados clínicos por RAPD-PCR, documentamos 8 agrupamientos que incluían 39 casos de los 75 analizados (52%). Sin embargo predominaron 2 clonas que incluyeron 26 casos y 41 cepas. Las infecciones causadas por estas dos cepas se presentaron en la UCI durante todo el periodo de estudio. La mayoría fue neumonía (77%) y en menor grado bacteremia primaria (11.5%). Estas cepas fueron resistentes a aminoglucosidos (76%), ceftazidima (100%), cefepime (92.7%), quinolonas (100%), imipenem/meropenem (88%), piperacilina (100%), ticalcilina/ac. clavulánico (100%). La prevalencia de resistencia para *P. aeurigosa* en Latino América de acuerdo al estudio SENTRY en 2001 para amikacina fue de 34.6%, ceftazidima 43.7% cefepime 45.2%, ciprofloxacina 50.7%, meropenem 35.6%, piperacilina 40.1%. La resistencia bacteriana ha incrementado en los últimos años, el brote que presentamos sobrepasa la prevalencia de susceptibilidad a antibióticos.⁴⁵

La investigación con cultivos ambientales no documento la fuente de infección. Sin embargo las características epidemiológicas ya comentadas son evidencia de transmisión horizontal.

Mortalidad

Observamos un aumento en la mortalidad en los casos de infección por *P. aeruginosa*, 33.3% comparada con los controles de 18.7% RM2.18 (IC95% 1.61-4.1 $p \leq 0.022$). Asimismo, las tasas de mortalidad fueron más altas en los casos, 4.1 por 100 egresos; comparada con controles, 2.33 por 100 egresos, RM 1.8 (IC95% 1.08-3.05 $p \leq 0.035$), los casos clonales presentaron la tasa mas alta de mortalidad 5.28 por 100 egresos que fue superior a la mortalidad que los casos no clonales 3.57 por 100 egresos, RM 1.49 (IC95% 0.97-2.3 $p \leq 0.08$), y que la mortalidad en la UCI 2.44 por 100 egresos RM 2.2 (IC95% 1.36-3.8 $p \leq 0.001$).

De los 25 pacientes infectados que murieron, 22 de ellos la muerte fue atribuida a la infección. Esto ya se ha visto en otros estudios. Bukholm G, y cols reporta un incremento en la mortalidad por cepas de *P. aeruginosa* perteneciente a una cepa clonal con ventilación mecánica por mas de 6.5 días con RM de 8.4 (IC95% 1.49-47.49 $p \leq 0.016$).⁴⁶

CONCLUSIONES

Los objetivos de este estudio fueron describir las características del brote, determinar los factores de riesgo asociados con infección por *P. aeruginosa* y definir posibles fuentes de infección. Nuestros datos revelan que aunque este brote fue secundario a múltiples cepas genéticamente relacionadas, por lo menos 2 clonas fueron las más numerosas indicando una transmisión reciente. Los microorganismos clonales se asociaron a mayor mortalidad.

Los factores de riesgo para adquirir infección por *P. aeruginosa* fueron hospitalización prolongada y estancia en la UTI.

Aunque no pudimos identificar una fuente común de infección la presencia de dos clonas predominantes sugiere un reservorio no identificado.

Este brote fue controlado con el reforzamiento de las medidas de control de infecciones nosocomiales, limitando el uso de antibióticos de amplio espectro y mejorando las medidas de aislamiento de los pacientes en áreas de alto riesgo.

FIGURAS

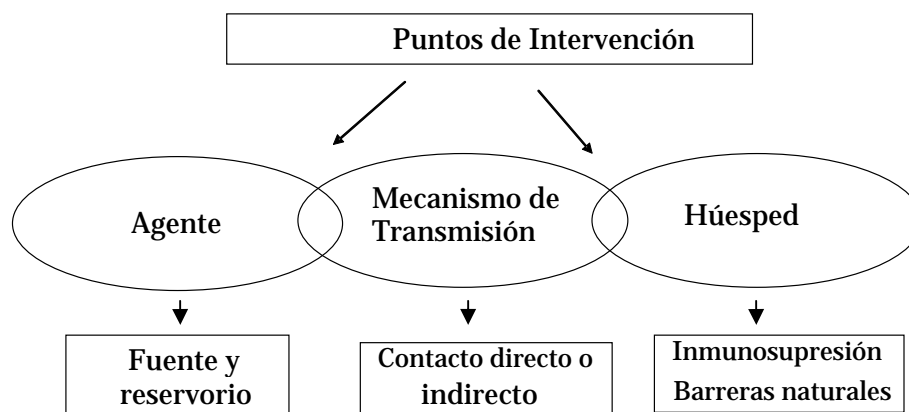


Figura 1. Muestra los puntos de intervención en la Cadena Epidemiológica de Infección Nosocomial para control de Brotes

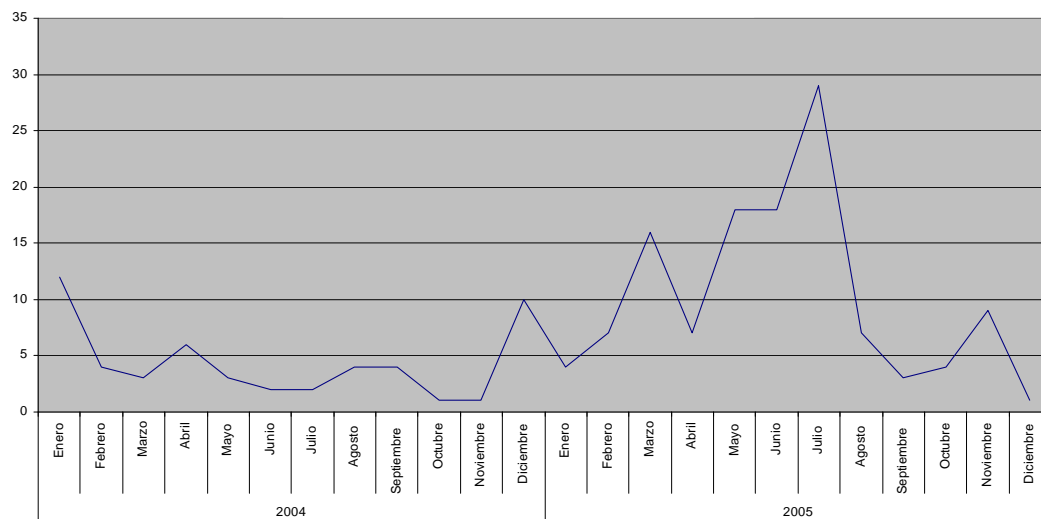


Figura 2. Curva epidémica de los casos de infección por *P. aeruginosa* en el INCMNSZ de enero 2004 a diciembre 2005.
INCMNSZ

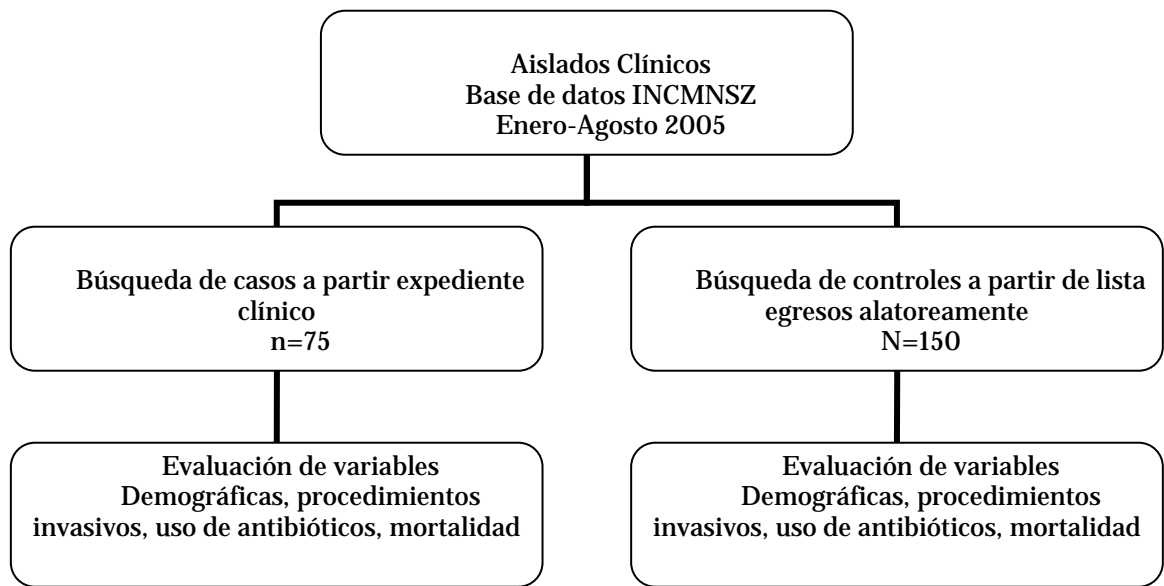


Figura 3. Algoritmo de Trabajo

Canal Endémico para Infecciones por *P. aeruginosa* de 1999-2004

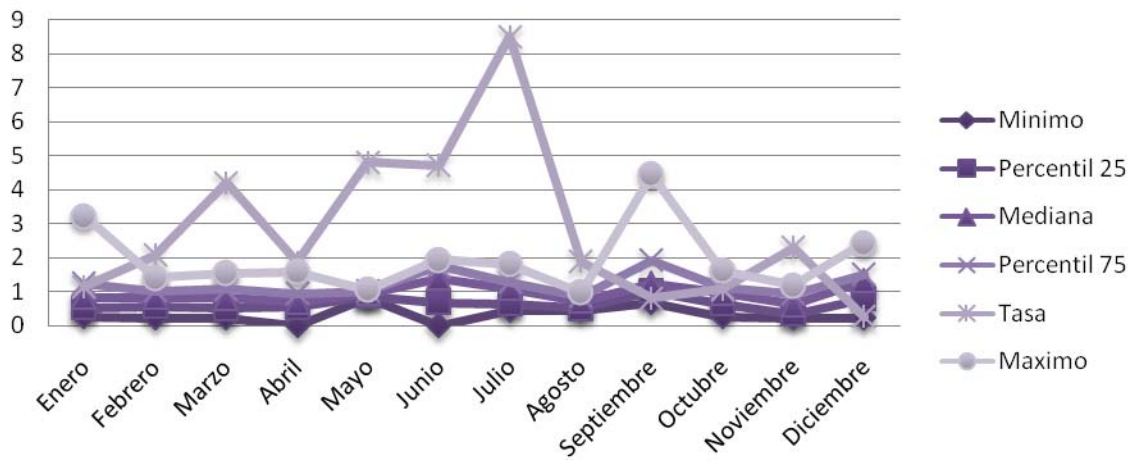


Figura 4. Canal Endémico

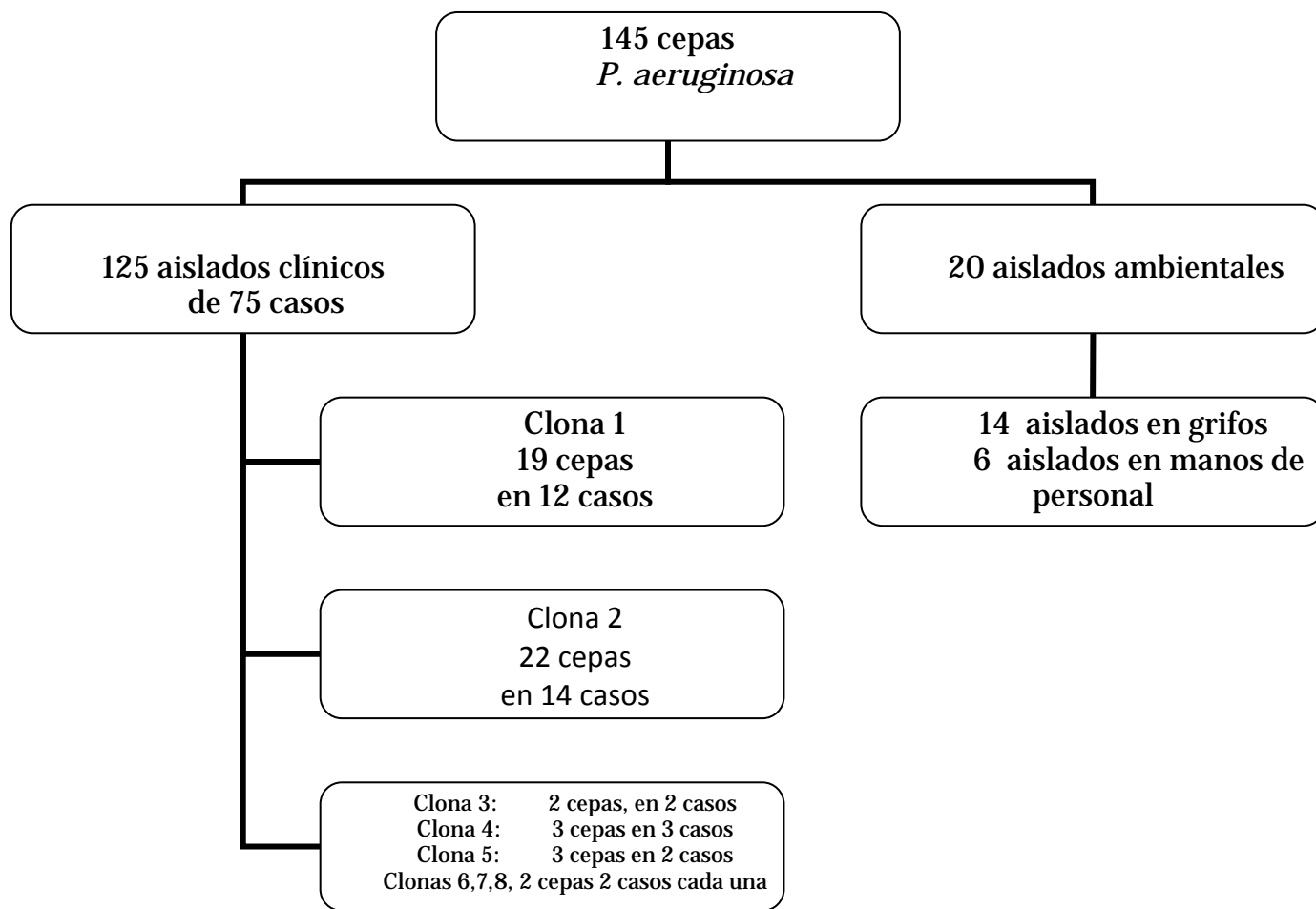


Figura 5. Muestra la distribución de cepas aisladas de cultivos clínicos y ambientales. De las 125 aislados clínicos, 55 (44%) se agruparon en conglomerados, y 26 de estos, mostraron un patrón de transmisión horizontal.

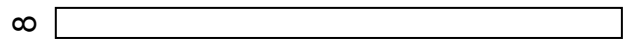
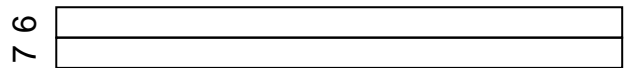
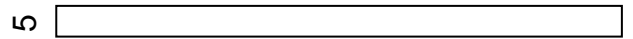
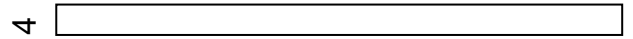
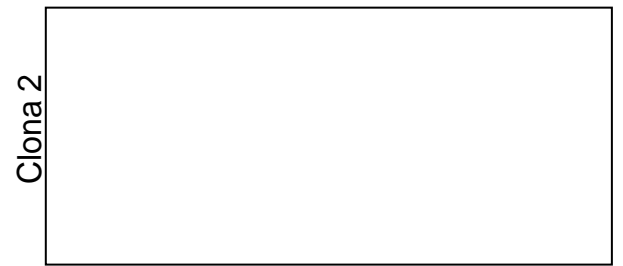
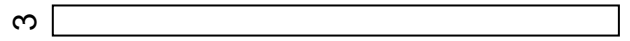
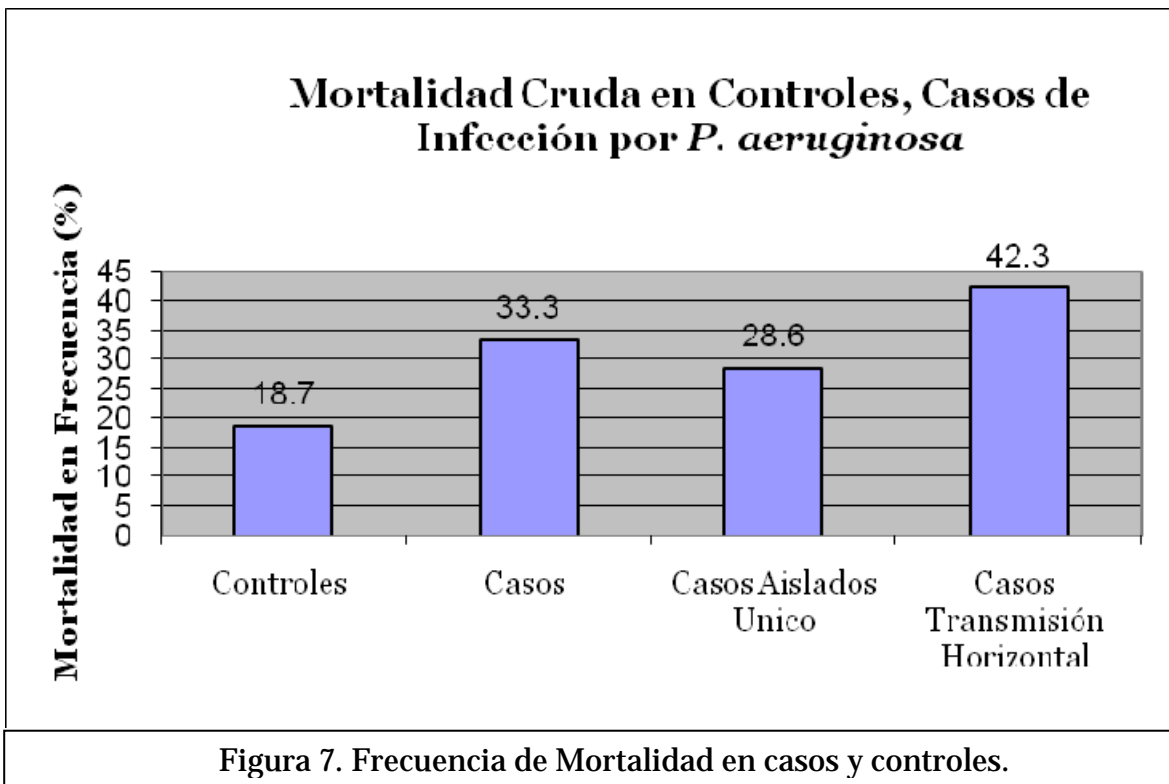


FIGURA 6. Dendrograma de aislados clínicos y cultivos ambientales. Se observan 8 clonas



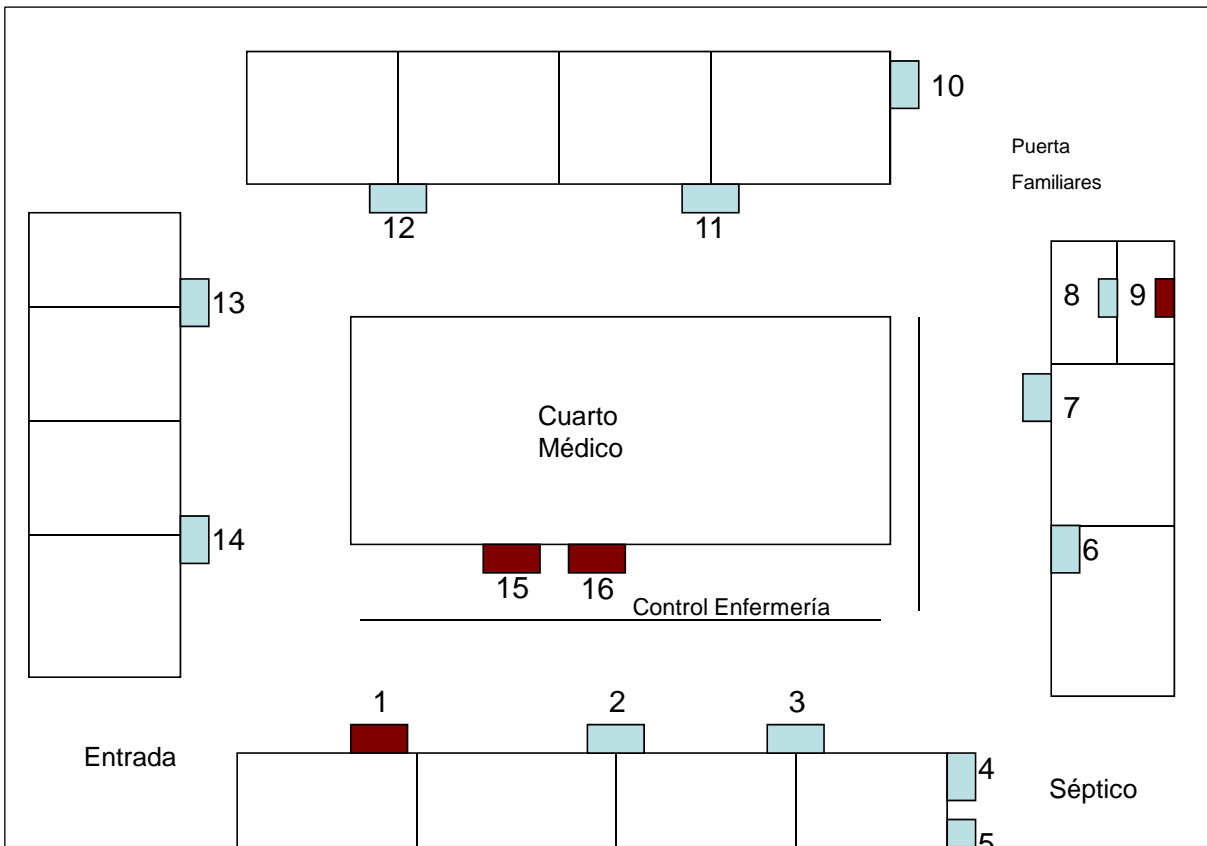


Figura 8. Distribución de Grifos en la UCI

**Cuadros rojos son grifos de los que se obtuvo aislamiento de *P. aeruginosa*.
Cuadros azules grifos sin aislamientos positivos.**

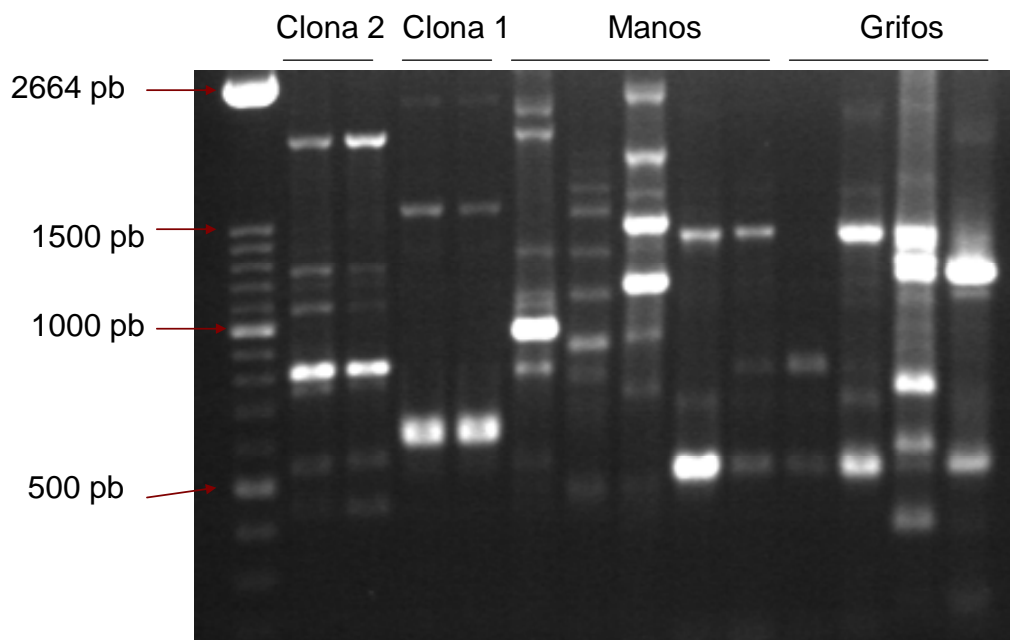


Figura 9. Fotografía de Patrón de bandas de clona 1, 2 y cultivos de manos y grifos. A la izquierda el marcador de peso molecular

CUADROS

Cuadro 1. Análisis Univariado de Factores de Riesgo para infección por *P. aeruginosa*: Características Demográficas, Comorbilidades, Inmunosupresión, Motivo de Hospitalización y Gravedad

CARACTERÍSTICA	Casos (n=75)	Controles (n=150)	RM	IC (95%)	P
Demográficas					
Edad/ años [mediana (min.- max.)]	48 (16-85)	50 (15-97)	NC	NC	0.552
Género Masculino [n (%)]	38 (50.7)	58(38.7)	1.62	(.931-2.85)	0.116
Traslado de otro hospital [n (%)]	14 (18.7)	8 (5.3)	4.07	(1.62-10.21)	≤0.001
Hospitalización 3 meses previos al ingreso [n (%)]	35 (46.7)	35 (23.3)	2.87	(1.59-5.1)	≤0.001
Estancia Hospitalaria [mediana (min.- max.)]	45 (1-232)	14 (1-108)	NC	NC	≤0.001
Estancia UCI [n (%)]	46 (61.3)	68 (45.3)	1.91	(1.08-3.36)	0.024
Días estancia UTI [mediana (min.- max.)]	4 (0-114)	0 (0-50)	NC	NC	≤0.001
Distribución en áreas de hospitalización [n (%)]					
1er piso	7 (9.3)	16 (10.6)	0.862	(0.338-2.1)	0.93
2do piso	14(18.7)	26(17.3)	1.095	(0.534-2.24)	0.95
3er piso	8(10.7)	13 (8.7)	1.25	(0.497-3.18)	0.8
4to piso	1 (1.3)	2 (1.3)	1	(0.08-11.2)	0.53
Terapia intermedia	1 (1.3)	2 (1.3)	1	(0.08-11.2)	1.53
Urgencias	13 (17.3)	26 (17.3)	1	(0.48-2.08)	0.85
UCI	31 (41.3)	63 (42)	0.97	(0.55-1.7)	0.96
Inmunosupresión [n (%)]					
Neutropenia grave	6 (8)	5 (3.3)	2.52	(0.74-8.5)	0.187
Inmunosupresores	24 (32)	32 (21.3)	1.73	(0.93-3.2)	0.11
PDN ≥ 20 mgs	8 (10.7)	14 (9.3)	1.16	(0.46-2.9)	0.93
PDN ≤ 20 mgs	8 (10.7)	13 (8.7)	1.25	(0.49-3.1)	0.808
Gravedad [mediana (min.- max.)]					
Apache II al ingreso	14 (0-32)	8.5 (2-33)	NC	NC	0.003
SOFA al ingreso	4 (0-13)	2 (0-11)	NC	NC	0.19
SOFA al evento	4 (1-11)	0 (NE)	NC	NC	NC

NC= No calculable. NE=No evaluable, UCI= Unidad de cuidados intensivos

Cuadro 2. Tipos de Infección por *P. aeruginosa* en 75 casos y eventos de bacteremia secundaria

	Casos n=75 (%)	Bacteremia 2ria n=19
Neumonía Intrahospitalaria	35 (46.66)	14 (73.68)
Bacteremia primaria	18 (24)	0 (0)
Sitio Quirúrgico	6 (8)	1 (5.26)
Sitio Qx. Órganos/Esp.	5 (6.66)	2 (10.52)
Infección de Tracto Urinario	4 (5.33)	0 (0)
Tejidos blandos	3 (4)	1 (5.26)
Intraabdominal	2 (2.66)	0 (0)
Osteomielitis	2 (2.66)	1 (5.26)

Cuadro 3. Análisis Univariado de Factores de Riesgo para infección por *P. aeruginosa*. Procedimientos Invasivos, uso de Antibióticos.

CARACTERÍSTICA	Casos (n=75)	Controles (n=150)	RM	IC (95%)	P
PROCEDIMIENTOS INVASIVOS					
Procedimientos endoscópicos [n (%)]	14(18)	24 (16)	1.2	(0.58-2.4)	0.753
Catéter venoso central [n (%)]	67 (89.3)	118 (78.7)	2.27	(0.99-5.2)	0.049
Días cateter venoso central [mediana (min.-max.)]	11 (0-103)	8 (0-94)	NC	NC	0.19
Hemodiálisis [n (%)]	13 (17.3)	11 (7.3)	2.65	(1.12-6.24)	0.039
Sonda urinaria [n (%)]	58 (77.3)	105 (70.5)	1.46	(0.76-2.7)	0.246
Días sonda urinaria [mediana (min.- max.)]	7 (0-100)	3 (0-48)	NC	NC	≤0.001
Sonda nasogástrica [n (%)]	38 (50)	37 (24.7)	3.13	(1.74-5.6)	≤0.001
Días sonda nasogástrica [mediana (min.-max.)]	0 (0-98)	0 (0-70)	NC	NC	≤0.001
Línea arterial [n (%)]	21 (28)	45 (30)	0.9	(0.49-1.6)	0.756
Días línea arterial [mediana (min.- max.)]	0 (0-28)	0 (0-18)	NC	NC	0.568
Ventilación Mecánica [n (%)]	42 (56)	48 (32)	2.7	(1.52-4.78)	≤0.001
Días ventilación mecánica [mediana (min.-max.)]	4 (0-100)	0 (0-38)	NC	NC	≤0.001
Cirugía [n (%)]	41 (54)	83 (55)	0.97	(0.55-1.69)	0.509
ANTIBIOTICOS ANTES DEL EVENTO					
Antibióticos 7 días previos al ingreso [n (%)]	23 (31.1)	15 (10)	4.05	(1.96-8.38)	≤0.001
Num. antibióticos previos evento [mediana (min.- max.)]	3(0-11)	2 (0-8)	NC	NC	0.013
Aminoglucósidos	40 (53.3)	43 (28.6)	2.84	(1.6-5.05)	≤0.001
AK	34 (45)	40 (26)	2.28	(1.27-4.07)	0.005
Gentamicina	6 (8)	3 (2)	4.26	(1.03-17.5)	0.063
Cefalosporinas actividad anti <i>pseudomonas</i>	38 (50.6)	67 (44.6)	1.27	(0.73-2.2)	0.479
Quinolonas [n (%)]	13 (17.3)	18 (12)	1.53	(0.7-3.3)	0.37
Meropenem/ Imipenem [n (%)]	20(26.7)	13(8.7)	3.82	(1.78-8.2)	≤0.001
Ertapenem [n (%)]	5 (6.7)	9 (6)	1.1	(0.36-3.4)	1
Penicilinas [n (%)]	20 (26)	30 (20)	1.45	(0.76-2.7)	0.257
Ticar/ PIP/ PIP-TAZ [n (%)]	2(2.7)	0(0)	1.02	(0.99-1.06)	0.11
Colistina [n (%)]	1 (1.3)	0 (0)	6	(0.24-150)	0.619
Metronidazol [n (%)]	19 (25.3)	33 (22)	1.2	(0.62-2.3)	0.576
Clindamicina [n (%)]	15 (20)	29 (19.3)	1	(0.52-2)	0.905
Macrolidos [n (%)]	12 (16)	16 (10.7)	1.59	(0.71-3.5)	0.253
Terapia anti-tuberculosis [n (%)]	4 (5.3)	0 (0)	1	(1-1.1)	0.012
Antifungicos [n (%)]	13 (17.3)	13 (8.7)	2.2	(0.96-5)	0.55
Vancomicina [n (%)]	31(41)	35 (23)	2.31	(1.27-4.1)	0.005

NC= No calculable.

Cuadro 4. Análisis por Regresión Logística para Factores de Riesgo de Infección por *P. aeruginosa*

	RM	IC (95%)	P
Días de estancia hospitalaria	1.06	(1.03-1.1)	≤0.001
Hospitalización en UCI	9.75	(2.1-44.2)	0.003
Días de estancia en UCI	1.08	(1.0-1.17)	0.039

Cuadro 5. Características de aislados de 26 casos pertenecientes a Clona 1 y 2

ID cepa	ID paciente	Muestra	DX	Fecha	Sitio	AK	CAZ	CEF	CIP	GATI	LEV	IMP	MER	PIP	PIPTZ	TIM
CLONA 1																
6173	219432	TM	NIH	30.01.05	UCI (24)	I	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
6175	136909	TM	NIH	4.02.05	UCI(25)	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
6237	220437	HC	NIH	15.03.05	UCI(32)	S	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R
6240	104039	URO	ITU	18.03.05	UCI (29)	S	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R
6243	219593	TM	NIH	19.03.05	UCI (34)	R	R	R	R	R	R	I	R	S	I	R
6265	220313	TM	NIH	5.04.05	UCI 32	I	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R
6269	215231	TM	NIH	9.04.05	UCI (30)	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
6298	221187	HC	NIH	3.05.05	UCI (25)	I	R	R	R	R	R	I	R	S	S	R
4366	183906	HC	Sitio Qx. Org. Esp	21.05.05	UCI 32	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6427	222634	TM	NIH	11.07.05	UCI(31)	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R
6443	222267	HC	Bacteremia 1ria	20.07.05	UCI (29)	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R
6481	186144	Herida	Sitio Qx.	4.08.05	3 (381)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CLONA 2																
6222	220805	TM	NIH	3.03.05	UCI(32)	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R
6229	188008	TM	NIH	4.03.05	UCI (26)	I	R	S	I	R	R	R	R	R	S	R
4344	221624	HC	Bacteremia 1ria	9.05.05	UCI (22)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4363	220169	HC	Bacteremia 1ria	21.05.05	UCI (32)	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6342	222347	TM	NIH	24.05.05	UCI(25)	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6341	221931	TM	NIH	25.05.05	UCI (26)	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
4407	136690	HC	NIH	10.06.05	UCI (24)	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6375	180497	TM	NIH	12.06.05	UCI (21)	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6376	131663	TM	NIH	13.06.05	UCI (31)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
6379	219218	TM	NIH	14.06.05	UCI (30)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6420	147593	TM	NIH	10.07.05	UCI (24)	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6436	213681	TM	NIH	13.07.05	UCI (22)	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6531	222678	TM	NIH	10.08.05	UCI (33)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
6503	87852	TM	NIH	10.08.05	UCI (32)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

ID=Identificación, TM=Trampa Muller, NIH= Neumonía intrahospitalaria ITU= Infección tracto urinario, I=Intermedio, R=Resistente, S=Sensible

Cuadro 6. Frecuencia de resistencia a antibióticos en pacientes casos clonales vs. no clonales

Antibiótico	Casos clonales (n=26) Resistencia (%)	Casos no clonales (n=49) Resistencia (%)	<i>P</i>
Aminoglucósidos	20(76)	11 (22.4)	≤ 0.001
Ceftazidima	26 (100)	13 (26.5)	≤ 0.001
Cefepime	24 (92.7)	20 (40.8)	≤ 0.001
Quinolonas	26 (100)	17 (34.6)	≤ 0.001
Imipenem / Meropenem	23(88)	9 (18.3)	≤ 0.001
Pipracilina	26 (100)	7 (14.2)	≤ 0.001
Ticarcilina / Ac. Clavulánico	26 (100)	16 (32.6)	≤ 0.001

Cuadro 7. Análisis de Factores de Riesgo para Muerte en casos de infección por *P. aeruginosa*

Característica	Casos (n=75)	Controles (n=150)	RM	IC (95%)	P
Mortalidad					
Mortalidad cruda [n (%)]	25 (33.3)	28 (18.7)	2.18	(1.61-4.1)	0.022
Muerte atribuida a infección [n (%)]	22 (29.3)	12 (8)	4.77	(2.20-10.32)	≤0.001
Tiempo entre ingreso y muerte (días) mediana (min-max.)	66 (5-232)	9 (1-31)	—	—	≤0.001

Cuadro 8. Análisis de Mortalidad en casos de Infección por *P. aeruginosa*, Casos Clonales y no Clonales.

Tasa x 100 egresos	Tasa	RM	IC	P
Mortalidad en controles	2.33	1	—	—
Mortalidad en casos clonales y no clonales	4.16	1.8	(1.08-3.05)	0.035
Mortalidad en controles	2.33	1	—	—
Mortalidad en casos clonales	5.28	2.33	(1.42-3.8)	≤ 0.001
Mortalidad UTI	2.44	1	—	—
Mortalidad en casos clonales	5.28	2.2	(1.36-3.8)	≤ 0.001
Mortalidad casos no clonales	3.57	1	—	—
Mortalidad casos clonales	5.28	1.49	(0.97-2.3)	0.08

REFERENCIAS

1. Gaynes R, Edwards RJ, NNIS. Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *CID* 2005; 41:848-54
2. Richards JM, Edwards RJ, Culver HD, Gaynes PR, NNIS. Nosocomial Infections in combined Medical-Surgical Intensive Care Units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000;21:510-15
3. Alpuche A.M, Daza Timana C, Infecciones nosocomiales por bacterias gramnegativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociacion de dos peligrosos enemigos. *Enf Infecc y Micro* 2002; 22: 192-199
4. Arruda AGE, Marinho SI, Boulos M, Sinto IS, Caiaffa HH, Mendes MC, Nosocomial Infections Caused by Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Control and Hosp Epidem* 1999; 20: 620-23
5. Bueno-Cavanillas A, Delgado-Rodriguez M, Lopez-Duque A, Schaffino-Cano S, Galvez-Vargas R. Influence of nosocomial pneumonia on mortality in an intensive care unit. *Crit Care Med* 1994; 22:55-60
6. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control* 2004; 32: 470-85
7. Rangel-Fraustro MS, Morales Garcia D, Baez-Martinez R, Ibarra Blancas J, Ponce de León Rosales S, Validación de un programa de vigilancia de infecciones nosocomiales. *Salud Pública Mex* 1999; 41 (1): S59-S63
8. Navarro NS, Mejía AJM, Rivera García B, Rangel F. MS, ¿Como estudiar brotes de infección nosocomial? *Enf Infecc y Micro* 2003; 23: 17-22

9. García de Jalón J, Astier P, Polo ME, Escobar E, Estudio de brotes nosocomiales. *ANALES SIS San Navarra* 2000, 23:49-68
10. Gastmeier P, Hansen S, Nitzschke-Tiemann F, Groneberg, K, Rüdén H, How outbreaks can contribute to prevention of nosocomial infections: analysis of 1, 022 outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26: 357-361.
11. Miranda G, Leanos B, Marquez L, Valenzuela A, Silva J, Carrillo B, Munoz O, Solorzano F, Molecular Epidemiology of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in a paediatric intensive care unit. *Scand J Infect Dis* 2001; 33:738-743
12. Jones NR, Mendes C, Turner P, Masterton R, 2005. An Overview of the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program: 1997-2004. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 247-256
13. Karlowsky JA, Jones ME, Thornsberry C, Evangelista AT, Yee YC, Sahm DF. Stable antimicrobial rates for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from 2001-2003 tracking resistance in the United States today surveillance studies. *Clin Infect Dis* 2005; 40:s89-98
14. Kato-Maeda, M, Bautista-Alavez A, Rolón-Montes-de Oca A, Ponce-de-León A, Bobadilla-del Valle M, Ruiz-Palacios G, Sifuentes-Osornio J, Tendencia en el incremento de la resistencia antimicrobiana en organismos causantes de bacteremia en un hospital de tercer nivel: 1995-2000. *Rev Inv Clin* 2003; 55: 600-605
15. Sifuentes-Osornio J, Guerrero-Almeida MC, Ponce de León-Garduño LA, Guerrero-Almeida ML. Tendencia de las bacteremias y factores de riesgo de

16. Maravilla Franco E, Genotipificación de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los aminoglucósidos, utilizando la técnica de amplificación al azar del ADN polimorfo (RAPD). Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 2007.
17. McGowan EJ, 2006. Resistance in Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multiresistance to the Maximum. *American Journal of Medicine* 2006; 119: S29-S36
18. Pier GB, Ramphal R, *Pseudomonas aeruginosa*. en: Mandell, Douglas and Bennett's. Principles and practice of infectious diseases, fourth edition. Elsevier-Churchill-Livingstone, Philadelphia, Pennsylvania, 2004:2411-2421.
19. Karlowsky AJ, Jones EM, Thornsberry C, Evangelista TA, Yee CY, Sahm FD, Stable Antimicrobial Susceptibility Rates for Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the 2001-2003 Tracking Resistance in the United States Today Surveillance Studies. *CID* 2005;40 S89-98
20. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos MG, Samore HM, Emergence of Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Risks Associated with Different Antipseudomonal Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1379-82
21. Livermore DM, Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst Nightmare? *CID* 2002; 34:634-40

22. Walsh TR, Toleman MA, Piorel L, Nordmann P, Metallo-B-Lactamases: The Quiet before the Storm. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:306-325
23. Poole K, Eflux-mediated Multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:12-26
24. Poole K, Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:479-487
25. Riley LW, Laboratory Methods Used for Strain Typing of Pathogens: Conventional and Molecular Techniques. En: *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. Principles and Practices*. American Society for Microbiology. Washington DC, EE UU. 2004: 29-62
26. Speijer H, Savelkoul PHM, Bonten MJ, Stobberingh EE, Tjhi JHT, Application of Different Genotyping Methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a Setting of Endemicity in an Intensive Care Unit. *Journal Clin Microbiol* 1999; 37:3654-3661
27. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC Definitions of Nosocomial Infections. En: *Olmsted RN, APIC Infection Control Epidemiology: Principles and Practice*. St Louis: Mosby, 1996: A1-A20
28. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13:818-29
29. Vincent JL, Moreno R, Takala S, Willats S, De Mendoca A, Bruining H, The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) Score to describe organ dysfunction/ failure. 1996. *Intensive Care Med* 22: 207-710

30. Fagernes M, Lingas E, Bjark P, Impact of a single plain finger on the bacterial load on the hands of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epimemiol*. 2007; 28:1191-1195.
31. Trautman Trautmann M, Lepper PM, Haller M, Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005;33 :S41-9.
32. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for*
33. *Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S15. CSLI , Wayne PA 2005.
34. Pitcher, D.G., N. A. Saunders and R.J. Owen. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett App. Microbiol* 1989, 8:151-156.
35. Akopyanz, N., N.O. Bukanov, T.U. westblom, S. Kresovich and D.E. Berg. DNA among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res*. 1992, 20:5137-5142.
36. Moreno-Altamirano A, López-Moreno S, Corcho-Berdugo A, Principales medidas en epidemiología. *Salud pública de México* 2000; 42: 337-48
37. Correa A, Stewart FW, Santos-Burgoa C, La medida de la exposición en estudios de casos y controles: métodos y recomendaciones registrados en la literatura. *Bol Oficina Sanit Panam* 1996; 120: 504-519
38. Vilar-Compte D, Jacquemin B, Díaz-González A, Velasquez C, Volkow P, Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmactectomizadas. *Salud Pública de México* 2003; 45: 371-378

39. Ostrosky-Zeichner L, Baez-Martínez R, Rangel-Frausto MS, Ponce de León S, Epidemiology of Nosocomial outbreaks: 14-years experience at a tertiary-care center. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21: 527-529.
40. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y, Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Risk Factors and Clinical Impact. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 43-48
41. Bukholm G, Tannaes T, Britt BK, Smith EN, An Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Increased Risk of Patient Death in an Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 441-446
42. Larson E, Aiello A, Lee LV, Della-Latta P, Gómez-Duarte C, Lin S. Short- and long-term effects of handwashing with antimicrobial or plain soap in the community. *J Community Health*. 2003 Apr; 28(2):139-50.
43. Traunmann M, Lepper MP, Haller M, Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* 2005; 33: S41-9.
44. Sader SH, Fritsche RT, Jones NR, Potency and spectrum trends for cefepime against 65 746 clinical bacterial isolates collected in North American medical centers: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 52: 265-273
45. Andrade SS, Jones RN, Gales AC, Sader HS, Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centers: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial

Surveillance Program (1997-2001) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*
2003; 52:140-141.

46. Bukholm G, Tannaes T, Kjelsberg ABB, Smith-Erichsen N, Outbreak of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Risk of Patient Death in the Intensive Care Unit. *Infect Control Hosp Epimemiol* 2002;23: 441-446.

ANEXO 1 HOJA DE CAPTURA DE DATOS

1. - Num. Identificación sujeto 2.- Fecha de elaboración / /
3. No registro: 4. Caso (1) Control (0)
- 5.- Apellido Paterno, Apellido Materno y Nombre: _____
- 6.- Fecha de nacimiento (dd/mm/yy) / /
- 7.- Género: 0. femenino 1. masculino
- 8.- Fecha de Ingreso (dd/mm/aa) / / 9.- Fecha de Egreso / /
- 10.- Estancia Hospitalaria (días)
- 11.- Desenlace al egreso: (0=mejoría, 1=muerte, 3=dato no disponible, 4= Máximo beneficio, 5=voluntaria)
- 12.- Muerte atribuida a proceso infeccioso (1=si, 0=no)

Marque con una cruz

Sepsis	<input type="checkbox"/>
CID	<input type="checkbox"/>
Otras	<input type="checkbox"/>
Especifique	<input type="text"/>

- 13.- Procedencia (1. comunidad, 2, Otro Hospital) 14.- Hospitalización Últimos 3 meses (0=no, 1=si)
- 15.- Tiempo que fue egresado en días
16. Llene en los espacios (motivo de hospitalización MH, Comorbilidades COM, e infecciones asociadas y no asociadas a PA)

	Enfermedades Crónicas	MH	COM	29	Enf. Autoinmunes	MH	COM			MH	Infecciones
1	<i>Endocrinas</i>			30	AR			68	Sitio quirúrgico		
2	DM2			31	Amiloidosis			69	Tej. Blandos		
3	Bocio			32	LES			70	Sepsis ab.		
4	<i>Cardiovasculares</i>			33	Dermatomiositis			71	TB		
5	HAS			34	Enf. Mixta TC			72	Neuroinfección		
6	ICC			35	SAF			73	Osteomielitis		
7	Cardiomiopatía			36	Sx. Alport			74	Colangitis		
8	<i>Gastrointestinal</i>			37	Complicaciones Agudas			75	Mediastinitis		
9	Cirrosis Hepática			38	Cetoacidosis			76	Neumonía asp		
10	CUCI			39	TEP			77	Endocarditis		
11	<i>Pulmonar</i>			40	Hemorragia pulmonar			78	Sinusitis		
12	Fibrosis Pulmonar			41	Gastroenteritis			79	Diarrea inf		
13	<i>Renales</i>			42	Abdomen agudo			80	Candidiasis		
14	IRC			43	Pancreatitis			81	Abse. Pulmonar		
15	Transplantado			44	Hx arma fuego			82	Traqueitis		
16	<i>Neurológicas</i>			45	STDA			83	Otros		
17	Demencia			46	Oclusión intestinal			84	Infecciones por Pseudomonas aeruginosa		
18	Epilepsia			47	BAV			85	Bacteremia 1ria		
19	Otros			48	IRA			86	Bacteremia 2ria		
20	Miastenia gravis			49	Fracturas			87	NIH		
21	Neoplasia Org. Sólido			50	Isquemia cardiaca			88	IVU		
22	Pancreas			51	Ins. Art. Aguda			89	Tejidos blandos		
23	Colangiocar			52	Infecciones No asociadas PA			90	Sitio qx		
24	Vía biliar			53	NAC			91	Intrabdominales		
25	Neoplasia Hematológica			54	NIH			92	Sx qx. Org y Esp		
26	LNH			55	IVU						
27	LAM			56	Bacteremia 1ria						
28	LAL			67	Bacteremia 2ria						

17. Severidad

	INGRESO	EVENTO
APACHE II		
SOFA		
SOFA		
TEMP		
TAM		
FC		
Fio2		
PAo2		
pH		
Na		
K		
Creatinina		
Hcto		
Leucos		
Gasgow		
Plaquetas		
BT		
Gradiente A/a		

18.- Area de hospitalización al momento del evento: 1=piso 1, 2=piso 2, 3=piso 3, 4=piso 4, 5= UCI, 6=urg, 7=ter. Intermedia

29. Estuvo en algún momento en UCI (1=si, 0=no)

Cambios de cama

_____ fecha ingeso _____ fecha egreso _____
 _____ fecha ingeso _____ fecha egreso _____
 _____ fecha ingeso _____ fecha egreso _____
 _____ fecha ingeso _____ fecha egreso _____
 _____ fecha ingeso _____ fecha egreso _____

Infecciones por PA

Fecha	Evento

19.- Infecciones asociadas a *Pseudomonas aeruginosa*

	Aislamiento PA	Fecha
1	Expectoración	
2	Exp T/M	
3	LBA	
4	Hemocultivo	
5	Orina	
6	Orina / Sonda	
7	Biopsia	
8	Otros especifique	

1	S	I	R	2	S	I	R	3	S	I	R
AK				AK				AK			
Genta				Genta				Genta			
PIP				PIP				PIP			
PZ				PZ				PZ			
TIM				TIM				TIM			
CEF				CEF				CEF			
CAZ				CAZ				CAZ			
Cipro				Cipro				Cipro			
Nor				Nor				Nor			
OF				OF				OF			
Mero				Mero				Mero			

20.- Criterios Dx. 0=ausencia, 1=presencia

NIH	Inf. Sitio qx..	Intraabdominal
Estertores / consolidación clínica	Superficial	Evidencia de absceso
Rx, infiltrado, consolidación, o derrame	Profunda (fascia, músculo)	Histopatología
Evidencia histológica neumonía	Esta en los 30 días procedimiento?	
Expectoración nueva (≥ 25 pmn, ≤ 10 -15 células)	Drenaje purulento por herida	
IVU	Dolor	
Cultivo $\geq 100,000$ UFC/ml (10^5 ml.) germen único	Edema	
Asociada a catéter 2 cultivos	Eritema	
Fiebre (sin otra causa conocida)	\geq temp. Local.	
Urgencia	Inf. Organos y Espacios (30 días de qx)	
Disuria	Drenaje por drenajes	
Dolor suprapúbico	Evidencia de abscesos	

21.- Factores de Riesgo 0=no 1=si

	Si/ NO	Días antes del evento	Días después del evento	Comentarios
CVC				Tipo de catéter
Sonda Foley				
Línea arterial				
Ventilación M				
Neutropenia ≤ 500				
Terapia Inmunosupresora				Dosis PDN: Tiene más de 2 meses?
SNG				
AB 7 días previos				Esquema :

--	--	--	--	--

22.- Antibioticoterapia

Terapia empírica adecuada (1=si, 0= no) si recibió por lo menos un agente anti-pseudomona

Terapia ajustada a susceptibilidad (adecuada=1 (cobertura) insuficiente =0 (muestra susceptibilidad intermedia o resistente)

	Previos al evento		Posterior al evento		Observaciones
	Si/NO 0=no, 1=si	# días	Si/No 0=no, 1=si	# días	
AK					
Gentamicina					
CAZ					
CEF					
CRO u otras					
Mero/Imipenem					
CIP					
Gati/ Moxi					
OFLO/NOR					
TIM/ PIP/PTZ					
Metronidazol					
Clinda					
Claritro/azitro					
Antifungicos					
Anti TB					

3.- Aislamientos (Solo si es necesario agregar algo)

Aislamiento

Num. muestra	Fecha toma	Sensibilidad	
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

Comentarios: