

302827⁶
2230



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A.C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

ANALISIS EPIDEMIOLOGICO Y MICROBIOLOGICO DE LA
RESISTENCIA DE ALGUNOS BACIOS GRAMNEGATIVOS A
AMINOGLICOSIDOS Y BETA-LACTAMICOS DE AMPLIO
ESPECTRO EN UN HOSPITAL DE TERCER NIVEL EN MEXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
ROSA AURORA GONZALEZ SANDOVAL

MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

2.2.2.1	Mecanismo de resistencia a β -lactámicos.	20
2.2.2.2	Mecanismo de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro.	21
2.3	Epidemiología nosocomial.	23
2.4	Métodos de investigación.	25
3	PARTE EXPERIMENTAL.	
3.1	Diagrama de flujo.	27
3.2	Material, reactivos, medios de cultivo y equipo.	28
3.2.1	Material biológico.	28
3.2.2	Material de laboratorio.	28
3.2.3	Medios de cultivo.	29
3.2.4	Equipo de laboratorio.	29
3.2.5	Reactivos.	30
3.2.5.1	Agentes antimicrobianos.	31
3.2.6	Preparación de reactivos.	32
3.2.6.1	Preparación de medios y reactivos para tipificación bioquímica de <i>Klebsiella</i> y <i>Serratia</i> .	32
3.3	Metodología.	36
3.3.1	Métodos de Sensibilidad.	36
3.3.2	Método para la tipificación bioquímica de los géneros <i>Klebsiella</i> y <i>Serratia</i> .	36
4	RESULTADOS Y DISCUSION.	38
4.1	Resultados	38
4.2	Discusión	50
5	CONCLUSIONES.	67.
	BIBLIOGRAFIA.	68

Capítulo 1 INTRODUCCION.

1.1 Planteamiento del problema.

Durante las últimas cuatro décadas de la era antimicrobiana se han observado cambios progresivos y profundos del perfil de sensibilidad antimicrobiana (15) y, paralelamente, en la etiología de las infecciones nosocomiales.

Las infecciones intrahospitalarias, en la década de los 40's, eran más frecuentemente causadas por cocos grampositivos (51). Muchos de estos microorganismos, especialmente *Staphylococcus aureus*, en eventos mutacionales al azar presentaron resistencia a los antibióticos disponibles, y se asociaron con grandes epidemias. La amenaza de estas infecciones persistió durante las dos siguientes décadas, pero gradualmente han sido reemplazados por los bacilos gramnegativos. Desde algunos años se ha notado un incremento en la proporción de estos microorganismos, en el número de antibióticos a los que son resistentes, así como en el grado de resistencia; es decir que se requiere una mayor concentración del antimicrobiano para inhibir a estos gérmenes (4,62). En los pacientes hospitalizados con infecciones graves, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. y algunas enterobacterias como *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*, son los patógenos de mayor riesgo para multirresistencia y se asocian, además, con una alta mortalidad (52).

Diversos factores como el uso irracional e inadecuado de los antibióticos (en elección por actividad, dosis, vía de administración y tiempo) han contribuido a la proliferación de numerosos microorganismos resistentes (59). La prevalencia de éstos ha sido particularmente notable después del empleo de antibióticos como aminoglicósidos, penicilinas, quinolonas y cefalosporinas de amplio espectro.

Por otro lado, es bien conocido que los patrones de resistencia de los gérmenes intrahospitalarios varían a lo largo del tiempo e incluso, en ocasiones entre los diferentes servicios dentro de un mismo hospital (22). Este cambio está

determinado, fundamentalmente, por un proceso evolutivo y de selección natural de la flora habitual prevalente en los hospitales, que se lleva a cabo por un probable mecanismo de presión selectiva por el uso local de antimicrobianos.

Por lo expuesto anteriormente, es necesario conocer el patrón de resistencia de las enterobacterias más representativas como patógenos nosocomiales (*Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Citrobacter* spp y *Serratia* spp) y de *Pseudomonas* spp, a diversos antibióticos (aminoglicósidos y β -lactámicos, penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro) aisladas en un hospital de tercer nivel de atención en México.

1.2 OBJETIVOS.

1) Determinar la susceptibilidad antimicrobiana por microdilución de las enterobacterias (*Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp y *Serratia* spp) y *Pseudomonas* spp. identificadas, inicialmente, como resistentes a β -lactámicos por el método de difusión en agar (cefalosporinas de amplio espectro, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas) y a aminoglicósidos en un centro de tercer nivel (INNSZ) de mayo de 1989 a enero de 1990.

2) Determinar y comparar el patrón de resistencia antimicrobiana, la especie y el biotipo de los bacilos gramnegativos resistentes aislados de pacientes hospitalizados o de consulta externa.

3) Determinar la concordancia entre los métodos de susceptibilidad antimicrobiana de difusión en agar y microdilución en bacilos gramnegativos multirresistentes.

1.3 HIPOTESIS.

1) Los bacilos gramnegativos identificados como resistentes a aminoglicósidos y β -lactámicos de amplio espectro por el método de difusión en agar presentan un nivel de resistencia alto a estos antibióticos.

2) Los bacilos gramnegativos aislados de pacientes hospitalizados presentan

un perfil de multirresistencia, y una menor proporción de sensibilidad a aminoglicósidos y β -lactámicos, con predominio probable de una especie y/o tipo.

3) Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana que se emplean en este estudio son concordantes en la determinación de la resistencia a aminoglicósidos y β -lactámicos en bacilos gramnegativos.

Capítulo 2 ANTECEDENTES.

2.1 Generalidades de antibióticos:

En la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, miles de productos naturales han sido planteados en una actividad del antibiótico; pero pocos han demostrado ser seguros, eficaces y capaces de ser producidos en cantidades comerciales. Las sulfonamidas fueron los primeros agentes antimicrobianos efectivos de amplio uso para diversas infecciones aplicados en 1936 (23). La edad de oro empezó con la producción de la penicilina en 1941 cuando este compuesto previamente descubierto en 1929, fue producido en cantidades masivas, disponibles para tratamientos clínicos en la primera dosis.

Estos agentes sintéticos fueron seguidos en 1950 por otros antibióticos y el amplio uso de estos agentes antimicrobianos ha provisto de un restringido medio selectivo que favorece la aparición y el surgimiento de nuevos microorganismos resistentes. Muchos estudios realizados han demostrado la presencia de bacterias resistentes a agentes antimicrobianos en hospitales, agricultura y en varias formas animales acuáticas (35), ya que han sido usados para reducir la probabilidad de infecciones bacterianas.

Los antibióticos tienen como primer paso importante la purificación y la caracterización química como una técnica previa a las pruebas biológicas, investigándose también el modo de acción del producto quimioterapéutico.

Comúnmente de 20 a 30 agentes antimicrobianos son de uso médico, algunos están disponibles para la práctica médica general, mientras que otros están reservados para el uso especializado en el hospital (58).

2.1.1 Clasificación de los antibióticos.

Los antibióticos se han clasificado de acuerdo a su estructura química, mecanismo de acción, actividad bactericida y bacteriostática; y su espectro antibacteriano (ver cuadro 1).(23,39,40).

Cuadro 1. Clasificación de los antibióticos.

ANTIBIOTICO	BLANCO CELULAR	EFEECTO ANTIMICROBIANO
Aminoglicósidos Amikacina Gentamicina Tobramicina Netilmicina	Subunidades 30 S y 50 S ribosomal.	Inhibe la síntesis de proteínas por sus efectos sobre los ribosomas, ocasionando la lisis celular.
β-lactámicos Penicilinas Cefalosporinas	Pared celular de las proteínas.	Inhibe la síntesis de la pared celular, por lo que ocasiona la li- sis celular.
Macrólidos Lincosamidas	Subunidad 50 S ribosomal.	Inhibe la síntesis de proteínas por sus efectos sobre los ribosomas.
Estreptograminas		
Sulfonamida	Dihidrofteroato sintetasa.	Inhibe la síntesis del ác. fólico.
Trimetoprima	Dihidrofolato reductasa	Inhibe la síntesis del ác. fólico.
Tetraciclinas Doxiciclina	Subunidad 30 S ribosomal	Inhibe la síntesis de proteínas por sus efectos sobre los ribosomas.
Minociclina		
Cloranfenicol	Subunidad 50 S ribosomal.	Inhibe la síntesis de proteínas por sus efectos sobre los ribosomas.
Agentes análogos a ác.nucleicos.	enzimas virales esenciales.	Detiene la replicación viral y la síntesis del DNA.
Quinolonas.	DNA girasa	Evita la correcta replicación y transcripción del DNA bacteriano.

2.1.2 Aminoglicósidos.

2.1.2.1. Actividad antimicrobiana:

Desde la introducción de la estreptomina en la década de los 40's, los aminoglicósidos han mejorado su eficacia en el tratamiento de las infecciones por bacilos gramnegativos (23,58). Los aminoglicósidos los cuales son compuestos catiónicos, penetran la capa polisacárida extracelular por un transporte activo de difusión y son modificados (9). Estos son potencialmente bactericidas con una amplia actividad de espectro que cubre un importante número de enfermedades clínicas contra los bacilos gramnegativos, los cuales en combinación con antibióticos β -lactámicos actúan eficazmente (33) (ver cuadro 1).

Actualmente, se les reconoce actividad antimicrobiana contra: enterobacterias, *Pseudomonas* spp, otros bacilos gramnegativos aeróbicos no fermentadores, *Staphylococcus*, micobacterias (de rápido crecimiento y otras incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*). Los aminoglicósidos no tienen actividad sobre anaerobios, debido a que requieren de un transporte activo dependiente de electrones (59). Los aminoglicósidos incluyen a la gentamicina, kanamicina, tobramicina, sisomicina, netilmicina y amikacina (10,39). La gentamicina y sisomicina son ligeramente más activas que los anteriores aminoglicósidos (40).

2.1.2.2 Mecanismo de acción:

Los aminoglicósidos inhiben la síntesis protéica y disminuyen la traducción del RNAm en el ribosoma, lo cual no es suficiente para explicar su rápido efecto letal (13).

Los aminoglicósidos se difunden a través de los canales acuosos formados por proteínas porinas, en la membrana externa de las bacterias gramnegativas, ingresando así al espacio periplásmico (23). La permeabilización fuera de la membrana para los aminoglicósidos ocurre siempre, y el mecanismo para la

mediación de estos antibióticos es semejante a las polimixinas (47). El transporte de estos antibióticos a través de la membrana citoplásmica depende de el transporte de electrones, lo que impulsa a la penetración de los aminoglicósidos, esta fase de transporte se ha denominado Fase 1 dependiente de energía (FDE 1), la cual puede verse alterada por cationes divalentes, hiperosmolaridad, reducción de pH y anaerobiosis. En esta fase puede existir resistencia cruzada por la alteración en la concentración de cationes divalentes (Mg^{++}), la cual se ve disminuída en la superficie celular. Después de pasar a través de la membrana citoplásmica, estos se unen a polisomas e inhiben la síntesis protéica. Este proceso parece acelerar el transporte del antibiótico (58) y se conoce poco acerca de esta llamada fase 2 dependiente de energía (FDE 2), la cual se encuentra de algún modo ligada a la interrupción de la membrana (ver figura 1).

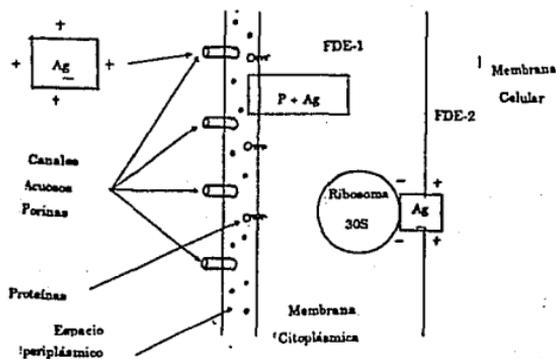


Fig. 1 Mecanismo y sitio de acción de los aminoglicósidos; Ag: aminoglicósido; P: polisoma; P+Ag: inhibición de síntesis protéica; +/-: transporte de electrones; Ribosoma 30S: subunidad ribosómica; FDE, y FDE2: fase 1 y 2 dependiente de energía.

Los aminoglicósidos, inhiben la síntesis de proteínas al unirse en uno o más sitios en los ribosomas, tienen su sitio de acción primario en la subunidad 30 S, lo que puede conducir a la acumulación de complejos anormales llamados "monosomas" (23). Otro efecto de estos antimicrobianos es la capacidad de inducir la lectura equivocada del RNAm, incorporándose aminoácidos incorrectos a la cadena polipeptídica en formación. El cloranfenicol, espectinomicina y otros inhibidores antagonistas de la síntesis de proteínas destruyen a los aminoglicósidos aparentemente a nivel del transporte.

2.1.3 Beta lactámicos.

2.1.3.1 Actividad antimicrobiana.

La importancia clínica de los antibióticos β -lactámicos se ha incrementado significativamente, en cuanto a la potencia de su actividad, ya que presentan un espectro bacteriano amplio que incluye un gran número de microorganismos grampositivos y gramnegativos, lo cual ha favorecido en la clínica dando muy buenos resultados en el tratamiento de infecciones graves (59). Por otro lado, se asocian a una baja toxicidad lo que ha favorecido su uso extenso en la mayoría de los hospitales e inclusive en los pacientes ambulatorios (23).

La estabilidad de estos antimicrobianos ofrece ventajas como la pobre resistencia que generan algunos de ellos, en microorganismos gramnegativos y grampositivos; además los β -lactámicos en combinación con otros antibióticos (aminoglicósidos, quinolonas, etc.) alcanzan actividad bactericida sinérgica y han tenido un buen éxito terapéutico (ver cuadro II). Los β -lactámicos pueden tener ciertas fallas cuando se emplean como monoterapia, lo que puede favorecer la aparición de cepas mutantes resistentes en el ambiente hospitalario, por la producción de proteínas fijadoras de penicilina (PFP) de pobre afinidad como consecuencia de desrepresión del genoma de la bacteria (56), aunque también se han descrito fallas terapéuticas debido a la adquisición de plásmidos mediadores

de β -lactamasas (68).

La estabilidad de las β -lactamasas no garantiza la eficacia de los antibióticos contra infecciones en bacterias como *Enterobacter* spp., y la resistencia ha sido usualmente asociada a la falla terapéutica o al proceso de infección (23).

2.1.3.2 Mecanismo de acción:

La pared celular de las bacterias es esencial para su crecimiento y desarrollo normales (23). El peptidoglucano es un componente heteropolimérico de la pared celular que brinda estabilidad y rigidez a su estructura de enrejado entrecruzado.

Este peptidoglucano está constituido por cadenas glucano que son ramas lineales de 2 aminoazúcares alternantes (N-acetilglucosamina y ác. N-acetilmurámico) entrelazadas por cadenas peptídicas. El componente péptido está constituido de los siguientes aminoácidos: L-ala, D-glu, L-lis, D-ala, D-ala (76). La síntesis de la red ocurre en etapas, y es la final, en la que ocurre el enlazamiento cruzado fuera de la membrana, las enzimas como la transpeptidasa y la carboxipeptidasa contribuyen a catabolizar la síntesis del polímero de la pared celular. La transpeptidación es el sitio de acción de la penicilina y de otros antibióticos β -lactámicos (30) (ver fig. 2).

La lisis bacteriana después de su exposición a los antibióticos β -lactámicos depende de la actividad de las enzimas autolíticas de la pared celular autolisinas o mureinhidrolasas. La interferencia con el ensamble del peptidoglucano en presencia de las autolisinas podría llevar a la lisis celular, pero el mecanismo parece ser más complejo, al parecer la exposición de la bacteria a estos antibióticos produce la pérdida de un inhibidor de las autolisinas (16).

Tipper y Strominger en 1965 (9), encontraron que la penicilina actuaba como un análogo estérico de la porción terminal D-ala de la cadena peptídica en el crecimiento del peptidoglucano (31). La unión de las penicilinas por un enlace covalente da como resultado la inactivación de la transpeptidasa. En la última década, esta hipótesis resultó cierta. Las enzimas que llevan a cabo las reacciones

para elaborar la pared celular, son las PFP. La formación de un complejo acil-enzima también ocurre cuando las β -lactamasas interactúan con las penicilinas. Las β -lactamasas son formas evolucionadas de las enzimas que sintetizan peptidoglucanos, ya que éstas y las transpeptidasas tienen gran similitud en su secuencia de aminoácidos. Las PFP también son necesarias para el mantenimiento y forma bacilar de la bacteria, o para los tabiques en la división (23). La inhibición de las transpeptidasas produce formación de esferoplastos y la lisis rápida (PFP 2), o puede también producir formas filamentosas largas de la bacteria (PFP 3).

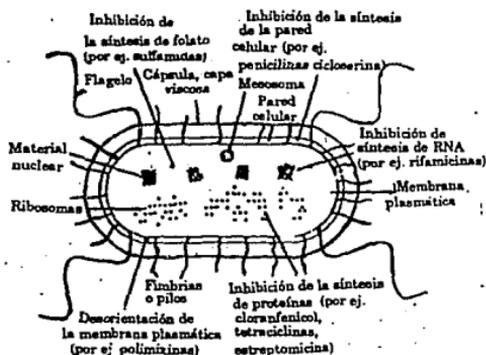


Fig. 2 Mecanismo de acción de β -lactámicos en bacterias gramnegativas.

2.1.3.3 Penicilinas.

Este grupo de antibióticos constituye uno de los más importantes para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (23). Aunque se han producido muchos agentes antimicrobianos desde que se descubrió la penicilina, este grupo ha sido importante y ampliamente utilizado, con nuevos derivados en su núcleo

básico para su producción en cantidades elevadas. Muchos de estos tienen ventajas únicas y en la actualidad los derivados de este grupo de antibióticos, son utilizados como elección para un gran número de enfermedades infecciosas (43).

La cadena lateral de las penicilinas determina muchas de las características antibacterianas y farmacológicas de un tipo particular de penicilina. El descubrimiento de que podían obtenerse cultivos de *Penicillium chrysogenum* llevó al desarrollo de las penicilinas semisintéticas. La intensidad y duración del tratamiento con penicilinas es necesaria para abortar cierto tipo de infecciones ya que este tipo de antibióticos son más activos contra bacterias en su fase de crecimiento logarítmico y tienen poco efecto sobre los microorganismos en la fase estacionaria, cuando no existe la necesidad de sintetizar componentes de la pared celular (60) (ver cuadro 2).

Las penicilinas G y V son muy efectivas contra muchas especies de cocos grampositivos y gramnegativos. Los estreptococos son muy susceptibles en concentraciones mínimas. Las penicilinas de amplio espectro como la carbenicilina se extiende contra varias especies de *Pseudomonas* spp y bacilos gramnegativos.

2.1.3.3.1 Clasificación de las penicilinas.

Las penicilinas han sido clasificadas de acuerdo a su espectro de actividad antimicrobiano (ver cuadro 2) (23,76).

2.1.3.4 Cefalosporinas.

Las nuevas cefalosporinas ofrecen un amplio espectro de actividad antibacteriana con baja toxicidad (9,20,40), la molécula básica de las cefalosporinas ha sido modificada para incrementar la potencia, ampliar el espectro de actividad, mejorar la estabilidad frente a las diversas β -lactamasas y modificar las propiedades farmacológicas de estos antibióticos por lo que han sido catalogadas como miembros de la 1a, 2a y 3a generación. Al igual que las penicilinas, las

cefalosporinas suelen ser antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared bacteriana (23,56) (ver cuadro 3).

Cuadro 2. Clasificación de las Penicilinas.

NOMBRE GENERICO	RESIS. A LA PENICILINASA	ESPECTRO ANTIMICROBIANO
Penicilinas		
Penicilina G	NO	Cocos grampositivos pero poca a <i>S. aureus</i> .
Penicilina V		
Meticilina*		
Ampicilina	NO	<i>S. aureus</i> Bacterias gramnegativas
Aminopenicilinas		
Carbenicilina**	NO	Bacterias gramnegativas <i>P.aeruginosa</i> , <i>Enterobacter spp.</i> <i>Proteus spp.</i> indol +
Ureidopenicilinas		
Piperacilina	NO	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> y <i>Klebsiella spp.</i>

* Oxacilina, Nafcilina, Cloxacilina.

** Ticarcilina, Sulbenicilina.

Las cefalosporinas de la generación representadas por cefalotina y cefazolina generalmente tienen un espectro similar de actividad antibacteriana.

Todas tienen una gran actividad contra estafilococos, no se usan en el tratamiento de meningitis causadas por estos microorganismos debido a que no se difunden al líquido cefalorraquídeo y aunque muchas veces muestran actividad contra ciertos bacilos gramnegativos, son inefectivos contra muchas otras bacterias

no entéricas como *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (16).

La producción de enzimas que inactivan cefalosporinas de primera generación condujo a la síntesis de compuestos más estables a las β -lactamasas, surgiendo de este modo los compuestos llamados de segunda generación cuyo espectro, además, es mejor para gramnegativos que positivos siendo los más utilizados el cefamandol, cefoxitina y el cefaclor (23). La síntesis de compuestos con espectro antimicrobiano más reducido condujo a la síntesis de compuestos llamados de tercera generación representados por la cefotaxima, ceftriaxona y ceftizoxima, seguido de compuestos con actividad antipseudomonal como cefoperazona, cefsulodina y ceftazidima. Estos antibióticos tienen gran estabilidad contra muchos gramnegativos debido a su afinidad por las PFP. Su actividad incluye a múltiples enterobacterias resistentes y algunas tienen actividad específica para *Pseudomonas* spp (66).

Las llamadas "cefalosporinas de 4a. generación", cefepima y ceftiproma (HR-810 y BMY-28142), exhiben una importante actividad contra múltiples enterobacterias y *Pseudomonas* spp. (11,59).

2.1.3.4.1 Clasificación de cefalosporinas.

Las cefalosporinas se han clasificado de acuerdo a su mecanismo de acción y espectro antibacteriano (ver cuadro 3) (23,10).

2.2 Resistencia antimicrobiana:

En las décadas de los cuarenta a sesentas el uso de agentes antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones bacterianas pareció ser la solución a este tipo de enfermedades; sin embargo, los patógenos rápidamente desarrollaron mecanismos de supervivencia lo que motivó la búsqueda de nuevos antibióticos (21). En la mayoría de los géneros, los mecanismos de resistencia son múltiples y representan la capacidad de los microorganismos de aumentar su sobrevivencia.

ambientes hostiles a través de la adquisición de determinantes genéticas, cuyo origen puede ser la herencia o la mutación (5,23).

Cuadro 3. Clasificación de las Cefalosporinas.

NOMBRE GENERICO	RESISTENCIA A	ESPECTRO
	β -LACTAMASAS	ANTIBACTERIANO
1a. Generación.		
Cefalotina*	Sensible	Estafilococos, <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp.
Cefazolina		
2a. Generación.		
Cefamandol**	Resistente	Bacterias gramnegativas, cocos grampositivos, anaerobios, (<i>B. fragilis</i>).
Cefoxitina		
3a. Generación.		
Cefotaxima***	Altamente Resistentes	Bacterias gramnegativas, grampositivas y <i>P. aeruginosa</i> .
Ceftriaxona		
Cefoperazona		
Ceftazidima		
4a. Generación.		
Cefepima	Altamente Resistentes	bacterias gramnegativas, <i>Pseudomonas</i> spp.
Cefpiroma		

* Cefapirina, Cefalexina, Cefradina, Cefadroxil;

** Cefaclor, Cefuroxima, Cefonicin, Cefotetan, Ceforanida;

*** Moxalactam, Ceftizoxima.

Estas determinantes por lo general se encuentran en plásmidos (estructuras

subcelulares de ADN, dependientes del genoma), que codifican la información para la producción de sustancias que hidrolizan, inactivan o impiden la entrada de los antimicrobianos a la bacteria, evitando de esta manera su muerte (23,36).

Mientras los plásmidos pueden ser vectores de genes de resistencia, ellos mismos pueden poseer segmentos móviles de DNA llamados transposones, que tienen la habilidad de brincar de un plásmido a otro, o de este al cromosoma. Si la entrada del plásmido es inestable, el transposon puede quedar bien estabilizado en el nuevo huésped por inserción dentro del plásmido residente y/o dentro del cromosoma. El transposon puede acarrear simple o múltiple resistencia; puede entrar y permanecer estable en diferentes especies siempre que el vector entre; siendo éste un plásmido o fago (30,55). El descubrimiento de resistencia transferible provee las bases para entender la rápida diseminación de los factores de resistencia a través de diferentes especies y géneros de bacterias para ayudar a la explicación de porqué diferentes géneros han sido envueltos en genes similares de resistencia.

En los últimos años, la utilización indiscriminada de antibióticos de amplio espectro y la automedicación han favorecido la selección de microorganismos con nuevos mecanismos de resistencia, fenómeno que ha aumentado en forma desproporcionada y sin control, principalmente entre las bacterias gramnegativas (39,72).

En México, la vigilancia epidemiológica es relativamente reciente y algunos brotes de multiresistencia son los que han obligado a las autoridades sanitarias a establecer políticas de uso de antimicrobianos y han estimulado a los investigadores al estudio de patrones epidemiológicos de resistencia a los antimicrobianos comunes (4,10,34). Un ejemplo de esto es el reportado en *Salmonella typhi* resistente a cloranfenicol durante una epidemia surgida en México, donde se reportaron más de 10,000 casos en pocos meses (19) por lo que la resistencia de estas cepas fueron relacionadas a factores R estableciéndose normas de control epidemiológico en este tipo de brotes.

En el INNSZ, la sensibilidad reportada de *Klebsiella* spp, *Serratia* spp, *Pseudomonas* spp, *Citrobacter* spp y *Enterobacter* spp, para amikacina fue de: 82%,

23%, 50%, 81% y 73% respectivamente, estos organismos juntos causan el 80% de las infecciones intrahospitalarias por gramnegativos en orina, sangre y heridas (22,58,66).

En un estudio de vigilancia epidemiológica realizado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (IMSS), la frecuencia de resistencia en gramnegativos fue elevada especialmente en *Pseudomonas* spp, a cefalosporinas de tercera generación que alcanzó hasta el 65% y del 40% en el caso de aminoglicósidos (amikacina), durante el período de febrero a octubre de 1986 (6).

2.2.1 Mecanismos de resistencia.

El uso de los antimicrobianos en el inicio de la terapia para diversas infecciones debe tener una toxicidad selectiva en concentraciones toleradas por el huésped ya que, interfiere con algunos procesos metabólicos de síntesis que solamente existen en el microorganismo y no en el ser humano (47,62).

El desarrollo de la resistencia en los antibióticos, envuelve cambios genéticos estables heredados de generación en generación (29). A nivel celular y subcelular, la mayor parte de los antimicrobianos actúan en una de cuatro mecanismos principales:

- 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- 2) Alteración de la permeabilidad de la célula bacteriana a los antimicrobianos.
- 3) Inhibición de la transcripción del material genético y su traslación.
- 4) Inhibición del ácido nucleico.

Esta serie de mecanismos que resultan de la composición bacteriana genética puede actuar, y la bacteria puede así ser resistente a los agentes antimicrobianos por varios caminos que suelen ser: mutación, transducción, transformación y conjugación (10,23).

No existen evidencias que las mutaciones resulten de la resistencia microbiana por el agente antimicrobiano debida a la exposición de uno o varios antimicrobianos en particular, ya que suelen ser eventos al azar. Esta resistencia

por mutación sigue diferentes pasos dando lugar a alteraciones en la secuencia del ADN del cromosoma bacteriano, lo que se traduce en la síntesis de proteínas alteradas pero funcionales lo que modifica la acción de los antimicrobianos.

En el caso de la transducción interviene el bacteriófago, en la transferencia de la resistencia de un microorganismo resistente a uno sensible acarreado una pieza de ADN. Por otro lado la transformación envuelve un proceso en el que la célula bacteriana incorpora del medio ambiente uno o más genes formados por otra bacteria.

La conjugación juega un papel importante en los mecanismos de resistencia y envuelve 2 factores; uno llamado de resistencia (R), y otro el de resistencia transferida (RTF) (42). La presencia de estos dos factores, son los responsables de la sensibilidad a los antimicrobianos, o de la falla de la síntesis de las enzimas que inactivan a estos microorganismos. Muchas de estas bacterias son capaces de codificar para la síntesis de proteínas tubulares y se cree que a través de ellos el ADN se transmite de una célula a otra. Los plásmidos no son esenciales para el metabolismo de la célula, su pérdida es permanente ya que la célula no puede regenerarlo, sólo adquirirlo de otra bacteria (36).

2.2.1.1 Mecanismos de resistencia a aminoglicósidos.

Los aminoglicósidos son compuestos catiónicos que penetran en la capa polisacárida extracelular por un transporte activo de difusión siendo modificados en la membrana citoplásmica (10); son potencialmente bactericidas con un espectro amplio que incluye a la inmensa mayoría de bacilos gramnegativos aerobios y anaerobios facultativos y estafilococos (13). Las bacterias pueden tener dos tipos de resistencia a aminoglicósidos, una de tipo natural y otra adquirida. Esta resistencia puede ser ejercida por varios mecanismos y puede codificarse tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano (54) y estos son:

2.2.1.1.1 Inhibición enzimática.

La principal forma de resistencia a los aminoglicósidos de los bacilos gramnegativos se debe a la producción de enzimas que inactivan al antibiótico (10). Se han descrito por lo menos 11 enzimas que acetilan, fosforilan o adenilan aminoglicósidos en los grupos amino e hidroxilo expuestos en sus estructuras anulares. A estas enzimas se les denominan: acetiltransferasa (AAC), adeniltransferasa (AAD) y fosfotransferasa (APH). Se cree que estas enzimas se encuentran en la superficie externa de la membrana citoplásmica, en la que podrían interactuar con el antibiótico e inactivarlo antes de que alcance su sitio blanco (39).

La penetración de los agentes antimicrobianos a través de la membrana externa de los microorganismos gramnegativos dentro del espacio periplásmico puede retrasarse, ya que pueden ser alteradas por éstas enzimas en grupos hidroxilo o amino específicos. Al parecer estas enzimas interfieren en el transporte del antimicrobiano al interior de la bacteria.

Los aminoglicósidos se unen a la pared celular, en donde son inactivados por las enzimas modificadoras situadas aquí (10,13). La conjugación en cada caso es catalizado por una enzima producida en la célula bacteriana como parte de su información contenida en un plásmido extracromosomal.

Este proceso de unión debe ser irreversible, ya que es imposible observar en el medio el antibiótico modificado. La inactivación aumenta en forma considerable y el transporte de la célula se vuelve inefectivo debido a la presencia de estas enzimas modificadoras y no se lleva a cabo la 2a. fase del transporte que depende de energía (EDP II) (23).

2.2.1.1.2 Alteración en el transporte del antibiótico.

La información que transmite esta resistencia es transportada en material genético extracromosómico conocido como factor R. Esta es llevada en plásmidos capaces de transferirlos de una bacteria a otra o de ésta a otras especies por conjugación. Cuando el aminoglicósido se incorpora en el medio líquido de las

bacterias que contiene estas enzimas, dan lugar a su reproducción (36,57).

El 99% del líquido no se modifica aún, pero las bacterias no son inhibidas en presencia del antibiótico activo. En las bacterias existe la desorganización de la membrana celular en el cual se suscita la pérdida en el control de la permeabilidad en pequeñas moléculas por lo que la célula muere.

2.2.1.1.3 Resistencia ribosomal.

El aminoglicósido modificado es presentado al ribosoma pero no puede unirse a él, (en éste hay una acumulación del antimicrobiano y la saturación de los sitios de transporte intracelular se encuentran disponibles) ya que la interacción con el ribosoma y el resultado de los efectos en síntesis de proteínas es un paso esencial para la acción de los aminoglicósidos (69). Aquí se establece el equilibrio entre la concentración externa y estos sitios blanco.

2.2.1.1.4 Alteraciones del sitio de acción.

La modificación del sitio de acción es responsable de la resistencia a una gran variedad de antibióticos incluyendo: beta-lactámicos, aminoglicósidos, macrólidos y otros. La mayoría de estas alteraciones inhiben el crecimiento bacteriano al fijarse a una proteína que se encuentra en la membrana citoplásmica las cuales son mediadas cromosómicamente (43).

2.2.1.1.5 Excreción activa de antibióticos.

Debido a que el sitio de acción de los aminoglicósidos es el ribosoma se podría suponer que la disminución en la afinidad de estos antimicrobianos sería uno de los mecanismos más importantes de resistencia, sin embargo, el que tiene una mayor relevancia consiste en la excreción dependiente de energía fuera de las bacterias (28), gracias a la presencia de vesículas que transportan el antibiótico fuera de la

célula, codificadas por plásmidos. Este mecanismo se ha descrito recientemente entre bacterias como *E. coli* resistente a quinolonas y aminoglicósidos respectivamente (19).

2.2.2.1 Mecanismo de resistencia a β -lactámicos.

Desde la introducción de antibióticos β -lactámicos para el tratamiento en pacientes con diversas infecciones, en el ambiente hospitalario (23), se ha visto incrementado el número de casos por multirresistencia a varios antimicrobianos.

Inicialmente los estafilococos resistentes a penicilina eran un problema grave, recientemente han ocupado el lugar las bacterias gramnegativas incluyendo anaerobios las cuales han sido la causa de múltiples brotes de cepas resistentes mutantes (77).

Este problema es en gran parte debido a las β -lactamasas inducidas encontradas en ciertas bacterias gramnegativas (55). Entre estos, el 100% poseen este tipo de enzimas (β -lactamasas) que intervienen en gran medida a la resistencia cruzada, por lo que los antibióticos β -lactámicos tienen varias fallas terapéuticas, debido a la adquisición de plásmidos mediadores de β -lactamasas (60).

Las bacterias resistentes a antibióticos β -lactámicos hidrolizan el anillo β -lactámico de penicilinas y cefalosporinas que pueden ser clasificadas en base a su hidrólisis de diferentes compuestos (30).

En las bacterias gramnegativas la estructura superficial es más compleja ya que en la cápsula la membrana interna está cubierta de lipopolisacáridos. Ciertos antibióticos hidrofílicos se difunden a través de los canales acuosos de la membrana externa formados por proteínas denominadas "porinas". Las bacterias pueden destruir los antibióticos β -lactámicos mediante mecanismos enzimáticos aunque puede haber aminohidrolasas que son poco activas y no protegen a las bacterias por lo que las β -lactamasas son capaces de inactivar algunos de estos antibióticos y así hidrolizar el anillo β -lactámico.

En las bacterias gramnegativas las β -lactamasas se encuentran en

cantidades pequeñas localizadas en el espacio periplásmico de la membrana interna y externa. Estas enzimas están codificadas en cromosomas o plásmidos y pueden ser constitutivas o inducibles. Los plásmidos pueden transferirse entre las bacterias mediante conjugación, y pueden hidrolizar a penicilinas, cefalosporinas o ambas.

Los antibióticos β -lactámicos pueden detener el crecimiento de las bacterias con una falta de autolisinas, pero la lisis no se produce y la bacteria permanece viable. Se dice que este tipo de bacterias son "penicilina-tolerantes" y se han aislado de bacterias grampositivas con infecciones persistentes (16).

2.2.2.2 Mecanismo de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro.

Las antibióticos β -lactámicos como las penicilinas y cefalosporinas, suelen ser bactericidas ya que actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared celular bacteriana (23).

La resistencia a las penicilinas y cefalosporinas se relaciona generalmente a la incapacidad del antibiótico de alcanzar sus sitios de acción, o alteraciones en las proteínas de unión con el antibiótico, de modo que no se realiza esta interacción con las enzimas bacterianas (β -lactamasas) que pueden hidrolizar el anillo β -lactámico e inactivar a las penicilinas y cefalosporinas y de este modo las bacterias pueden destruir a estos antibióticos (39).

Si el antibiótico se une sólo con una enzima a la que inactiva una mutación en la codificación genética de esa enzima, hidrolizan la unión amida en el anillo β -lactámico de los antibióticos sensibles e inactivan estos compuestos. La mayor parte de los bacilos gramnegativos producen al menos una β -lactamasa mediada cromosómicamente siendo enzimas específicas para género y especie. Estas β -lactamasas se encuentran en el espacio periplásmico entre la membrana externa e interna de los bacilos gramnegativos y presentan una barrera para la difusión de estos antimicrobianos al interior de la célula (23) (ver fig. 3).

La resistencia in vitro de las diferentes penicilinas y cefalosporinas a las

β -lactamasas son variables y pueden clasificarse en tres grupos:

- 1) Las sensibles a la mayor parte de las β -lactamasas de algunos bacilos gramnegativos.
- 2) Las resistentes a algunas β -lactamasas como *E. coli*, *Klebsiella* spp. y *Proteus mirabilis*.
- 3) Las resistentes a la mayor parte de las β -lactamasas de gramnegativos.

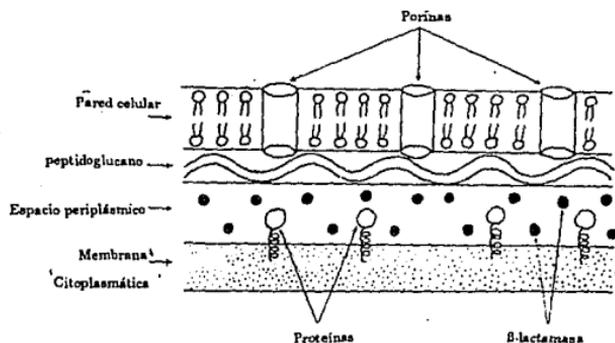


Fig. 3 Representación de la célula y localización de la β -lactamasas en bacterias gramnegativas

Muchos problemas clínicos incluyen la emergencia de la resistencia durante la terapia, esta se ha visto limitada cuando ocurre la múltiple resistencia y es debida a tres mecanismos que han sido encontrados como responsables de esta resistencia (61).

- 1.- Multirresistencia a β -lactámicos por la inducción cromosomal de β -lactamasas debido a la creación de barreras no hidrolíticas que bloquean el acceso a la proteína blanco dentro de la célula.
- 2.- Producción de β -lactámicos-aminoglicósidos resistentes, que envuelven un cambio en la permeabilidad fuera de la membrana.
- 3.- Enzimas como las cefalosporinasas que pueden penetrar rápidamente dentro de

la célula presentando una actividad de resistencia.

La estabilidad de las β -lactamasas no garantiza la eficacia de los antibióticos contra infecciones debidas a la producción de β -lactamasas en las bacterias y esta resistencia ha sido usualmente asociada a la falla terapéutica o al proceso de la infección.

Aunque la mayoría de las cefalosporinas de 3a. generación son relativamente resistentes a la hidrólisis por las β -lactamasas bacterianas, existen pocos informes sobre la resistencia de estos agentes por *Enterobacter*, *Serratia* y *Pseudomonas spp.*(61).

Estas características han sido examinadas para ceftazidima, HR-810 y BMY-28142, las cuales son cefalosporinas de amplio espectro estables a β -lactamasas.

2.3 Epidemiología nosocomial.

Hasta hace unos 40 años los cocos grampositivos eran los causantes de la mayoría de las enfermedades infecciosas, y no se les atribuía ningún papel patógeno fuera de circunstancias muy especiales. A través del tiempo las bacterias gramnegativas fueron adquiriendo importancia clínica y en el aspecto patogenicidad se distinguía al género *P. aeruginosa* conocida por su capacidad de infectar heridas, y en muy raras ocasiones capaz hasta de producir septicemias (51).

En la década de los 50's hacen su aparición los antibióticos de amplio espectro, acelerándose así la evolución de los bacilos gramnegativos, encontrándose en toda clase de procesos infecciosos en forma severa, especialmente cuando producen septicemias (27,51).

La mayoría de las bacterias gramnegativas poseen lipopolisacáridos complejos en su pared celular y han adquirido una importancia reelevante debido a que en la actualidad se ha incrementado en número de infecciones por estas bacterias en los hospitales (35). Estos bacilos gramnegativos son llamados "oportunistas" porque provocan diversas enfermedades en pacientes inmunosuprimidos, ya que constituyen un grupo grande de bacterias comensales

de intestino, colon, vías respiratorias y tracto urinario.

Recientemente estas bacterias han sido causa de un porcentaje alto de morbi-mortalidad (4), debido a que son el producto de una serie de mecanismos de multirresistencia obtenidas mediante la herencia o mutación en cambios genéticos a antibióticos específicos.

Es debido a esto, que la epidemiología nosocomial de los bacilos gramnegativos radica, no sólo en conocer sus patrones de resistencia, sino tratar de controlar este tipo de enfermedades causadas por estos bacilos gramnegativos con una morbi-mortalidad, que ocurre del 2 al 10% de los pacientes admitidos en hospitales generales, sin embargo, estas cifras pueden llegar a ser mayores en centros de tercer nivel (1,15) debido a la naturaleza de las enfermedades subyacentes en estos enfermos y a su estancia prolongada en el hospital, con un incremento en los costes de la atención y un aumento substancial en la mortalidad (52).

Estas infecciones pueden ser de tipo endógeno o exógeno, las endógenas son ocasionadas por microorganismos que están presentes en la flora normal del paciente y las exógenas por microorganismos que se adquieren por la exposición al personal del hospital, servicios médicos o el medio ambiente hospitalario.

Un gran número de infecciones (4,34), son producidas por cepas bacterianas con múltiple resistencia antimicrobiana. Existen varios factores de transmisión por los cuales los microorganismos adquieren una múltiple resistencia y estos suelen ser (4,23): readmisión de los pacientes al hospital, transferencia de pacientes de un lugar a otro, pacientes con cuidados y equipos especiales (sondas, diálisis, catéteres etc.), pacientes con heridas quirúrgicas o de otro tipo, contaminantes del medio ambiente, alimentos contaminados, presión del antibiótico (multirresistencia y/o dosis inadecuada del antimicrobiano), transmisión de persona a persona por medio del personal del hospital (4,34,51).

Entre los bacilos gramnegativos *Klebsiella* spp. (46), ha sido el que más predomina causando una diversidad de enfermedades. Este organismo usualmente se ha visto relacionado junto con *Enterobacter* spp y *Serratia* spp. (41,64) como

membros de la tribu *Klebsiellae* (2) . En años recientes *Klebsiella* spp y *Pseudomonas* spp, los cuales son agentes etiológicos de una gran diversidad de infecciones tienen una elevada mortalidad (75), y se les ha visto frecuentemente asociado a infecciones del tracto respiratorio bajo (46), así como bacteremias, septicemias, pneumonia, abscesos etc. por lo que han sido una causa de infecciones nosocomiales, esta incidencia se incrementa y se relaciona al uso de antibióticos junto con los procedimientos en hospitales.

La resistencia de este tipo de bacterias en hospitales, a múltiples antibióticos, ha sido debida a la presencia de factores R y se le encuentra frecuentemente en el medio ambiente, en el aire, suelo o en otras superficies.

2.3.1 Métodos de Investigación.

Se han implementado varias técnicas en la investigación de brotes epidémicos desarrollados en los hospitales para su identificación rápida en el laboratorio (7), y una de las que más se han utilizado es la serotipificación la cual ha tenido un importante papel a nivel mundial.

Se han realizado diversos esfuerzos en la industria farmacéutica para desarrollar nuevos agentes antimicrobianos con actividad sobre los organismos resistentes gracias al conocimiento que se ha logrado con el estudio de los mecanismos de resistencia bacteriana (21).

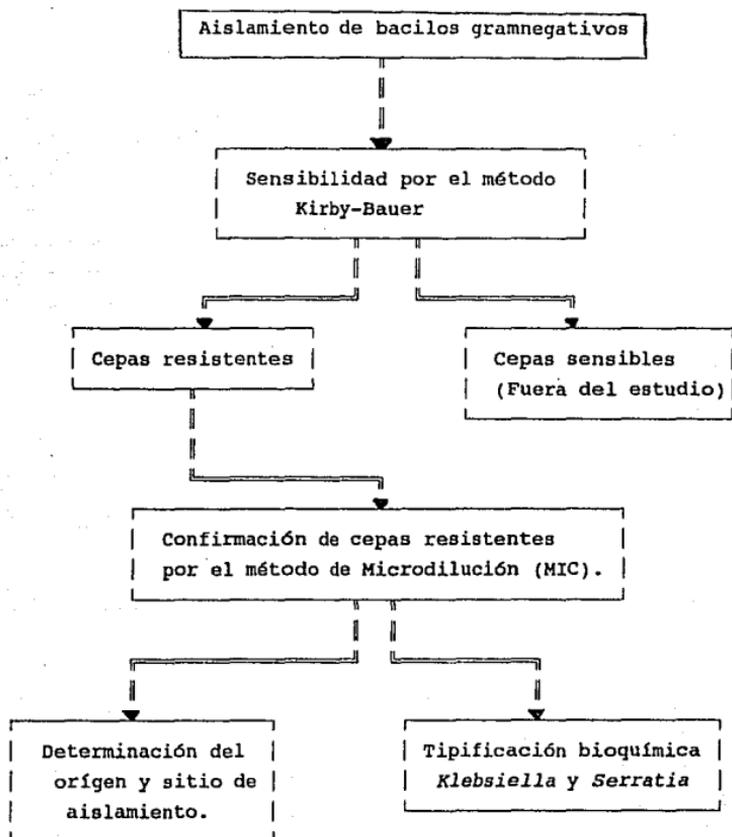
La biotipificación con sistemas comerciales como el API 20E, así como la propuesta por Grimont (24), (prueba de asimilación, producción de pigmento y reducción de tetrionato), así como la múltiple tipificación en cepas de *E. coli* descrita por Wilson M.I. (76), (pruebas de fermentación, resistotipificación, hemaglutinación y pruebas de sensibilidad de antibióticos) son de ayuda para caracterizar a las cepas, siendo una herramienta epidemiológica para los microbiólogos clínicos.

Otras técnicas empleadas por diferentes sistemas son (5,46,54): fagotipificación, producción de la sensibilidad por bacteriocin, zimotipificación,

antibiograma, producción de klebocin así como técnicas más sofisticadas como el perfil plasmídico, susceptibilidad a antibióticos como aminoglicósidos y beta-lactámicos de amplio espectro, polimorfismo enzimático, con la subsecuente producción de prodigiosin y marcadores plásmicos, análisis automatizado de los niveles proteicos de 35-S-metionina por electroforesis SDS (5).

Capítulo 3 PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 Diagrama de flujo.



3.2 MATERIAL, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO Y EQUIPO.

3.2.1 Material biológico:

Durante el estudio se utilizaron 304 aislados clínicos de diferentes sitios de y de muestras clínicas provenientes de pacientes de consulta externa y pacientes de el hospital; de mayo de 1989 a enero de 1990 en el INNSZ.

CEPAS CONTROL: Se utilizaron como cepas control: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. typhi* ATCC 6539.

3.2.2 Material de laboratorio:

Portaobjetos.

cubreobjetos.

asas de nicromo.

tubos de vidrio de 12 x 75, 75 x 75, 13 x 100.

pipetas pasteur.

isopos.

pinzas.

mechero.

microplacas estériles.

puntas para pipetas automáticas.

viales estériles.

recipientes de vaciado.

pipetas graduadas de 1ml, 5ml y 10ml.

espátula.

algodón.

placas de poliestireno estériles.

filtros estériles con membranas millipore 0.45 μ .

jeringas estériles de 5ml y 10ml.

bolso de plástico estériles.

papel filtro y tijeras.

3.2.3 Medios de cultivo:

Agar MacConkey.(Beckton Dickinson).

Agar Nutritivo. (Beckton Dickinson).

Caldo infusión cerebro corazón (BHI). (Beckton Dickinson).

Caldo soya tripticaseína. (Beckton Dickinson).

Caldo Müeller-Hinton suplementado.(Beckton Dickinson).

Agar Mueller Hinton. (Beckton Dickinson).

Agar TSI: Agar triple azúcar hierro. (Beckton Dickinson).

Agar LIA: Agar lisina hierro. (Beckton Dickinson).

Agar Citrato de simmons. (Beckton Dickinson).

Agar SIM: Agar sulfhídrico, indol, movilidad. (Beckton Dickinson).

Medio Voges-Proskauer: Rojo de metilo. (Beckton Dickinson).

Agar DNAsa: (Difco Laboratories).

Caldo urea sacarosa: Surraco. (Difco Laboratories).

Agar MIO: Agar movilidad, indol, ornitina. (Beckton Dickinson).

Caldo LOA: lisina, ornitina y arginina descarboxilasa. (Beckton Dickinson).

Agar Base mineral. (Beckton Dickinson).

Agar bacteriológico. (Beckton Dickinson).

Peptona. (Beckton Dickinson).

Agar soya tripticaseína. (Beckton Dickinson).

3.2.4 Equipo de laboratorio:

Centrífugas. (Beckman).

Estufas o Incubadoras. (Precision Thomas Científic). Mechanical convection incubator.

Microscopio de luz blanca. (Zeiss)

Pipetas multicanal automáticas de 50 μ l. (Dynatech).

Pipetas automáticas de 1 ml. (Sigma Chemical Company).

Balanza analítica. (Mettler).

Selladora eléctrica de bolsas de plástico.

Refrigeradores con temperatura de -20°C y -70°C . (IEM y Forma Scientific).

Espejo concavo de lectura.

3.2.5 Reactivos:

Fosfato dibásico de sodio Na_2HPO_4 . (Baker Analyzed).

Cloruro de potasio KCl (Baker Analyzed).

Hidróxido de sodio NaOH. 97-98% (Baker Analyzed).

Ac. clorhídrico HCl. (Baker Analyzed).

Glicerol. 87% (Sigma Chemical Company).

Cloruro de sodio NaCl. (Baker Analyzed).

Cloruro de Magnesio MgCl_2 . (Baker Analyzed).

Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 94-97% (Baker Analyzed).

Fosfato monobásico de sodio NaH_2PO_4 . 99% (Baker Analyzed).

Ac. p-amino-benzóico. (Bioxon).

Ac. 3-meta-hidroxi-benzoico. (Sigma Chemical Company).

Ac. hipúrico. 99%

D-L-carnitina. 98%

L-fenilalanina.

Tirosina.

Dulcitol.

m-Eritritol.

Ac. propiónico.

D(+) Glucosa.

Ac. Quínico. 99%

Trigonelina.

Tiocianato de potasio $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. (Baker Analyzed).

Fosfato monopotásico KH_2PO_4 . (Baker Analyzed).

Fosfato dipotásico K_2HPO_4 .

Sulfato de magnesio heptahidratado $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. (Baker Analyzed).

Sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$. 99% (Baker Analyzed).

Azul de Bromotimol. (Sigma Chemical Company).

3.2.5.1 Agentes antimicrobianos.

Discos para la prueba de difusión en agar:

ANTIBIOTICO	LABORATORIO	CONCENTRACION
Amikacina	Bristol	30 μg
Gentamicina	Scheramex	10 μg
Tobramicina	Lilly	10 μg
Netilmicina	Scheramex	30 μg
Carbenicilina	Bigaux diagnostica	100 μg
Piperacilina	Difco	100 μg
Cefoperazona	Difco	75 μg
Ceftriaxona	Roche	30 μg
Ceftazidima	Oxoid	30 μg

Antibióticos empleados para la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

ANTIBIOTICO	LABORATORIO	POTENCIA	CONCENTRACION
Amikacina	Bristol	905	512 $\mu g/ml$
Gentamicina	Sheramex	643	256 $\mu g/ml$
Tobramicina	Lilly	934	256 $\mu g/ml$
Netilmicina	Sheramex	584	256 $\mu g/ml$
Carbenicilina	Sanfer	838	2048 $\mu g/ml$
Piperacilina	Lederle	1003	256 $\mu g/ml$
Cefoperazona	Pfizer	947	512 $\mu g/ml$
Ceftriaxona	Roche	1000	256 $\mu g/ml$
Ceftazidima	Glaxo	845	256 $\mu g/ml$

3.2.6 Preparación de reactivos.

3.2.6.1 Preparación de medios y reactivos para tipificación bioquímica de *Klebsiella* y *Serratia*.

1) Agar base mineral composición:

KH_2PO_4	2g
K_2HPO_4	3g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g
NaCl	3g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1g
Agar bacteriológico	5g
Agua desionizada	1000ml

pH= 7.1 ± 2

Pesar las cantidades indicadas y colocarlos en un matraz de 2 lt. Calentar a ebullición hasta la disolución completa de los ingredientes. Distribuir en matraces volumétricos (500 ml) 390 ml., esterilizar 15lb \ 15min.

2) Solución amortiguadora de fosfatos: (28mM NaH_2PO_4 y 72mM Na_2PO_4)

NaH_2PO_4	7.7274g
Na_2HPO_4	20.4428g
Agua desionizada	2000ml

pH= 7.1 ± 2

Pesar las cantidades indicadas y disolver completamente. Distribuir en tubos con tapón de rosca de 16 x 175 alícuotas de 4.5 ml y 3 ml. Esterilizar en autoclave 15lb \ 15min.

3) Sustratos para *K. pneumoniae* y *Serratia* spp. a una concentración final de 0.1%

a) Benzoato:

Ac. p-amino-benzóico. 0.4 g.
NaOH (1 N) 1.06 ml.
Agua desionizada cbp. 10 ml.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar el ácido y agregar 1.06 ml. de NaOH, agitar hasta su disolución total; aforar a 10 ml. con agua desionizada. Esterilizar a través de filtros de membrana tipo HV 0.45 μ (Millipore Corp., Bedford, Mass.).

b) m-hidroxi-benzóico:

Ac.3-meta-hidroxi-benzóico 0.4 g.
Agua desionizada caliente cbp. 10 ml.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar el ácido y agregar el agua desionizada caliente hasta su disolución total, esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

c) Hipurato, Carnítina, Fenilalanina, Eritritol.

Ac. Hipúrico 0.4 g.
D-L-Carnitina 0.4 g.
L-Fenilalanina 0.4 g.
Eritritol 0.4 g.
Agua desionizada cbp. 10 ml. c/u.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar de cada uno de los sustratos las cantidades señaladas por separado y aforar a 10 ml. de agua desionizada hasta su disolución total. Esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

d) Tirosina.

Tirosina 0.4 g.
NaOH (1 N) 0.66 ml.

Agua desionizada cbp. 10 ml.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar la tirosina y agregar 0.66 ml. de NaOH, agitar hasta disolución total. Aforar a 10 ml con agua desionizada y esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

e) Dulcitol.

Dulcitol 0.4 g.

Agua desionizada caliente cbp. 10 ml.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar el dulcitol y agregar agua desionizada caliente hasta su disolución total. Aforar a 10 ml y esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

f) Propionato.

Ac. propiónico (concentración de 0.4%) 1.6 g.

Agua desionizada cbp. 10 ml.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar el ácido a la concentración indicada y agregar agua desionizada hasta su disolución total. Aforar a 10 ml y esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

g) Glucosa.

D(+) Glucosa (concentración de 0.05%) 0.2 g.

Agua desionizada cbp. 10 ml.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar la glucosa a la concentración indicada y agregar agua desionizada hasta su disolución total. Aforar a 10 ml y esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

h) Ac. Quínico.

Ac. Quínico 0.2 g.

Agua desionizada, alcohol o ác. acético glacial (caliente) cbp 200 ml.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar el ácido y agregar alcohol caliente hasta su disolución total. Aforar a 10 ml y esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

i) Trigonelina.

Trigonellina 0.2 g.

Agua desionizada cpb 200 ml.

En un matraz aforado de 10 ml, pesar el sustrato y agregar agua desionizada hasta su disolución total. Aforar a 10 ml y esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

j) Reducción de tetrationato.

Tiocianato de Potasio 0.5 g.

Azul de Bromotimol 0.2% (g/vol) 2.5 ml.

Agua desionizada 100 ml.

Peptona (caldo) 1 g.

NaCl 0.5 g.

pH= 7.4

En un matraz pesar las cantidades indicadas y disolver en agua desionizada hasta su disolución total. Esterilizar a través de filtros de membrana 0.45 μ .

k) Producción de prodigiosina.

Agar Soya tripticaseína 2 cajas.

Utilizar cajas de agar soya tripticaseína preparadas por los laboratorios comerciales.

3.3 METODOLOGIA.

3.3.1 Métodos de sensibilidad:

Llevar a cabo las técnicas de difusión en agar (Kirby-Bauer) en agar Mueller Hinton ajustando el inóculo aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ml., en caldo BHI. Colocar los sensibilizadores con los antibióticos correspondientes, incubar las placas a 37°C de 18-24 hrs. En el caso de la concentración mínima inhibitoria (CMI) utilizar caldo Mueller-Hinton suplementado con cationes Ca^{++} y Mg^{++} ajustando el inóculo aproximadamente 1.5×10^6 UFC/ml., en caldo BHI. Posteriormente ajustar el inóculo en solución amortiguadora de fosfatos y/e inocular en las placas con los antimicrobianos correspondientes: amikacina (AN), gentamicina (GE), tobramicina (TB), netilmicina (NT), carbenicilina (CB), piperacilina (PIP), cefoperazona (CFP), ceftriaxona (CRO) y ceftazidima (CAZ). Incubar a 37°C de 18-24 hrs. y leer. (40).

3.3.2 Método para la tipificación bioquímica de los géneros *Klebsiella* y *Serratia*.

1. Preparación de los medios con sustrato:

Para preparar las cajas, utilizar un matraz con 390 ml de medio base y agregar los 10 ml del sustrato correspondiente, agitar suavemente y vertir en cajas petri estériles aproximadamente 20 ml por caja. Dejar solidificar. Guardar en bolsas de plástico y refrigerar a 4°C . (no deben usarse después de 4 semanas).

2. Técnica de biotipificación:

La técnica de biotipificación es hecha por duplicado sobre placas de medio base mineral y sustrato previamente descrito. Tomar 3 o 4 colonias de un cultivo de cepas de 18-24 h en medio de MacConkey o agar nutritivo de las cepas problema

fosfatos ajustándose a una turbidez 1 de McFarland; agitar y centrifugar a 2500 rpm. durante 10 min. decantar el sobrenadante y agregar nuevamente 3 ml de buffer, este lavado se realiza 3 veces (todo en condiciones estériles). La concentración final del inóculo debe estandarizarse al 0.5 de McFarland.

Posteriormente hacer una dilución 1:10 de esta suspensión (4.5 ml de buffer de fosfatos + 0.5 ml del inóculo) homogenizar suavemente, ya que ésta es usada para la inoculación de las placas, conteniendo una concentración final de 3×10^3 UFC/ml. Utilizar una asa calibrada de $10\mu\text{l}$ y proceder a estriar las placas previamente divididas en 8 partes, para cada inoculación esterilizar el asa para evitar su contaminación. Marcar claramente cada una de las placas con su correspondiente sustrato y el número o clasificación de la muestra.

Sellar las placas con papel parafilm para evitar su deshidratación y/e incubar a 30°C durante 14 días.

Estapruebe de asimilación es leída después de 4, 7 y 14 días de su incubación, dando como un cultivo positivo (# 1) a aquellas colonias bien definidas a simple vista y aquellas que aparecen muy pequeñas o puntos no definidos como cultivo negativo (# 0).

Comparar las placas inoculadas con placas de glucosa el cual es usado como control positivo y el medio base mineral como control negativo.

En el caso de bacterias como *Serratia* spp, para confirmar la producción de prodigiosina, inocular placas de agar soya tripticasefna e incubar a 37°C , leer de 12 a 24 hrs. y confirmar la producción de cepas pigmentadas.

Capítulo 4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 Resultados:

Durante el período de estudio, se recuperaron 304 aislados clínicos de bacilos gramnegativos provenientes de pacientes de consulta externa y del hospital.

En relación al sitio de infección descrito en la Tabla 1, se indica que los sitios de aislamiento más frecuentes fueron el tracto urinario (37%) y las secreciones de heridas (31%), de los pacientes hospitalizados. En esta misma tabla se señala la frecuencia de las bacterias aisladas en las que predominan *P. aeruginosa* (36%), seguidas de las enterobacterias siendo las más comunes *Klebsiella* spp. (30%) *Enterobacter* spp. (21%) y *C. freundii* (8%). *Serratia* spp. fue el organismo menos frecuente (5%); y la mayoría de estos (91%) fueron aislados de urocultivos de pacientes de consulta externa.

La sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión en agar para determinar la susceptibilidad de los 304 aislados clínicos se muestra en las tablas 2 a 6; como se observa en la tabla 2, *P. aeruginosa* presenta una alta resistencia a los aminoglicósidos carbenicilina y piperacilina en ambas poblaciones estudiadas.

Ceftazidima fue el antibiótico β -lactámico que mostró la mayor actividad contra *P. aeruginosa* (52%); aunque por el método de microdilución la cefoperazona presentó una actividad semejante. *P. aeruginosa* tuvo mayor resistencia a gentamicina y piperacilina que otros aminoglicósidos y β -lactámicos respectivamente.

En el caso de las enterobacterias se detectó una mayor resistencia a tobramicina que otros aminoglicósidos y en el grupo de los β -lactámicos a carbenicilina y cefoperazona.

Una vez realizado el método de escrutinio de los 304 aislados clínicos, sólo 189 muestras (62%) fueron utilizadas para realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana por microdilución (CMI); a los mismos antimicrobianos.

La decisión que condujo a trabajar sólo con este número de muestras fue debido a que los 304 aislamientos clínicos pertenecían a un mismo paciente o no

presentaban un patrón de resistencia a 1 o más antibióticos citados en los objetivos.

En la tabla 7 se observa que en el grupo de los aminoglicósidos *P. aeruginosa* mostró tener en tobramicina una buena actividad sobre este germen, la amikacina presenta baja resistencia y netilmicina una actividad disminuida (ver fig.1). En el caso de *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp., la gentamicina parece ser un buen antibiótico (ver fig. III y IX), la amikacina presenta una baja resistencia en ambos casos y tobramicina para *Enterobacter* tiene una baja actividad y para *Serratia* una alta resistencia. Para *Klebsiella* spp. y *C. freundii* la amikacina es uno de los que mejor actúa (ver fig. V y VII) y gentamicina en el caso de *Citrobacter* presenta una baja resistencia.

En el caso de los antibióticos β -lactámicos que se muestran en la tabla 8 las bacterias aisladas como *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. *Klebsiella* spp. *C. freundii* y *Serratia* spp. mostraron tener un patrón semejante de resistencia a carbenicilina (ver fig. II,IV,VI y VIII). En cuanto a piperacilina es uno de los antibióticos que presenta una buena actividad en general.

Dentro de las cefalosporinas de tercera generación, la cefoperazona resulta ser un antibiótico con una alta resistencia, ceftriaxona tiene una buena actividad en *C. freundii* y *Serratia* spp. en el caso de *P. aeruginosa* presenta una elevada resistencia. la ceftazidima mostró una buena actividad contra *P. aeruginosa*, en caso de *Enterobacter* spp. con una alta resistencia y *Klebsiella* spp. resultó tener una mejor actividad.

Los resultados anteriores confirman la alta resistencia presentada a los derivados penicilínicos, seguidos de los aminoglicósidos y cefalosporinas de tercera generación respectivamente.

Los resultados de sensibilidad por el método de escrutinio (difusión en agar) y el confirmatorio (CMI), que se muestran en la tabla 9, observamos en general una buena concordancia por la prueba estadística de kappa, la cual relaciona 2 o más pruebas indicando grados de concordancia ("excelente, moderada y deficiente") con una discrepancia notoria en *Serratia* spp., donde no hubo correlación con ambos métodos en antibióticos como netilmicina, cefoperazona y amikacina. En el caso de

métodos en antibióticos como netilmicina, cefoperazona y amikacina. En el caso de *C. freundii* no existió correlación con la tobramicina y *Klebsiella* spp., con cefoperazona.

En el estudio de tipificación bioquímica de los aislados clínicos se utilizó el método de Grimont (25,26), para *Serratia* spp. (ver tabla 10), y se encontraron 6 diferentes biotipos, con predominio del biogrupo A 5/8 con un número mayor del grupo A 8b en sitios como el tracto urinario, en pacientes de consulta externa. En este biotipo se muestra un patrón uniforme de resistencia remarcado en la carbenicilina y la piperacilina con una sensibilidad a ceftriaxona y ceftazidima.

La alta frecuencia con la cual *K. pneumoniae* se encontró en el estudio, decidió realizar la prueba de biotipificación. En la tabla 11, se señala el aislamiento de 9 diferentes biotipos con predominio del biogrupo 570, en pacientes del hospital sobre los de consulta externa. Es importante indicar que todos los biotipos aislados de muestras clínicas de orina presentan una alta resistencia a la tobramicina, la carbenicilina y la piperacilina. También resulta interesante destacar que para este microorganismo la sensibilidad presentada es alta en cefalosporinas de 3a. generación.

TABLA 1. Origen y sitios de aislamiento de 304 bacilos gramnegativos durante un periodo de 9 meses en el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubiran".

GERMEN	ORIGEN No.TOTAL	SITIO DE AISLAMIENTO						
		ORINA	SANGRE	VIAS AEREAS	SEC. PURULENTAS	TEJIDOS	LIQUIDOS	CATETERES
<i>P. aeruginosa.</i>	H [47]	15 (32)	2 (4)	12 (25)	12 (25)	4 (9)	2 (5)	-
	CE [63]	16 (25)	3 (5)	12 (19)	22 (35)	4 (6)	5 (8)	1 (1)
<i>Enterobacter spp.</i>	H [36]	12 (33)	1 (3)	6 (17)	12 (33)	1 (3)	4 (11)	-
	CE [26]	9 (34)	-	2 (7)	9 (35)	1 (4)	5 (19)	-
<i>Klebsiella spp.</i>	H [43]	20 (46)	1 (2)	9 (21)	10 (23)	1 (2)	2 (5)	-
	CE [49]	21 (43)	3 (6)	4 (8)	12 (24)	4 (8)	4 (8)	1 (2)
<i>C. freundii.</i>	H [11]	3 (27)	-	-	7 (63)	1 (9)	-	-
	CE [13]	5 (38)	-	-	7 (54)	-	1 (7)	-
<i>Serratia spp.</i>	H [5]	1 (20)	-	-	3 (60)	1 (20)	-	-
	CE [11]	10 (91)	-	-	1 (9)	-	-	-
Total	H [142] CE [162]	112 (37)	10 (3)	45 (15)	95 (31)	17 (6)	23 (7)	2 (1)

H: pacientes hospitalizados; CE: pacientes de consulta externa; (%); []: no. total de muestras recibidas.

TABLA 2. Sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar de *P. aeruginosa* aislado de muestras clínicas de los pacientes atendidos en el INNSZ de mayo de 1989 a enero de 1990.

ANTIMICROBIANO	HOSPITAL (%) (N=47)			CONSULTA EXTERNA (%) (N=63)		
	R	I	S	R	I	S
Amikacina	53	-	47	47	-	52
Gentamicina	81	-	19	79	-	20
Tobramicina	59	-	40	49	-	51
Netilmicina	72	-	27	71	-	28
Carbenicilina	59	-	40	59	1	39
Piperacilina	66	-	34	54	-	46
Cefoperazona	57	-	42	49	-	51
Ceftriaxona	57	6	36	51	5	44
Ceftazidima	49	2	49	46	-	54

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible; N: No. de casos.

TABLA 3. Sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar de *Enterobacter* spp aislado de muestras clínicas de los pacientes atendidos en el INNSZ de mayo de 1989 a enero de 1990.

ANTIMICROBIANO	HOSPITAL (%) (N=36)			CONSULTA EXTERNA (%) (N=26)		
	R	I	S	R	I	S
Amikacina	43	6	51	18	-	81
Gentamicina	46	3	51	37	-	63
Tobramicina	66	-	34	33	-	66
Netilmicina	60	-	40	29	-	70
Carbenicilina	83	3	14	41	4	52
Piperacilina	71	6	23	33	7	59
Cefoperazona	60	-	40	29	-	70
Ceftriaxona	46	3	51	37	-	63
Ceftazidima	53	-	47	37	-	63

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible; N: No. de casos.

TABLA 4. Sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar de *Klebsiella* spp aislado de muestras clínicas de los pacientes atendidos en el INNSZ de mayo de 1989 a enero de 1990.

ANTIMICROBIANO	HOSPITAL (%) (N=43)			CONSULTA EXTERNA (%) (N=49)		
	R	I	S	R	I	S
Amikacina	21	-	79	29	-	71
Gentamicina	42	-	58	27	-	73
Tobramicina	42	-	58	25	-	75
Netilmicina	39	-	60	23	-	77
Carbenicilina	81	-	18	79	4	16
Piperacilina	46	-	53	29	2	66
Cefoperazona	39	-	60	25	2	73
Ceftriaxona	21	2	76	19	2	79
Ceftazidima	14	-	86	12	-	87

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible; N: No. de casos.

TABLA 5. Sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar de *Citrobacter freundii* aislado de muestras clínicas de los pacientes atendidos en el INNSZ de mayo de 1989 a enero de 1990.

ANTIMICROBIANO	HOSPITAL (%) (N=11)			CONSULTA EXTERNA (%) (N=13)		
	R	I	S	R	I	S
Amikacina	50	-	50	14	7	78
Gentamicina	50	-	50	50	-	50
Tobramicina	58	-	41	78	-	21
Netilmicina	58	-	41	36	-	64
Carbenicilina	66	-	33	64	-	36
Piperacilina	58	-	41	50	14	36
Cefoperazona	33	-	67	43	14	43
Ceftriaxona	33	-	67	36	7	57
Ceftazidima	33	-	67	43	-	57

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible; N: No. de casos.

TABLA 6. Sensibilidad antimicrobiana por difusión en agar de *Serratia* spp aislado de muestras clínicas de los pacientes atendidos en el INNSZ de mayo de 1989 a enero de 1990.

ANTIMICROBIANO	HOSPITAL (4) (N=5)			CONSULTA EXTERNA(4) (N=11)		
	R	I	S	R	I	S
Amikacina	20	-	80	18	-	82
Gentamicina	20	-	80	18	9	72
Tobramicina	40	-	60	63	-	36
Netilmicina	20	-	80	45	-	54
Carbenicilina	60	-	40	36	-	63
Piperacilina	20	20	60	45	9	45
Cefoperazona	20	20	60	9	18	72
Ceftriaxona	20	-	80	-	-	100
Ceftazidina	20	-	80	-	-	100

R: Resistente; I: Intermedio; S: Sensible; N: No. de casos.

TABLA 7. Sensibilidad antimicrobiana por microdilución de 189 aislados clínicos de bacilos gramnegativos resistentes por difusión en agar a uno o más antibióticos.

Antibiótico	<i>P. aeruginosa</i> (n=85)	<i>Enterobacter</i> (n=40)	<i>Klebsiella</i> (n=38)	<i>Citrobacter</i> (n=16)	<i>Serratia</i> (n=10)
Amikacina					
X±DS	26±5	18±4	26±5	19±7	19±5
Intervalo	1-256	0.25-256	1-256	0.25-256	2-256
CMi 50/90	32/256	16/128	32/128	32/128	4/64
R %	34	16	19	8	50
Gentamicina					
X±DS	36±3	16±5	29±5	21±7	6±4
Intervalo	0.25-128	0.125-128	0.25-128	0.125-128	1-64
CMi 50/90	32/128	32/128	64/128	64/128	4/32
R %	70	23	29	10	30
Tobramicina					
X±DS	20±6	28±5	35±5	44±3	19±3
Intervalo	0.125-128	0.125-128	0.25-128	8-128	2-128
CMi 50/90	32/128	64/128	128	64/128	16/128
R %	49	27	28	13	60
Netilmicina					
X±DS	51±3	26±5	30±4	28±6	14±7
Intervalo	0.125-128	0.125-128	0.25-128	0.5-128	1-128
CMi 50/90	64/128	64/128	64/128	64/128	4/128
R %	69	24	28	10	50

X: Media Geométrica; DS: Desviación Estándar; CMi: Concentración Mínima Inhibitoria al 50 y 90% en µg/ml; N: No. de casos; R%: Resistencia en porcentaje.

TABLA 8. Sensibilidad antimicrobiana por microdilución de 189 aislados clínicos de bacilos gramnegativos resistentes por difusión en agar a uno o más antibióticos.

ANTIBIOTICO	<i>P. aeruginosa</i> (n=85)	<i>Enterobacter</i> (n=40)	<i>Klebsiella</i> (n=38)	<i>Citrobacter</i> (n=16)	<i>Serratia</i> (n=10)
Carbamicilina					
XIDS	20826	41424	83322	37029	219213
Intervalo	1-1024	4-1024	16-1024	1-1024	1-1024
CMI 50/90	512/1024	1024	1024	1024	1024
R%	56	75	92	81	70
Piperacilina					
XIDS	2715	8323	10122	8323	4824
Intervalo	1-128	0.5-128	4-128	2-128	1-128
CMI 50/90	128	128	128	128	64/128
R%	52	65	87	75	40
Cefepazona					
XIDS	3015	4126	5725	4326	2114
Intervalo	0.25-128	0.25-256	0.25-256	0.25-256	1-128
CMI 50/90	64/256	32/256	64/256	64/256	32/64
R%	53	52	63	62	40
Ceftiazona					
XIDS	3214	2623	1423	1924	514
Intervalo	0.25-128	0.125-128	0.125-128	0.25-128	0.125-64
CMI 50/90	64/128	32/128	6/64	32/128	1/32
R%	66	57	39	50	20
Ceftazidima					
XIDS	1524	2624	823	2424	824
Intervalo	0.125-128	0.125-128	0.125-128	0.125-128	0.125-128
CMI 50/90	32/64	32/128	2/32	16/128	0.5/64
R%	55	60	29	56	20

X: Media Geométrica; DS: Desviación Estandar; CMI: Concentración Mínima Inhibitoria al 50 y 90% en µg/ml; N: No. de casos; R %: Resistencia en porcentaje.

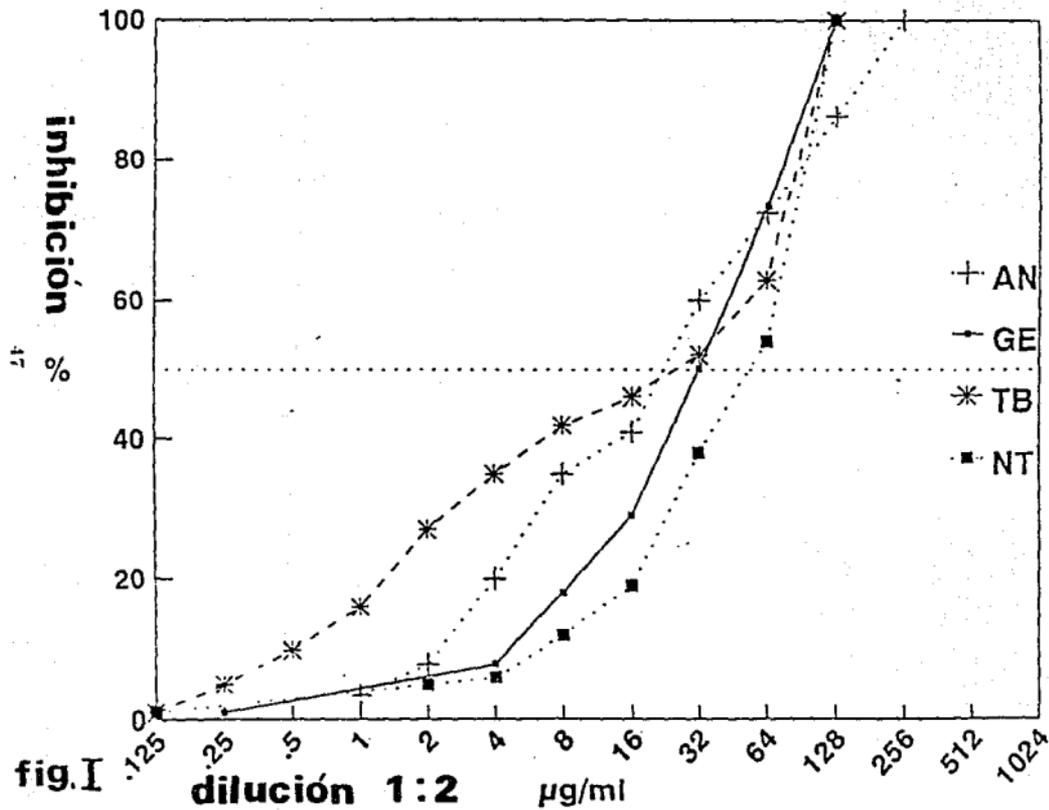


fig. I

Inhibición acumulada de 85 aislados clínicos de *Pseudomonas* spp. a aminoalcoídidos.

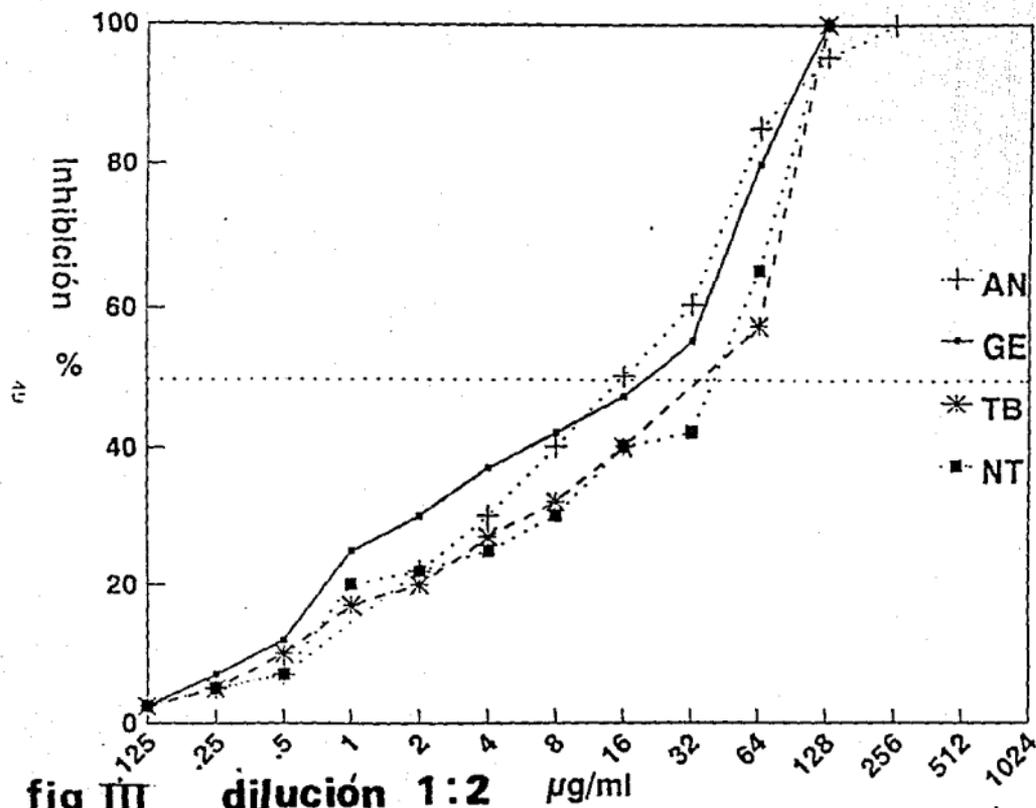


fig. III dilución 1:2 µg/ml
 Inhibición acumulada de 40 aislados clínicos de *Enterobacter* spp.
 a aminoglucósidos.

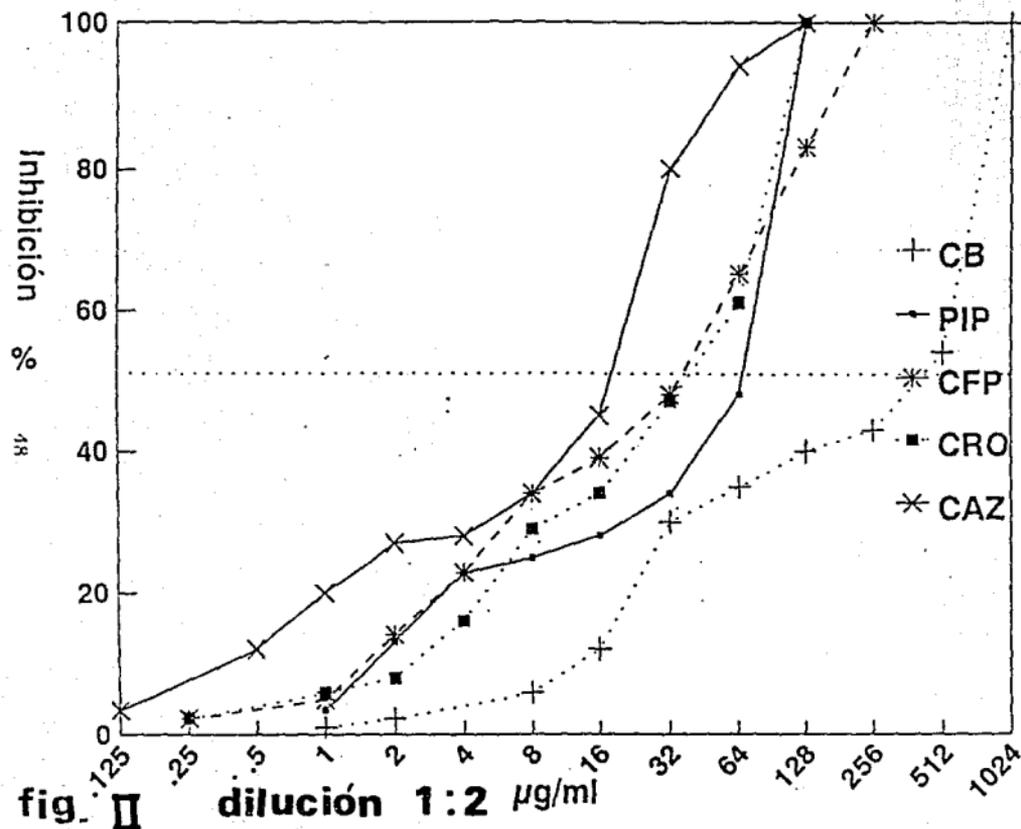


fig. II dilución 1:2 µg/ml
 Inhibición acumulada de 85 aislados clínicos de *Pseudomonas* spp.
 por β-lactámicos.

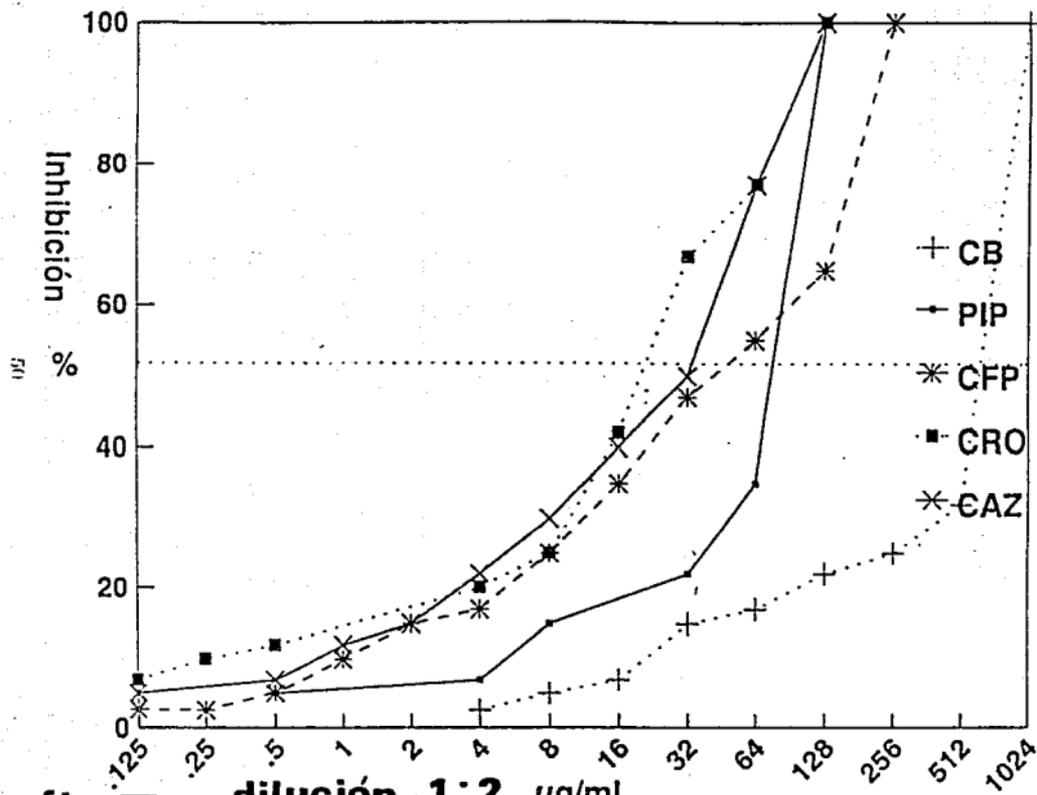


fig. IV

dilución 1:2 µg/ml

Inhibición acumulada de 40 aislados clínicos de *Enterobacter* spp. por β-lactámicos.

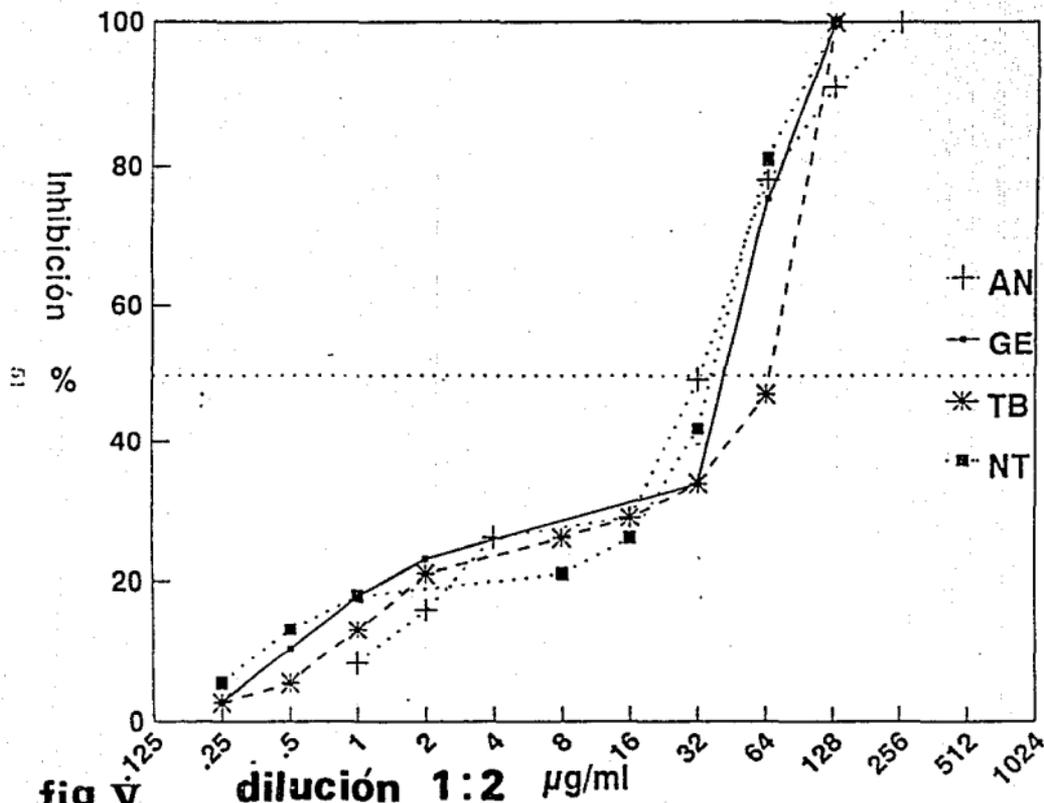


fig. 5

dilución 1:2 µg/ml

Inhibición acumulada de 38 aislados clínicos de *Klebsiella* spp. a aminoglucósidos.

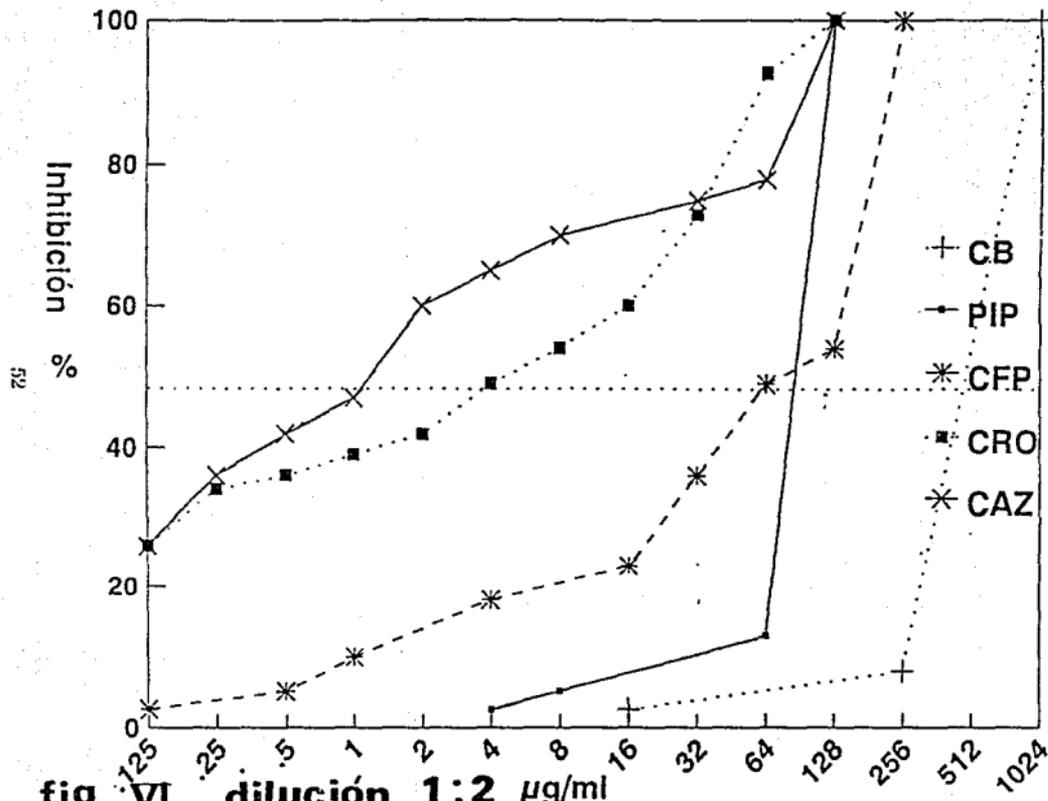


fig. VI dilución 1:2 µg/ml
 Inhibición acumulada de 38 aislados clínicos de *Klebsiella* spp.
 por β-lactámicos.

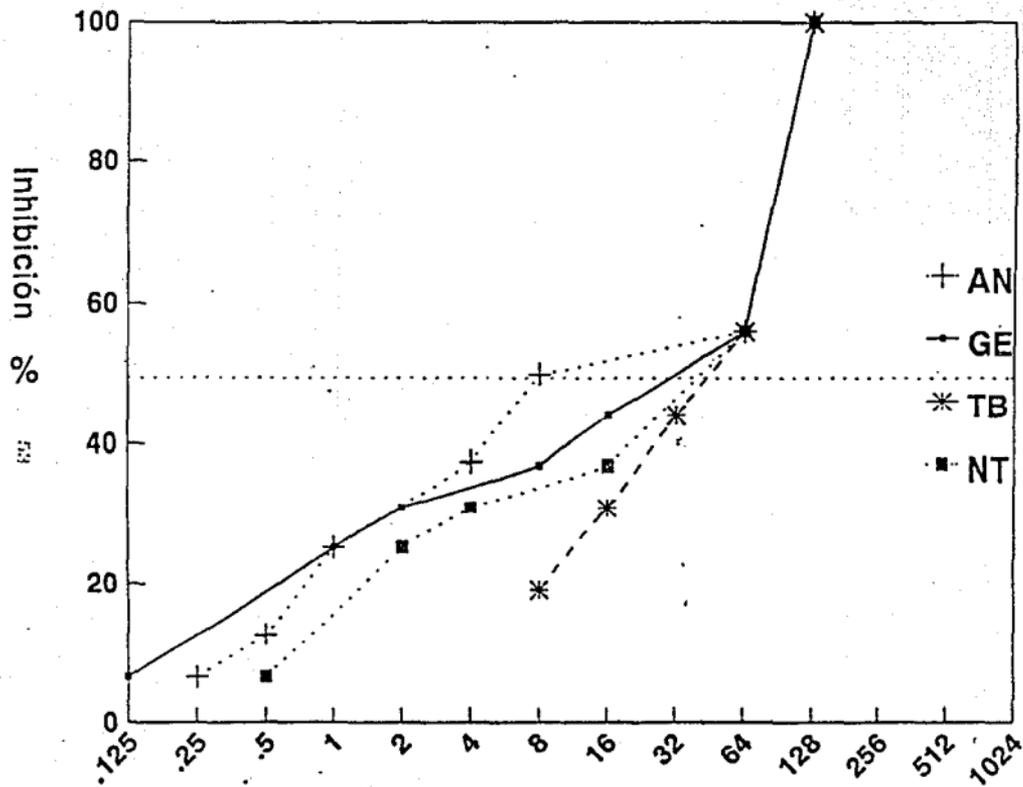


fig. VII dilución 1:2 µg/ml
 Inhibición acumulada de 16 aislados clínicos de *Citrobacter* spp.
 a aminoglicósidos.

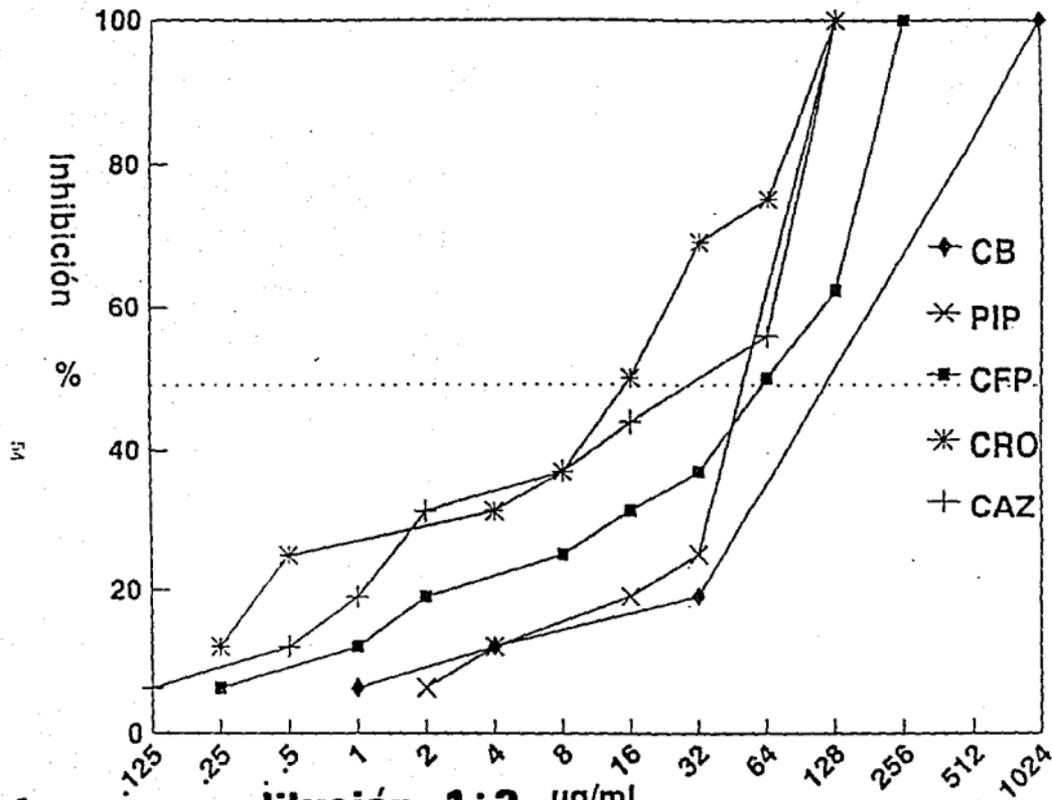


fig. VIII

dilución 1:2 µg/ml

Inhibición acumulada de 16 aislados clínicos de *Citrobacter* spp. por B-lactámicos.

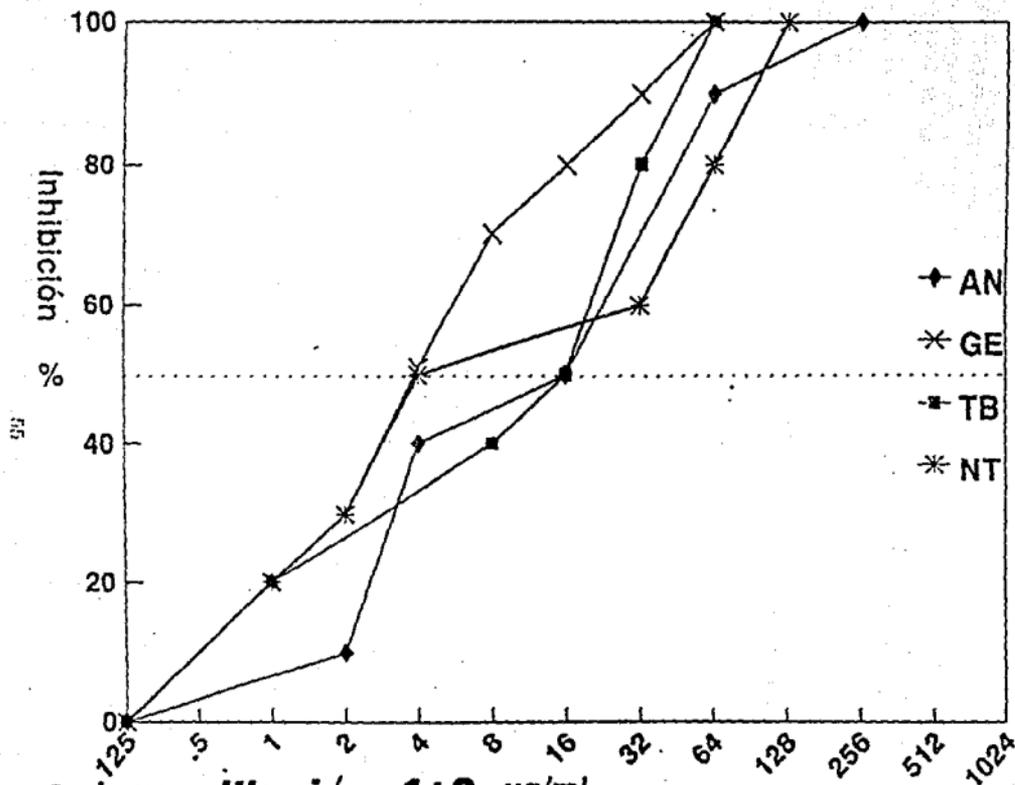


fig. IX dilución 1:2 µg/ml

Inhibición acumulada de 10 aislados clínicos de *Serratia* spp.
a aminoglicósidos.

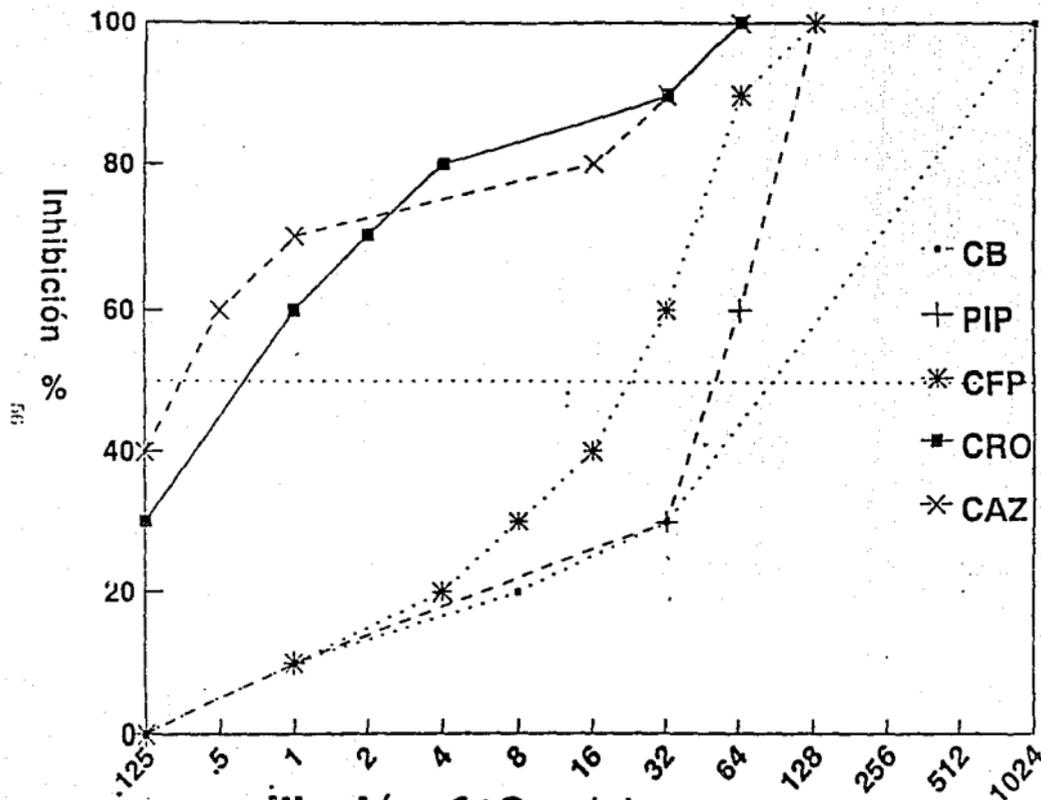


fig. X dilución 1:2 µg/ml
 Inhibición acumulada de 10 aislados clínicos de *Serratia* spp.
 por β-lactámicos.

TABLA 10. Biotipos y sensibilidad antimicrobiana por microdilución de *Serratia* spp.

Biotipo	n	Sitio de aislamiento	AN	GE	TB	NT	CB	PIP	CFP	CRO	CAZ
A 8b	3	Orina(CE)	256	16	128	128	1024	128	64	1	0.5
		Orina(CE)	64	8	32	128	1024	128	32	1	0.125
		Orina(CE)	16	4	8	2	1024	128	128	1	0.5
A 5/8	2	Orina(CE)	64	64	128	64	1024	128	16	0.125	0.125
		Orina(H)	4	4	8	32	8	64	32	2	1
A 5	2	Tejido(CE)	64	8	32	128	1024	32	4	32	64
		Tejido (H)	4	2	32	2	1024	64	8	64	128
A 3a	1	Sec. Purul.(CE)	64	1	8	4	32	64	64	4	16
A 6b	1	Orina (H)	4	32	16	1	1	1	1	0.125	0.125
A 2b	1	Sec. Purul.(CE)	32	1	2	4	1024	32	64	0.125	0.125

N: no. de biotipos; CE: pacientes consulta externa; H: Pacientes hospitalizados; AN: amikacina; GE: gentamicina; TB: tobramicina; NT: netilmicina; CB: carbenicilina; PIP: piperacilina; CFP: cefoperazona; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima.

TABLA 11. Biotipos y sensibilidad antimicrobiana por microdilución de *Klebsiella pneumoniae*.

Biotipo	n	Sitio de aislamiento	AN	GE	TB	NT	CB	PIP	CFP	CRO	CAZ	
570	9	Orina(CE)	128	128	128	128	1024	128	256	64	128	
		Orina (H)	128	64	128	64	1024	128	256	16	32	
		Orina(CE)	64	64	128	64	1024	128	4	0.125	0.125	
		Orina (H)	64	64	128	64	1024	128	256	4	2	
		Orina(CE)	64	64	64	64	1024	128	128	64	32	
		Orina (H)	64	32	128	32	1024	128	16	1	1	
		Sec.	2	128	128	16	1024	128	32	0.125	1	
		Purul.(H)										
		Vías aereas(H)	32	64	128	128	1024	128	64	64	64	
		Sec. Purul.(H)	32	32	64	32	1024	128	32	4	4	
770	3	Orina(CE)	64	32	64	64	1024	128	256	64	32	
		Líquido(H)	1	128	16	32	1024	128	16	0.125	0.25	
		Sec.	4	0.5	0.5	0.5	1024	64	1	0.125	0.125	
		Purul.(CE)										
574	2	Vías aereas(H)	256	128	128	64	1024	128	256	32	128	
		Sangre(CE)	64	1	32	64	256	128	64	32	32	
674	1	Orina(H)	128	128	128	64	1024	128	256	4	0.125	
670	1	Orina(H)	2	128	128	32	1024	128	256	0.25	2	
550	1	Orina(CE)	32	64	128	64	1024	128	32	0.25	0.125	
772	1	Vías aereas(H)	64	64	128	64	1024	128	256	32	32	
		Orina(H)	32	64	128	64	1024	128	128	0.125	0.25	
340	1	Sec.	4	1	1	8	1024	128	256	32	8	
024	1	Purul.(CE)										

N: no. de biotipos; CE: pacientes consulta externa; H: pacientes hospitalizados; AN: amikacina; GE: gentamicina; TB: tobramicina; NT: netilmicina; CB: carbenicilina; PIP: piperacilina; CFP: cefoperazona; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima.

4.2 DISCUSION.

El patrón de resistencia de las enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de los pacientes hospitalizados en una institución de salud de tercer nivel de atención en México y seleccionadas como patógenos nosocomiales y como resistentes cuando menos a uno de los antibióticos incluidos en el estudio fue predominante, ente de multirresistencia y con regular o mínima actividad de los antimicrobianos del estudio sobre estas bacterias. Este fenómeno revela un riesgo enorme dado que las infecciones nosocomiales son uno de los problemas importantes en los hospitales en la actualidad. En virtud de que la aparición de brotes por este tipo de microorganismos ha sido particularmente grave al asociarse a mayor mortalidad (34,52).

Aunque la variedad de los agentes patógenos varía con el tiempo y de hospital a hospital, los bacilos gramnegativos especialmente aquellos de origen entérico y *Pseudomonas* spp., son los más frecuentes y peligrosos. Estos microorganismos están muy difundidos en la naturaleza desarrollándose en el ambiente hospitalario incluyendo agua, alimentos, equipo y personal médico, los cuales contribuyen a la colonización de pacientes.

En cuanto a la proporción de los microorganismos presentados en este estudio, se muestra que la población del hospital y de consulta externa tuvieron una alta multirresistencia tanto a aminoglicósidos como a β -lactámicos de amplio espectro. Aproximadamente el 37% de los microorganismos seleccionados correspondieron a *P. aeruginosa* con un perfil de multirresistencia, seguido de *Klebsiella* spp. 30%, *Enterobacter* spp. 21%, *C. freundii* 8% y *Serratia* spp. 5%. (tabla 1).

Los microorganismos aislados de orina fueron los más abundantes (37%), con un claro predominio de *P. aeruginosa*, en el caso de *Serratia* spp. el 91% de los aislados clínicos de pacientes ambulatorios correspondió a orina, lo que podría indicar que los pacientes se infectan en el hospital y desarrollan la infección en su domicilio, dado que hasta el 80% de infecciones se relaciona con instrumentación

urológica (72). Las bacterias aisladas de las infecciones de heridas quirúrgicas (secreciones purulentas), ocuparon el segundo lugar en número con un claro predominio de *P. aeruginosa*. (31%), *Klebsiella* spp. (24%), *Enterobacter* spp. (34%) y *C. freundii* (58%).

En los aislados clínicos las vías aéreas ocuparon el siguiente lugar en bacterias como *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. en los que resulta ser uno de los mayores problemas encontrados frecuentemente en pacientes con inmunosupresión (75). La sangre (hemocultivos), parece ser uno de los sitios de aislamiento más importantes en el que predomina *P. aeruginosa* y *Klebsiella* spp. Cabe mencionar que bacterias como *P. aeruginosa* son responsables hasta de un 30% de todos los episodios de bacteremias y septicemias en todos los hospitales (75,34).

La elevada frecuencia de resistencia de *P. aeruginosa* contrasta con los estudios realizados previamente en el INNSZ (22), donde en 1984 la resistencia a amikacina era apenas de 18% y 6 años después aumentó hasta el 64%, en el caso de otras enterobacterias en el mismo año fué del 0% mientras que en 1990 fue del 42% para el resto de los aminoglicósidos manteniéndose constante aunque ya no son utilizados.

En la tabla 2 de acuerdo a la sensibilidad antimicrobiana que se describe, *P. aeruginosa* presentó una alta resistencia a gentamicina, en los antibióticos β -lactámicos la ceftazidima tuvo una buena actividad en ambos grupos. *Enterobacter* spp., mostró tener un patrón de resistencia uniforme en los aminoglicósidos apreciándose un mayor número en el hospital (tabla 3), en los β -lactámicos como es el caso de ceftazidima, este antibiótico no parece ser uno de los mejor empleados para esta bacteria sin embargo posee una buena actividad debido a la presencia de las β -lactamasas (cefalosporinasas) que son mediadas cromosómicamente y no son hidrolizadas tan fácilmente por otras β -lactamasas inducibles (31).

Por otro lado se mostró una menor resistencia en *Klebsiella* spp., a amikacina y netilmicina en pacientes de consulta externa, y en las cefalosporinas la ceftriaxona y ceftazidima mostraron una buena actividad en contra de este

microorganismo para consulta externa y el hospital (tabla 4). En *C. freundii* el patrón de resistencia observado fue uniforme en aminoglicósidos y β -lactámicos en contraste con las cefalosporinas, teniendo una buena actividad en pacientes del hospital ya que parecen ser mejores productores de β -lactamasas.

Finalmente *Serratia* spp., mostró una menor resistencia en todos los antimicrobianos probados aunque carbenicilina y tobramicina tuvieron mayor resistencia a pesar de que no se utilizan en el hospital y es debido a que en la tobramicina existe la posible selección de cepas productoras de la enzima acetiltransferasa (6'N AAC) probablemente codificada por plásmidos que se han seleccionado en este hospital por el uso exclusivo de amikacina. En el caso de carbenicilina hace suponer que existe un mecanismo semejante al de los aminoglicósidos que por presión selectiva de los mismos resulta en una elevada resistencia codificada por plásmidos o cromosomas (20), debido a la presencia de la β -lactamasa TEM-1 localizada en un transposón propagándose en diversos géneros de bacilos entéricos y *Pseudomonas*. Estas enzimas β -lactamasas se clasifican de acuerdo a su sitio de acción o blanco específico.

La mayor parte de estos esquemas de antimicrobianos probados incluyeron a amikacina, antibiótico que se ha asociado a un menor número de microorganismos resistentes mostrándose una estabilidad en la mayor parte de los gérmenes del hospital donde se ha utilizado de manera exclusiva (58), por lo que la resistencia que se observó en este estudio fue menor comparada con los demás antimicrobianos utilizados.

Al realizar el método de microdilución en las bacterias seleccionadas para este estudio, se observa en la tabla 7 que para *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *C. freundii* la amikacina fue el antibiótico que presentó una menor resistencia, en el caso de la tobramicina fue uno de los que mostró una buena actividad en general, lo que parece indicar que la enzima 6'N AAC tiene acción para la selección este tipo de cepas (10). *Serratia* spp. presentó una menor resistencia a gentamicina la cual contrasta con *P. aeruginosa* debido posiblemente a la escasa producción de enzimas modificadoras de los aminoglicósidos. Estas

enzimas se pueden clasificar de acuerdo a su sitio de acción.

En los antibióticos β -lactámicos que se presentan en la tabla 8, - - - - (aminopenicilinas y ureidopenicilinas) la carbenicilina fue uno de los antimicrobianos que presentó una mayor resistencia para todos ellos debido a que en las bacterias gramnegativas las enzimas β -lactamasas confieren un aumento en la resistencia debido a que posiblemente se encuentran localizadas en un transposón codificado en un cromosoma o plásmido y que se puede propagar entre diversos géneros e hidrolizar a penicilinas, cefalosporinas o ambos (alteración de las proteínas fijadoras de penicilinas (PFP) y no realizar su interacción con dichas enzimas) (31).

En el caso de piperacilina se observa una menor resistencia en todos los gérmenes lo que parece indicar que ambos antibióticos (carbenicilina y piperacilina) comparten un mismo mecanismo de resistencia codificada por plásmidos o cromosomas por la presencia de enzimas como las β -lactamasas TEM-1 localizada en un transposón distribuyéndose en bacilos entéricos y *Pseudomonas*.

Las cefalosporinas de tercera generación mostradas en esta misma tabla 8, señalan que para *P. aeruginosa* la cefoperazona y ceftazidima tuvieron una menor resistencia teniendo una actividad antipseudomonal debido a la unión eficaz de las PFP. En el caso de *Enterobacter* spp. se obtuvo un patrón de resistencia uniforme y la ceftazidima una menor resistencia contra ésta bacteria. Para *Klebsiella* spp. el antibiótico que mostró tener una buena actividad fue ceftazidima y un mal antibiótico lo fue cefoperazona.

Para *C. freundii* la ceftriaxona mostró tener una menor resistencia siendo este un antimicrobiano con buena actividad capaz de poder ser utilizado en el tratamiento de infecciones debidas a este germen. Por último en *Serratia* spp. antibióticos como la ceftriaxona y la ceftazidima fueron los que mostraron una menor resistencia considerándose que la acción de las β -lactamasas fueron disminuidos en estos antimicrobianos.

Las cefalosporinas de tercera generación por presentar una unión de una cadena lateral de aminotiazol al anillo β -lactámico permite al antibiótico su entrada

o penetración en la pared celular de los bacilos gramnegativos y unirse eficazmente a las proteínas fijadoras de penicilina (PPF), siendo más activas contra esta población.

Al realizar la prueba de concordancia de los dos métodos utilizados (Prueba de Kappa) se pudo demostrar que el método de escrutinio (difusión en disco) y el confirmatorio (CMI) es satisfactorio (40). En la actualidad los laboratorios de microbiología manejan tanto el método de difusión en agar como el de microdilución (CMI), ya que ambas pruebas son confiables y comparables entre sí, pero es más útil el CMI debido a que el valor de corte, la sensibilidad y especificidad para considerar microorganismos resistentes se puede modificar según la concentración que alcanza el antimicrobiano a dosis terapéuticas en el sitio de origen del aislamiento.

Dentro del grupo de las enterobacterias *Serratia* spp. es una de las bacterias que generalmente se asocia a brotes de infecciones multirresistentes en los hospitales. Los resultados de tipificación bioquímica por el método de Grimont y Grimont (24) se muestran en la tabla 10 en el cual se observa que el método de microdilución presentó un patrón uniforme de multirresistencia para todos los antimicrobianos. La discrepancia observada en los biogrupos fue debida a las diferencias en la asimilación de los sustratos. Las dos cepas del biogrupo A 5/8 fallaron en su asimilación por el ác. quínico y fue asignado al biogrupo TC. Otros biogrupos como el A 8b crecieron con ác. m-OH-benzóico y no en m-eritritol. El biogrupo A 5 mostró su incapacidad por asimilar m-OH-benzóico y benzoato.

La bioagrupación de *S. marcescens* así como el método de microdilución son una de las herramientas para el estudio epidemiológico de las infecciones nosocomiales en pequeños hospitales así como en países subdesarrollados.

En el caso de *K. pneumoniae* que se muestra en la tabla 11 se utilizó el mismo método (24) y se puede observar el predominio del biotipo 570 (9 aislados clínicos) en el cual se destaca su incapacidad por asimilar el dulcitol, otro biotipo como es el 770 (3 aislados clínicos) crece en este medio por lo que existe sólo una prueba de diferencia entre estos dos biogrupos. Para el biotipo 574 se presenta su

habilidad por asimilar el ác. m-OH-benzóico y su falta en el dulcitol.

Cabe mencionar que estos aislados clínicos fueron nuevamente asociados a una múltiple resistencia a los antimicrobianos probados, y que el sistema de biotipificación es de gran ayuda en el análisis de brotes nosocomiales por *S. marcescens* y *K. pneumoniae* en diversos hospitales así como para el control de infecciones en los diferentes laboratorios.

Estos microorganismos son los responsables de brotes de infecciones multirresistentes en el hospital, siendo particularmente importantes en epidemias de infecciones nosocomiales (24,25); los cuales se ha originado en sitios como terapia intensiva, urgencias, áreas de quemados o en unidades de cuidados intensivos de neonatales, en donde se ha favorecido la diseminación de esta bacteria obteniéndose una moderada resistencia en los antibióticos probados (Fig. IX y X).

Otra técnica más sofisticada para la identificación de especies o subespecies es la determinación de perfiles plasmídicos el cual parece ser un método prometedor en la búsqueda de estos microorganismos, presenta una alta calidad pero que está muy por debajo del alcance de la mayoría de los laboratorios clínicos.

Es deseable que los hospitales mantengan un programa de vigilancia y control de infecciones nosocomiales para mantener el informe de los tipos de bacterias adquiridas tanto fuera como dentro del hospital, así como los patrones de sensibilidad a los diferentes antimicrobianos.

Un sistema de vigilancia como éste requiere del laboratorio de microbiología clínica, ya que es el responsable de la identificación y determinación de la sensibilidad antimicrobiana de las bacterias aisladas de muestras clínicas; lo que puede orientar al comité de control de infecciones y a los médicos respecto al uso racional de antibióticos para reducir el riesgo de inducción de resistencia así como lograr una disminución de los costos y de la toxicidad de los antimicrobianos que se emplean en el hospital.

La frecuencia de las infecciones debidas a bacilos gramnegativos multirresistentes ha aumentado significativamente en todo el mundo. Rangel y cols.

en este estudio (52), confirma esta incidencia ya que durante el período de estudio la frecuencia de infecciones multirresistentes duplicó a las infecciones intrahospitalarias sensibles (52). La administración previa de antibióticos así como el requerimiento de aumentar la cantidad de dosis cada vez mayores se ha considerado como uno de los factores de riesgo más importante en este evento (30).

En todos los hospitales existen áreas que sirven como fuentes de posibles reservorios de bacterias resistentes, ya que la flora bacteriana también está sometida a la presión selectiva continua debida al uso de la profilaxis de antibióticos y la quimioterapia en casos infecciosos con el uso de antibióticos de amplio espectro.

Capítulo 5 CONCLUSIONES

1. La resistencia de enterobacterias y *P. aeruginosa* para aminoglicósidos y β -lactámicos es alta en el INNSZ con predominio de un patrón de multirresistencia.
2. a) En bacterias como *Enterobacter* spp. y *C. freundii* no mostraron tener un patrón de resistencia elevado en el INNSZ.

b) Existe un predominio de biogrupo A 5/8 con predominio del biotipo A 8b en *Serratia* spp.

c) En el caso de *K. pneumoniae* se tiene un claro predominio de los grupos 570 y 770 relacionándose a un patrón de resistencia elevado.
3. Se presenta una mayor resistencia en cepas provenientes de pacientes hospitalizados.
4. Los métodos utilizados para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana mostraron una alta concordancia excepto en el caso de cefoperazona con *Serratia* spp.
5. En necesaria la realización de estudios epidemiológicos de sensibilidad antimicrobiana para:
 - a) Relacionar mejor el hallazgo clínico con la terapéutica empírica adecuada.

BIBLIOGRAFIA.

1. Allen J.R., Hightower A.W., et al. Secular trends in nosocomial infections 1970-1979. Am. J. Med. 70: 389-392. (1981).
2. Barr J.R., Rebeca J. et al. Factor affecting the value of a simple biochemical scheme for identifying enterobacteriaceae: the reproducible recognition of biotypes. J. Clin. Path. 30:495- 504 (1977).
3. Barry, L.A. ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST. PRINCIPLES AND PRACTICE. 3ed. Lea & Febriger Editors. Philadelphia, E.U. (1979).
4. Benette J.V. Brachman PS, NOSOCOMIAL INFECTIONS. 2nd ed. Little Brown Boston (1979).
5. Birnboim, HC and Daly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Reserch 7: 1513 (1979).
6. Boletfn epidemiológico. Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional (IMSS). 3 (1):1 (1986).
7. Bowman y Rand. FARMACOLOGIA, BASES BIOQUIMICAS Y PATOLOGICAS. APLICACIONES CLINICAS. 2a. ed. Interamericana. (1984).
8. Bruce S.K., Schick D.G., et al. Biotiping *Klebsiella* in single clinical as nosocomial infectious. J. Clin. Microbiol. 30: 223 (1981).
9. Bryan L.E. INTERACTIONS OF BETA-LACTAM ANTIBIOTICS WITH BETA-LACTAMASAS AS A CAUSE FOR RESISTANCE. Antimicrobial

- Resistance.,Orlando, Fl. Academic Press (1984).
10. Bryan L.E. AMINOGLUCOSIDE RESISTANCE. In Bryan LE. Ed. Antimicrobial Drug Resistance. Orlando, Fl. Academic Press (1984).
 11. Bush K. Recent developments in β -lactamase research and their implication for the future. Rew. Infect. Dis. 10: 681-90. (1988).
 12. CDC. National Nosocomial Infections study. MMWR 33: 2 ss. (1984).
 13. Davies J. Courvalin P. Mechanisms of resistance to aminoglycosides. Am. J. Med. 62: 868-872. (1977).
 14. De Silva M.I., Sally J. R. Multiple Biotipes of *Klebsiella pneumoniae* in single clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 5: 62-65. (1977).
 15. Dixon RE, (ed). Symposium on Nosocomial Infections. Am J. Med. 70: 379. (1981).
 16. Editorial. Microbial resistance to beta-lactámic antibiotics. Mayo Clin. Proc. 57: 781. (1982).
 17. Escobar-Gutiérrez,A. IMPORTANCIA DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL TAMAÑO DEL HALO DE INHIBICION EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS. Invest. Médica Internacional. 4 supl. 1 (1977).
 18. Farmer JJ. III, B.R. Davis, et al,. Detection of *Serratia* outbreaks in hospital. The Lancet. 8: 455. (1976).

19. Finland M. Emergence of antibiotic resistance in hospitals. Rev. Infect. Dis. 1: 4-21. (1979).
20. Follath A., Costa E, et al., Clinical consequence of development of resistance to third generation cefalosporins. Eur. J. Clin. Microbiol. 6: (4); 446. (1987).
21. George A, Jacoby M.D., et al., New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. N. Engl. J. Med. 324: (9): 601-612 (1991).
22. Giraud MC, Calva JJ, et al., Patrones de susceptibilidad a 19 antimicrobianos de gérmenes aislados de hemocultivos en un hospital de referencia de la Ciudad de México. Rev. Invest. Clín. (Méx). 38: 7. (1986).
23. Goodman, G.A. et al. LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. 4a. ed. Panamericana (1982).
24. Grimont P.A.D. and F. Grimont. Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. J. Clin. Microbiol. 8: 73-83. (1978.)
25. Grimont P.A.D. and F. Grimont, et al., Taxonomy of the genus *Serratia*. J. Gen. Microbiol. 98: 39-66. (1977).
26. Grimont P.A.D., F. Grimont, S. LeMinor, et al. Compatible results obtained from biotyping and serotyping in *Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol. 10: 425-432. (1979).
27. Guiscafré G.H., García P.M., et al., Resistencia de enterobacterias y *Pseudomonas*. Recomendaciones terapéuticas. Rev. Med. IMSS 20:485-492 (1982).

28. Hancock R. Aminoglycoside uptake and mode of action with special reference to streptomycin and gentamicin. J. Antimicrob. Chemother. 8: 429-445 (1981).
29. Hardy B.A. Bacterial Plasmids. ASM ed 2nd editions. Geneve. (1986).
30. Harold C. N. The emergence of bacterial resistance and its influence on empiric therapy. Rew. Infect. Dis. 5 (5): S 9 (1983).
31. Harold C.N. Contribution of β -lactamases to bacterial resistance and mechanism to inhibit β -lactamases. Am. J. Med. 79: 2-12 (1985).
32. Jack M, Wilson MD, and Guiney DG. Failure of oral trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in acute leukemia. Isolation of resistant plasmids from strains of enterobacteriaceae causing bacteremia. New. Eng. J. Med. (1982).
33. Jacoby G., Archer G. New mechanism of bacterial resistance to antimicrobial agents. N. Engl. J. Med. 324: 601-612 (1991).
34. James M, Hughes and W.R. J. Epidemiology of nosocomial infections. Manual of Clin. Microbiol. 4th ed. ASM. 9:(99):275. (1987).
35. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg E.A. MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICO. 9a.ed El manual moderno. (1981).
36. Joseph F.J. Jr. and James A. Trivity. Plasmids as epidemiologic markers in nosocomial gramnegative bacilli: Experience at a university and review of the literature. Rew. Infect. Dis. 8 (5) : 693. (1986).

37. Joseph F.J. Jr, and W.F. Neill. Characteristics of *S. marcescens* containing a plasmid coding for gentamicin resistance in nosocomial infections. J. Infect. Dis. 143:(6): 810. (1981).
38. Kado C.I. and S.T. Liu. Rapid procedure for detections and isolation of large and small plasmids. J. Bact. p.p. 1365. (1981).
39. Kagan B.M. TRATAMIENTO CON ANTIMICROBIANOS. 3a.ed. Interamericana. (1984).
40. Lennette E.H. Balows A, Hausler Jr and Truant, J.P. editors. MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 3d. ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. (1985).
41. Levy S, Burkel and Wallace. Task force control infectious diseases. Rew. Infect. Dis. 9 supl. 9. (1982).
42. Lorian V. M.D. ANTIBIOTICS IN LABORATORY MEDICINE. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. (1981).
43. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin binding proteins and the mechanism of action of beta-lactamases resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 30: 1-5. (1986).
44. Medeiros AA, O'Brien TF, Resenberg EY, et al., Loss of OmpC porin in a strain of *S. typhimurium* causes and increased resistance to cephalosporins during therapy. J. Infect. Dis. 156: 751-757. (1987).
45. Medeiros AA. Beta-lactamases. Br. Med. Bull. 40: 18 (1984).

46. Montgomery J.Z. Epidemiology of *Klebsiella* and 9 hospital associated infections. Rev. Infect. Dis. 1: 736-753. (1979).
47. Murray B.E., Moellering R.C. Patterns and mechanisms of antibiotic resistance. Med. Clin. North Am. 62: 899-923. (1978).
48. National Comitee for Clinical Laboratories Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility test NCCLS. 4(16):369 (1984).
49. National Comitee for Clinical Laboratories Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test, for bacteria that grow aerobically. NCCLS 3(2): 33. (1983).
50. Pelczar, Reid, Chan. MICROBIOLOGIA. 2a.ed. Mc Graw Hill. (1977).
51. Ramírez J.H., Cuéllar C.A., et al., Infecciones por bacilos gramnegativos. Importancia de su estudio. Rev. Inst. Invest. Médicas. 4(1): 149-154 (1975).
52. Rangel F. Análisis epidemiológico, microbiológico y molecular de la resistencia por gramnegativos en las infecciones intrahospitalarias en un instituto de tercer nivel del sistema de salud mexicano. TESIS MCM. U.N.A.M. (1992).
53. Reller L. B. The serum bactericidal test. Rev. Infect. Dis. 8 (5): 803. (1986).
54. Richard P.N. Plasmids. N. Engl. J. Med. p.p. 77 (1985).
55. Richmonds M.H. β -lactam antibiotics and β -lactamases: two sides of a continuing story. Rev. Infect. Dis. 31: 30-36 (1979).

56. Robert L., Charnas and Rudolf L.T. Mechanism of inhibition of chromosomal β -lactamases by third generation cephalosporins. Rev. Infect. Dis. 10: 752-760 (1988).
57. Rubens C.E, W Edmund F. Jr, et al., Evolution of a plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents during a prolonged epidemic of nosocomial infections. J. Infect. Dis. 143 (2): 170. (1981).
58. Ruíz Palacios G, Ponce de León S, Sifuentes J, et al. Control de la resistencia de bacilos gramnegativos a aminoglucósidos. Rev. de Invest. Clin. (Méx.) 38: 1. (1986).
59. Sahm D, Ph. D. and Thornsberry C. Beta-lactam and aminoglucoside selection for in vitro susceptibility testing. Laboratory Magnament. 140: 33-39 (1984).
60. Sanders C.C., Sanders W.E. Jr. Clinical importance of inducible β -lactamases in gramnegative bacteria. Eur. J. Clin. Microbiol. 6:(4): 435-437 (1987).
61. Sanders C.C., Sanders W.E. Microbial resistance to newer generation β -lactam antibiotics: clinical and laboratory implications. J. Infect. Dis. 151: 399-406 (1985).
62. Shaberg D.R., Rubens C.E., et al. Evolution of antimicrobial resistance and nosocomial infection. Am. J. Med. 70: 445-448. (1981).
63. Sifuentes O.J, Ruíz Palacios G, Gröschel D. Analysis of epidemiology markers of nosocomial *S. marcescens* isolates with special reference to the Grimont biotyping system. J. Clin. Microbiol. 23: 230. (1976).

64. Sifuentes O.J, Gröschel D.H M. Modification of Grimont biotyping system for epidemiologic studies with nosocomial *S. marcescens* isolates. J. Clin. Microbiol. 25: 567-568. (1987).
65. Smith S.M., Digori J.T. Eng R.H.K. Epidemiology of *Klebsiella* antibiotic resistance and serotypes. J. Clin. Microbiol. 16: 868-873. (1982).
66. Stuart L.B. Microbial resistance to antibiotics an evolving and persistent problem. The Lancet. 6: 83. (1982).
67. Sykes R B, Mathew M. The beta-lactamases of gramnegative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 2: 115. (1976).
68. Tenover F.C. Minireview. Studies of antimicrobial resistance genes using DNA probes. Antimicrob. Agents Chemother. 29: (5):721. (1986).
69. Thomas F.O. Resistance of bacteria to antibacterial agents. Report of task force 2. Rew. Infect. Dis. 9: S244-S259 (1987).
70. Tipper D.J. Mode of action of β -lactam antibiotics. Rew. Infect. Dis. 1: 39-53 (1979).
71. Tompkins L.S, James J, et al,. Molecular analysis of R-factors from multiresistant nosocomial isolates. J. Infect. Dis. 141 (5): 625. (1980).
72. Vera M, Olexy et al,. Hospital isolates of *S. marcescens* transferring ampicilin, carbenicilin and gentamicin resistance to other gramnegative bacteria including *P. aeruginosa*. Microb. Agents and Chemother. 45 (1): 93. (1979).

73. Volkow P, Sifuentes O.J, et al., Outbreak of *S. marcescens* primary bacteremia related to the earthquakes in México city. Revista de Salud Pública. México. (1986).
74. Weinstein R.A., Nathan C, Gruens F.R. Endemic aminoglycoside resistance in gramnegative bacilli: epidemiology and mechanisms. J. Infect. Dis. 141: 338-345. (1980).
75. Whitecar J.P., Luna M, Bodey G.P. *Pseudomonas* bacteremia in Patients with malignant diseases. Am. J. Med. Sci. 260: 216-223. (1970).
76. Wilson M.I., Crichton P.B. Characterization of urinary isolates of *Escherichia coli* by typing: retrospective analysis. J. Clin. Pathol. 34: 424-428. (1981).
77. Yocum R.R., James R.R., et.al., The mechanism of action of penicillin. J. Biol. Chem. 255; 9: 3977-3986. (1980).